



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
PRÓ REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE UMA LINHAGEM DE *Bacillus thuringiensis* ISOLADO DE AMBIENTE AMAZÔNICO EM CONDIÇÕES DE SEMICAMPO SOBRE POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* E EM ORGANISMOS NÃO-ALVO

**MANAUS - AM
2024**

IZANE MARIA DE SOUZA MATOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE UMA LINHAGEM DE *Bacillus thuringiensis* ISOLADO DE AMBIENTE AMAZÔNICO EM CONDIÇÕES DE SEMICAMPO SOBRE POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* E EM ORGANISMOS NÃO-ALVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação Multi-institucional em Biotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração Biotecnologia para Saúde.

Orientadora: Dra. Rosemary Aparecida Roque - INPA

Coorientador: Dr. Ricardo de Melo Katak - ILDM/FIOCRUZ-AM

**MANAUS-AM
2024**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M433a Matos , Izane Maria de Souza
Avaliação da atividade larvicida de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* isolado de ambiente amazônico em condições de semicampo sobre populações de *Aedes aegypti* e em organismos não-alvo / Izane Maria de Souza Matos . 2024
40 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rosemary Aparecida Roque
Coorientador: Ricardo de Melo Katak
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bactérias amazônicas. 2. Potencial bioinseticida. 3. Arboviroses. 4. Controle biológico. I. Roque, Rosemary Aparecida. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar durante o percurso e ter concedido fé e esperança na realização dessa etapa na minha vida, que durante essa jornada de desafios foi meu baluarte. “Pois tudo posso naquele que me fortalece”.

A minha saudosa mãe *in memoriam* Maria da Conceição meu exemplo de persistência, coragem e amor, aos meus irmãos Márcio e Madson por todo apoio incondicional.

A minha família pelo incentivo, que mesmo de longe, apesar da minha ausência, estavam torcendo por mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFAM pela realização de um sonho.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro.

A minha orientadora Dra. Rosemary Aparecida Roque pela oportunidade e realização desse trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Ricardo Melo Katak pelos aprendizados, conhecimentos, pela sua amizade e confiança de sempre.

Aos meus colegas e amigos: Dr. Elerson, Veranilce, Juan, Laura, Deidre, Jakeline, Ana, Dra. Yamille, Dra. Rejane e a todos colaboradores do Laboratório de Malária e Dengue (Inpa) que conquistei, minha eterna gratidão, sem a ajuda de vocês nada seria possível.

RESUMO

Aedes aegypti é o principal vetor dos arbovírus causadores de doenças como dengue, zika, chikungunya, febre amarela urbana, representando uma grande preocupação para a Saúde Pública. Diversas medidas são adotadas para mitigar os impactos causados por esse mosquito, incluindo o controle mecânico, químico e biológico. O *Bacillus thuringiensis* (Bti) é um agente de controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas, amplamente utilizado em programas de controle biológico ao redor do mundo. No entanto, fatores ambientais como radiação ultravioleta, pH, salinidade e temperatura podem afetar sua persistência, diminuindo sua plausibilidade biológica na natureza. Neste contexto, encontrar novas bactérias do bioma amazônico com potencial bioinseticida é crucial para implementação de novos agentes entomopatogênicos na região. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial larvicida de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* isolada de ambiente amazônico em condições de semicampo e sua toxicidade em organismo não-alvo. O presente estudo foi realizado no Laboratório de Controle biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (LCBBMD) do Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA). Foram utilizadas as linhagens GD02.13-*B. thuringiensis* e AM65-52 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) para avaliar seus efeitos em laboratório e semicampo. As análises de mortalidade e fatores químicos e físico, como pH e temperatura, foram realizadas semanalmente durante cinquenta dias. A persistência das bactérias foi determinada pela contagem de colônias viáveis em comparação com a linhagem padrão. As linhagens tóxicas para larvas de *Aedes aegypti* também foram testadas em girinos do gênero *Scinax*, organismo não alvo. Os resultados mostraram que os componentes celulares da linhagem GD02.13 foram mais eficientes que os da cepa padrão, tanto em condições de laboratório quando de semicampo. A exposição dos girinos aos componentes celulares das linhagens GD02.13 e AM65-52 não resultou em mortalidade até cinco dias de avaliação. Portanto, o desenvolvimento de larvicidas bacterianos para o controle biológico pode ser significativo e econômico, com atividade direcionada a organismos alvos, além de serem promissores como medidas de controle vetorial do mosquito *A. aegypti*.

Palavras-chaves: Bactérias amazônicas, potencial bioinseticida, arboviroses, controle biológico.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main vector of arboviruses that cause diseases such as dengue, zika, chikungunya, and urban yellow fever, representing a major concern for public health. Several measures are adopted to mitigate the impacts caused by this mosquito, including mechanical, chemical, and biological control. *Bacillus thuringiensis* (Bti) is an insect vector control agent for diseases and agricultural pests, widely used in biological control programs around the world. However, environmental factors such as ultraviolet radiation, pH, salinity, and temperature can affect its persistence, decreasing its biological plausibility in nature. In this context, finding new bacteria from the Amazon biome with bioinsecticidal potential is crucial for the implementation of new entomopathogenic agents in the region. The objective of this study was to evaluate the larvicidal potential of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated from the Amazon environment under semi-field conditions and its toxicity in non-target organisms. This study was carried out at the Laboratory of Biological Control and Biotechnology of Malaria and Dengue (LCBBMD) of the Amazon Research Institute (INPA). The strains GD02.13-*B. thuringiensis* and AM65-52 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) were used to evaluate their effects in the laboratory and semi-field. Mortality and chemical and physical factors, such as pH and temperature, were analyzed weekly for fifty days. Bacterial persistence was determined by counting viable colonies in comparison with the standard strain. The strains toxic to *Aedes aegypti* larvae were also tested on tadpoles of the genus *Scinax*, a non-target organism. The results showed that the cellular components of the GD02.13 strain were more efficient than those of the standard strain, both in laboratory and semi-field conditions. Exposure of tadpoles to the cellular components of the GD02.13 and AM65-52 strains did not result in mortality up to five days of evaluation. Therefore, the development of bacterial larvicides for biological control could be significant and cost-effective, with activity directed at target organisms, in addition to being promising as vector control measures for the mosquito *A. aegypti*.

Keywords: Amazonian bacteria, bioinsecticide potential, arboviruses, biological control.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 <i>Aedes aegypti</i> : Aspectos gerais.....	9
2.2 As principais arboviroses	11
2.3 Controle vetorial.....	13
2.4 Controle biológico.....	14
2.5 Fatores que afetam as formulações dos produtos à base de microrganismos	14
2.6 Ecotoxicidade e persistência	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Geral	18
3.2 Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Local de Estudo.....	19
4.2 Reativação e purificação de bactérias	19
4.3 Coloração de Gram	19
4.4 Pré inóculo e condições de cultivo	20
4.4.1 Cultivo de linhagem de <i>Bacillus</i> spp. para obtenção de biomassa bacteriana.....	20
4.5 Ensaio biológico.....	20
4.5.1 Obtenção e manutenção das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	20
4.5.2 Bioensaios <i>in vivo</i> em condições de laboratório com os componentes celulares.....	21
4.5.3 Diluição das amostras para os ensaios larvicidas de semicampo	21
4.5.4 Teste semicampo com larvas de <i>Aedes aegypti</i>	22
4.6 Avaliação da persistência dos <i>Bacillus</i>	23
Figura 4: Procedimento de isolamento, caracterização morfológica e atividade larvicida das bactérias obtidas dos experimentos de semicampo	24
4.6.1 Bioensaios <i>in vivo</i> em condições de laboratório com as colônias isoladas	24
4.7 Avaliação da toxicidade em <i>Scinax sp.</i> , organismo não alvo.	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Atividade larvicida <i>in vivo</i> em condições de laboratório.....	26
5.2 Atividade larvicida em condições de semicampo	28
5.3 Avaliação da persistência de bacilo	29
5.4 Perfil fenotípico dos bacilos	31
5.5 Atividade larvicida das colônias viáveis	32
5.6 Avaliação da persistência das linhagens de bacilos	35
5.7 Testes em girinos (<i>Scinax sp</i>) organismos não alvo.....	38
6. CONCLUSÕES	40
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	9
Figura 2: Técnica de coloração de gram	20
Figura 3: Montagem dos bioensaios em condições de semicampo.	23
Figura 4: Procedimento de isolamento, caracterização morfológica e atividade larvívora das bactérias obtidas dos experimentos de semicampo	24
Figura 5: Experimento com girinos, organismos não-alvo	26
Figura 6: Percentual de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> obtida do cultivo da linhagem GD02.13 e Bti AM65-52	27
Figura 7: Porcentagem média de colônias obtidas do isolamento da sétima semana do tratamento sob a condição A: presença de Luz	30
Figura 8: Porcentagem média de colônias viáveis obtidas do isolamento da linhagem GD02.13 durante as 7 semanas dos tratamentos B.....	31
Figura: 9 : A e B. Perfil morfológico e micromorfológico das colônias da linhagem GD02.13 e e Bti AM65-52 na concentração 2.000 Bt UTI/mg.....	32
Figura 10: Porcentagem das média de colônias viáveis obtidas do isolamento da linhagem GD02.13 na diluição de 3.000 Bt UTI/mL.....	36
Figura 11: Médias da porcentagem de colônias viáveis obtidas do isolamento da linhagem padrão AM65-52 na diluição de 3.000 Bt UTI/mL	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média da mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas aos componentes celulares da linhagem GD02.13 em condições de semicampo	28
Tabela 2: Média da mortalidade de larvas expostas aos cultivos das colônias obtidas do isolamento dos tratamentos A e B na concentração de 2.000 Bt UTI/mg.	33
Tabela 3: Média da mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> de 3º estágio expostas aos componentes celulares da linhagem GD02.13 e Bt AM65-52 em condições de semicampo na concentração 3.000 Bt UTI/mg.	34

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por arbovírus representam uma ameaça significativa à saúde das populações em áreas tropicais e subtropicais do planeta (TOLLE, 2009; WHO,2022). Nas últimas décadas, arboviroses de amplo impacto na saúde pública, como dengue, chikungunya, Zika e febre amarela urbana, têm recebido atenção em relação as medidas de controle, especialmente devido ao agravamento dessas enfermidades (BENELLI, 2016; HUANG et al., 2019; SOUZA- NETO et al., 2019). A distribuição dessas infecções virais tem se expandindo, resultando em epidemias em diversas partes do mundo. Diante desses cenário, torna-se imperativa a implementação de novas estratégias para mitigar os impactos causados pelos insetos vetores de doenças (ACHEE et al., 2019, WHO, 2024).

Apesar da disponibilidade de duas vacinas aprovadas pela ANVISA (Dengvaxia[®] - SANOFI e Qdenga[®] - Takeda), a luta contra a dengue ainda enfrenta diversas limitações. Vários métodos são utilizados no controle vetorial, incluindo o controle mecânico, que consiste na eliminação ou remoção de criadouros, e o controle químico, que utiliza inseticidas sintéticos (ZARA et al., 2016). No entanto, esses produtos químicos são tóxicos ao meio ambiente e, além disso, o uso prolongado pode favorecer a seleção das populações resistentes desses mosquitos (HAMID et al.,2018; WULIANDARI et al., 2020).

Diante disso, outras estratégias estão sendo implementadas, como o controle biológico, que utiliza microrganismos entomopatogênicos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Esse método é considerado ecológico e visa amenizar os impactos negativos provocados pelos inseticidas químicos e sintéticos (MOYES et al., 2017; LAZARTE et al., 2018; HAMID et al., 2018).

Bactérias do gênero *Bacillus* abrigam diversas espécies com potencial para o controle de insetos vetores de patógenos e pragas agrícolas (DAHAMA et al., 2020; FALQUETO et al., 2021). Um exemplo notável é a bactéria *Bacillus thuringiensis*, que, devido à sua grande variabilidade genética, tem se destacado como uma importante ferramenta em programas de controle biológico em todo mundo. Essas bactérias produzem uma variedade de moléculas inseticidas como proteínas Cry, Cyt, Vip e outros metabólitos com eficácia no controle de mosquitos dos gênero *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* spp. (CRICKMORE et al., 2021).

Os agentes bacterianos baseados em *B. thuringiensis israelensis* e *Lysinibacillus sphaericus* são considerados larvicidas microbianos eficazes contra diversos gêneros de mosquitos, como *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* spp., sendo amplamente utilizados em programas de controle biológico ao redor do mundo (DERUA et al., 2019; BARBIERE et al., 2021). Esses

agentes têm como alvo as formas imaturas (larvas) dos insetos que habitam ambientes aquáticos, contribuindo para a redução da densidade vetorial e diminuindo os casos de transmissão de arbovírus. Além disso, os produtos à base desses microrganismos podem ser utilizados individualmente ou em combinações para controlar as populações desses mosquitos (MUNGA et al., 2013; BARBIERE et al., 2021).

No entanto, as larvas de mosquitos podem reagir de forma variável aos larvicidas bacterianos (DERUA et al., 2019), assim como a muitos outros inseticidas, o que pode influenciar os resultados dos programas que utilizam larvicidas como método de controle. O sucesso desses programas requer um planejamento e uma gestão cuidadosa dos diferentes aspectos envolvidos (FILLINGER et al., 2011;WHO,2013).

As principais considerações incluem a escolha do produto larvicida, sua eficácia e a residualidade do efeito, além de como esses fatores são impactados pelos diferentes tipos de habitat e condições ambientais. A eficácia dos biolarvicidas pode ser afetada por diversos fatores, como a exposição à luz solar, que pode reduzir a persistência dos biolarvicidas em habitats aquáticos, tendo potencialmente um efeito adverso nos programas larvicidas (ZOGO et al., 2019).

No entanto, é necessária a busca por novos agentes entomopatogênicos e moléculas que sejam eficazes, ecologicamente corretas e seguras para o ser humano e para o meio ambiente (DAROS et al., 2009; KATAK et al., 2023). Para o desenvolvimento de produtos de origem microbiana, é fundamental a realização de diversas análises para avaliar sua eficácia em relação ao inseto alvo e aos não-alvos ao longo do período de aplicação durante os testes, bem como para determinar a dose letal e a concentração crítica de ecotoxicidade (BOTELHO, 2010).

Os fatores ambientais representam um dos maiores desafios para produtos à base de *B. thuringiensis*, devido às variações climáticas, umidade, temperatura, pH, radiação solar, entre outros. Portanto, é essencial realizar um estudo de viabilidade e persistência antes de aplicar inoculantes microbianos nos testes, a fim fornecer novas ferramentas que ajudem a mitigar os impactos causados por insetos vetores de patógenos (BOTELHO, 2010; DERUA et al., 2019; VIANA et al., 2020).

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar, em condições de semicampo, o potencial larvicida da linhagem GD02.13 de *B. thuringiensis israelensis*, isolada de ambiente amazônico, assim como sua toxicidade em girinos, que são organismos não-alvo. A pesquisa busca entender a eficácia dessa linhagem específica no controle de larvas de mosquitos, contribuindo para o desenvolvimento e manejo sustentável e minimamente impactantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aedes aegypti*: Aspectos gerais

O mosquito *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) é um inseto pertencente à classe Insecta, ordem Diptera e Família Culicidae, sendo o vetor de diferentes arbovírus, como o Dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febre amarela urbana (YFV) (FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; ARAGÃO et al., 2018; SOUZA-NETO et al., 2019).

O *A. aegypti* apresenta características que o diferenciam de outros mosquitos, como a presença de listras brancas no tórax em formato de lira musical e manchas esbranquiçadas nas pernas (FORATTINI, 2002; WRBU, 2022). Esses insetos vetores adaptam-se facilmente a áreas urbanizadas devido aos seus hábitos domésticos, o que favorece sua proliferação nesses ambientes (CARVALHO & MOREIRA, 2017; XIA et al., 2021).

O ciclo de vida desse inseto é do tipo holometábolo (metamorfose completa), composto por um ciclo aquático que inclui o ovo e quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), além da fase pupal e do ciclo terrestre do mosquito adulto (ZETTEL & KAUFMAN, 2009; TORRES et al., 2022). (Figura 01).

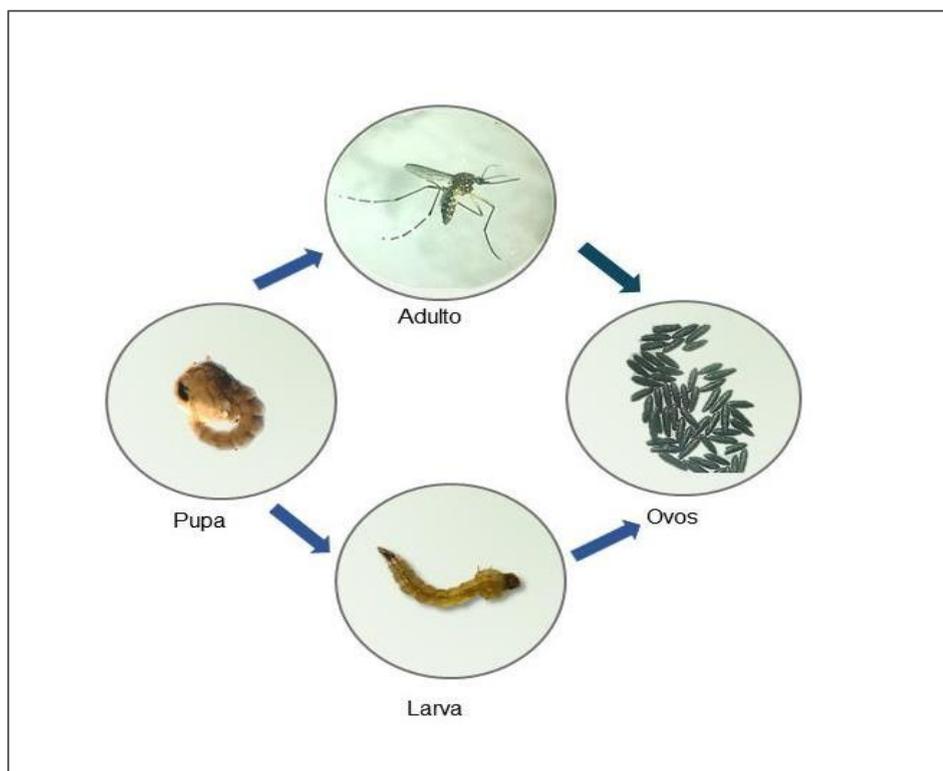


Figura 1: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*
Fonte: Laboratório de Malária e Dengue, 2024

A duração dessas fases depende de alguns fatores ambientais como: temperatura, demanda de alimento e a quantidade de larvas no recipiente (BESERRA & FERNANDES, 2009; GARZÓN et al., 2020; TORRES et al., 2022). O macho e a fêmea se alimentam de néctar, mas a fêmea precisa fazer a hematofagia, após o acasalamento, para amadurecimento dos ovos (CONSOLI & LOURENZO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATINI, 2002; CDC, 2022).

Os ovos do *A. aegypti*, apresentam a forma elíptica ou oval, no momento da oviposição apresentam coloração de cor pálida e, após algumas horas vão adquirindo coloração negra e tonalidade brilhante devido ao contato com o oxigênio. Os ovos são resistentes à dessecação, isso faz com que permaneçam por um longo período sem eclodir, são colocados em ambientes naturais ou artificiais em superfícies úmidas, logo acima da linha d'água (FUNASA, 2001; WRBU, 2022). As condições de umidade e temperatura são essenciais para o desenvolvimento do embrião do mosquito. A fase embrionária do *A. aegypti* dura de dois ou três dias secando ao ar livre, pois precisam ficar em condições ideais para eclodirem (SILVA e SILVA, 1999).

Os ovos do *A. aegypti* é a forma mais resistente e importante do ciclo biológico dos culicídeos, pois permite uma vasta sobrevivência, isso devido à resistência que possuem diante de grandes adversidades climáticas (SILVA & SILVA, 1999). O repasto sanguíneo das fêmeas estão relacionados ao amadurecimento de seus ovos, pois precisam das proteínas encontradas no sangue para maturação dos ovos (CONSOLI et al., 1982). As fêmeas de *A. aegypti* são altamente antropofílicas, mesmo quando outros animais como mamíferos e aves se encontram disponíveis (WRBU, 2022).

As larvas dos mosquitos *A. aegypti* são aquáticas, têm aspecto vermiforme e coloração que varia entre o esbranquiçado e esverdeado, é a fase que apresenta maior atividade funcional na alimentação e crescimento. Seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome, sendo que os dois primeiros são mais globosos, enquanto seu abdome apresenta aparência semicilíndrica. A larva apresenta um aparelho bucal mastigador, é desprovida de apêndices locomotores e não se pode definir facilmente o sexo do mosquito (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

As pupas dos mosquitos *A. aegypti* têm forma de vírgula, durante essa fase não se alimentam, movimentam-se bastante quando incomodadas, mas estão quase sempre parada sem contato com a superfície da água, onde realizam as trocas gasosas. Seu corpo, inicialmente tem a mesma cor das larvas recém-transformadas, próximo ao momento da emergência do adulto apresentam coloração escura. Após esta fase ocorre à metamorfose do mosquito que passa da fase pupal e se transforma em mosquito adulto, na qual por sua vez se alimenta por punção, tem asas, pernas, genitálias internas e externas completamente formadas (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O corpo do mosquito *A. aegypti* adulto é dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça encontram-se os principais órgãos do sentido como: os olhos e as antenas. Os palpos possuem escamas brancas apicais, probóscide com escamas escuras, clipeo com mancha de escamas pálidas, pedicelo com escamas pálidas nas superfícies laterais. No tórax estão localizados os apêndices especializados na locomoção, isto é, as pernas e as asas. No abdome está localizada a maior parte dos órgãos internos, dos aparelhos reprodutor, digestivo e excretor. Seu exoesqueleto é formado principalmente por quitina (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; WRBU, 2022).

Essa espécie de mosquito é comum em áreas urbanas nos trópicos e subtropicais, sendo altamente adaptada a viver em estreita associação com humanos, alimentando-se preferencialmente de sangue de hospedeiros, colocando seus ovos em recipientes localizados no interior e ao redor de habitações humanas (OMS, 2020; WULIANDARI et al., 2020).

2.2 As principais arboviroses

As arboviroses são doenças causadas por vírus, que são veiculadas por artrópodes vetores de doenças como o mosquito *A. aegypti*. Esses patógenos ocasionam grandes agravos à saúde humana (GUBLER et al., 2001; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; ARAGÃO et al., 2018, OMS, 2020). A dengue é transmitida pela picada da fêmea de *A. aegypti* infectada. Quatro sorotipos circulam no Brasil: (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), sendo que já foi detectado o quinto sorotipo (DENV-5) na Malásia, onde até o primeiro momento ocorreu apenas em primatas (GOULD e SOLOMON, 2008; ROCHA & TAUIL, 2009; VASILAKIS, 2013). Estima-se que 95 e 114 milhões de infecções por dengue ocorram globalmente por ano, com 32 a 66 milhões de casos febris e quatro milhões de infecções que requerem hospitalização (CATTARINO et al., 2020; WHO, 2023). Além da dengue, o *A. aegypti* pode transmitir os arbovírus causadores da Febre Amarela Urbana (YFV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), este último reemergente no Brasil (GUBLER, 1998; ZARA et al., 2016). O mosquito vetor encontra-se disseminado, por todo o território Nacional, fazendo-se necessário trilhar novas abordagens, nesta área epidemiológica para avançar nas pesquisas no combate a essas infecções virais (CAVALCANTE et al., 2020; ARAÚJO, 2021; WHO, 2023).

O Zika foi identificado pela primeira vez no continente Africano, em 1947, após detecção em macacos sentinelas para monitoramento da febre amarela, na floresta Zika, em Uganda. Classificado como um arbovírus da família *Flaviridae* é transmitido principalmente

pela picada da fêmea do mosquito *A. aegypti* (GOIS et al., 2021).

A disseminação também pode ocorrer por meio de um paciente infectado para outras pessoas saudáveis, por meio da transmissão vertical, transfusões de sangue e relações sexuais (FREITAS et al., 2020). Em sua maioria, os infectados pelo Zika vírus permanecem assintomáticos ou apresentam sintomas leves como dor de cabeça, febre baixa, dores leves nas articulações, manchas vermelhas na pele, coceira e vermelhidão nos olhos. Contudo, a Zika também está associada a manifestações neurológicas em crianças e adultos, a exemplo de complicações oftálmicas, como anormalidades do nervo óptico e da retina, síndrome de Guillain-Barré e déficit cognitivo (GOIS et al., 2021), assim como está ligado às malformações congênitas, como a microcefalia, grave consequência da Síndrome Congênita do Zika (SIDDQUE et al., 2019; BRADY et al., 2019; ANTONIOU et al., 2020).

No Brasil, o vírus foi identificado pela primeira vez em abril de 2015. No mesmo período, houve alta no padrão de ocorrência de microcefalia no país. Na época, o evento foi considerado uma Emergência de Saúde Pública Nacional e posteriormente Internacional. Em seguida, foi constatado que os recorrentes casos de microcefalia, que também cursam com outras anomalias cerebrais e alterações neurológicas, estavam diretamente relacionados à infecção pelo Zika no período gestacional (SILVA et al., 2021).

A febre chikungunya foi registrada pela primeira vez em 1953, quando o vírus foi isolado durante uma epidemia da doença na Tanzânia. A palavra chikungunya, traduzida do swahili, significa “aqueles que se dobram” em referência à postura que os pacientes apresentaram durante a fase aguda da doença. Trata-se de uma doença viral veiculada pelos mosquitos *A. aegypti* em ambientes urbanos e *Aedes albopictus* em ambientes rurais ou selvagens. O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus* de genoma RNA (AZEVEDO et al., 2015). Em relação à fase crônica, se estende por anos, o vírus Chikungunya representa uma problemática para a Saúde Pública para países de clima tropical como o Brasil, devido à grande dispersão dos seus vetores, *A. aegypti* e *A. albopictus* em suas regiões (CAMPBELL et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No início dos anos 2000, o surto de chikungunya foi relatado em países da África, Ásia e Europa. Em meados de 2013, surgiu nas Américas, onde no primeiro ano, mais de um milhão de novos casos foram relatados (JONES et al., 2020). Desde então, o vírus tem sido responsável por grandes surtos e epidemias sobre a população resultando em mortes atribuídas por essa doença. No Brasil, o primeiro registro da presença do vírus ocorreu em 2014 nos estados da Bahia e do Amapá, que rapidamente se espalhou para os demais estados do país, aumentando de forma considerável os casos suspeitos em um curto período de tempo, mas bem menor

quando comparado aos demais países, especialmente da América Central e Caribe (SILVA et al., 2018). O CHIKV é caracterizado clinicamente por febre com dores articulares intensas, afeta principalmente as articulações periféricas dos pés, mãos, dedos, tornozelos, joelhos e punhos, são os primeiros sintomas que ocorrem na fase aguda e pode persistir por semanas.

Dessa forma, o vírus apresenta um grave problema à Saúde Pública nos países de clima tropical pelas condições favoráveis ao desenvolvimento do mosquito vetor da doença. Com isso, a melhor forma de prevenção destas arboviroses ainda é o combate ao mosquito vetor, mantendo a limpeza do ambiente, eliminando os possíveis criadouros, assim como o uso de repelentes e inseticidas durante os surtos da doença (WILSON et al., 2020).

2.3 Controle vetorial

Apesar da disponibilidade das vacinas (Dengvaxia[®] - SANOFI e Qdenga[®] - Takeda) aprovadas pela ANVISA, comercializadas e disponibilizadas para a prevenção da dengue, o controle vetorial, ainda é um dos métodos mais utilizados para reduzir os impactos na Saúde humana, principalmente na prevenção dos quatro sorotipos da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), Zika e chikungunya, no Brasil e em outros países (HAMID et al., 2018; SAMISTA et al., 2021; BRASIL, 2023).

O controle vetorial, ainda é considerado a principal estratégia para prevenir e reduzir a transmissão dos arbovirus transmitidas pelo vetor. No entanto, o programa nacional de controle enfatiza o papel do envolvimento da comunidade na redução de possíveis criadouros de mosquitos por meio de campanhas socioeducativas, ou seja, cobrindo e limpando possíveis pontos de reprodução e eliminando recipientes contaminados (KUSRIASTUTI, 2005). Com isso é possível reduzir o foco trabalhando juntos no manejo ao vetor.

Além do controle vetorial outros métodos como o controle mecânico, químico, biológico e integrado, são utilizados no combate à doença e são estratégias usadas como forma de diminuir esse problema de Saúde Pública que afeta vários continentes. Os inseticidas químicos causam efeitos instantâneos, porém, pode ocasionar a seleção de populações de mosquitos resistentes aos produtos, ocasionando prejuízos econômico, ambiental e preocupação na Saúde Pública (TADEI et al., 1998; TADEI, 2017; MOYES et al., 2017).

O controle dos vetores são ferramentas relevantes para combater o mosquito vetores e não pode depender de uma única metodologia de ação contra esses insetos-alvos. Ao contrário, deve-se dispor de várias alternativas adequadas à realidade local, que permita sua execução de forma integrada e seletiva (OPS, 1995; ROSE, 2001; QUIROZ et al., 2007).

2.4 Controle biológico

O controle biológico vem sendo utilizado como proposta promissora depois do uso prolongado de inseticidas sintéticos. É um método seguro e eficaz por utilizar organismos provenientes da natureza no combate a esses mosquitos vetores de doenças. Como todos os organismos, os insetos são suscetíveis à infecção por microrganismos patogênicos. Os inseticidas biológicos estão, portanto, se tornando componentes-chave das estratégias de manejo integrado desses vetores. As espécies de *B. thuringiensis* (Bt) têm sido utilizadas em diversos programas de controle biológico no mundo (CRICKMORE, 2006; DERUA et al., 2019). Bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus* têm sido usadas por décadas, principalmente contra os mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (ROH et al., 2007; ROSAS-GARCIA, 2009; JOHNSON et al., 2020; ORTIZ e SANSINENE et al., 2021).

A bactéria *B. thuringiensis*, tem sido estudada por suas propriedades inseticidas como agentes entomopatogênicos para o controle microbiano de insetos vetores de doenças (SANCHIS et al., 2011). Várias espécies de *B. thuringiensis* são utilizadas no controle de insetos, pois são intensamente específicos para diferentes organismos-alvos e são inofensivos para espécies não-alvos, ao meio ambiente e ao homem (CRICKMORE et al., 1998; MOYES et al., 2017). Esta espécie de bactéria produz um corpo de inclusão parasporal composto principalmente pelas proteínas inseticidas Cry, Cyt e Vip que são codificadas principalmente em mega plasmídeos. Esses tipos de inclusões ou cristais devem ser ingeridos por um inseto suscetível e, após alguns processos bioquímicos, irá interferir no equilíbrio osmótico celular e a integridade do intestino médio, resultando em paralisia intestinal e morte dos insetos (ADANG et al., 2014). Um dos mecanismos de ação dessas bactérias é o potencial das toxinas Cry, Cyt e Vip serem específicas para as larvas dessas espécies de dípteros, que causam lise das células epiteliais do intestino, resultando na morte do inseto (RITCHIE et al., 2010; BRAVO et al., 2013; MENDOZA-ALMANZA et al., 2020).

2.5 Fatores que afetam as formulações dos produtos à base de microrganismos

Os produtos à base de *B. thuringiensis* são considerados de grande importância por apresentar diversas vantagens, segurança e alta efetividade inseticida (LEMAUX et al., 2008). Como um bioinseticida, o *B. thuringiensis* produz cristais inseticidas (ICPs) que são eficazes contra uma variedade de ordens de insetos, incluindo Lepidoptera, Hemiptera e Diptera (LETOWSKI et al., 2005; ZHANG et al., 2016). As pesquisas das estruturas dessas proteínas e

o mecanismo de ação em insetos vetores de doenças e pragas agrícolas são estudados em diversas abordagens (CHAKRABARTY et al., 2020).

Os bioinseticidas provenientes de microrganismos apresentam várias vantagens significativas sobre os inseticidas químicos (CHAKRABARTY et al., 2022). Contudo, os produtos à base de microrganismos são suscetíveis a uma série de fatores ambientais, como: luz solar, chuva, orvalho, pH e temperatura sob condições de campo (BRAR et al., 2006; JALLOULI et al., 2014), sendo que os raios UV na luz solar é o fator mais importante. A radiação ultravioleta pode danificar ou degradar as proteínas, assim como suas células microbianas, reduzindo a duração e persistência na natureza e, conseqüentemente limitando sua plausibilidade biológica (ZHANG et al., 2016). Estudos mostraram que após um dia de exposição à luz solar, os produtos à base de *B. thuringiensis* são inativados, mas geralmente são necessários dois a três dias para que os efeitos inseticidas entrem em ação. Assim, o custo desses produtos aumenta, pois são necessárias repetidas pulverizações (SANSINENEA & ORTIZ, 2015).

Diversas estratégias são utilizadas para melhorar a qualidade e a eficácia dos biopesticidas, principalmente a otimização de seus produtos e a sua plausibilidade biológica diante das condições adversas. Estudos mostraram que abordagens utilizando resíduos de azeite de oliva podem proteger os esporos de *B. thuringiensis*. Além disso, o uso de partículas do látex, etanol e água para encapsular produtos à base de *B. thuringiensis* são boas estratégias para melhorar a estabilidade das proteínas cristalinas inseticidas (ICPs) sobre a radiação UV-A (JALLOULI et al., 2014; JALALI et al., 2020). Embora esses métodos apresentem alguma positividade, muitos deles não são empregados devido aos custos e/ou praticidade.

Estudos sobre ensaios de semicampo e testes de campo foram realizados e também relataram a eficácia desses larvicidas no controle de mosquitos. A atividade larvicida alguns de formulados variam de uma área para outra, devido às influências das variáveis ambientais. Considerando este fato, a OMS, (2013) relatou que a estratégia larvicida eficaz em uma determinada área pode ser ineficaz em outra área. A aplicação de produtos à base de *B. thuringiensis israelenses* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (Bs) em diferentes regiões devem ser avaliadas de forma cuidadosa e criteriosa. Os produtos passam por avaliações preliminares e robustas para poderem ser implementadas no Plano Nacional Integrado de Gestão de Vetores (PNIGV) (ADETORO et al., 2022).

Diante disso, estudos envolvendo novas linhagens de *Bacillus* provenientes do ambiente amazônico são importantes para a busca de novos agentes entomopatogênicos. Dessa forma, é relevante a busca de novas linhagens resistentes às condições ambientais do próprio ambiente

e, que sejam de menor impacto em organismos não- alvo.

2.6 Ecotoxicidade e persistência

Embora o uso de *B. thuringiensis* tenha aumentando em todo o mundo, os estudos de monitoramento dos efeitos ambientais permanecem relativamente escassos. Essas bactérias são consideradas biocidas ambientalmente seguras, eficazes e específicas para insetos alvo (DESPRES et al., 2011).

No entanto, existem estudos que mostraram a sensibilidade de certas espécies não- alvos aos produtos à base de Bti, seja diretamente expressando respostas fisiológicas (LAJMANOVICH et al., 2015; ALLGEIER et al., 2018) ou indiretamente por meio de efeitos mediados por alterações na composição da flora e da fauna (POULIN et al., 2010).

A maioria dos organismos testados até agora, exceto mosquitos alvos (Culicidae e Chironomidae) e borrachudos (Simuliidae), não revelaram mortalidade mesmo em concentrações altas de Bti. Os mosquitos são uma parte substancial da biomassa em uma ampla gama de zonas úmidas e representam fontes de alimentos para muitos predadores aquáticos e terrestres (BECKER et al., 2010). Além disso, os adultos desempenham um papel subestimado na polinização (PEACH & GRIES, 2016; LAHONDÉRE et al., 2020).

Além dos estudos de campo, onde o controle dos fatores ambientais é difícil, foram realizados estudos de mesocosmos sobre os efeitos do Bti em redes alimentares aquáticas reconstruída. PAULEY et al., (2015) examinaram a interação entre predação e formulações de Bti em anfíbios. A sobrevivência de girinos da perereca cinzenta (*Yla versicolor*) foi significativamente reduzida em 80% na presença de predadores (larvas de libélulas) e uma formulação Bti (Mosquito dunk) em mesocosmos de lagoas.

Em uma abordagem semelhante, ALLGEIER et al., (2019) avaliaram os efeitos indiretos do Bti na disponibilidade de recursos alimentares em larvas predadoras de tritão (*Lissotriton helveticus* e *L. vulgaris*). O ambiente aquático pode ser contaminado por pesticidas ou outros xenobióticos em geral, estes últimos podem acarretar em variações diversas nos órgãos e tecidos dos girinos. As consequências destes agentes podem ser diretas ou indiretas manifestando-se em níveis como também por reflexos estruturais na dinâmica das populações e comunidades (FERREIRA, 2014). Ainda não são conhecidas prováveis influências e consequências que o biopesticidas à base de *B. thuringiensis* pode causar para a fauna aquática (especificamente peixes), mesmo diante da crescente utilização de defensivos agrícolas nas culturas vegetais de produção.

A espécie *Sicnax ruber* (Hylidae), tem distribuição geral na Bacia Amazônica do Brasil, Peru, Equador, Colômbia, Guiana e Suriname (LIMA et al., 2005). No Brasil são registradas 1.136 espécies, a grande maioria de anuros (1.093 espécies), 38 cecílias e cinco salamandras (SEGALLA et al., 2019). Os Anfíbios são um importante componente da fauna dos diferentes ecossistemas Sul Americanos e podem representar grande parte da biomassa animal de ambientes aquáticos.

Essa adversidade de formas de habitat, reflete a capacidade desses anfíbios de se adaptarem a uma ampla variedade de ambientes aquáticos onde vivem. São importantes bioindicadores da qualidade da água e saúde dos ecossistemas (WLADDIE, 2006). As condições favoráveis de lagos e riachos, proporcionam a reprodução local para muitos organismos aquáticos, como anfíbios e mosquitos (BLAUSTEIN & MARGALIT, 1996). Contudo, esses locais são criadouros de insetos vetores de doenças, sendo muitas das vezes necessários aplicar biosinseticidas nesses ambientes para o controle vetorial.

Com isso, o Bti é o agente mais seletivo e menos tóxico disponíveis para controlar os mosquitos, principalmente nos programas de controle biológico, e devem integrar campanhas de conscientização e medidas de mitigação, equilibrando as demandas sociais para a redução do mosquito com os fatores envolvidos na proliferação e dispersão destes vetores. O monitoramento não deve incluir obrigatoriamente apenas a resistência do mosquito, mas também a exposição ao Bti, bem como os efeitos relacionados à rede alimentar nos ecossistemas. As avaliações de persistência, resistência e efeito ambiental devem ser conduzidos por órgãos independentes em complemento aos operadores de controle de mosquitos para gerar confiabilidade pública nos resultados dos estudos (BRUHL et al., 2020).

Considerando a aplicação de inseticidas Bti em áreas suburbanas e urbanas para controlar mosquitos como o principal vetor de doenças humanas, destaca-se a necessidade de avaliação de riscos ecotoxicológicos em organismos não- alvos (LAJMANOVICH et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o potencial larvicida de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* isolada de ambiente amazônico em condições de semicampo em populações de *Aedes aegypti* e testes em organismo não- alvo.

3.2 Específicos

- Obter biomassa bacteriana da linhagem GD02.13- *B. thuringiensis* e da cepa padrão AM65-52 Bti por meio de cultivos microbianos;
- Avaliar a eficácia e a persistência dos produtos da linhagem GD02.13 e da cepa padrão em testes de semicampo;
- Avaliar os efeitos dos componentes celulares (pellets) dos produtos obtidos dos *Bacillus*, em girinos *Scinax* sp., organismo não-alvo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Estudo

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e da Dengue (LCBBMD) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil.

4.2 Reativação e purificação de bactérias

A linhagem GD02.13-*Bacillus* sp. isolada de ambiente amazônico (Katak et al., 2021), foi identificada por sequenciamento genômico como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) (Biorproject PRJNA1137396, MUNIZ, em preparação, 2024). A linhagem GD02.13 foi cultivada em meio de cultivo sólido Nutriente Agar NA (extrato de carne 1.0 g, extrato de levedura 2.0 g; peptona 5.0, pH 6.8 g/L), incubada a 30°C por 24 h para o crescimento das colônias bacterianas em estufa B.O.D. A linhagem padrão AM65-52 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), obtida do produto comercial Vectobac® WG, foi utilizada como controle positivo, cultivada sob as mesmas condições.

Após a reativação, as bactérias foram purificadas pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas, utilizando uma alça de platina esterilizada em álcool 70% e flambada em chama no bico de Bunsen. A pureza das colônias foi confirmada por meio da coloração de Gram e visualização em microscópio na lente objetiva de 100x.

4.3 Coloração de Gram

Inicialmente, foram adicionados 10 µL de água destilada estéril em lâminas de vidro esterilizadas. Com uma alça de platina flambada, um isolado de bactéria foi espalhada na lâmina para a homogeneização e fixação. Em seguida, aplicou-se cristal violeta de genciana por 1 minuto, seguido de lavagem em água corrente. Depois, utilizou-se Lugol por 60 segundos e um descolorante de solução álcool-acetona por 15 segundos, com uma nova lavagem em água corrente. Por último, aplicou-se a solução de Fuccina durante 60 segundos e lavou-se novamente em água corrente. As lâminas secas foram visualizadas no microscópio óptico com lente objetiva de 100x utilizando óleo de imersão (MARTINEZ & TADDEI, 2008).

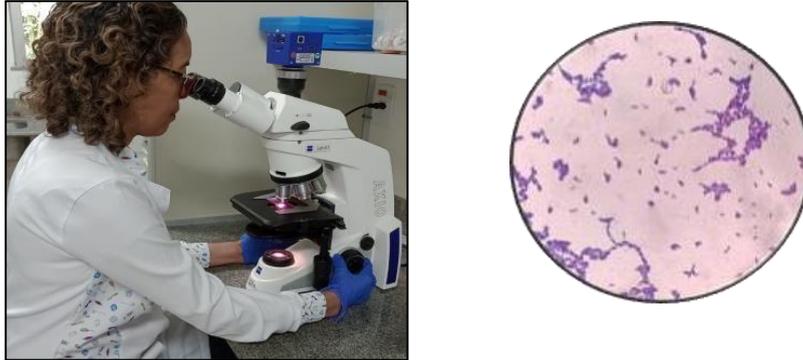


Figura 2:Técnica de coloração de gram, visualização de células bacterianas com o auxílio de microscópio óptico, com a lente 100x.

4.4 Pré inóculo e condições de cultivo

O pré inóculo foi realizado em tubos de ensaios de 20 mL, contendo 2 mL do meio de cultivo Nutriente Broth (5g de tecido animal, 5g cloreto de sódio, 1.5g extrato de carne, 1.5 g de extrato de levedura). Foi adicionada uma amostra da biomassa do cultivo bacteriano e incubado em estufa rotativa a 30 °C e 180 rpm por 24 horas, até atingir o crescimento padrão de número 2, correspondente à turbidez da escala de McFarland (3×10^8 n° células/mL).

4.4.1 Cultivo de linhagem de *Bacillus* spp. para obtenção de biomassa bacteriana

Para escala preparativa, foram utilizados Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio de cultivo Nutrient Broth (NB), ao qual foram acrescentados 100 µL do cultivo bacteriano do pré inóculo. Os frascos foram incubados em estufa rotativa a 30 °C e 180 rpm por 120 horas até atingir o crescimento padrão número 8, correspondente à turbidez da escala de McFarland (8×10^6 n° células/mL). Após este período, 40 mL do cultivo bacteriano foram separados em tubos falcon estéreis de 50 mL e centrifugados em 5.000 rpm por 40 min a 4 °C. Os pellets obtidos foram congelados a -20 °C e, em seguida, liofilizados em liofilizador (Enterprise I, TERRONI) durante 48 horas, pesados e armazenados em -20 °C para estudos posteriores (DAHMANA et al., 2020; KATAK et al., 2021).

4.5 Ensaios biológicos

4.5.1 Obtenção e manutenção das larvas de *Aedes aegypti*

As larvas de *A. aegypti* utilizadas neste estudo foram oriunda de uma população de

campo coletada por Oliveira (2021) na zona leste da cidade de Manaus/AM (SISBIO/74091-1/2020-2021) e mantidas no Laboratório de Malária e Dengue do INPA. Para a eclosão, os ovos foram colocados em bandejas plásticas (45 x 30 x 7,5 cm) com 200 mL de água destilada. Após a eclosão, as larvas receberam alimentação composta por ração de roedores (Teklab global) e ração de gatos (Wiskas®) na proporção de 1:1 (LIMA et al., 2009). As larvas foram mantidas em temperatura de 26 ± 2 °C, umidade relativa em torno de 70 a 80% e fotofase (12L/12D). Foram selecionadas larvas de 3º estágio para os bioensaios, enquanto as demais permaneceram até a fase de pupa. As pupas foram transferidas para copos de plásticos com 100 mL de água e colocados em gaiolas padronizadas (18 cm de diâmetro x 17cm de altura) para a emergência dos adultos e manutenção da colônia. Para alimentação dos machos e das fêmeas foi adicionada solução de sacarose 10% em algodão envolto em gaze estéril. O repasto sanguíneo das fêmeas foi realizado com hamsters (*Mesocricetus auratus*) devidamente anestesiado, conforme o procedimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA: 01280.000842/2023-48) - Criação de mosquitos vetores, em condições de laboratório).

4.5.2 Bioensaios *in vivo* em condições de laboratório com os componentes celulares

Para avaliar a eficácia dos componentes celulares (pellets) obtidos dos *Bacillus*, foi realizado um teste preliminar em condições de laboratório. Os testes *in vivo* foram realizados na sala de bioensaios do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e da Dengue do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), com temperatura controlada (26 ± 2 °C), umidade relativa de 70 a 80% e fotoperíodo de 12h (12L:12E).

Inicialmente, foram adicionados 5 mg da biomassa bacteriana das linhagens GD02.13 e AM65-52 em 10 mL de água destilada para preparar uma diluição de 0,5 mg/mL. Em seguida, as concentrações previamente estabelecidas por Katak et al. (2021) – 40, 30, 20 e 10 µg/mL foram utilizadas para avaliar o potencial tóxico dos componentes celulares. Para o bioensaio, foram utilizados cinco copos plásticos de 180 mL para cada linhagem. Cada copo continha 150 mL de água destilada, 20 larvas de 3º estágio da geração F₁₂ de *A. aegypti*, 1 mg de ração de rato e gato para as larvas e as concentrações de 40 a 10 µg/mL da biomassa dos componentes dos *Bacillus*, a mortalidade foi registrada após um intervalo de 24 horas.

4.5.3 Diluição das amostras para os ensaios larvicidas de semicampo

Para os testes de semicampo, inicialmente foi pesado 200 mg da biomassa, que foi

adicionada 10 mL de água destilada estéril (submetida a um processo de esterelização) e homogeneizada em vortéx por 1 hora até que todo produto estivesse diluído. Essa preparação resultou em uma concentração de 2.000 Bt UTI/mg, equivalente a 20 mg/mL. De acordo com as recomendações do fabricante do produto comercial Vectobac®WG, a potência recomendada para ser aplicada é de 2.000 UTI/mg. As concentrações utilizadas para avaliar a atividade larvicida em condições de semicampo foram 7, 3, 1 e 0,9 µg/mL.

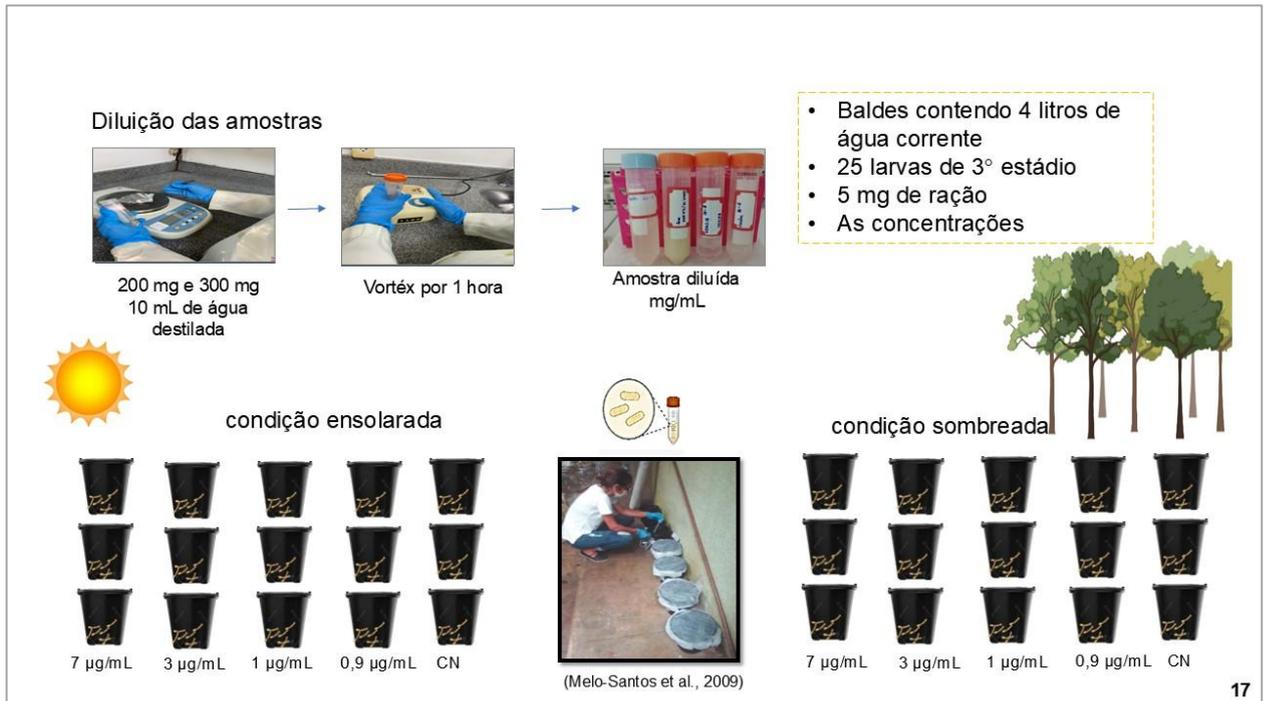
No teste piloto com a diluição de 2.000 UTI/mg, o pellet da linhagem padrão AM65-52 não apresentou atividade larvicida. Diante disso, foi necessário aumentar a potência para 3.000 UTI/mg, pesando-se 300 mg em 10 mL de água para obter a concentração de 30 mg/mL. Novas concentrações 150, 70, 18 e 10 µg/mL foram então utilizadas para avaliar a atividade larvicida.

4.5.4 Teste semicampo com larvas de *Aedes aegypti*

A avaliação da eficácia da linhagem GD02.13 em condição de semicampo foi comparada com a linhagem padrão AM65-52 de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, obtida do produto comercial VectoBac®WG. O experimento foi realizado no Campus I do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em três períodos diferentes: O primeiro experimento ocorreu de outubro a dezembro de 2022, o segundo entre janeiro a março de 2023, e o terceiro entre abril e junho de 2023. Os experimentos seguiram a metodologia de MELO-SANTOS et al., (2009) e VIANA et al., (2021), com adaptações.

Os testes foram realizados em baldes com capacidade de 5 litros, contendo 4 litros de água, 25 larvas de 3º estágio, 5 mg de ração para larvas e as concentrações 7, 3, 1 e 0,9 µg/mL da potência de 2.000 UTI/mg estabelecidas para o uso de produtos biológicos. A cada sete dias, foram introduzidas novas larvas para avaliar o efeito residual e a persistência em dois locais distintos: uma área sombreada (lado B) e uma exposta ao sol (lado A). Estes experimentos foram realizados em triplicata com três réplicas de cada condição.

A mortalidade das larvas, o pH, a temperatura ambiente e da água foram mensurados diariamente. As larvas mortas foram contabilizadas e a média foi calculada para obter a porcentagem de mortalidade.



17

Figura 3: Montagem dos bioensaios em condições de semicampo. Lado (A) experimento exposto a luz solar; Lado (B) experimento exposto em ambiente sombreado.

4.6 Avaliação da persistência dos *Bacillus*

A persistência das bactérias em condições de semicampo foi avaliada por meio da contagem de colônias viáveis (células vivas), comparado a linhagem padrão AM65-52. O experimento seguiu os protocolos de MELO-SANTOS (2009); WHO (2005), com algumas adaptações.

Inicialmente, uma alíquota de 1 mL de cada tratamento (A e B) foi coletada e submetida a um banho-maria a 80°C por 12 minutos para eliminar as células vegetativas. As amostras foram diluídas em séries até 10^{-3} , 20 µL da última diluição foram semeados em meio de cultivo NA contendo fluconazol. As placas de petri foram incubadas a 30 °C durante 24 horas, e o número de colônias foi quantificado. Foram utilizadas três amostras para cada balde, sendo que os baldes com concentrações de 7 e 0,9 µg/mL foram utilizadas para o isolamento das colônias bacterianas.

As colônias isoladas foram purificadas pela técnica de esgotamento em estrias cruzadas. Posteriormente, foi realizada a coloração de Gram para verificar se as células eram semelhantes às da linhagem introduzida. As colônias que se assemelhavam à linhagem GD02.13 foram cultivadas em meio Nutrient Broth por 72 horas a 30 °C, sob agitação em 180 rpm. Em seguida,

foi realizado um bioensaio larvicida para comparar o perfil de mortalidade com a linhagem original.

O isolamento das colônias bacterianas, sua caracterização e atividade larvicida visaram demonstrar que a linhagem GD02.13 pode permanecer ativa e estável por um determinado período.



Figura 4: Procedimento de isolamento, caracterização morfológica e atividade larvicida das bactérias obtidas dos experimentos de semicampo

4.6.1 Bioensaios *in vivo* em condições de laboratório com as colônias isoladas

Os bioensaios foram conduzidos na sala de bioensaios do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e da Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As condições experimentais foram mantidas em temperaturas controlada com umidade relativa entre 70 a 80% e um fotoperíodo de 12 horas (12L:12E).

Para cada linhagem testada, foram utilizados três copos plásticos de 50 mL. Cada copo continha 10 mL de água destilada, 10 larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, 1 mg de ração para as larvas e 1 mL do cultivo bacteriano dos bacilos. Após a exposição das larvas aos produtos dos *Bacillus*, a mortalidade foi registrada em intervalo de uma hora.

4.7 Avaliação da toxicidade em *Scinax* sp., organismo não alvo.

A linhagem GD02.13, que apresentou toxicidade para larvas de *A. aegypti*, foi testada em espécimes de girinos do gênero *Scinax* sp., com o objetivo de avaliar sua toxicidade em organismo não-alvo. Para a realização deste teste foram utilizados girinos coletados do interior de tanques de fibra localizados Centro de Estudos de Quelônios da Amazônia (CÉQUA), localizado no Bosque da Ciência do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), sob a autorização do SISBIO (93589-1). A coleta foi realizada com auxílio de uma concha de alumínio. Inicialmente, os girinos foram mantidos e acondicionados em baldes plásticos. Posteriormente, foram transportados para o Laboratório de Controle Biológico e Biotecnológico da Malária e Dengue (LCBBMD) do INPA.

Os girinos foram colocados em recipientes retangulares de plástico, medindo (12 x 9 cm) com volume de 450 mL. Em cada recipiente, foram adicionados 195 mL de água corrente da torneira e 5 mL de água obtida do ambiente da coleta, contendo dez girinos de tamanho semelhante em cada recipiente. Para o teste piloto, foram aplicadas as concentrações 7, 3, 1, 0,9 µg/mL das linhagens GD02.13 e AM65-52, que já haviam sido testadas em larvas de *A. aegypti* em condições de semicampo. Como controle negativo, utilizou-se um recipiente contendo apenas com água.

Os testes foram realizados em triplicada, com três réplicas, sob temperatura de (26 ± 2°C), umidade relativa de 70 a 80% e fotoperíodo de 12h (12L:12E). Para a aplicação das concentrações dos produtos, aguardou-se aproximadamente duas horas para aclimação, evitando-se estresse e permitir a estabilização dos girinos nos recipientes. A avaliação da mortalidade foi realizada até 120 horas após a exposição aos componentes celulares dos bacilos.

No segundo experimento, as concentrações foram para 150, 70 e 18, 10 µg/mL nas mesmas condições anteriores, com o objetivo de verificar o efeito tóxico em altas concentrações.

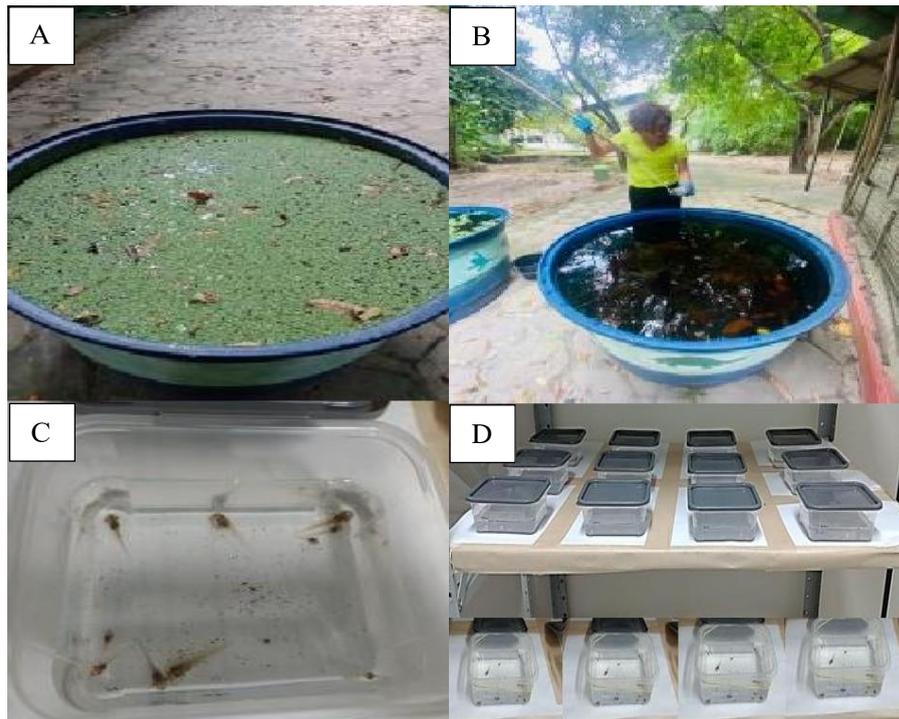


Figura 5: Experimento com girinos, organismos não-alvo obtidos de tanques de fibras do CEQUA. A: tanque de fibra; B: coleta e capturas de girinos com conchas entomológicas, C e D: ensaios biológicos utilizando os componentes celulares dos bacilos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade larvicida *in vivo* em condições de laboratório

Os testes preliminares realizados em condições de laboratório revelaram que os componentes celulares (pellets) obtidos dos cultivos de *Bacillus* mostraram eficácia na mortalidade em ambiente controlado. A exposição das larvas de *A. aegypti* aos componentes celulares da linhagem GD02.13-*B. thuringiensis* revelou que as concentrações de 40 a 10 $\mu\text{g/mL}$ mataram 100% das larvas no intervalo de 24 horas. O mesmo perfil de mortalidade foi observado para linhagem padrão Bti AM65-52, exceto na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$, onde a linhagem GD02.13 apresentou maior atividade larvicida, com uma diferença de 5% (Figura 6).

Uma das estratégias para diminuir os impactos causados pelo *A. aegypti* é a utilização do manejo de fonte de larvas que combina controle físico, químico e biológico para gerenciar os estágios imaturos dos mosquitos. Nesse sentido, o gerenciamento de fonte larval (LSM) tem como foco principal reduzir a população de mosquitos que veiculam patógenos causadores de doenças, principalmente por meio da intervenção nos habitats naturais de reprodução e

desenvolvimento deste vetor (OMS, 2005).

Neste contexto, esta pesquisa avaliou a eficácia dos componentes celulares de uma linhagem de *B. thuringiensis*, codificada como GD02.13, proveniente de ambiente amazônico, em comparação com uma linhagem padrão Bti AM65-52. Os resultados mostraram que tanto a linhagem GD02.13 quanto a padrão Bti AM65-52 foram eficazes contra larvas de *A. aegypti*. A eficácia das linhagens padrão AM65-52 e GD02.13 pode estar associada a diversos fatores de virulência. Os formulados à base da bactéria entomopatogênica AM65-52 – *B. thuringiensis* var. *israelensis* estão disponíveis para aplicação em diversos programas de controle biológico (DERUA et al., 2019).

De acordo com as informações do fabricante, esses formulados contém uma variedade de esporos, endotoxinas (Cry) e adjuvantes responsáveis pelo controle de insetos vetores de doenças (DERUA et al., 2019; ADETORO et al., 2022). Por outro lado, ainda não se conhecem os componentes celulares e nem os mecanismo de ação da linhagem GD02.13, uma vez que a linhagem isolada mostrou maior eficácia em comparação à linhagem padrão.

Os dados obtidos neste experimento corroboram com o os testes realizado por KATAK et al. (2021), que utilizaram os componentes celulares da linhagem GD02.13 e observaram o potencial larvicida de 100% sobre as larvas de *A. aegypti* em condições de laboratório.

As médias calculadas com os dados de mortalidade mostraram que, na concentração de 10 µg/mL, a linhagem GD02.13 foi mais eficiente que a linhagem padrão AM65-52.

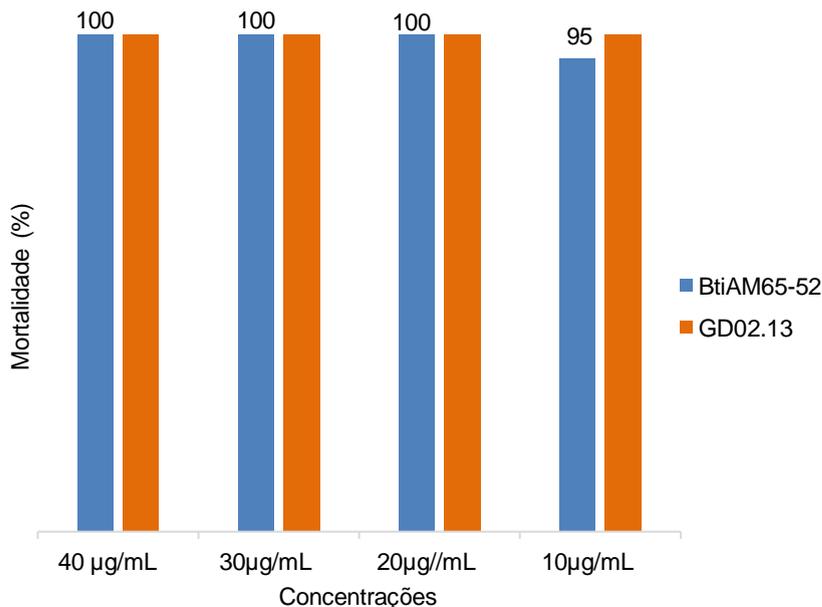


Figura 6: Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas as concentrações de 40-10 µg/mL obtida do cultivo da linhagem GD02.13 e Bti AM62-52 após 24 horas de exposição.

5.2 Atividade larvica em condições de semicampo

Considerando os resultados dos testes com larvas de *A. aegypti* expostas aos componentes celulares de *Bacillus*, em condições de semicampo, observou-se que somente a linhagem GD02.13 - *B. thuringiensis* apresentou toxicidade em todas as concentrações avaliadas (Tabela 1). Não foi registrada mortalidade para a linhagem padrão AM65-52 em nenhuma das condições testadas. Por outro lado, a linhagem GD02.13 de *B. thuringiensis* demonstrou mortalidade nas primeiras 24 horas após cada introdução de novas larvas de *A. aegypti*, durante o período de 50 dias na potência de 2.000 Bt UTI/mg (Tabela 1).

Tabela 1: Média da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* de 3° estágio expostas aos componentes celulares (pellet) da linhagem GD02.13 em condições de semicampo durante 7 semanas na concentração de 2.000 Bt UTI/mg.

24 horas	Lado A (Sol)					Lado B (sombra)				
	Concentração 2.000 Bt UTI/mg					Concentração 2.000 Bt UTI/mg				
Linhagem	Mortalidade (%)									
	7 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	0,9 µg/mL	CN	7 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	0,9 µg/mL	CN
GD02.13										
1° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
2° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
3° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
4 Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
5° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
6° Semana	90	90	90	90	0	100	100	90	90	0
7° Semana	90	80	80	70	0	90	90	90	90	0

Lado A: local exposto à luz solar. Lado B: local sombreado. CN: controle sem cultivo bacteriano. Unidade Tóxica Internacional (UTI)

A atividade larvica no intervalo de 24 horas referente ao experimento do lado A (exposto ao sol) apresentou uma redução de 10 a 30% na mortalidade durante a 6° e 7° semanas. Na sexta semana, a linhagem GD02.13 de *B. thuringiensis* exibiu 90% de mortalidade em todas as concentrações testadas (Tabela 1). Na sétima semana, a mortalidade foi de 90% na maior concentração testada (7µg/mL), 80% nas concentrações intermediárias (3 e 1 µg/mL) e 70% na menor concentração (0,9 µg/mL). Não foi observada mortalidade nos controles negativos (CN) durante as sete semanas.

Em relação ao experimento do lado B (sombreado), ocorreu a mortalidade de 100% até

a sexta semana nas concentrações 7 e 3 µg/mL, enquanto que nas demais concentrações a mortalidade foi de 90%. Na sétima semana, todas as concentrações avaliadas apresentaram 90% de mortalidade.

A diminuição da atividade larvicida da linhagem GD02.13 nas semanas 6^o e 7^o pode estar relacionada a diversos fatores, como: clima, temperatura e umidade da região, que possivelmente interferem no metabolismo dos microrganismos, na produção de princípios ativos, na degradação dos seus componentes celulares e nos mecanismos de ação dos biolarvicidas.

Os resultados da mensuração do pH dos experimentos nas duas condições ambientais avaliadas (A e B) mostraram que o pH se manteve entre 5 e 6, sendo classificado como ácido durante o período de avaliação. A umidade relativa variou entre 70 a 79 %, enquanto a temperatura da água e do ambiente variou entre 24 a 30 °C. Fatores ambientais, como o pH da água, são importantes para avaliar a capacidade de resistência desses microrganismos no ambiente. A temperatura do ambiente e da água são elementos fundamentais para analisar a persistência desses microrganismos na natureza e a sobrevivência do *A. aegypti* nesses locais.

5.3 Avaliação da persistência de bacilo

Durante os experimentos, foi possível verificar que a persistência da linhagem GD02.13 permaneceu por cinquenta dias em todas as condições testadas. O rastreamento da linhagem foi realizado por meio de técnicas de isolamento por choque térmico. As colônias obtidas a partir do isolamento das amostras dos baldes nas condições ambientais A (exposta ao sol) e B (na sombra) permitiram a obtenção de colônias semelhantes à linhagem introduzida.

Observou-se que, à medida que a concentração diminuía, o número de colônias também apresentava redução. Nos isolamentos bacterianos da sexta e sétima semana, o número de colônias aumentou nas maiores concentrações, enquanto nas concentrações mais baixas ocorreu uma diminuição (Figura 7).

O número de colônias viáveis de bacilos nas amostras coletadas variou de 93 a 15% colônias na condição A (Figura 7). O declínio no número de colônias nas concentrações não coincidiu com uma redução na mortalidade larval (tabela 1), especialmente nos primeiros quatro isolamentos. Contudo, nas últimas semanas (6 e 7), houve um aumento no número de colônias, acompanhamento por uma redução na mortalidade larval de aproximadamente 10%.

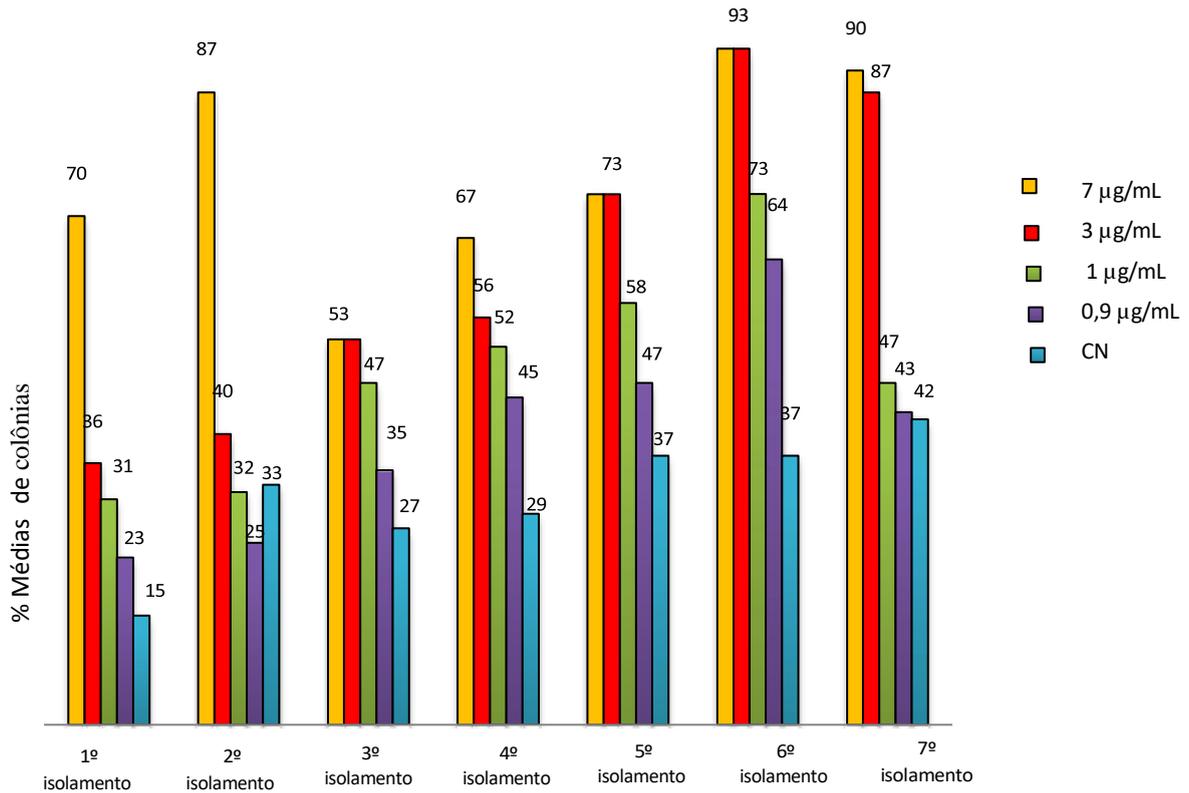


Figura 7: Porcentagem média de colônias obtidas do isolamento da sétima semana do tratamento sob a condição A: presença de Luz. CN: Controle negativo sem cultivo bacteriano

Em relação ao isolamento do tratamento B (sombra), observou-se que a porcentagem de colônias diminuiu nas menores concentrações avaliadas. Também foi verificado que o declínio no número de colônias não coincidiu com a mortalidade larval até a quinta semana. No entanto, nas duas últimas semanas (6ª e 7ª), o número de colônias apresentou uma relação com a diminuição da mortalidade larval (Figura 8 e Tabela 1).

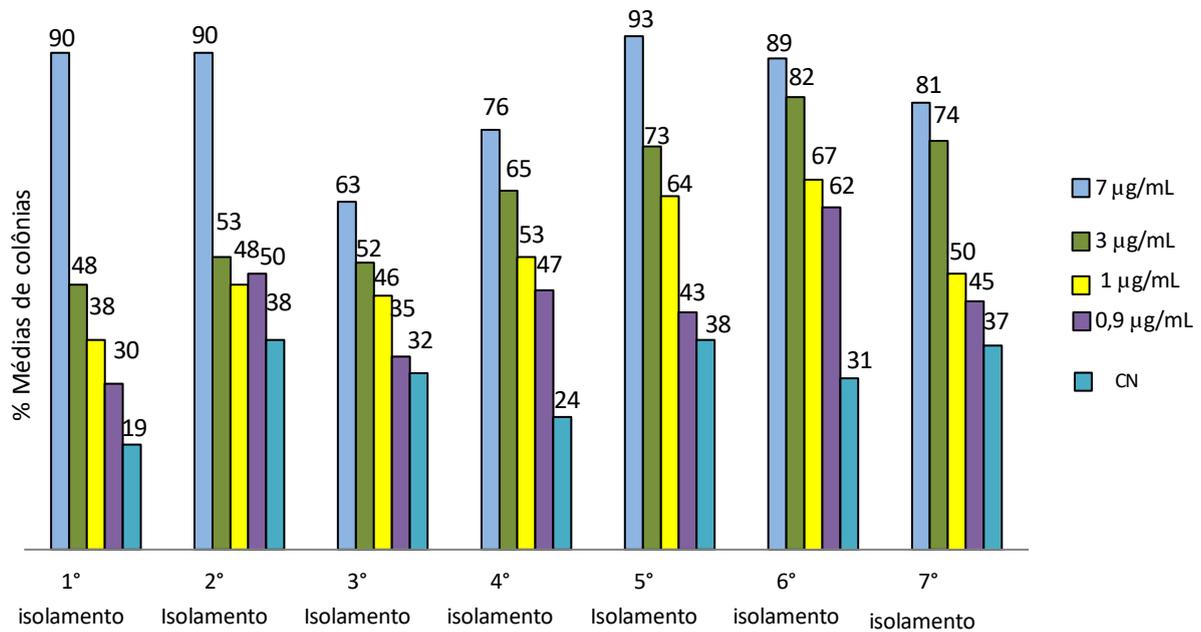


Figura 8: Porcentagem média de colônias viáveis obtidas do isolamento da linhagem GD02.13 durante as 7 semanas dos tratamentos B: sombra. CN: Controle negativo sem cultivo bacteriano.

5.4 Perfil fenotípico dos bacilos

As colônias obtidas no isolamento apresentaram características morfológicas externas semelhantes. O perfil fenotípico, incluindo morfologia, coloração de Gram e atividade larvicida, demonstrou semelhanças com a linhagem GD02.13, que foi introduzida no início do experimento. As características fenotípicas observadas nas colônias incluíram cores opacas e coloração de Gram positivas (Figura 9).

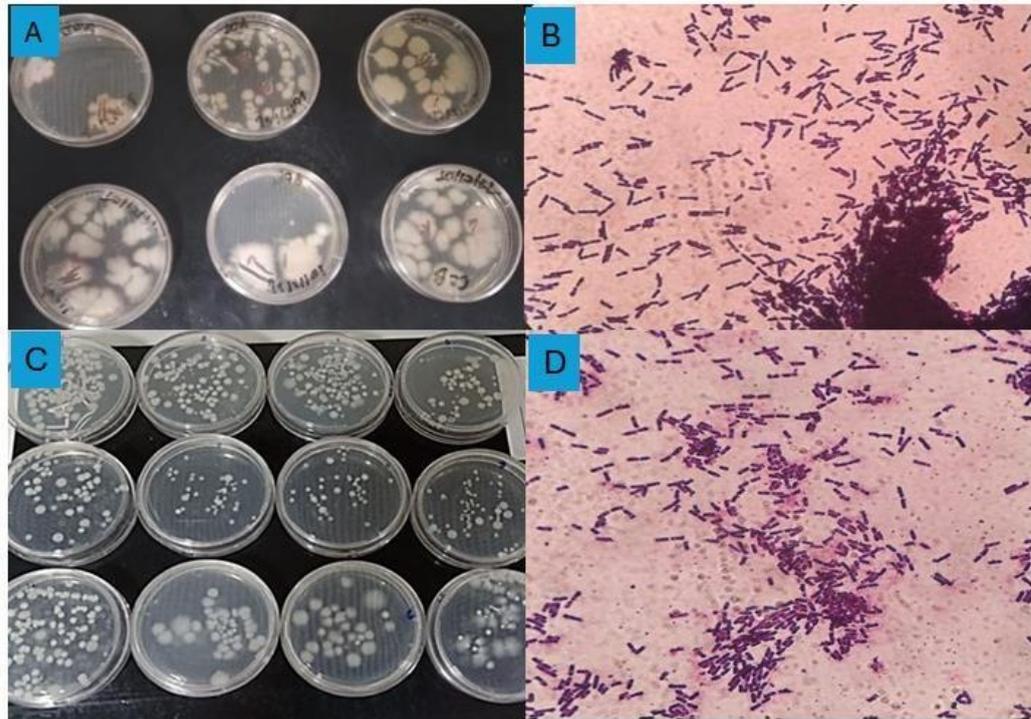


Figura: 9 : A e B. Perfil morfológico e micromorfológico das colônias da linhagem GD02.13 na concentração 2.000 Bt UTI/mg obtidas dos isolamentos durante setes semanas. C e D. Perfil morfológico e micromorfológico da cepa padrão AM65-52.

5.5 Atividade larvicida das colônias viáveis

Cinco colônias de cada isolamento dos tratamentos A e B, incluindo o controle, foram selecionadas para avaliar o potencial larvicida contra larvas de *A. aegypti* em condições de laboratório. As linhagens foram escolhidas pelo tratamento do choque térmico, que elimina as células vegetativa e obtém as células esporulantes (WHO, 1985; POLANCZYK, 2004; KATAK et al., 2021). Após esse processo, as características morfológicas, como aspectos das colônias e a parede celular, foram comparadas com a linhagem GD02.13, introduzida nos experimentos.

As larvas de *A. aegypti* foram expostas aos cultivos das colônias semelhantes à linhagem GD02.13 no intervalo de 1 hora. Durante o isolamento até a quinta semana, foi observada mortalidade nas larvas expostas à linhagem GD02.13. Em relação às colônias do sexto e do sétimo dia de isolamento, houve uma redução na mortalidade, variando de 90% a 95% (Tabela 2). Por outro lado, a linhagem GD02.13 manteve uma eficácia de 100% em todos os experimentos.

Tabela 2: Média da mortalidade de larvas de 3° estágio expostas aos cultivos das colônias obtidas do isolamento dos tratamentos A e B durante 7 semanas na concentração de 2.000 Bt UTI/mg. Lado A: local exposto à luz solar e lado B local sombreado. CN: controle sem cultivo bacteriano. Unidade Tóxica Internacional (UTI).

Lado A			Lado B		
Colônias			% Mortalidade		
1 Hora			1 Hora		
1° Isolamento	GD02.13	100	1° isolamento	GD02.13	100
	1.1 A	100		1.1 B	100
	1.2 A	100		1.2 B	100
	1.3 A	100		1.3 B	100
	1.4 A	100		1.4 B	100
	CN 1A	5		CN 1B	0
2° isolamento	GD02.13	100	2° isolamento	GD02.13	100
	2.1 A	100		2.1 B	100
	2.2 A	100		2.2 B	100
	2.3 A	100		2.3 B	100
	2.4 A	100		2.4 B	100
	CN 2A	5		CN 2B	0
3° Isolamento	GD02.13	100	3° Isolamento	GD02.13	100
	3.1 A	100		3.1 B	100
	3.2 A	100		3.2 B	100
	3.3 A	100		3.3 B	100
	3.4 A	100		3.4 B	100
	CN 3A	10		CN 3B	0
4° Isolamento	GD02.13	100	4° isolamento	GD02.13	100
	4.1 A	100		4.1 B	100
	4.2 A	100		4.2 B	100
	4.3 A	100		4.3 B	100
	4.4 A	100		4.4 B	100
	CN 4A	10		CN 4B	0
5° Isolamento	GD02.13	100	5° isolamento	GD02.13	100
	5.1 A	100		5.1 B	100
	5.2 A	100		5.2 B	100
	5.3 A	100		5.3 B	100
	5.4 A	100		5.4 B	100
	CN 5A	9		CN 5B	0
6° Isolamento	GD02.13	100	6° Isolamento	GD02.13	100
	6.1 A	10		6.1 B	10
	6.2 A	10		6.2 B	10
	6.3 A	10		6.3 B	10
	6.4 A	10		6.4 B	10
	CN 6A	0		CN 6B	0
7° Isolamento	GD02.13	100	7° isolamento	GD02.13	100
	7.1 A	5		7.1 B	5
	7.2 A	5		7.2 B	5
	7.3 A	5		7.3 B	5
	7.4 A	5		7.4 B	5
	CN 7A	0		CN 7B	5

Devido a ineficiência da linhagem padrão AM65-52, cuja potência informada pelo fabricante é 2.000 Bt UTI/mg, foi necessário aumentar a potência para 3.000 Bt UTI/mg, o que corresponde a 30 mg/mL. Os resultados da exposição das larvas aos produtos revelaram que a linhagem GD02.13 causou 100% de mortalidade em todas as concentrações testadas até a quinta

semana. Um perfil semelhante de mortalidade foi observado para a linhagem padrão até a quarta semana, no entanto, na quinta, sexta e sétima semanas, houve uma pequena redução no percentual de mortalidade, que foi 90% em todas as concentrações testadas. Apesar do aumento da potência da linhagem padrão, esta se mostrou menos eficiente que a linhagem GD02.13, nos tratamentos A (exposto a luz solar) e B (sombra) (Tabela 3).

Tabela 3: Média da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* de 3° estágio expostas aos componentes celulares (biomassa) da linhagem GD02.13- e Bt AM65-52 em condições de semicampo durante sete semanas na concentração na concentração 3.000 Bt UTI/mg.

Lado	Lado A (Sol)					Lado B (sombra)				
	% Mortalidade									
24h	Potência 3.000 Bt UTI/mL					Potência 3.000 Bt UTI/mL				
GD02.13	150 µg/m L	70 µg/µL	10 µg/mL	18 µg/mL	CN	150 µg/mL	70 µg/µL	10 µg/mL	18 µg/mL	CN
1° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
2° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
3° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
4 Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
5° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
6° Semana	90	90	90	90	0	100	100	90	90	0
7° Semana	90	80	80	70	0	90	90	90	90	0
			Lado A (Sol)					Lado B (Sombra)		
Bti	150 µg/mL	70 µg/µL	10 µg/mL	18 µg/mL	CN	150 µg/mL	70 µg/µL	10 µg/mL	18 µg/mL	CN
1° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
2° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
3° Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
4 Semana	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
5° Semana	90	90	90	90	0	90	90	90	90	0
6° Semana	90	90	90	90	0	90	90	90	90	0
7° Semana	90	90	90	90	0	90	90	90	90	0

Lado A: local exposto à luz solar e lado B: local sombreado. CN: controle sem cultivo bacteriano. Unidade Tóxica Internacional (UTI).

Os resultados do pH, temperatura da água e do ambiente nos experimentos com a diluição de 3.000 Bt UTI/mL foram semelhantes aos da diluição de 2.000 Bt UTI/mL (experimento anterior). Produtos à base de Bti são expostos a uma série de fatores abióticos, como calor, chuva, umidade, pH e temperatura sob condições de campo (BRAR et al., 2006; JALLOULI et al., 2014). A radiação ultravioleta pode danificar as proteínas inseticidas, assim como suas células microbianas, reduzindo a duração desses produtos na natureza e, conseqüentemente, limitando sua efetividade no ambiente (ZHANG et al., 2016). Estudos demonstraram que após um dia de exposição à luz solar, os produtos à base de *B. thuringiensis* perdem sua eficácia. Essa inativação ocorre antes que os insetos possam ser afetados, uma vez que esses produtos necessitam de 2 a 3 dias para que os efeitos inseticidas se manifestem. Como resultado, é necessária a realização de pulverizações contínuas, o que pode aumentar o custo associado ao seu uso (SANSINENEA & ORTIZ, 2015).

Estudos em semicampo e campo demonstraram a eficácia dos larvicidas no controle de mosquitos (DIEDHIOU et al., 2016; VIANA et al., 2021). A atividade larvicida de alguns formulados varia de uma área para outra, e é influenciada por diversas variáveis presentes nos ambientes naturais. Nesse contexto, a OMS (2013) destacou que uma estratégia larvicida eficaz em uma determinada região pode ser ineficaz em outra. Portanto, a aplicação de Bti e *Lysinibacillus sphaericus* (LBs) deve ser cuidadosamente estudada em diferentes regiões e climas antes que possa ser totalmente incorporada ao plano nacional integrado de gestão de vetores, no qual utilizam as toxinas desses microrganismos contra organismos alvo (ADETORO et al., 2022).

Embora o Bti seja atualmente o agente mais seletivo e menos tóxico disponível para controlar os mosquitos, os programas de controle devem incluir campanhas de conscientização e medidas de mitigação. Torna-se fundamental equilibrar as demandas sociais para a redução de mosquitos com os fatores que contribuem para sua proliferação e dispersão (CARSTEN et al., 2020).

5.6 Avaliação da persistência das linhagens de bacilos

Os resultados da média de colônias viáveis obtidas do experimento A (Exposto ao sol) da linhagem GD02.13 mostraram que, à medida que a concentração diminui, a média de colônias também tende a diminuir (Figura 10). No entanto, estes resultados indicam que a redução no número de colônias não coincide com a diminuição da eficácia da linhagem, especialmente nas

semanas de 1 e 5 (Tabela 3).

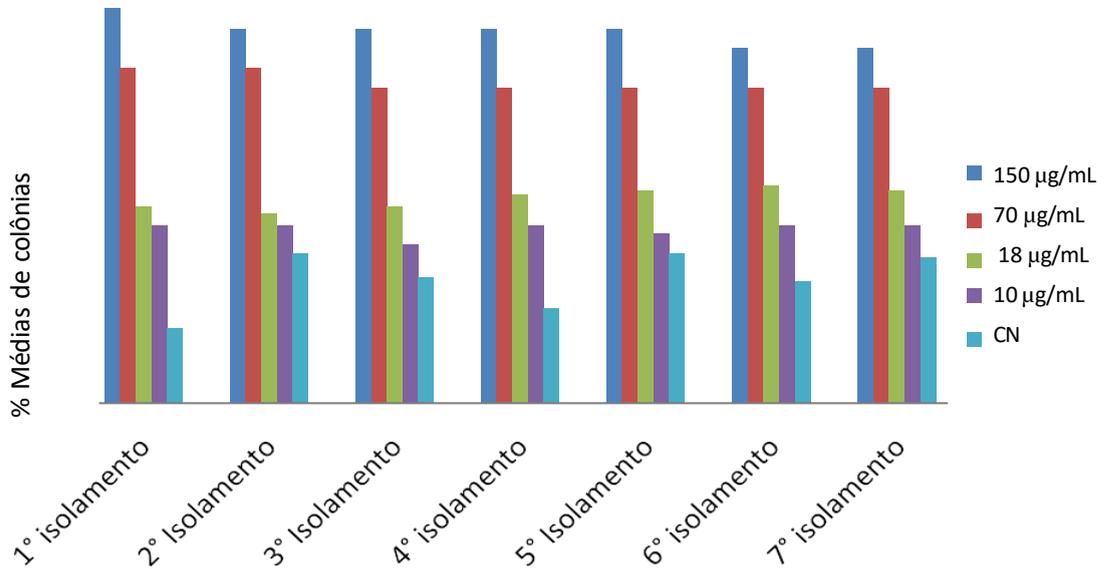


Figura 10: Porcentagem das média de colônias viáveis obtidas do isolamento da linhagem GD02.13 na diluição de 3.000 Bt UTI/mL das 7 semanas dos tratamentos A (Luz solar). CN: Controle negativo sem cultivo bacteriano.

Em relação às colônias viáveis do isolamento do experimento (A) com o uso da linhagem padrão, também foi observado que, à medida que a concentração diminuiu, o número de colônias diminuiu (Figura 11). No entanto, foi observada a relação da diminuição do número de colônias com a diminuição da atividade larvicida, principalmente até a quarta semana (Tabela 3).

A diminuição da atividade larvicida pode estar relacionada a diversos fatores ambientais. Melo-Santos et al., (2001) relataram que a suscetibilidade do Bti à luz solar ou radiação ultravioleta (UV) pode afetar a eficácia dos produtos à base desses microrganismos. A radiação solar inativa os esporos, causando perda da atividade biolarvicida dos produtos à base de Bti (BECKER, 2002). Um estudo semelhante realizado por Musugupakulya et al., (2024), revelou que os biolarvicidas como VectoBac GR e VectoMax FG para o controle de *Anopheles arabiensis* em ambiente sombreado demonstraram eficácia prolongada. Por outro lado, os biolarvicidas expostos ao ambiente ensolarado necessitaram de aplicações mais frequentes para manter sua eficácia.

As bactérias do gênero *Bacillus* têm uma vasta capacidade de reciclagem (MELO-SANTOS et al., 2009). Assim, a persistência da linhagem GD02.13 é um fator importante para determinar seu sucesso como larvicida no controle de mosquitos. No entanto, novos estudos

deverão ser realizados com o objetivo de verificar o potencial da reciclagem dessas linhagens e, conseqüentemente sua persistência na natureza.

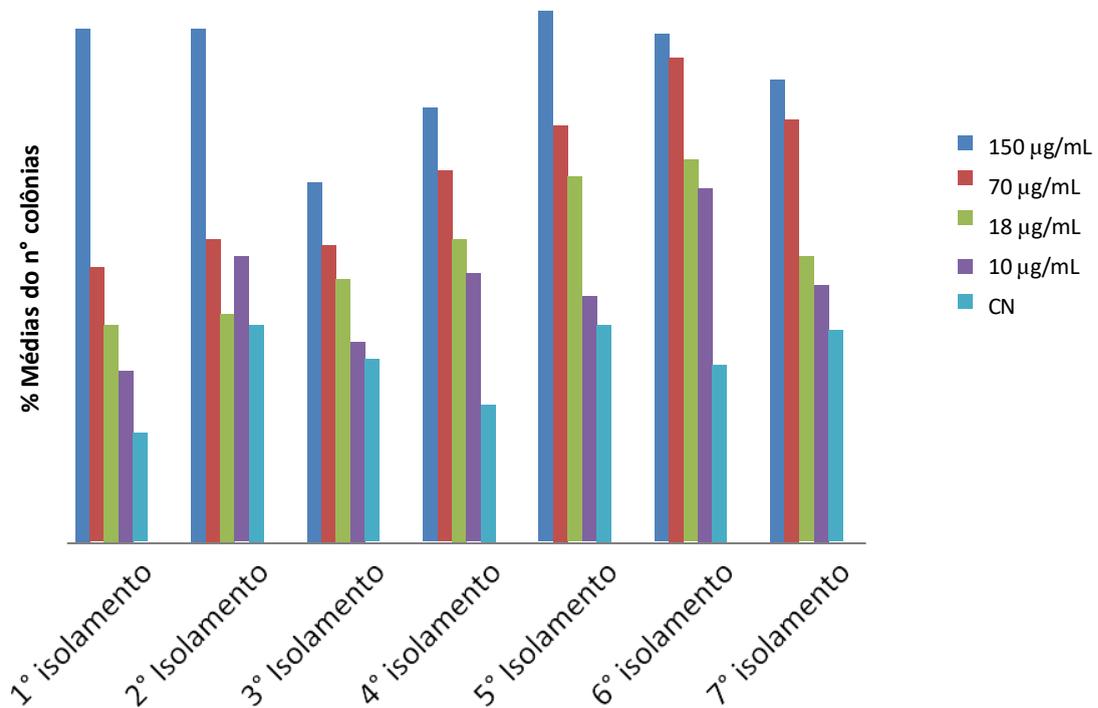


Figura 11: Médias da porcentagem de colônias viáveis obtidas do isolamento da linhagem padrão AM65-52 na diluição de 3.000 Bt UTI/mL das sete semanas dos tratamentos A (Luz solar). CN: Controle negativo sem cultivo bacteriano.

Portanto, o monitoramento não deve incluir apenas o acompanhamento obrigatório da resistência do mosquito, mas também a exposição ao Bti e aos efeitos ambientais devem ser conduzidas por órgãos independentes em complemento aos operadores de controle de mosquitos, para gerar confiança pública nos resultados dos estudos (CARSTEN et al., 2020).

A eficácia e a persistência do biolarvicida tendem a ser reduzidas ao longo do tempo, demonstrando assim a influência das condições climáticas na sua eficácia. Além disso, mesmo em condições adversas, outros microrganismos podem afetar a atividade larvicida, o que representa uma nova oportunidade para futuros estudos e investigações.

5.7 Testes em girinos *Scinax* sp., organismos não alvo

Os resultados da exposição dos componentes celulares (pellets) da linhagem GD02.13 aos espécimes de *Scinax* sp. demonstraram que as concentrações 7, 3, 1 e 0,9 µg/mL da potência de 3.000 Bt UTI/mL não causaram a mortalidade dos organismos não alvos até cinco dias de exposição. O mesmo padrão foi observado para a linhagem padrão AM65-52 e no controle negativo, que continha apenas água.

Estudos sobre o efeito de produtos à base de Bti e *Bacillus thuringiensis* var. *kurtaski* (Btk) em anfíbios têm sido amplamente investigados por diversos pesquisadores, com o objetivo de compreender seus efeitos e mecanismos de ação em organismos não-alvo. Algumas espécies de sapos e salamandras habitam terrenos úmidos ou pequenos lagos, que costumam ser criadouros típicos para a reprodução de mosquitos vetores de arbovírus e patógenos, os quais podem ser tratados com bioinseticidas à base desses microrganismos (BECKER & LUTHY, 2017).

Neste contexto, os anfíbios são organismos de grande importância na cadeia e teia ecológica, além de apresentarem diversas funções nos ecossistemas. Esses organismos são particularmente suscetíveis a poluentes aquáticos e, por essa razão, são frequentemente utilizados em testes de toxicidade (VU et al., 2015, BILODEAU et al., 2019, YOUNG et al., 2020).

Embora os mecanismos de ação dos produtos desses microrganismos estejam bem estabelecidos em insetos vetores de patógenos, como *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, ainda não se conhece completamente a possível ação desses produtos em anfíbios ou outros organismos não-alvo a longo prazo. Diante disso, foi realizado um teste preliminar com os componentes celulares à base das linhagem GD02.13 e da cepa padrão AM65-52, com o objetivo de avaliar e comparar seus efeitos tóxicos em girinos do gênero *Scinax* sp. .As concentrações de 150, 70, 18 e 10 µg/mL testadas com os espécimes de *Scinax* sp., foram as mesmas que causaram a mortalidade nas larvas de *A. aegypti* no teste de semicampo. Os resultados demonstraram que não houve mortalidade utilizando os componentes celulares, tanto com a cepa padrão AM65-52, quanto no controle negativo, em cinco dias de avaliação.

Um estudo semelhante foi realizado por Lajmanovitch et al., (2015), que avaliaram a toxicidade do produto comercial Introban^(R), contendo 1,25 mg/mL de Bti com potência de 1.2000 Bti UTI/mL. Os girinos da espécie *Leptodactylus latrans* expostos a esse produto apresentaram uma mortalidade de 3,5% na concentração 2.5 mg/mL. Além disso, observaram uma mortalidade de 100% quando os girinos foram expostos a 40 mg/mL.

Por outro lado, Schweizer et al., (2019) expuseram espécimes de *Rana temporaria* à formulação de VectoBac WG® na concentração 1, 10 e 100 mg/L. Os espécimes expostos à menor concentração (1mg/L) exibiram 12% de mortalidade, enquanto os grupos expostos às altas concentrações de 100 mg/L mostraram uma mortalidade de 10% e, nenhuma mortalidade foi observada na concentração de 10 mg/L. Considerando esses resultados, a mortalidade pode variar conforme as concentrações; os efeitos dos produtos estão associados a diversos fatores, como dissipação de oxigênio, concentração de íons, temperatura, alimentação e o pH, que podem ter variado entre os experimentos. Ademais, as diferentes formulações comerciais e os aditivos introduzidos podem produzir diferenças nos resultados (EMPEY et al., 2021).

Em virtude disso, os espécimes de *Scinax* sp. foram expostos novamente às concentrações de 30, 25, 20 e 10 µg/mL dos componentes celulares da linhagem GD02.13 e AM65-52. Os resultados mostraram que não houve mortalidade até cinco dias de avaliação para ambas linhagens, assim como no controle negativo. Os resultados obtidos neste experimento representam o primeiro relato do efeito de bactérias Amazônicas sobre espécimes de girinos do gênero *Scinax*, sendo desconhecidas suas repostas metabólicas e fisiológicas nesses organismos.

Embora as linhagens GD02.13 e AM65-52 não tenham ocasionado mortalidade nos espécimes de girinos, os efeitos a longo prazo desses tratamentos ainda não são bem compreendidos. SCHWEIZER et al., (2019), demonstraram que a exposição dos girinos da espécie *R. temporaria* ao formulado VectoBac^(R) WG não afetou a sobrevivência dos espécimes durante 11 dias de avaliação, mas induziu significativos biomarcadores para proteotoxicidade, neurotoxicidade ou ação metabólica em condições de campo. Além disso, foram encontrados resultados significativos relacionados a biomarcadores enzimáticos de desintoxicação.

EMPEY et al., (2021) avaliaram alguns efeitos em anfíbios, como sobrevivência, crescimento, eclosão, metamorfose, topologia e biomarcadores, em relação a produtos à base de Bti e Btk. Portanto, são necessárias mais investigações e abordagens para encontrar novas respostas sobre esse organismos. Dessa forma, o estabelecimento de novos testes com concentrações maiores, biomarcadores e quantificação de proteínas dos componentes celulares é fundamental para avançar na avaliação do risco potencial desses bioinseticidas. Além disso, contribuirá para um melhor entendimento dos efeitos em anfíbios expostos aos produtos de *Bacillus* a longo prazo.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os componentes celulares da linhagem GD02.13 e AM65-52 apresentaram eficácia para o controle de *A. aegypti* em condições de semicampo durante 7 semanas;
- ✓ A linhagem GD02.13 foi mais eficiente que a linhagem padrão AM65-52 em todas as condições testadas;
- ✓ Os espécimes de girinos não apresentaram mortalidade quando expostos as concentrações dos componentes celulares das linhagens GD02.13 e AM65-52;
- ✓ No entanto, são necessário mais estudos, para avaliação da atividade fisiológica e metabólica dos girinos expostos as linhagens GD02.13 e AM65-52;
- ✓ Dessa forma, a linhagem de *Bacillus* da Região Amazônica apresenta potencial como agente entomopatogênico para o controle de culicídeos no Brasil.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACHEE, N. L.; GRIECO, J. P.; VATANDOOS, H.; SEIXAS, G.; PINTO J, et al. Correção: Estratégias alternativas para o controle de arbovírus transmitidos por mosquitos. **PLOS Doenças Tropicais Negligenciadas** 13 (3): e 0007275. 2019.

ADANG, M. J.; CRICKMORE, N. JURAT-FUENTES, J. L. Diversidade de toxinas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* e mecanismo de ação. Em: Dhadialla TS Gil SS, editores. **Avanços na fisiologia dos insetos**. Oxford Imprensa Acadêmica. pág. 39 – 87. 2014.

ADETORO, F. A.; et al. "Comparative Evaluation of Larvicides for Larval Source Management of Mosquitoes in Lagos, Nigeria." Egyptian Academic Journal of **Biological Sciences. A, Entomology** 15.1: 33-46. 2022.

ALLGEIER, S., et al. "European common frog *Rana temporaria* (Anura:Ranidae) larvae show subcellular responses under field-relevant *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti) exposure levels". **Environmental Research**, 162: 271 - 279. 2018.

ALLGEIER, S.; KASTEL, A.; BRUHL, C. A. Adverse effects of mosquito control using *Bacillus thuringiensis var. israelensis*: reduced chironomidae abundances in mesocosm, semiield and field studies. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 169, 786 - 796. 2019.

ANTONIOU, E.; OROVOU, E.; SARELLA, A.; LLIADOU, M.; RIGAS, N.; PALASKA, E.; LATRAKIS, G.; & DAGLA, M. Zika Vírus and the Risk of Developing Microcephaly in Infants: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 17 (11), 3806. 2020.

ARAGÃO, C. F; CRUZ, A. C. R; NUNES-NETO, J. P; MONTEIRO, H. A. O; DA SILVA, E. V. P; DA SILVA, S. P; PINHEIRO, V.C.S. Circulation of Chikungunya vírus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. **Acta. Tropica**, 186, 1– 4. 2018.

ARAÚJO, H. R. C; CARVALHO, D. O & CAPURRO M. L. *Aedes aegypti* Control Programmes in Brazil. In: Pereira, J. H. R & Vreysen, M. J. B. **Area-Wide Integrated Pest Management: Development and Field Application**, CRPress, Boca Raton, Florida, USA. *Aedes aegypti* control in Brazil. 339–366 p. 2021.

AZEVEDO, R.; OLIVEIRA, C.; VASCONCELOS, P. F. Risco do Chikungunya para o Brasil. **Revista Saúde Pública**; 49:58. 2015. 2015.

AZIZ, S., JAMSHED, S.A., MUKHTAR, T. (2024). Evaluation Of *Bacillus* Spp. As Biocontrol Agents Against Chili Leaf Spot Caused By *Xanthomonas Vesicatoria*. **J Plant Dis Prot** 131, 987997.

BALASKA, S.; FOTAKIS. E. A.; KIOULOS, I.; GRIGORAKI, L.; MPELLOU, S.; CHASKOPOULOU, A.; & VONTAS, J. Bioassay and molecular monitoring of insecticide resistance status in *Aedes albopictus* populations from Greece, to support evidence-based vector control. **Parasites & Vectors**, 13 (1), 328. 2020.

- BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Springer, Dordrecht**, p. 383-398. 2000.
- BECKER, N.; ZGOMBA, M.; PETRIC, DAHL, C; BOASE, C.; LANE, J.; et al., Mosquitoes and their Control. **Springer US, New York**. 2010.
- BENELLI, G; MEHLHORN, H. Declining malaria, rising dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. **Parasitol Res.** 115(5): 1747–1754. 2016.
- BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; & RIBEIRO P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, 38 (6), 847–852. 2009.
- Bilodeau, J. C.; Gutierrez Villagomez, J. M.; Kimpe, L. E.; Thomas, P. J.; Pauli, B. D.; Trudeau, V. L.; Blais, J. M. Toxicokinetics and Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Compounds in Wood Frog Tadpoles (*Lithobates sylvaticus*) Exposed to Athabasca Oil Sands Sediment. **Aquat. Toxicol.** 2019, 207, 217–225.
- BOTELHO, R. G. **Toxicidade de herbicidas para *Escherichia coli* e alevinos de *Ctenopharyngodon idella***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Vale Do Rio Doce, Governador. 2010.
- BRADY, O. J.; OSGOOD-ZIMMERMAN, A.; KASSEBAUM, N. J.; Ray, S. E.; DE ARAÚJO, V. E. M.; DA NÓBREGA, A. A.; Frutuoso, L. C. V.; LECCA, R. C. R.; STEVENS, A.; ZOCA DE OLIVEIRA de, B.; DE LIMA, J. M.; Bogoch, I. I.; MAYAUD, P., JAENISCH, T.; MOKDAD, A. H.; MURRAY, C. J. L.; HAY, S. I.; REINER, R. C.; & MARINHO, F. The association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil 2015–2017: An observational analysis of over 4 million births. **PLOS Medicine**, 16 (3). 2019.
- BECKER N, LÜTHY P (2017) Chapter 26—mosquito control with entomopathogenic bacteria in Europe. In: Lacey LA (ed) Microbial control of insect and mite pests, pp 379–392. **Academic Press**.
- BRAR, S. K.; et al. "Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides." **Process biochemistry** 41.2: 323-342.2006.
- BRAVO, A; GILL, S.S; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**; 49, 423±435. 2007.
- BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCIA-GÓMEZ, B. I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnol.** 6:17-26. 2013.
- BRUHL, C. A.; DESPRES, L.; FROR, O.; PATIL, C. D.; POULIN, B.; TETREAL, G.; & ALLGEIER, S. Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). **Science of the Total Environment**, 724, 137800. 2020.
- CAMPBELL, L. P.; LUTHER, C.; MOO-LLANES, D.; RAMSEY, J. M.; DANIS-LOZANO, R.; PETERSON, A. T. Climate change influences on global distributions of dengue and

chikungunya virus vectors. **Philos Trans R Soc B Biol Sci.** Apr; 370 (1665): 20140135. 2015.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A.; Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species. **Neotropical entomology**, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

CATTARINO, L.; RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; IMAI, N. CUMMINGS, D.A.T. Ferguson, N.M. Mapping global variation in dengue transmissivos intensity. **Sci. Transl. Med.** 12, 4144. 2020.

CAVALCANTE, A. C. P.; DE OLINDA, R. A.; GOMES, A.; TRAXLER, J. SMITH, M., & SANTOS, S. Spatial modelling of the infestation indices of *Aedes aegypti*: an innovativestrategy for vector control actions in developing countries. **Parasites & Vectors**, 13(1), 197.2020.

CDC. **Life Cycle of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes** | Mosquitoes | CDC. Site: n www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/aedes.2022. Acesso em maio de 2023.

CHAKRABARY, S. J. I. M. M.; WU, C.; CHAKRABARTY, P. *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. **Pest Manag Sci.** 76, 1612 - 1617. 2020.

CHAKRABARY, S. et al “*Bacillus thuringiensis* proteins: Structure, mechanism and biological controlo f insect pests”. *Bacilli* in Agrobiotechnology; Plant Stress Tolerance Bioremediation, and Bioprospecting. **Cham; Springer Internation Publishing**,581-608.2022.

CONSOLI, R. A.G.B. Longevidade dos adultos de *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) quando submetidos a diversas dietas de carboidratos e de sangue (Diptera: Culicidae). **Rev. Brasil. Biol.** 42:303-310. 1982.

CONSOLI, R. G. B. A.; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 228 P. ISBN 85 – 85676 - 03-5. Available from Scielo Books. 1994.

CRICKMORE, D. R.; ZEIGLER, J.; FEITELSON, E.; SCHNNEPF, J.; VAN, R. I. E.; D. LERECLUS, J.; BAUM, DH DEAN. Revisão da nomenclatura para as proteínas de cristal pertencentes de *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62 807-813. 1998.

CRICKMORE, N. Beyond the spore–past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology.** 101:616-619. 2006.

CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; et al. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology.** Nov; 186 :107438. 2021.

DAHMANA, H.; RAOULT, D.; FENOLLAR, F.; MEDIANNIKO, O. Insecticidal activity of bacteria from larvae breeding site with Natural Larvae Mortality: Screening of Separated Supernatant and Pellet Fractions. **Pathogens.** 9, 486. 2020.

DAROS, W.F.; RIEDER, A.; RODRIGUES, F.A.C.; MACEDO, P. C.; LEITE, M. C.; MELÃO, A.V. **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. 2009.

DERUSA, YA.; et al. “Suscetibilidade de mosquitos do complexo *Anopheles gambiae* a larvicidas microbianos em diversos ambientes ecológicos no oeste do Quênia”. **Entomologia médica e veterinária**. 33. 2: 220-227. 2019.

DESPRES, L.; LOGNEAU, C.; FRUTOS, R. Using the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* in mosquito control. In: Stoytcheva, M. (Ed), **Pesticides in the modern World, IntechOpen**, Rijeka. 2011.

DIÉDHIYOU, S. M.; L. KONATÉ, S.; DOUCOURÉ, B.; SAMB, E. A.; NIANG, O.; SY, O.; THAW, A.; KONATE, A. N.; WOTODJO, M.; DIALLO, AND GADIAGA, L. Effectiveness of three biological larvicides and of an insect growth regulator against *Anopheles arabiensis* in Senegal. **LeBulletin de la Société de Pathologie Exotique**. 110: 102–15, 2016.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY.K.D.; ANDRES, J.V.; FEATHERSTONES.R.M.;A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem .Pharmacol**.7,88-95.1961.

EMPEY, M. A.; LEFEBVRE-RAINE, M.; GUTIERREZ-VILLAGOMEZ, J. M.; LANGLOIS, V. S.; TRUDEAU, V. L. A Review of the Effects of the Biopesticides *Bacillus Thuringiensis Serotypes Israelensis* (Bti) and Kurstaki (Btk) in Amphibians. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. 2021, 80, 789–800.

FERREIRA, B. B.; **Toxicidade e Efeitos do Pesticida Atrazina sobre a Frequência de Células Mucosas na Epiderme do Lambari, *Astyanax altiparanae***. Fundação Universidade Federal do Tocantins, Araguaína. 2014.

FERREIRA-DE-BRITO, A.; RIBEIRO, I. P.; MIRANDA, R. M. D.; FERNANDES, R. S.; CAMPOS, S. S.; SILVA, K. A. B. D.; ... & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 111, 655-658. 2016.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2002.

FREITAS, D. A. et al. Síndrome congênita do zika: uma revisão sistemática. **Plos One**. v. 15. 2020.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas. Brasília: Funasa; 2001. 25. SANTOS R.C.; Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997-2002). *Revista de Saúde Pública* 2003; 37 (5): 671-673. 26. **Centers for Disease Control. Information on ROSE RI. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. Emerging Infectious Diseases**;7 (1):17-23. 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue**.Brasília:Funasa;2001.

GARZÓN, M. J.; MAFFEY, L.; LIZUAIN, A.; SOTO, D.; DIAZ, P. C.; LEPORACE, M.; SALOMÓN, O. D.; & SCHWEIGMANN, N. J. Temperature and photoperiod effects on dormancy status and life cycle parameters in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from subtropical Argentina. **Medical and Veterinary Entomology**, 35(1), 97–105. 2021.

GLUBER, D. J; REITER, P; EBI, K. L; YAP, W; NASCI, R; PATZ, J. A. Climate Variability and Change in the United States: Potencial Impacts on Vectorrand. **Environm. Health Perspectives**. 109 (2): 223-233. 2001.

GOIS, A.; WANDERSON, V.; CERQUEIRA, DOS SANTOS, R.; FERREIRA, E. P.; ROCHA, Â. M. **Mapeamento do desenvolvimento de vacinas contra Zika em fase de teste clínico com foco nas vacinas gênicas**. ISTI/SIMTEC – ISSN: 2318-3403 Aracaju/SE –Vol. 11/n.1/ p.1689-1698. 2021.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. **Pathogenic flaviviruses**. *Lancet* 371: 500 – 509. 2008.

GUBLER, D. J. Resurgent vector - borne disease as a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v.4, n.3, p. 442-450,1998.

HAMID, P. H.; NINDITYA, V. I.; PRASTOWO, J.; HARYANTO, A.; TAUBERT A.; HERMOSILLA, C. Situação atual do desenvolvimento de resistência a inseticidas *Aedes aegypti* de Banjarmasin, Kalimantan, Indonésia. **Biomed Res Int.**; 2018:1735358. 2018.

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

HARRIS, A. F.; SANCHEZ, PRATS, J.; NAZARIO, MALDONADO, N.; PIOVANETTI FIOLE, C.; GARCÍA PÉREZ, M.; RAMÍREZ-VERA, P.; MIRANDA-BERMÚDEZ, J.; ORTIZ, M., & DECHANT, P. An evaluation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (AM65-52) treatment for the control of *Aedes aegypti* using vehicle-mounted WALS® application in a densely populated urban area of Puerto Rico. **Pest Management Science**, 77 (4), 1981–1989. 2021. <https://doi.org/10.1002/ps.6227>

HUANG, MUGEN.; HU, LINCHAO.; ZHENG, BO. Comparing the efficiency of Wolbachia driven *Aedes* mosquito suppression strategies. **J. Appl. Anal. Comput**, v. 9, n. 1, p. 211-230, 2019.

JALALI, E.; MAGHSOUDI, S.; NOROOZIAN, Ebrahim. A novel method for biosynthesis of different polymorphs of TiO₂ nanoparticles as a protector for *Bacillus thuringiensis* from Ultra Violet. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 426, 2020.

JALLOULI, W SELLAMI, S., M.& TOUNS, S. Efficacy of olive mill wastewater for protecting *Bacillus thuringiensis* formulation from UV radiations. **Acta Trop**. 140, 19-25. 2014.

JOHNSON, B. J; MANBY, R; DEVINE, G. J. Performance of an Aerially Applied Liquid *Bacillus thuringiensis* Var. *israelensis* formulation (strain AM65-52) against mosquitoes in mixed saltmarsh–mangrove systems and fine-scale mapping of mangrove canopy cover using affordable drone-based imagery. **Pest Management Science**. 76 (11): 3822–31. 2020.

JONES, R.; KULKARNI, M. A.; DAVIDSO, T. M. V.; TALBOT, B.; RADAM-LAC. Research Team Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. **PLOS ONE**, 15, e 0220753. 2020.

KATAK, R. M.; ROCHA, E. M.; CAMPOS-DE-OLIVEIRA, J.; MUNIZ, V. A.; DE OLIVEIRA, R.; FERREIRA, F. A. S.; SILVA, W. R., *et al.*, Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of supernatant and pellet fractions from cultured *Bacillus* spp. isolated from Amazonia microenvironments. **Tropical medicine and**. 2021.

KATAK, R. D. M.; CINTRA, A. M.; BURINI, B. C.; MARINOTTI, O.; SOUZA-NETO, J. A., & ROCHA, E. M. Biotechnological Potential of Microorganisms for Mosquito Population Control and Reduction in Vector Competence. **Insects**, 14(9), 718. 2023.

KUSRIASTUTI, R.; SUTOMO, S. Evolução do programa de prevenção e controle da dengue na Indonésia Boi Dengue, 29 p.1-7. Disponível em: <https://apps.who.int/irirs/handle/10665/164013>. **Infectious Disease**. 6 (2): 104. 2005.

LAHONDÈRE, C. C.; OKUBO, R. P.; WOLFF, G. H.; CHAN, J. K.; AKBARI, O. S.; et al., The olfactory basis of orchid pollination by mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 117,708-716. 2020.

LAJMANOVICH, RAFAEL, C.; *et al.* " Toxicity of *Bacillus thuringiensis var israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles." **Enviromental Research**. 136:205-212. 2015.

LAZARTE, N.; LOPEZ, R. P.; GHIRINGHELLI, P. D.; BERÓN, C. M. *Bacillus wiedmannii* biovar *thuringiensis*: a specialized mosquitocidal pathogen with plasmids from diverse origins. **Genome Biology and Evolution**. 2018. doi:10.1093/gbe/evy211.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of CryI gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains by use of DNA microrrays **Appl. Environ. Microbiol.**, 71,5391-5398. 2005.

LEMAUX, P. G. Genetically Engineered Plants and Foods: A Scientist's Analysis of the issues (Part I). **Annu. Rev. Plant Biol.**, 59771-812. 2008.

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

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos de Diagnóstico. In: TRABULSI, L. R.; MELO-SANTOS, M. A. V.; ARAÚJO, A. P.; RIOS, E. M. M.; REGIS, L. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis serovar. israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. **Biological Control**, v. 49, n. 2, p.186-191, 2009.

MELO-SANTOS, M. A. V.; ARAÚJO, A. P.; RIOS, E. M. M.; REGIS, L. Long lasting

persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *Israelenses* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. **Biological Control**, v. 49, n 2, p. 186-191, 2009.

MENDOZA, G.; ESPARZA, E.; AYALA, J.; Mercado, M.; Godina, S., Hernández, M.; & Olmos, J. O espectro citocida de toxinas *Bacillus thuringiensis*: De insetos a células cancerosas humanas. **Toxins**, 12 (5), 290-301. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Chikungunya: manejo clínico**. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa. www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue;2023.

MOYES, C. L.; VONTAS, J.; MARTINS, A.; NG, L. C.; KOOU, S. Y.; DUSFOUR, I.; RAGHAVENDRA, K.; PINTO, J.; CORBEL, V. DAVID, J.-P.; *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLOS Negl. Trop. Dis.** 11, e 0005625. 2017.

MSUGUPAKULYA, B. J., NGAJUMA, S. K., NGAYAMBWA, A. N., KIDWANGA, B. E., MPASUKA, I. R., SELVARAJ, P., ... & OKUMU, F. O. (2024). Influence of larval growth and habitat shading on retreatment frequencies of biolarvicides against malaria vectors. **Scientific Reports**, 14(1), 1002.

NASSER, S.; DA COSTA, M. P. M.; FERREIRA, I. L. DE M.; & LIMA, J. B. P. k-Carrageenan-*Bacillus thuringiensis* israelensis hydrogels: A promising material to combat larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, 2, 100125. 2021.

OLIVEIRA, J. C.; **Seleção de *Bacillus spp.* da Amazônia Brasileira portadores do gene Chi (quitinase) para o controle biológico de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)**. Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Estratégia global para prevenção e controle da dengue 2012–2020**. Genebra: A Organização; 2012. Acesso em 31/07/2022.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **DENGUE Y DENGUE hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**. Washington, DC: OPS;1995.

ORTIZ, A.; SANSINENEA, E.; *Baccillus thuringiensis* bases biopesticides for integrated crop management, In: Biopesticides: Advances in Bio-inoculantes (Eds, Rakshit A, Singh Meena V, Abhilash PC, Sarna BK, Singh HB, Fraceto L, Parihar M, Singh AK). **Elsevier Woodhead Publishing**.z Vol 2, p.1-6. 2021b.

PAULEY, ALLEY, L.R.; EARLI, J.E.; SEMLISTSCH. R.D.; Ecological Effects and Human. Use of Commercial Mosquito Insecticides in Aquatic Communities.vol 49. **BIDONE**. 2015.

PEACH, D. A. H; GRIES, G. Nectar thieves or invited pollinators. A case study of tansy flowers and common house mosquitoes. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 10, p. 497-506, 2016.

POLANCZYK, R. A. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Piracicaba, 2004. 158p. Tese (Doutorado)-Escola Superior, 2004.**

POULIN, B.; GAETAN, L.; and LEIRE, P. "Red flag for green spray: adverse trophic effects of Bti on birds." **Journal of Applied Ecology** 47.4:889.2010.

QUIROZ, M. H.; RODRÍGUEZ-CASTRO, A.; Aquatic insects as predators of mosquito larvae. *Journal of the American mosquito control association*, 23.sp2: 110-117.2007

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Editora da UEM, 137P. Maringá, 2013.

RITCHIE, S.; RAPLEY, L.; & BENJAMIN, S. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) proporciona controle residual do *Aedes aegypti* em pequenos recipientes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 82 (6), 1053-1059. 2010.

ROCHA, L.A; TAUIL, P.L.; Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 42(1): 18-22, jan-fev, 2009.

ROH, J. Y; CHOI, J. Y; L. I, M. S; JIN, B. R; J. E, Y. H.; *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 17 (4): 547 -- 59; 20:5. 2007.

ROSAS-GARCIA, N.M.; Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. **Resente Patentes on Biotechnology**, 3 (1):28-36. 2009.

ROSE, R.; Pesticides and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management. **Emerging Infectious Diseases**, 7(1), 17–23.2001.

SUSETYO, R.; D. et al. Potential biocontrol agent of indigenous *Bacillus sp.* EG6. 4: Molecular identification, larvicidal toxicity, and mechanism of actions. **BIODIVERSITAS.**, v. 23, n. 10, p. 5431-5438, 2022.

SANCHIS, V.; From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. **A review. Agronomy for sustainable development**, 31(1), 217-231. 2011.

SANSINENA, E.; ORTIZ, A.; MELANIM. A photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Biotechnol Lett**. 37:487-490. 2015.

SANTOS, V. S. V.; & PEREIRA, B. B.; Properties, toxicity and current applications of the bio-larvicidal spinosad. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 23(1), 13–26. 2020.

SASMITA, H.I.; NEOH, K.B.; YUSMALINAR, S, ANGGRAENI, T, CHANG, N.T. BONG, L.J, et al. Vigilância por ovitrampa de mosquitos vetores da dengue na cidade de Bandung, província de Java Ocidental, Indonésia. **PLOS Negl Trop Dis.**; 15(10): e 0009896.h. 2021.

SIDDIQUE, R. *et al.* Zika virus potentiates the development of neurological defects and microcephaly: Challenges and control strategies. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 319, 2019.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; Influência no período quiescência dos ovos sobre o ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Dípteras Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 32: 349-355. 1999.

SILVA, NAYARA, TEIXEIRA, RICARDO, CARDOSO, CLEVER, JUNIOR, JOÃO BOSCO, COELHO, GIOVANINI, OLIVEIRA, ELLEN. Vigilância de Chikungunya no Brasil: desafios no contexto da saúde pública. **Epidemiol. Serv. Saúde**. 27. 3 de set. 2018.

SILVA, SAMILO, JARLUS, BRITO et al. Complications arising from congenital Zika virus infection. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e1610313029- e1610313029. 2021.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; B, Mariangela. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, genetics and evolution**, 67: 191-209.2019.

SCHWEIZER, M.; MIKSCH, L.; KÖHLER, H.-R.; TRIEBSKORN, R. Does Bti (*Bacillus Thuringiensis* Var. *Israelensis*) Affect *Rana Temporaria* Tadpoles? Ecotoxicol. **Environ. Saf.** 2019, 181, 121–129

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B. Rafael, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 59: 325-35,1998.

TADEI, W. P; RODRIGUES I. B.; RAFAEL, M. S.; SAMPAIO, R. T. M.; MESQUITA, H. G; PINHEIRO, V. C. S.; ZEQUI, J. A. C.; ROQUE, R. A.; DOS SANTOS, J. M. M. Adaptive processes control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. **Hydrobiologia (The Hague. Print)**, v. 1, p. 1-18, 2017.

TOLLE, M. A.; Mosquito-borne *Diseases*. atual Problema Pediatr Adolesc. **Saúde**, 39,97-140. 2009.

TORRES, S.J; LINDSAY, S.W.; The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14(1), e 0007831. 2020.

TORRES, P. F. F.; BALDINOTTI, H. DA, S.; COSTA, D. A.; DA, MIRANDA, C. M.; de & CARDOSO, A. F.; Influence of pH, light, food concentration and temperature in *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) larval development. **EntomoBrasilis**, 15, e 999. 2022.

VASILASK, 2013. (<http://News.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-denguevirustype>

50 years).

VIANA, J. L.; *et al.* Larvicide activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. in simulated field condition. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 43248-43264, 2021.

VIEIRA-NETA, M. R. A.; SOARES-DA-SILVA, J.; VIANA, J. L.; SILVA, M. C.; TADEI, W. P.; & PINHEIRO, V. C. S.; Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, 81(4), 872–880. 2021.

VU, M.; NAVARRO-MARTÍN, L.; GUTIERREZ-VILLAGOMEZ, J. M.; TRUDEAU, V. L. Development of an in Vitro Ovary Culture System to Evaluate Endocrine Disruption in Wood Frog Tadpoles. **J. Toxicol. Environ. Heal. Part A** 2015, 1137

WARD, W. W.; PRENTICE, H. J.; ROTH, A. F.; CODY, C. W.; & REEVES, S. C. Spectral perturbations of the Aequorea green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* 35: 803-808. 1982.

WILSON, A. L; COURTENAY, O; KELLY-HOPE, L. A; SCOTT, T. W; TAKKEN, W; TORR, S.J; LINDSAY, S.W. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14 (1), e 0007831. 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. 2005. Acesso em 08 de agosto de 2023. Disponível em: WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Larval source management: a supplementary measure for malaria vector control – na operational manual**.2013 Acesso em 08 de agosto de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **Guidelines for laboratory and field-testing of mosquito larvicides world health organization communicable disease control, prevention and eradication who pesticide**. 2005. Acesso em 26 de junho de 2022.

WORLD, ORGANIZATION. **Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations**. 2016. Acesso em 26 de junho de 2023.

WORLD, HEALTH, ORGANIZATION. **Informal Consultation on the Development of Bacillus sphaericus as Microbial Larvicide**; WHO: Geneva, Switzerland, 24p. 1985.

WORLD, HEALTH. ORGANIZATION. **DISEASE OUTBREAK OUTBREAK NEWS; Geographical expansion of cases of dengue and chikungunya beyond the historical areas of transmission in the Region of the Americas**. Acesso em 21 de junho de 2023.

WRBU – WALTER, REED, BIOSYSTEMATICS, UNIT.; **Mosquito identification resources**. 2022. <http://www.wrbu.org/VeclD MQ.html>).

WULIANDARI, JR, HOFFMANNA, A. TANTOWIJOYO, W.; Endersby-Harshman N.M. Frequency of Kdr mutations in the voltage -sensitive sodium channel (VSSC) gene in *Aedes aegypti* from Yogyakarta and implications for Wolbachia-infected mosquito trials. **Parasites**

Vectors. 13(1):429. 2020.

XIA, S. *et al.* Larval breeding sites of the mosquito *Aedes aegypti* in forest and domestic habitats in Africa and the potential association with oviposition evolution. **Authorea Preprints**, 2021.

ZARA, A. L.; SANTOS, S. M. D.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E.; Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 25: 391- 404, 2016.

ZETTEL, C.; KAUFMAN, P.; Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). **EDIS**, v. n. 2, p.1-8, 2009.

ZHANG, L. ZHANG, X.; Zhang, Y.; W. U, S.; GELBI, I.; Xu, L.; GUAN, X.A new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. **Sci. Rep.** 39425. 2016.

YOUNG, S. D.; GAVEL, M. J.; GUTIERREZ-VILLAGOMEZ, J. M.; FORBES, M. R.; ROBINSON, S. A. Assessment of Sublethal Ecotoxicity of pubs.acs.org/est Article Solvents on Larvae of a Model Native Amphibian (*Lithobates Pipiens*). **J. Appl. Toxicol.** 2020, 40, 483–492.