

NÚCLEO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE - NCBS

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE NOVOS ISOLADOS BACTERIANOS COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO

Amanda Lunardelli Martins¹
Rosália Hernandes Fernandes Vivan²
Fernando Pereira dos Santos³

RESUMO:

Uma nova alternativa para controle de pragas e insetos é a utilização de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis*. A atividade larvicida desta linhagem está relacionada com a produção de inclusão parasporal que é sintetizada durante a esporulação. Estas formam posteriormente toxinas citolítica a base de proteínas. A ação destas toxinas causa a paralisia do aparelho digestório. Diante de diversas vantagens apresentadas pelos bioinseticidas, vários trabalhos são desenvolvidos com o intuito de isolar novas linhagens bacterianas com potencial de controle biológico. Uma das técnicas mais utilizadas é a Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) que envolve a síntese enzimática in vitro de um segmento específico de DNA. Esta técnica permite estudos de diversidade de linhagens propiciando o isolamento de novos agentes biológicos com potencial entomopatogênico. A forma de teste in vivo da real atividade tóxica sobre o inseto é a metodologia de bioensaio, que consiste em expor os seres vivos alvo a uma determinada substância, sob condições controladas. O presente trabalho visa descrever as etapas de desenvolvimento de pesquisa de caracterização genético de microorganismo e fornecer informações seguras sobre o uso de *Bacillus Thuringiensis* no controle biológico.

PALAVRA-CHAVE: Controle de biológico, PCR, Bioensaio, *B. Thuringiensis*.

ABSTRACT:

A new alternative to control pests and insects is to use the base bioinsecticide *B. thuringiensis*. The larvicidal activity of this strain is related to the production of which is synthesized parasporal inclusion during sporulation. These subsequently form the basis for cytolytic toxin proteins. The action of these toxins cause paralysis of the digestive system. Given the many advantages presented by biopesticides, several studies have been conducted in order to isolate new bacterial strains with biocontrol potential. One of the most used techniques is the Polymerase Chain Reaction (PCR) involving the in vitro enzymatic synthesis of a specific segment of DNA. This technique allows for studies of diverse lineages providing the isolation of novel agents with potential biological entomopathogenic. The way to test the actual in vivo toxic activity on the insect is the bioassay method, which involves exposing the living target a particular substance under controlled conditions. This paper aims to describe the stages of research and genetic characterization of microorganisms provide reliable information on the use of *Bacillus thuringiensis* in biological control.

KEYWORD: Control of biological, PCR, bioassay, *B. Thuringiensis*.

INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2012) a dengue é a doença viral mais comum transmitida por mosquitos, que nos últimos anos tornou-se um importante problema de saúde pública internacional. Globalmente, 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde o vírus da dengue pode ser transmitido (WHO, 2012).

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) é responsável pela manutenção do ciclo virótico da febre dengue e febre amarela, em áreas urbanas. A falta de educação ambiental e consequente o aumento dos lixos jogados nas ruas ou acumulados nos domicílios têm favorecido a proliferação de criadouros desse mosquito nas regiões tropicais, e essas condições tem contribuído com o número de doenças causadas pelo agente etiológico veiculado por esses mosquitos (GUBLER, 1998).

De acordo com Kroeger *et al.* (1995), o conhecimento fragmentado sobre a doença, transmissão e prevenção, é um importante fator para falta de ações antrópicas na prevenção da doença. Pelo fato de não haver vacinas ou drogas para o tratamento

1 Aluna de Graduação em Farmácia do Centro Universitário Filadélfia – UniFil, bolsista PIBIC da Fundação Araucária: amanda_lunardellimartins@hotmail.com

2 Docente do Centro Universitário Filadélfia – UniFil, coordenadora: rosalia.vivan@unifil.br

3 Docente do Centro Universitário Filadélfia – UniFil, orientador: fernando.santos@unifil.br

da dengue, Batra *et al.* (2000) aponta o controle do vetor como a melhor escolha para o combate da doença.

O controle químico é o mais utilizado no mundo todo e alguns produtos merecem destaque como o Dicloro Difenil, Dicloroetano, Methoprene, Diflubenzuron e o mais utilizado, o organofosforado Temephos (CUNHA, 2001; LOZOVEI, 2001). Eles são muito eficientes contra estes insetos vetores, porém não são específicos, podendo atuar em insetos benéficos, assim como em outros animais, inclusive em humanos. Também podem facilitar o aparecimento de populações resistentes de insetos, diminuindo assim a eficiência dos produtos (VILARINHOS *et al.* 1998; WIRTH *et al.* 2007).

Uma das formas de controle deste vetor envolve o uso de controle biológico, que consiste em utilização de produtos cujo princípio ativo são microrganismos, que podem ser aplicados de maneira similar a um inseticida químico (MELO e AZEVEDO, 1998). Dentre as bactérias que possuem atividade entomopatogênica, o uso do *Bacillus thuringiensis* vem ganhando espaço anteriormente dedicado aos inseticidas químicos. É uma bactéria Gram-positiva que tem a capacidade de produzir, durante o processo de esporulação, uma inclusão protéica denominada δ -endotoxina (proteínas Cry). Diferentes variedades desta espécie produzem diferentes tipos de cristais que são altamente específicos para diferentes ordens de insetos (HABIB e ANDRADE, 1998).

Por ser um microrganismo promissor, diversos laboratórios em todo o mundo buscam novos isolados de *B. thuringiensis* que produzam diferentes toxinas ou que estejam mais adaptados às condições locais, para que tenham melhor eficácia em campo e possam ser usados no manejo da resistência de insetos (MONNERAT e BRAVO, 2000).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* está sendo estudada, principalmente através da utilização de técnicas que tem como base a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Estas técnicas apresentam aplicações práticas, tais como a previsão da especificidade tóxica de uma linhagem através da determinação do conteúdo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes pouco conhecidos e, direcionando os trabalhos de bioensaio (CAROZZI *et al.*, 1991; BRAVO *et al.*, 1998; IBARRA *et al.*, 2003; OTIENO-AYAYO *et al.*, 2008).

O presente trabalho visa descrever as etapas de desenvolvimento de pesquisa de caracterização genético de microrganismo e fornecer informações seguras sobre o uso de *Bacillus Thuringiensis* no controle biológico.

Bacillus Thuringiensis

Bacillus thuringiensis foi descrito em 1915 na Alemanha, isolado a partir de traça de farinha (*Anagasta kuehniella*). No entanto, a comercialização de produtos a base desta bactéria só se iniciou em 1938 na França, com o bioinseticida comercializado sob o nome de “Sporeine” (BRAR *et al.*, 2006; CAPALBO *et al.*, 2004; VIDAURRE, 1996). *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram positiva que ocorre naturalmente no solo, água, insetos mortos e ambientes onde se armazenam grãos.

O cristal protéico típico de *B. thuringiensis* é, em geral, produzido durante a esporulação e constitui o principal ingrediente ativo dos bioinseticidas à base dessa bactéria. Este cristal é tóxico para várias espécies de insetos, destacando-se no controle de Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Porém, há subespécies de *B. thuringiensis* que apresentam cristais tóxicos contra insetos das Ordens Hymenoptera, Hemiptera, Ortoptera, Phthraptera e também para alguns nematóides, protozoários e ácaros.

Os cristais de *B. thuringiensis* são formados principalmente por proteínas

denominadas Cry, também conhecidas como δ -endotoxinas, e por proteínas citolíticas (Cyt). A proteína Cry, principal constituinte deste cristal, e a Cyt que caracterizam a espécie, são codificadas por genes que geralmente se localizam em plasmídios e, com menor frequência, no cromossomo bacteriano (BRAVO *et al.*, 2007).

As delta endotoxinas são sintetizadas na forma de pró-toxinas que quando ingeridas pelo inseto são solubilizadas e convertidas proteoliticamente em fragmentos tóxicos de aproximadamente 650 aminoácidos. Esses fragmentos ligam-se especificamente, e com alta afinidade, os receptores protéicos na membrana das células epiteliais do intestino, criando poros na membrana celular. Essas lesões levam ao dilatamento e lise do epitélio intestinal, causando a morte do inseto (Gill *et al.* 1992, Visser *et al.* 1990, Li *et al.* 1991).

BIOENSAIO

Um dos parâmetros mais importantes no estudo com *B. thuringiensis* é o seu potencial tóxico ante o inseto-alvo. O bioensaio pode ser entendido como um teste onde seres vivos são expostos a uma determinada substância, sob condições controladas. No caso de *B. thuringiensis*, o bioensaio é feito com larvas de insetos alvos segundo protocolos da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MORAES, *et al.*, 2001; WHO, 2005).

Para *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, o teste é feito com larvas de dípteros dos gêneros *Aedes*. Nesse ensaio, larvas entre terceiro ou quarto instar são colocadas em diferentes recipientes, nos quais são aplicadas diferentes concentrações do produto a uma determinada temperatura. É realizado o teste de concentração letal para 50% (CL50) e 90% (CL90) das larvas por meio de uma regressão linear log-probit, a qual pode ser feita com o uso de programas de computador adequados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Muitos fatores podem influenciar um bioensaio, destacando-se a espécie de inseto, o instar, a densidade de larvas, qualidade da água e a temperatura, desse modo é crucial a padronização do teste. Estudos revelam que *A. aegypti* é uma das espécies mais sensíveis à *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, isto ocorre devido a fatores intrínsecos dessa espécie, tais como sua alta velocidade de filtração da água (JARIC'-PERKUSIC *et al.*, 2008; OTIENO-AYAYO *et al.*, 2008).

Técnica de PCR – Reação em cadeia da polimerase

A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que ligam-se a região alvo (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). Com a caracterização genética, é possível discriminar isolados de *B. thuringiensis* (FRUTOS *et al.*, 1994). São conhecidas várias aplicações da tecnologia do DNA recombinante no controle biológico de insetos, sendo que a maioria dos exemplos provém de bactérias, principalmente empregando *B. thuringiensis* e espécies correlatas (AZEVEDO, 1998).

A técnica de PCR permite comparar geneticamente, isolados pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (LIMA *et al.*, 2002;

PORCAR e JUARÉZ-PÉREZ, 2003), o que a torna uma ferramenta de trabalho indispensável. É uma forma de caracterizar isolados de *B. thuringiensis* e é amplamente utilizada na detecção de genes *cry* em novas linhagens de bactérias (VALICENTE *et al.*, 2000; VILAS BOAS e LEMOS, 2004) onde os “primers” podem ser desenhados a partir de regiões conservadas destes genes.

A técnica requer quantidades pequenas de DNA na ordem de picogramas, e permite uma rápida e simultânea caracterização de muitas amostras. Todavia, o procedimento normal de PCR não pré-determina exatamente a atividade inseticida do isolado, assim como outros fatores, como, por exemplo, o nível de expressão dos genes *cry* presentes que estão envolvidos no potencial inseticida de cada isolado (MARTINEZ *et al.*, 2005).

Produção de *Bacillus Thuringiensis*

Nas décadas de 1970 e 1980, com o isolamento de novas linhagens e a possibilidade da manipulação gênica, o interesse por *B. thuringiensis* aumentou bastante, principalmente no setor privado (CAPALBO *et al.*, 2004).

Em geral, os produtos à base de *B. thuringiensis* são compostos por uma mistura de cristais, esporos, poucas células vegetativas e ingredientes secundários da formulação (CAPALBO *et al.*, 2004).

A produção de *B. thuringiensis*, assim como de outros produtos microbianos, envolve as seguintes etapas: seleção da linhagem, estocagem, processo fermentativo, recuperação do princípio ativo (esporos e cristais), formulação do produto e análise da qualidade (MORAES *et al.*, 2001). Os principais critérios para seleção de uma subespécie bacteriana para produção de bioinseticidas são: espectro de ação, potência por unidade de volume da cultura, requerimentos nutricionais, facilidade de produção, estabilidade genética e facilidade de estocagem.

A forma mais comum de produção de *B. thuringiensis* é por fermentação submersa (líquida) descontínua, também conhecida como processo em batelada. Nesta fermentação, um recipiente contendo meio de cultura líquido é inoculado com o microrganismo, não havendo acréscimo ou retirada significativa do meio fermentado. Portanto, ocorre todo o desenvolvimento da cultura, sendo retirado o produto apenas no final do processo. Em geral, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* são formadas no fim da fermentação, quando as condições do meio se tornam desfavoráveis, sendo o processo em batelada satisfatório para tal produção (MORAES *et al.*, 2001).

Antes de ser comercializado, o produto formulado deve passar por testes de análise de qualidade que atestem principalmente sua potência tóxica. Para *B. thuringiensis*, a toxicidade é geralmente analisada por meio de bioensaio com o inseto-alvo (MORAES *et al.*, 2001).

Os produtos encontrados no mercado são de difícil acesso aos consumidores, quer pelo preço, pela falta de informação ou devido às condições legais estabelecidas pelo país. O desenvolvimento de produções locais pode ser uma solução para tal situação. Neste caso, a produção pode ser feita em um volume menor, escala piloto, utilizando-se materiais alternativos e abundantes na região a ser atendida (SALAMA e MARGALIT, 1993).

Considerações Finais

São necessários investimentos na prospecção de isolamento de novas linhagens de patógenos que possam ser utilizados, diretamente ou substâncias por eles sintetizadas, na produção de inseticidas biológicos, corresponde ao passo inicial para o desenvolvimento

de novos métodos e ou técnicas na formulação de produtos comerciais. Pode também, estes Bancos de isolados bacterianos servirem de fonte de genes para transferência em diversos microrganismos aquáticos, que possam vir a ser empregado no controle biológico de insetos.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.239-268.
- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D. & VALÉRO, J.R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, Kansas, v.41, n.2, p.323-342, fev. 2006.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p.4965-4972, dez. 1998.
- BATRA, C.P.; MITTAL, P.K.; ADAK, T. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. **Journal of American Mosquito Control Association**. Mount Laurel, v.16, n.4, p.321-323, dez. 2000.
- CAPALBO, D. M. F.; BOAS, G.T.V.; ARANTES, O.N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (ed.). **Biotecnologia e meio ambiente**. 1ªed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p.309-350.
- CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p. 3057-3061, nov. 1991.
- CUNHA, M.C.I. Culicídeos. In MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, p. 31-47, 2001.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargen**, Brasília, 3.ed, 1998., 222p.
- FRUTOS, R.; FEDERICI, B.A.; REVET, B.; BERGOIN, M. Taxonomic studies of *Rickettsiella*, *Rickettsia*, and *Chlamydia* using genomic DNA. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.63, n.3, p.294-300, mai. 1994.
- GILL, S.S.; E. A. COWLES & P.V. PIETRANTONIO. The mode of action of *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 615-636. 1992
- GLUBER, D.L. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, p.480-496, jul. 1998
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (coord) **Controle microbiano de insetos**. 1 ed. Piracicaba: Manole, 1998. p.383-446.

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

JARIC' -PERKUSIC, D.; HACKENBERGER, B.K.; STEPIC, S. & MERDIC, E. Influence of Molting on Efficacy of Two Functionally Different Larvicides: *Bti* and *Temephos*. **Journal of Economic Entomology**, Califórnia, v.101, n.4, p. 1204-1210, ago. 2008.

KROEGER, A.; DEHLINGER, U.; BURKHARDT, G. ATEHORTUA, W.; ANAYA, H.; BECKER, N. Community based dengue control in Columbia: people's knowledge and practice and the potential contribution of the biological larvicide Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*). **Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.46, n.4, p.241-246, dez. 1995.

LI, M.S.; JE, Y.H.; LEE, I.H.; CHANG, J.H.; ROH, J.Y.; KIM, H.S.; OH, H.W.; BOO, K.S. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki* containing a new δ – endotoxin gene. **Current Microbiology**, New York, v.45, n.4, p. 299-302, set. 2002.

LIMA, A.S.G.; GUIDELLI, A.M.; ABREU, I.L.; LEMOS, M.V.F. Identification of new isolates de *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxins electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p.225-229, mai. 2002.

16

LOZOVEI, A.C. Culicídeos (mosquitos). In – MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**, 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p.59-103.

MARTÍNEZ, C.; PORCAR, M.; LÓPEZ, A.; EXSUDERO, I.R.; CABALLERO, P. Characterization of the *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Holanda, v.11, n.1, p.71-77, jan. 2004.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA, 1998. 264p.

MONNERAT, R.S. & 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-CNPMA, 3ed., 2000. p. 163-200.

MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. & ARRUDA, R.O.M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BOZARNI, W. & SCHMIDELL, W. (org.) **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Ed. 3. Porto Alegre: Edgar Blücher, 2001. p.245-265

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

PORCAR, M. & JUÁREZ-PÉREZ. PCR-based identification of *B. thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology**, Europa, v.26, n.5, p.419-132, jan. 2003.

SALAMA, H.S.; MARGALIT, J. The use of *Bacillus thuringiensis israelensis* in development countries. In ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J. & HIGGS, S. (eds) *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Wiley, 1993. p.237-254.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, M.J.V.; FIGUEIREDO, J.E.F.; PAIVA, E. PCR. Identification of *cryI* genes in *Bacillus thuringiensis* strains that are efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v.29, n.1, p. 147-153, mar. 2000.

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

Visser, B, E. Munsterman, A. Stoker & W.G. Dirkse. 1990. A Novel *Bacillus thuringiensis* Gene Encoding a *Spodoptera exigua* - Specific Crystal Protein. *J. Bacteriol.* 172: 6783-6788.

VIDAURRE, T. J. C. Estudos de otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento de nova linhagem de "*Bacillus thuringiensis*". Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1996, 136p.

VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; ANDRADE, C.F.S.; ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 1 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 447-480

WIRTH, M.C.; YANG, Y.; WALTON, W.E.; FEDERICI, B.A.; BERRY, C. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, n.73, p.6066-6071, out. 2007

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. 13ed. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005. 2005, 39p.
WORLD HEALTH ORGANIZATION . 2012. Impact of dengue, 1: 1. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/> acesso em 05/09/2012.