



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS DE CODÓ
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS NATURAIS/BIOLOGIA

BIANCA GEOVANA VIANA PEREIRA

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1911) PARA CONTROLE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA, CULICIDAE)

CODÓ-MA

2023

BIANCA GEOVANA VIANA PEREIRA

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1911) PARA CONTROLE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA, CULICIDAE)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Maranhão-UFMA, como requisito para obtenção do título de Licenciada em Ciências Naturais com habilitação em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Joelma Soares da Silva
Coorientadora: Ma. Katiane dos Santos Lobo

CODÓ-MA

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Pereira, Bianca Geovana Viana.

Otimização do cultivo de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 para controle de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 Diptera, Culicidae / Bianca Geovana Viana Pereira. - 2023.

39 p.

Coorientador(a): Katiane dos Santos Lobo.

Orientador(a): Joelma Soares da Silva.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Naturais -
Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Codó,
Maranhão, 2023.

1. Arboviroses. 2. Bactéria entomopatogênica. 3.
Controle biológico. 4. Vetor. I. Lobo, Katiane dos
Santos. II. Silva, Joelma Soares da. III. Título.

BIANCA GEOVANA VIANA PEREIRA

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1911) PARA CONTROLE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA, CULICIDAE)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Maranhão-UFMA, como requisito para obtenção do título de Licenciada em Ciências Naturais com habilitação em Biologia.

APROVADA EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Joelma Soares da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA, *Campus VII*

Profa. Dra. Antonia Suely Guimarães e Silva
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Profa. Ma. Juliete Lima Viana
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Aos meus pais, Janete Galvão Viana e João Francisco de Sousa Pereira, por todo esforço que tiveram ao longo da minha jornada acadêmica, pelo apoio e incentivo. Bem como, a minha irmã Beatriz de Kássia Viana Pereira, que sempre esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Universo por todos os momentos incríveis que tive a oportunidade de viver e por todas as pessoas maravilhosas que foram colocadas em meu caminho.

A Universidade Federal do Maranhão, *Campus VII*, pela oportunidade de realizar essa etapa importante da minha vida, e me proporcionar crescimento pessoal e profissional.

A profa. Dra. Joelma Soares da Silva pela orientação, confiança e oportunidades que tornaram possível a realização deste trabalho, assim como, por ter me acompanhado durante minha formação acadêmica.

A Ma. Katiane dos Santos Lobo pela coorientação e relevante contribuição na realização deste trabalho.

Ao corpo docente do Curso de Ciências Naturais/Biologia, da Universidade Federal do Maranhão, *Campus VII*, que me acompanharam e contribuíram de forma significativa a minha formação.

Ao grupo de pesquisa Controle Biológico de Insetos Vetores, da Universidade Federal do Maranhão, pelo acolhimento e suporte durante a realização deste trabalho, em especial, a minha colega Mônica pela parceria e força.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, a qual fui bolsista durante os anos 2019 a 2022 desenvolvendo pesquisas que foram importantes na construção da minha carreira acadêmica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, pelo financiamento e apoio.

Ao Laboratório de Entomologia Médica – LABEM da Universidade Estadual do Maranhão, pela parceria e pela concessão do espaço para realização de parte deste trabalho.

A minha família, minha mãe Janete Galvão Viana e meu pai João Francisco de Sousa Pereira, por sempre me apoiarem, incentivarem, e serem tão dedicados para que eu tenha o melhor. Bem como, a minha irmã Beatriz de Kássia Viana Pereira, pelo companheirismo e apoio, a qual eu posso contar em todos os momentos. E aos meus avós, tios, primos e cunhado que se fizeram presentes e contribuíram de alguma forma.

Aos colegas de curso, especialmente Nilcelane dos Santos e Jhony Fernandes, grandes amigos que ganhei na graduação, que me acompanharam, apoiaram e incentivaram durante toda esta caminhada.

Aos amigos que estiveram comigo nesta caminhada, pelo companheirismo, amizade, e por me proporcionarem sorrisos sinceros.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta, e fizeram parte da minha trajetória acadêmica.

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) considerada o patógeno de insetos de maior sucesso, é muito estudada devido suas propriedades inseticidas no controle de mosquitos vetores de doenças ao homem. Para produção de um biolarvicida a base de *B. thuringiensis* a partir de linhagens isoladas de diferentes ambientes, é necessário conhecer as condições de crescimento de cada linhagem, para assim, obter um bom rendimento de toxinas/proteínas inseticidas, com custo de produção reduzido. Logo, este trabalho teve por objetivo obter os parâmetros de crescimento, físicos e químicos, em laboratório para linhagens de *B. thuringiensis* ativas a mosquitos vetores de doenças. Dezoito combinações de pH e temperaturas foram testadas para obtenção das melhores condições de crescimento para cada um dos três melhores isolados do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA), BtMA-690, BtMA-750 e BtMA-1114. Para comprovação das melhores condições de crescimento foi realizada a quantificação do inóculo para obtenção da concentração de esporos/mL e a determinação da massa celular (g/L). Foram utilizadas em bioensaios com larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), para confirmação de toxicidade, as CL₅₀ dos três isolados cultivados nas condições extremas de temperatura (26 °C e 36 °C) com os pH (6,0, 7,0 e 8,0), assim como, as duas melhores condições de crescimento de cada isolado. Os isolados BtMA-690 e BtMA-750 mostraram melhores condições de crescimento nas combinações de 34 °C com pH 8,0 para concentração de esporos/mL e 30 °C com pH 6,0 para massa celular, enquanto, o BtMA-1114 apresentou crescimento mais satisfatório na temperatura de 28 °C com pH 7,0 para concentração de esporos/mL e 34 °C com pH 6,0 para massa celular. Para BtMA-690, verificou-se que das condições extremas a maior mortalidade encontrada foi de 35% até 72 horas, obtida da combinação 26 °C com pH 6,0. Observou-se ainda, mortalidade inferior a 20% para as melhores condições de massa celular e concentração de esporos/mL. Para o BtMA-750 houve mortalidade acima de 90% com 72 horas de experimento, para quase todas as condições extremas, assim como, para as melhores condições de crescimento para massa celular e concentração de esporos/mL. Por outro lado, para o BtMA-1114, nas condições extremas a maior mortalidade foi 14% com 72 horas, obtida somente para a combinação 36 °C com pH 7,0 e inferior a 10% e 40% para as melhores condições de crescimento para massa celular e concentração de esporos/mL, respectivamente. Os resultados encontrados possibilitarão melhorar as atividades de controle de larvas de mosquitos, promovendo a produção de inseticidas biológicos de baixo custo, por meio da otimização do crescimento das linhagens de *B. thuringiensis* em laboratório.

Palavras-chave: Bactéria entomopatogênica. Controle biológico. Arboviroses. Vetor.

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) considered the most successful insect pathogen, is much studied due to its insecticidal properties in the control of mosquito vectors of human diseases. In order to produce a biolarvicide based on *B. thuringiensis* from isolated strains from different environment, it is necessary to know the growth conditions of each strain, in order to obtain a good yield of insecticidal toxins/proteins, with reduced production costs. Therefore, this work aimed to obtain the growth parameters, physical and chemical, in the laboratory for strains of *B. thuringiensis* active on disease vector mosquitoes. Eighteen pH and temperature combinations were tested to obtain the best growth conditions for each of the three best isolates from the Banco de Bacilos Entomopatogênico do Maranhão (BBENMA), BtMA-690, BtMA-750 and BtMA-1114. To prove the best growth conditions, the inoculum was quantified to obtain the spore concentration/mL and the determination of the cell mass (g/L). In bioassays with *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762), to confirm toxicity, the LC50 of the three isolates cultivated under extreme conditions of temperature (26 °C and 36 °C) with pH (6.0, 7, 0 and 8.0), as well as the two best growth conditions for each isolate. BtMA-690 and BtMA-750 isolates showed better growth conditions in combinations of 34 °C with pH 8.0 for spore concentration/mL and 30 °C with pH 6.0 for cell mass, while BtMA-1114 showed more satisfactory growth at a temperature of 28 °C with pH 7.0 for spore concentration/mL and 34 °C with pH 6.0 for cell mass. For BtMA-690, it was verified that among the extreme conditions the highest mortality found was 35% up to 72 hours, obtained from the combination of 26 °C with pH 6.0. It was also observed, mortality lower than 20% for the best conditions of cell mass and concentration of spores/mL. For BtMA-750 there was mortality above 90% with 72 hours of experiment, for almost all extreme conditions, as well as for the best growth conditions for cell mass and concentration of spores/mL. On the other hand, for BtMA-1114, under extreme conditions, the highest mortality was 14% at 72 hours, obtained only for the combination of 36 °C with pH 7.0 and less than 10% and 40% for the best growth conditions for cell mass and spore concentration/mL, respectively. The results found will make it possible to improve mosquito larvae control activities, promoting the production of low-cost biological insecticides, by optimizing the growth of *B. thuringiensis* strains in the laboratory.

Keywords: Entomopathogenic bacteria. Biological control. Arboviruses. Vector.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1. Mosquitos e sua importância epidemiológica	12
2.2. <i>Aedes aegypti</i> e a transmissão de patógenos	12
2.3. Controle de mosquitos vetores de doenças	14
2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> no controle de mosquitos	15
2.5. Parâmetros de crescimento bacteriano	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Seleção dos Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> para estudo dos parâmetros de crescimento.....	18
4.2. Avaliação dos fatores de crescimento de linhagens de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
4.2.1. Determinação do pH e temperatura	20
4.3. Bioensaios de confirmação de toxicidade com isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> obtidos de diferentes condições de crescimento.	21
4.3.1. Bioensaio com isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> crescidos em condições extremas de temperatura	21
4.3.2. Bioensaio com isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> cultivados nas melhores condições de crescimento	22
4.4. Manutenção de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório para realização dos bioensaios	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Avaliação dos fatores de crescimento de linhagens de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
5.2. Confirmação de toxicidade dos isolados.....	26
5.2.1. Bioensaio com isolados crescidos em condições extremas de temperatura	26
5.2.2. Bioensaio com isolados cultivados nas melhores condições de crescimento	28
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

O controle de mosquitos vetores de agentes patogênicos ao homem, como *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, vetores da Dengue, Malária e Filariose linfática respectivamente, é um desafio de saúde pública nacional (FERREIRA; CASTRO, 2016; LIMA-CAMARA, 2016; BRASIL, 2020; 2021).

São discutidas novas alternativas para o controle dessas espécies, pois há diversos estudos que comprovam a resistência das populações desses mosquitos a diferentes classes de inseticidas químicos (FLORES-SUAREZ *et al.*, 2016; MOYES *et al.*, 2017; VARGAS *et al.*, 2022). Com isso, há necessidade de substituição da utilização de inseticidas químicos, sobretudo pelos inseticidas biológicos, os quais são considerados ecologicamente seguros (SCOPEL; ROZA-GOMES, 2011; GUO *et al.*, 2015; BRÜHL *et al.*, 2020).

Dentre o universo de agentes de controle biológico, a espécie *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) é o patógeno de insetos de maior sucesso, pois apresenta múltiplas vantagens, principalmente quando comparado ao controle químico, que ocasionam sérios problemas à saúde humana e ao meio ambiente (ALVES, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003; BRAVO *et al.*, 2011; SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017; PEÑA; PAMPHILE; OLIVEIRA, 2022).

A bactéria *B. thuringiensis* é muito estudada pela comunidade científica, devido suas propriedades inseticidas, pois apresenta cristais proteicos que são formados por δ -endotoxinas, proteínas Cry e/ou Cyt, os quais são tóxicos para uma ampla gama de insetos, porém de forma específica para cada grupo (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; BEN-DOV, 2014; HECKEL, 2020).

Essa bactéria possui um grande potencial no controle de mosquitos vetores e, diversas linhagens já foram isoladas com atividade específica para mosquitos em diferentes partes do mundo, principalmente em estudos com larvas de *A. aegypti* (CAMPANINI *et al.*, 2012; EL-KERSH *et al.*, 2016; SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017; LOBO *et al.*, 2018; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021).

Devido à boa efetividade de *B. thuringiensis* no controle de vetores, diversos estudos foram realizados no sentido de buscar formas alternativas para produção dessa bactéria em condição de laboratório (PEREIRA; MARTINS, 2016; MOURÃO, 2017; LOBO *et al.*, 2018; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021). A escolha do meio de cultivo adequado, e a otimização das condições de crescimento de cada linhagem é extremamente importante para o sucesso de produção da bactéria. O crescimento ideal das linhagens da bactéria, deve proporcionar a máxima produção dos cristais tóxicos, com custo mínimo de insumos em laboratório (COUCH, 2000; MOURÃO, 2017).

Atualmente, o Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA) é um dos maiores da região Nordeste do Brasil, e dispõe de linhagens com elevada toxicidade em larvas de vetores de doenças, as quais foram isoladas de diferentes biomas (VIANA *et al.*, 2021; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021).

Devido essas linhagens terem sido isoladas de biomas diferentes, é preciso buscar as condições físicas e químicas necessárias para o melhor crescimento de cada uma, para assim também melhorar a atividade larvicida. A otimização de crescimento da bactéria em laboratório pode subsidiar a produção futura de bioproduto maranhense, de baixo custo, para o controle de mosquitos vetores.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Mosquitos e sua importância epidemiológica

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Culicidae, para qual são conhecidas atualmente 3.619 espécies, classificadas em duas subfamílias: Anophelinae, com três gêneros e Culicinae com 110 gêneros, os quais possuem ampla dispersão e adaptabilidade, sendo distribuídas em todo o globo terrestre e apresentando maior diversidade em ambientes de floresta tropical (HARBACH, 2022).

Historicamente, o grupo atrai atenção devido seu papel na transmissão de muitos patógenos importantes ao homem, como vírus, bactérias, protozoários e nematódeos, contribuindo para graves problemas de saúde pública. Os mosquitos são a causa indireta de mais morbidade e mortalidade entre os seres humanos do que qualquer outro grupo de organismos (HARBACH, 2022).

Entre as principais doenças as quais os mosquitos são vetores dos agentes etiológicos estão a Dengue, Zika, Chikungunya, Febre amarela, Malária e Filariose (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; WHO, 2017; 2020). Essas doenças têm como principais vetores de seus agentes patogênicos ao homem os mosquitos dos gêneros *Aedes* Meigen, 1818, *Anopheles* Meigen, 1818 e *Culex* Linnaeus, 1758. Uma das espécies mais estudadas é o *A. aegypti*, devido a seu papel como principal vetor de arboviroses (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; TERRA *et al.*, 2017). O *A. aegypti* é o vetor que apresenta o maior risco de transmissão de arbovírus nas Américas (PAHO/WHO, 2022).

2.2. *Aedes aegypti* e a transmissão de patógenos

Oriundo do Velho Mundo, o *A. aegypti* é um mosquito originalmente descrito no Egito, o qual possui atualmente distribuição mundial, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais.

No Brasil, a espécie foi introduzida durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

É um mosquito altamente domiciliado e antropófilo, que vive diretamente associado às habitações humanas, se reproduzindo em qualquer recipiente artificial ou natural que contenha água, mostrando-se capaz de usar diferentes tipos de micro-habitat, o que facilita a sua dispersão. Sua presença é mais comum em áreas urbanas e a infestação é mais intensa em regiões com alta densidade populacional, principalmente, em áreas com ocupação desordenada, onde as fêmeas têm mais oportunidades para alimentação e uma maior quantidade de criadouros para desovar (FORATTINI, 2002; FERREIRA-KEPPLER *et al.*, 2017; BRASIL, 2022a; PAHO/WHO, 2022) (Figura 1).

Figura 1: Fêmea do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

O *A. aegypti* já foi encontrado infectado por múltiplos patógenos. No Brasil, o mosquito é transmissor de diferentes agentes patogênicos ao homem, como vírus da Dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela Urbana, entre outros (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; BRASIL, 2022a). A transmissão desses patógenos ao homem se dá pela picada das fêmeas do *A. aegypti* infectadas, que adquirem o patógeno após o repasto sanguíneo em um indivíduo ou animal infectado (FORATTINI, 2002).

A Dengue é a infecção viral mais prevalente transmitida por esse mosquito no mundo, sua incidência tem crescido nas últimas décadas, e atualmente cerca de metade da população mundial corre risco de contrair a doença, estima-se 3,9 bilhões de pessoas em mais de 129 países (WHO, 2022). Esta, é reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública nas Américas, principalmente no Brasil. No ano de 2022, até 47ª semana epidemiológica, foi registrado mais de 1 milhão de casos prováveis da doença, sendo confirmados 1.410 casos de Dengue grave e 975 óbitos (BRASIL, 2022b).

As doenças Zika e Chikungunya também preocupam os órgãos de saúde pública do mundo. No Brasil, até a semana epidemiológica 46 de 2022 ocorreram 9.256 casos prováveis de Zika, sendo confirmado um óbito. Com relação aos dados de Chikungunya, até a semana epidemiológica 47 de 2022 ocorreram 170.199 casos prováveis da doença, sendo confirmados 85 óbitos (BRASIL, 2022b).

2.3. Controle de mosquitos vetores de doenças

A distribuição geográfica das arboviroses está diretamente relacionada a expansão do mosquito vetor, e para diminuir o avanço dessas doenças o foco principal são os esforços de controle dos mosquitos, sendo considerada uma das melhores estratégias. Contudo, um método efetivo para o controle desses insetos ainda constitui um grande desafio para os órgãos de saúde pública em todo mundo (WHO, 2017).

Devido o papel dos mosquitos na transmissão de patógenos ao homem, o conhecimento acerca do controle dessas espécies é amplamente estudado. Historicamente, no Brasil, o combate dos mosquitos vetores é feito com aplicações de inseticidas químicos. Há várias décadas, o controle químico tem sido a estratégia mais empregada para suprimir populações de vetores durante campanhas de saúde pública contra doenças (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; BORGES, 2018).

O controle químico, utilizando larvicidas e inseticidas para matar as larvas e mosquitos adultos inclui os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. No entanto, a utilização destes de maneira prolongada e intensiva vem apresentando desvantagens: causam desequilíbrio nos ecossistemas, promovem a seleção de populações de mosquitos resistentes, além de serem tóxicos ao homem (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; BORGES, 2018; PEÑA; PAMPHILE; OLIVEIRA, 2022).

Diante deste cenário, têm-se buscado métodos alternativos de controle que sejam mais eficazes e ecologicamente seguros. Assim, o controle biológico vem ganhando notoriedade por se apresentar como uma alternativa segura, além de reduzir a densidade populacional dos insetos, apresenta baixo impacto ambiental, menor chance de levar à resistência e atua de forma específica (ALVES, 1998; ERTHAL-JUNIOR; GUARUS, 2011; BRÜHL *et al.*, 2020).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas em busca de alternativas biológicas para o controle de mosquitos vetores, e a utilização de bactérias entomopatogênicas vem destacando-se mundialmente como principal medida, por possuírem grande potencial no controle biológico de insetos (LACEY *et al.*, 2015). Dentre estas, a bactéria *B. thuringiensis*, considerada a espécie

de maior interesse, representa o princípio ativo mais promissor, principalmente por seu mecanismo de ação específico (ALVES, 1998; MARRONE, 2019; HECKEL, 2020).

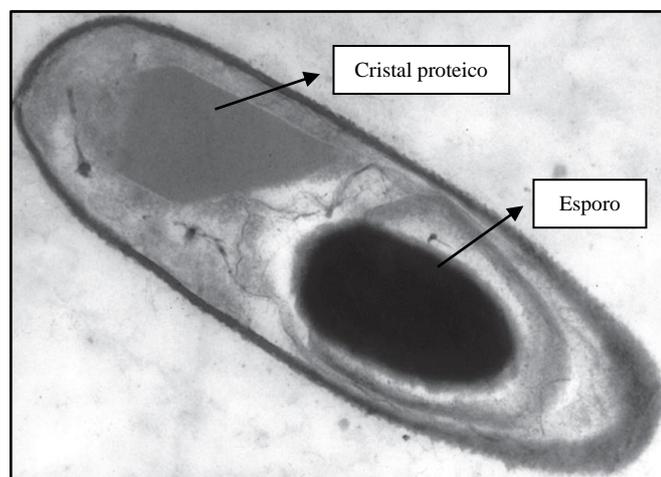
2.4. *Bacillus thuringiensis* no controle de mosquitos

O *B. thuringiensis*, pertencente à família Bacillaceae, é uma bactéria gram-positiva, aeróbica facultativa, em forma de bastonete, que cresce na faixa de temperatura de 10 a 45 °C, formadora de esporos elípticos e cilíndricos e que tem a capacidade de produzir, durante a esporulação, inclusões cristalinas altamente específicas, que são responsáveis pela atividade tóxica desta bactéria (ALVES, 1998).

A bactéria *B. thuringiensis* é isolada em todo o planeta, de diversos substratos, tais como: solo, insetos mortos, plantas, entre outros, sendo uma das espécies mais utilizadas na fabricação de inseticidas biológicos e nas aplicações de técnicas biotecnológicas para o controle de insetos em todo o mundo (POLANCZYK; ALVES 2003; GALZER; AZEVEDO-FILHO, 2016; LIU *et al.*, 2016).

A ação inseticida de *B. thuringiensis* é conferida pela presença de cristal de proteínas produzido durante a fase de esporulação, que atuam como toxinas (ALVES, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003) (Figura 2). Essas proteínas são conhecidas como δ -endotoxinas, que são compostas de duas famílias multigênicas, as proteínas Cry (Crystal) e Cyt (Citolíticas), as quais são tóxicas a insetos de diferentes ordens (HÖFTE; WHITELEY, 1989; ALVES, 1998; BADRAN *et al.*, 2016; SOBERÓN *et al.*, 2016).

Figura 2: Fotomicrografia eletrônica de *Bacillus thuringiensis* em final de esporulação, com a visualização do cristal de proteína e esporo.

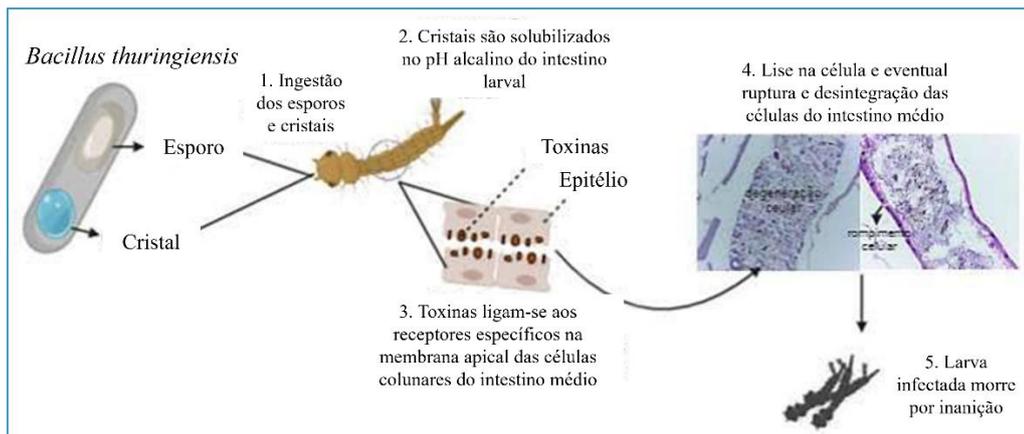


Fonte: Adaptado de Rabinovitch; Oliveira (2015).

As proteínas Cry produzidas pelo *B. thuringiensis* tornam-se tóxicas aos insetos alvo quando são ingeridas pelas larvas. Após a ingestão das inclusões cristalinas ocorre a solubilização dos cristais proteicos em pH alcalino no intestino médio das larvas liberando protoxinas, que após se tornarem tóxicas, formam poros na membrana celular do epitélio intestinal, provocando desequilíbrio iônico, aumentando a absorção de água, ruptura e desintegração das células do intestino médio, levando o inseto à paralisia e, conseqüentemente à morte (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; FIUZA, 2009) (Figura 3).

As toxinas Cyt são codificadas pelos genes cyt. Diferente das toxinas Cry, não se ligam aos receptores, mas se inserem diretamente na membrana celular, potencializando a ação inseticida das proteínas Cry (PÉREZ *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 3: Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* em larva de mosquito.



Fonte: VIANA *et al.*, 2021.

A utilização do controle biológico, por meio do uso de *B. thuringiensis* é uma das alternativas mais recomendadas. A patogenicidade da bactéria e o modo seletivo de ação, torna a sua aplicação segura, viável e eficaz, pois essa bactéria apresenta toxicidade elevada contra mosquitos, segurança ambiental, além de estarem em constante evolução, o que dificulta o surgimento de populações de insetos resistentes (BRAVO *et al.*, 2011; LACEY *et al.*, 2015; BADRAN *et al.*, 2016).

Contudo, o alto custo de produção de inseticidas a base de *B. thuringiensis*, em relação aos inseticidas químicos, a especificidade de ação e a baixa persistência do efeito larvicida em condição de campo, são alguns dos fatores que limitam o uso desses inseticidas biológicos (DEVIDAS; PANDIT; VITTHALRAO, 2014; MOURÃO, 2017; SCHMITT, 2018).

Devido ao problema do elevado custo dos bioinseticidas derivados desse entomopatógeno, a sua utilização é pouco difundida no Brasil, comparada aos países

desenvolvidos. Logo, para a ampliação do emprego de larvicidas microbianos em programa de controle de vetores, é necessário, implementação de estratégias para a diminuição dos custos de sua produção (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

A busca por novas linhagens de *B. thuringiensis* é realizada em diferentes laboratórios de todo o mundo, com intuito de obter isolados que estejam adaptadas às condições locais de cada região (REGIS *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2007; SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2015; 2017; LOBO *et al.*, 2018; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021).

O Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA) dispõe de linhagens com elevada toxicidade em larvas de *A. aegypti*, as quais foram isoladas de diferentes biomas, Cerrado, Caatinga e Amazônia, que apresentam características químicas diferenciadas (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017; LOBO *et al.*, 2018; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021). O que torna importante o estudo sobre as condições ideias de crescimento para cada um desses isolados, para um melhor rendimento bacteriano de forma específica.

2.5. Parâmetros de crescimento bacteriano

Um parâmetro importante na seleção das linhagens de *B. thuringiensis*, é a adequação do crescimento bacteriano em laboratório, como a verificação das exigências nutricionais de cada linhagem de forma específica, pois por meio da identificação das condições físicas e químicas necessárias para o melhor crescimento de cada uma, como a temperatura e o pH, é possível buscar as fontes alternativas corretas, e por fim obter um menor custo de produção (ENGELKIRK, 2012; TORTORA *et al.*, 2016).

Pode haver uma variação em relação aos parâmetros de crescimento de diferentes linhagens, o que, muitas vezes, dificulta a extrapolação dos resultados obtidos para um isolado. Diante disso, é necessário otimizar as condições de crescimento para cada um separadamente, por meio desses resultados é possível alcançar um melhor rendimento no crescimento bacteriano (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

O controle dos parâmetros temperatura e pH são fundamentais para o cultivo de *B. thuringiensis*, sendo essencial para o desenvolvimento da bactéria. A maioria das linhagens de *B. thuringiensis* crescem em temperaturas entre 15 e 45 °C, podendo também desenvolverem-se em uma ampla faixa de pH entre 5,5 e 8,5 (BERNHARD; UTZ, 1993 apud PANAROTTO, 2006, p. 72). Diversos estudos têm testado a influência dos parâmetros operacionais temperatura e pH sobre o crescimento, a esporulação e a produção de endotoxinas de *B.*

thuringiensis descrevendo valores ideais para diferentes linhagens (ÖZKAN *et al.*, 2003; PANAROTTO, 2006; KONG *et al.*, 2020; PAN *et al.*, 2021).

Portanto, como passos iniciais para a produção de um biolarvicida a base de *B. thuringiensis* a partir de linhagens isoladas de diferentes biomas, é necessário conhecer as condições de crescimento de cada linhagem, para assim, obter um bom rendimento de toxinas/proteínas inseticidas, com custo de produção reduzido.

Desta forma, a pesquisa teve a finalidade de estabelecer os parâmetros de crescimento dos isolados de *B. thuringiensis*, do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão, com o objetivo de selecionar as melhores condições para produção de inseticidas biológicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Obter as condições ótimas de crescimento para linhagens de *Bacillus thuringiensis* com elevada toxicidade para mosquitos vetores de doenças negligenciadas, em condições de laboratório.

3.2. Objetivos específicos

- Conhecer os parâmetros de crescimento físicos e químicos, pH e temperatura, em condições de laboratório para linhagens de *Bacillus thuringiensis* ativas a mosquitos vetores;
- Comparar a toxicidade de *Bacillus thuringiensis* crescidos em diferentes condições de pH e temperatura por meio de testes com a Concentração Letal Mediana - CL₅₀;
- Avaliar a atividade larvicida dos isolados de *Bacillus thuringiensis* maranhenses cultivados nas melhores condições para obtenção de massa celular e esporos, em larvas de *Aedes aegypti*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos Isolados de *Bacillus thuringiensis* para estudo dos parâmetros de crescimento.

As linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas neste trabalho foram selecionadas do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA), mantidas no Laboratório de Entomologia Médica-LABEM do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão (CESC-UEMA). O banco de bacilos dispõe atualmente de cerca de 1.500 isolados de *B. thuringiensis* provenientes dos biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga, dos

ecossistemas Mangue e Restinga do estado do Maranhão, e do bioma Caatinga do estado do Piauí, obtidos de amostras isoladas do solo, água e insetos mortos (Figura 4).

Figura 4: Fitas de papel filtro impregnadas com suspensão esporos/cristal de *Bacillus thuringiensis* armazenados em microtubos (A), estoque dos microtubos em caixas de criopreservação (B), isolados depositados no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (C).



Fonte: Acervo do LABEM.

Foram utilizadas três linhagens de *B. thuringiensis* do BBENMA, BtMA-690, BtMA-750 e BtMA-1114 (Tabela 1), as quais apresentaram maior toxicidade comprovada contra larvas de *A. aegypti*, pois para essas linhagens obteve-se menores valores de Concentração Letal Mediana - CL₅₀, de 0.004 mg/L (0.003-0.006), 0.041 mg/L (0.0300-0.063) e 0.025 mg/L (0.019- 0.030), respectivamente, quando cultivadas em meio de cultura comercial, mantidas sob as mesmas condições de crescimento (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2015, 2017; VIANA *et al.*, 2021). Além disso, na caracterização molecular dessas linhagens foi possível verificar a presença de genes que codificam para toxinas inseticidas, com diferentes perfis gênicos, incluindo combinações de toxinas Cry e Cyt (VIEIRA-NETA, 2016; SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017).

Tabela 1: Linhagens de *Bacillus thuringiensis* do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão com os respectivos dados de origem, selecionados para estudo com parâmetros de crescimento.

ISOLADOS	Substrato	Origem	Bioma
BtMA-690	Solo	Duque Bacelar-MA	Cerrado
BtMA-750	Solo	São José de Ribamar-MA	Amazônia
BtMA-1114	Inseto/Coleoptera	Mirador-MA	Cerrado

Fonte: De autoria própria.

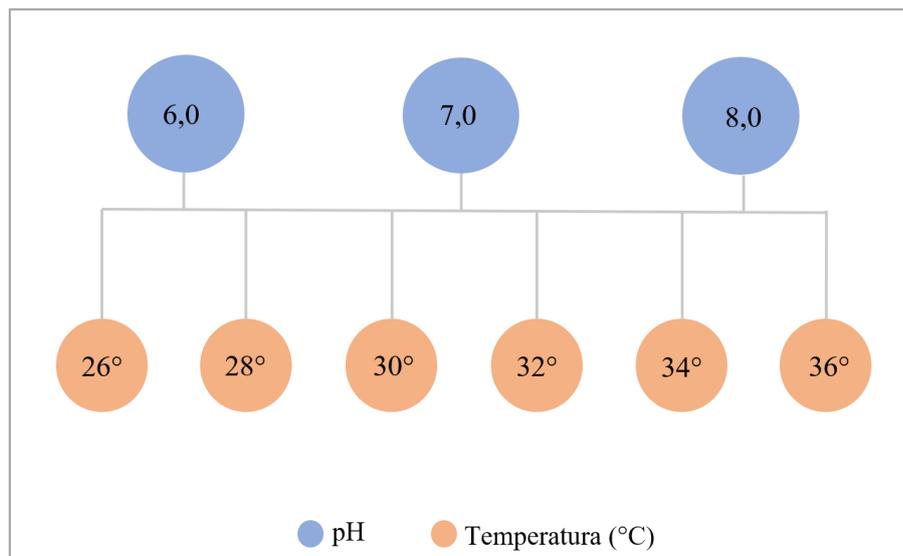
4.2. Avaliação dos fatores de crescimento de linhagens de *Bacillus thuringiensis*

Os três isolados selecionados foram submetidos a diferentes condições de pH e temperatura, para verificar as melhores condições de crescimento de cada uma das linhagens.

4.2.1. Determinação do pH e temperatura

Após crescimento em oito placas contendo meio Ágar Nutriente por 24 horas em estufa bacteriológica, todo o conteúdo de cada isolado foi raspado com auxílio de alça de platina e inoculado em 200 mL de meio Caldo Nutriente enriquecido com solução de sais e, posteriormente, incubado em agitador rotativo (*Shaker*) a 200 rpm, por cerca de cinco dias, até ser verificada a completa esporulação dos mesmos. Cada linhagem foi submetida a dezoito diferentes combinações, sendo testados três de pH (6,0; 7,0 e 8,0), combinado com seis temperaturas diferentes (26 °C, 28 °C, 30 °C, 32 °C, 34 °C e 36 °C), como demonstrado a seguir (Figura 5):

Figura 5: Esquema das diferentes combinações de pH e temperaturas as quais os isolados de *Bacillus thuringiensis* foram cultivados.



Fonte: De autoria própria.

Para ajustar o pH do meio de cultura, que é originalmente 6,0, foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio a 0,5 M.

Para comprovação das melhores condições de crescimento de cada isolado testado, foi realizada a quantificação de inóculo para obtenção da concentração de esporos/mL, além da determinação da massa celular (g/L). A quantificação de inóculo foi realizada através da técnica de placas de contagem por diluição sucessiva, de acordo com a metodologia descrita por Alves e Moraes (1998), que consiste na preparação de diluições seriadas a partir da cultura original e plaqueamento de 0,1 mL de cada diluição com auxílio de alça de *Drigalsky* em três réplicas. As

placas foram incubadas em estufa bacteriológica por cerca de 24 horas e feita a contagem de colônias para determinação de esporos viáveis, para o cálculo foram selecionadas as placas que continham de 30 a 300 colônias, sendo esse número multiplicado pela diluição que a placa representa.

Para análise da massa celular foram centrifugados os 200 mL do fermentado (meio de cultura + células bacterianas) a 5.000 rpm por 20 minutos, sendo a centrifugação realizada até a completa totalidade do conteúdo bacteriano. Em seguida foram realizadas três lavagens com água estéril, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* congelado e liofilizado por cerca de oito horas em aparelho liofilizador *Enterprise* (Terroni) e utilizado para o cálculo da massa celular, a qual foi expressa em g/L.

Os procedimentos descritos anteriormente foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica-LABEM do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão (CESC-UEMA). A liofilização foi realizada no Laboratório de Alimentos do Instituto Federal do Piauí (IFPI), *campus* Teresina zona Sul.

4.3. Bioensaios de confirmação de toxicidade com isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de diferentes condições de crescimento.

Foram realizados dois bioensaio para cada isolado, no primeiro foram testadas as CL₅₀ dos isolados cultivados nas condições extremas de temperatura com os três pH, e no segundo, foram testados os cultivos das melhores condições de crescimento, que corresponde à temperatura e pH com melhor rendimento de massa celular (g/L) e concentração de esporos/mL.

Para a realização dos bioensaios, dos isolados liofilizados cultivados nas diferentes combinações de temperatura e pH, foram preparadas duas soluções, de 5000 mg/L (solução I) e 50 mg/L (solução II), a partir da qual foram utilizadas as CL₅₀ dos isolados BtMA-690, BtMA-750 e BtMA-1114, de 0.004 mg/L, 0.041 mg/L e 0.025 mg/L (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2015, 2017; VIANA *et al.*, 2021), respectivamente.

4.3.1. Bioensaio com isolados de *Bacillus thuringiensis* crescidos em condições extremas de temperatura

As CL₅₀ testadas foram obtidas dos isolados cultivados nas condições extremas de temperatura (26 °C e 36 °C) com os pH 6,0; 7,0 e 8,0.

Para cada combinação de fatores de crescimento, foi preparado um bioensaio, os quais consistiram em uma repetição, com réplica de cinco copos plásticos com o volume final de 150

mL de água, 20 larvas de *A. aegypti* de terceiro estágio, obtidas do insetário da UFMA/Codó, e a CL₅₀ de cada isolado. Para cada bioensaio, foi preparado um controle negativo, que consistiu em uma réplica, sem inoculação de bactéria. Nesta etapa foram realizados seis bioensaios para cada isolado, um de cada combinação dos fatores pH e temperatura, totalizando 18 testes, considerando os três isolados.

Foram realizadas leituras de mortalidade das larvas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a aplicação da solução da bactéria. Nas leituras foram consideradas mortas, as larvas que não responderam ao toque com palitos estéreis, sendo contados todos os indivíduos vivos e mortos, obtendo desta forma o percentual de mortalidade das larvas (DULMAGE *et al.*, 1990).

Os testes foram realizados sob condições controladas, com temperatura em média de 28 ± 2 °C e fotofase de 12 horas.

4.3.2. Bioensaio com isolados de *Bacillus thuringiensis* cultivados nas melhores condições de crescimento

As CL₅₀ dos isolados testados foram obtidas a partir de cultivos nas melhores condições de crescimento das linhagens bacterianas, ou seja, condições de melhores rendimento de massa celular (g/L) e de esporos/mL. Sendo elas, as combinações de 34 °C com pH 8,0 e 30 °C com pH 6,0 para os isolados BtMA-690 e BtMA-750, e as combinações 28 °C com pH 7,0 e 34 °C com pH 6,0 para o BtMA-1114.

Os bioensaios com as condições ideais seguiram a mesma metodologia do anterior, no entanto, sendo realizados dois bioensaios para cada combinação dos isolados, em ambientes e populações de *A. aegypti* diferentes. O primeiro bioensaio foi executado no Laboratório de Biologia da UFMA/Codó com larvas de *A. aegypti* obtidas da criação mantida no laboratório. E o segundo bioensaio, foi executado no Laboratório de Entomologia Médica-LABEM da UEMA/Caxias, com larvas de *A. aegypti* obtidas da criação mantida pelo laboratório.

4.4. Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório para realização dos bioensaios

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*, as quais foram obtidas da criação mantida no Laboratório de Biologia da UFMA/Codó e do Laboratório de Entomologia Médica-LABEM da UEMA/Caxias. As larvas foram criadas sob condições controladas, com temperatura em média de 28 ± 2 °C e fotofase de 12 horas, de acordo com o protocolo de Consoli e Lourenço de Oliveira (1994), Forattini (2002) e Pinheiro e Tadei (2002).

Os ovos dos mosquitos previamente armazenados em papel-filtro foram colocados para eclosão em bacias de plástico contendo água. As larvas que eclodiram receberam alimento constituído de ração para gato triturada e, três vezes por semana foi realizada a limpeza das bacias plásticas, com a troca de água, para evitar a formação de película de gordura e a proliferação de microrganismos. As larvas permaneceram nas bacias até chegar ao 3º estágio, e retiradas para serem utilizadas nos experimentos. Os exemplares não utilizados nos bioensaios, foram deixados nas bacias até atingir o estágio de pupa, momento no qual foram levados para as gaiolas para emergência dos adultos.

Os mosquitos adultos foram mantidos para a reprodução e reposição do estoque de ovos em laboratório. Machos e fêmeas foram alimentados com solução de água e açúcar à 10%, umedecida em algodão. Adicionalmente, para as fêmeas foi oferecido o repasto sanguíneo, que é necessário para a maturação dos ovos. As fêmeas ingurgitadas são postas para desovar em copos revestidos com papel-filtro umedecido para evitar dessecação dos ovos. Após o período de oviposição, em média de três a cinco dias, as desovas foram retiradas e armazenadas em local apropriado no insetário, conservadas em local seco e protegido. Quando necessárias larvas para a realização dos bioensaios, os ovos foram transferidos para bandejas contendo água e alimento, seguindo o mesmo ciclo de atividades mencionado anteriormente.

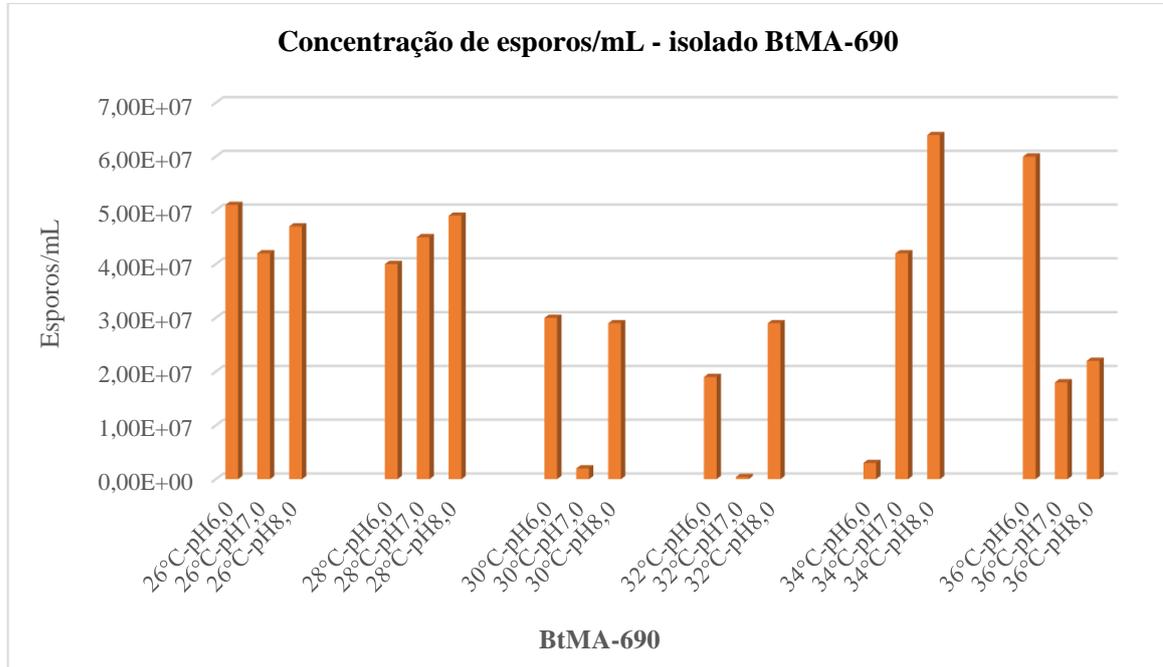
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação dos fatores de crescimento de linhagens de *Bacillus thuringiensis*

A partir da submissão dos isolados BtMA-690, BtMA-750 e BtMA-1114 a dezoito diferentes combinações de pH e temperatura foi observada a melhor condição de crescimento para cada um deles.

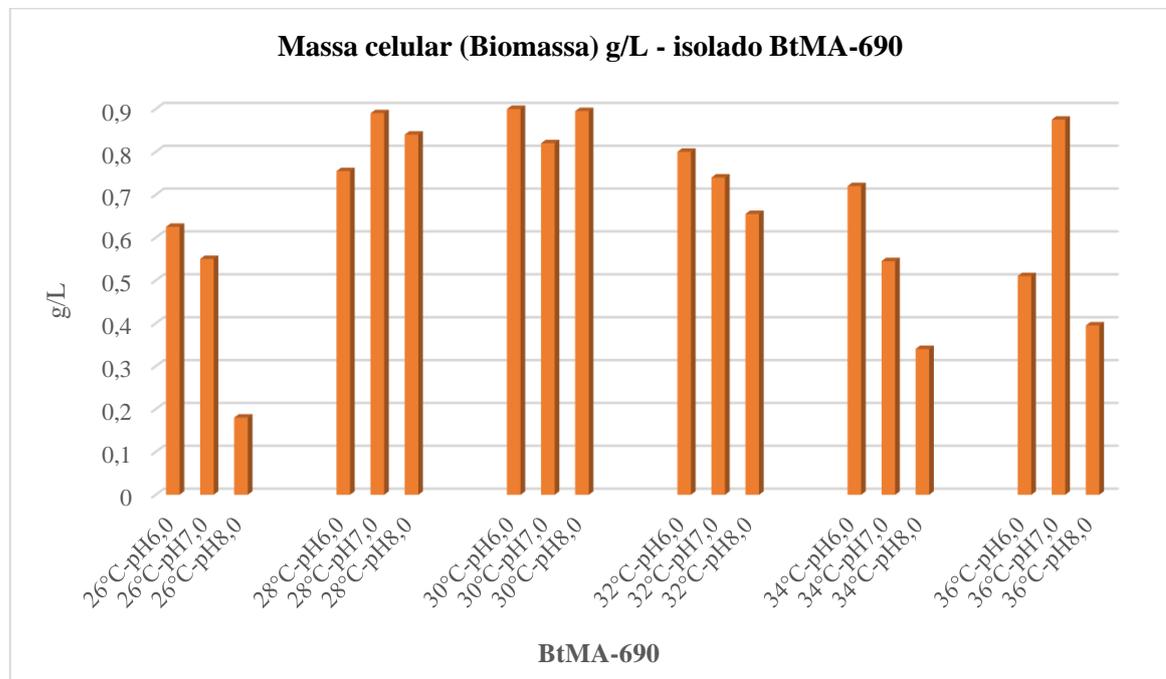
O isolado BtMA-690 mostrou melhores condições de crescimento na combinação dos fatores pH 8,0 com temperatura 34 °C, com concentração de $6,40 \times 10^7$ esporos/mL e na combinação pH 6,0 com temperatura 30 °C com 0,9 g/L de massa celular (Figuras 6 e 7).

Figura 6. Concentração de esporos/mL do isolado BtMA-690 em diferentes combinações de pH e temperatura.



Fonte: De autoria própria.

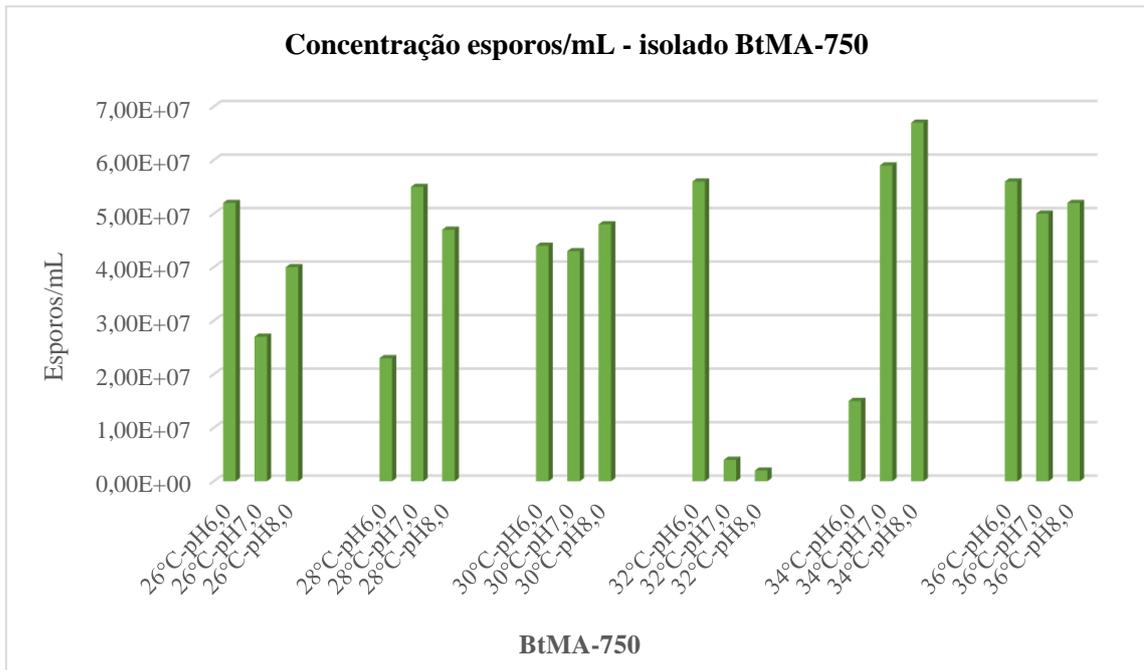
Figura 7. Massa celular (biomassa) do isolado BtMA-690 em diferentes combinações de pH e temperatura.



Fonte: De autoria própria.

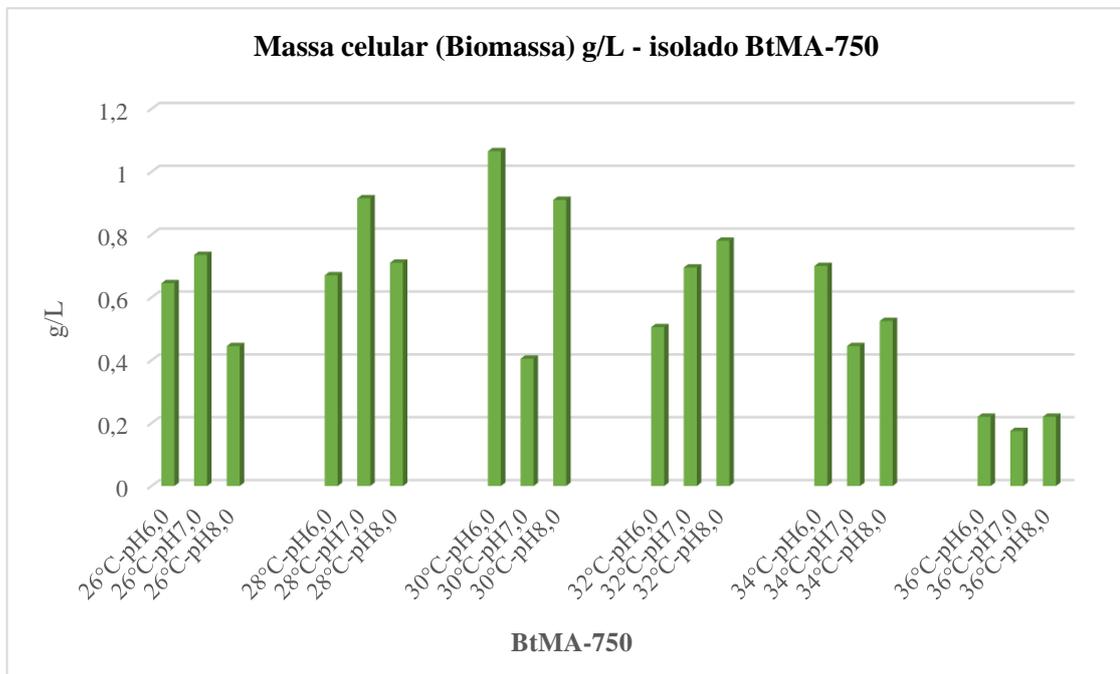
O BtMA-750 na combinação pH 8,0 com temperatura 34 °C apresentou crescimento mais satisfatório, obtendo concentração de $6,70 \times 10^7$ esporos/mL e na combinação pH 6,0 com temperatura 30 °C alcançando 1,065 g/L de biomassa (Figuras 8 e 9).

Figura 8. Concentração de esporos/mL do isolado BtMA-750 em diferentes combinações de pH e temperatura.



Fonte: De autoria própria.

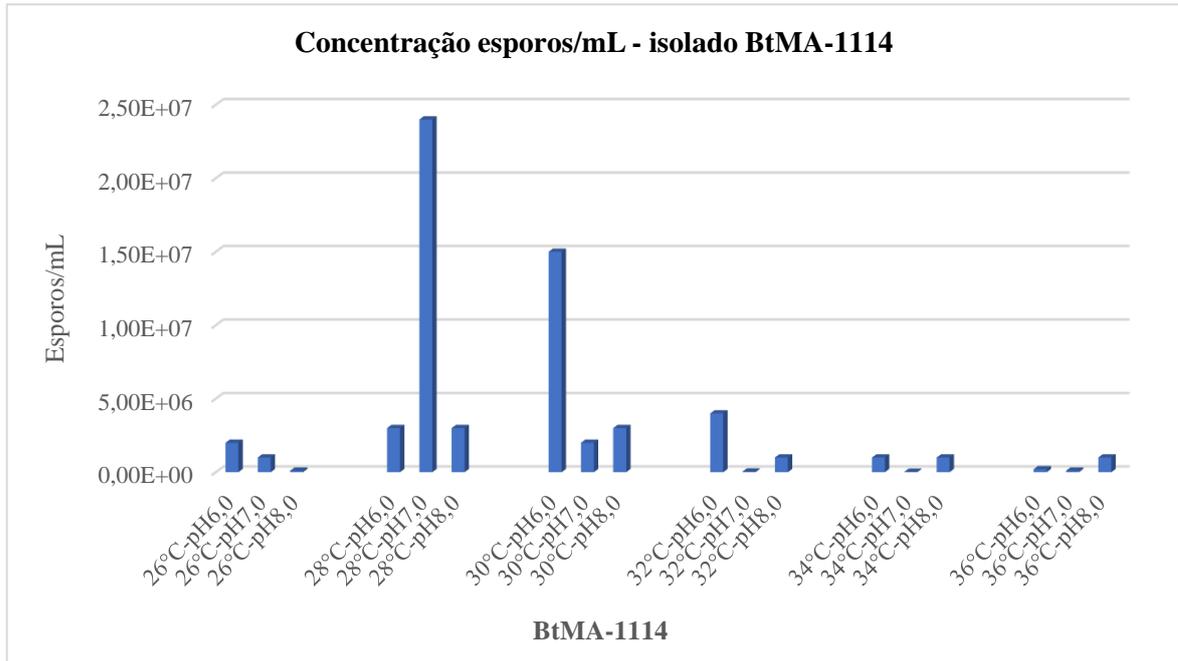
Figura 9. Massa celular (biomassa) do isolado BtMA-750 em diferentes combinações de pH e temperatura.



Fonte: De autoria própria.

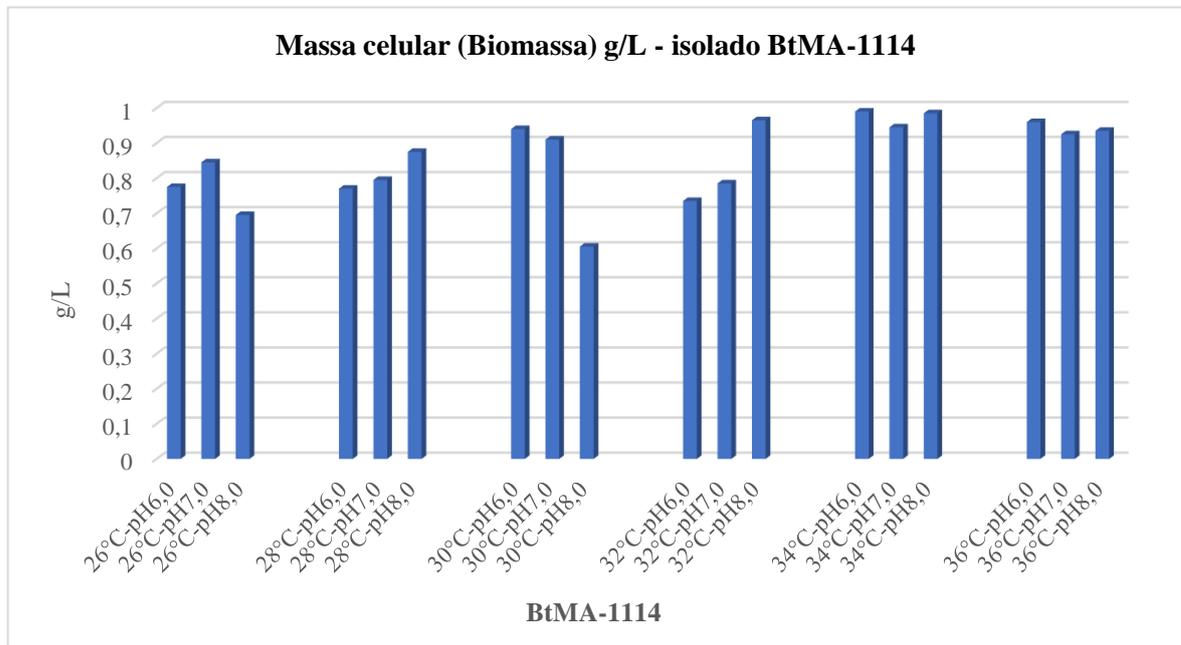
O BtMA-1114 teve melhor crescimento bacteriano com os fatores combinados de pH 7,0 com temperatura 28 °C, para a qual obteve-se concentração de $2,40 \times 10^7$ esporos/mL e, nos fatores pH 6,0 com temperatura 34°C atingindo 0,99 g/L de massa celular (Figuras 10 e 11).

Figura 10. Concentração de esporos/mL do isolado BtMA-1114 em diferentes combinações de pH e temperatura.



Fonte: De autoria própria.

Figura 11. Massa celular (biomassa) do isolado BtMA-1114 em diferentes combinações de pH e temperatura.



Fonte: De autoria própria.

5.2. Confirmação de toxicidade dos isolados

5.2.1. Bioensaio com isolados crescidos em condições extremas de temperatura

Por meio dos bioensaios realizados com os isolados BtMA-690, BtMA-750 e BtMA-1114, crescidos nas condições extremas de temperatura (26°C e 36°C) com os pH 6,0; 7,0 e 8,0 obteve-se diferentes resultados para as três linhagens testadas.

Verificou-se, que das seis combinações testadas do BtMA-690, cinco delas apresentaram atividade larvicida, porém, a maior mortalidade encontrada foi de 35% até 72 horas, obtida da combinação 26 °C com pH 6,0 sendo, para as demais, encontrada mortalidade inferior (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em bioensaios com o BtMA-690 crescido em condições extremas de temperatura.

Isolado	T (°C)	pH	Mortalidade (%)		
			24h	48h	72h
BtMA-690	26°C	6,0	2%	11%	35%
		7,0	1%	1%	1%
		8,0	3%	7%	14%
	36°C	6,0	1%	18%	19%
		7,0	0%	0%	0%
		8,0	6%	22%	30%

Fonte: De autoria própria.

Para o BtMA-750, todas as combinações apresentaram atividade larvicida, havendo mortalidade acima de 90% para quase todas as condições com 72 horas de experimento, com exceção da combinação 26 °C com pH 8,0, a qual apresentou mortalidade de 36%. Observa-se que as condições de temperatura 36 °C com os pH 8,0 e 6,0 obtiveram mortalidade de 100% com apenas 24 e 48 horas de experimento, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em bioensaios com o BtMA-750 crescido em condições extremas de temperatura.

Isolado	T (°C)	pH	Mortalidade (%)		
			24h	48h	72h
BtMA-750	26°C	6,0	35%	77%	93%
		7,0	99%	99%	99%
		8,0	31%	33%	36%
	36°C	6,0	99%	100%	-
		7,0	96%	97%	99%
		8,0	100%	-	-

Fonte: De autoria própria.

Por outro lado, das seis combinações do isolado BtMA-1114, cinco apresentaram atividade larvicida, contudo, a maior mortalidade foi 14% até 72 horas, obtida somente com a combinação 36 °C com pH 7,0, para as demais, foi verificado mortalidade inferior a 3%. Vale ressaltar que os índices de mortalidade foram bem abaixo do esperado para a CL₅₀ que seria em torno de 50% (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em bioensaios com o BtMA-1114 crescido em condições extremas de temperatura.

Isolado	T (°C)	pH	Mortalidade (%)		
			24h	48h	72h
BtMA-1114	26°C	6,0	0%	0%	1%
		7,0	0%	1%	2%
		8,0	0%	0%	0%
	36°C	6,0	1%	1%	1%
		7,0	7%	14%	14%
		8,0	1%	1%	1%

Fonte: De autoria própria.

5.2.2. Bioensaio com isolados cultivados nas melhores condições de crescimento

Dos bioensaios realizados com os isolados BtMA-690, BtMA-750 e BtMA-1114, crescidos nas melhores condições para rendimento de massa celular (g/L) e de esporos/mL, obteve-se os seguintes resultados:

Para o isolado BtMA-690 observou-se mortalidade inferior a 20% para as melhores combinações nos dois bioensaios realizados, sendo que para a melhor condição de crescimento em relação a massa celular obteve-se somente 1% e 9% de mortalidade e para melhor condição quanto a concentração de esporos 16% e 18% com 72 horas de experimento (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em bioensaios com o BtMA-690 cultivado nas melhores condições de crescimento.

Isolado	Melhor condição	T (°C)	pH	Mortalidade (%)			
				24h	48h	72h	
BtMA-690	Bioensaio I	Massa celular	30°C	6,0	1%	1%	1%
		Concentração de esporos	34°C	8,0	4%	8%	16%
	Bioensaio II	Massa celular	30°C	6,0	1%	2%	9%
		Concentração de esporos	34°C	8,0	7%	15%	18%

Fonte: De autoria própria.

Em relação às melhores condições de crescimento para massa celular e concentração de esporos do isolado BtMA-750, obteve-se mortalidades acima de 90% para ambas as condições e bioensaios. Destacando-se que para as duas condições no segundo bioensaio observou-se mortalidade de 100% com 48 horas de experimento (Tabela 6).

Tabela 6. Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em bioensaios com o BtMA-750 cultivado nas melhores condições de crescimento.

Isolado	Melhor condição	T (°C)	pH	Mortalidade (%)			
				24h	48h	72h	
BtMA-750	Bioensaio I	Massa celular	30°C	6,0	96%	96%	96%
		Concentração de esporos	34°C	8,0	86%	90%	96%
	Bioensaio II	Massa celular	30°C	6,0	99%	100%	-
		Concentração de esporos	34°C	8,0	99%	100%	-

Fonte: De autoria própria.

Por sua vez, o isolado BtMA-1114 apresentou mortalidade inferior a 10%, com 72 horas de teste, nos bioensaios com as melhores condições de crescimento para massa celular, assim como, mortalidade inferior a 40% nas melhores condições de concentração de esporos nos dois bioensaios realizados.

Tabela 7. Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em bioensaios com o BtMA-1114 cultivado nas melhores condições de crescimento.

Isolado	Melhor condição	T (°C)	pH	Mortalidade (%)			
				24h	48h	72h	
BtMA-1114	Bioensaio I	Massa celular	34°C	6,0	1%	3%	7%
		Concentração de esporos	28°C	7,0	17%	21%	22%
	Bioensaio II	Massa celular	34°C	6,0	1%	2%	2%
		Concentração de esporos	28°C	7,0	31%	37%	39%

Fonte: De autoria própria.

6. DISCUSSÃO

Parâmetros como pH e temperatura são de fundamental importância para o cultivo e a produção de endotoxinas de *B. thuringiensis*. Essas condições diferenciam-se de acordo com a variedade e a linhagem em estudo e, por isso, devem ser adequadas a cada uma delas, sendo

controladas de acordo com as necessidades do microrganismo (MALDONADO-BLANCO; SOLÍS-ROMERO; GALÁN-WONG, 2003).

No presente trabalho, verificou-se que as condições ótimas de crescimento das linhagens nativas de *B. thuringiensis* apresentaram maior concentração de esporos/mL e rendimento de massa celular nas temperaturas entre 28 °C e 34 °C para. Assim como, pH 7,0 e 8,0 para maior concentração de esporos viáveis e pH 6,0 para melhor rendimento de biomassa.

Considera-se que a temperatura ótima para o crescimento e produção de *B. thuringiensis* seja em torno de 30 °C, sendo que temperaturas acima deste valor podem induzir a supressão da formação de proteínas Cry, diminuindo o rendimento da produção, assim como, temperaturas baixas desaceleram o ciclo de multiplicação celular, conseqüentemente, aumentando o tempo de crescimento e custo de produção (COUCH *et al.*, 2000).

Os valores de pH em torno da neutralidade (7-7,5) são os mais adequados para a absorção de nutrientes e desenvolvimento da maioria das bactérias, o que também ocorre com o *B. thuringiensis* (MOURÃO, 2017), embora, a bactéria possa desenvolver-se em uma ampla faixa de pH entre 5,5 e 8,5 (BERNHARD; UTZ, 1993 apud PANAROTTO, 2006, p. 72).

Em laboratório, os parâmetros comumente utilizados para o cultivo da bactéria são temperatura em 30 °C e pH 7,0. Ao analisar a concentração de esporos/mL para o BtMA-690, observou-se que em condição comumente utilizada para crescimento de *B. thuringiensis*, o isolado apresentou a segunda menor concentração entre as dezoito combinações testadas. Por outro lado, na melhor condição de crescimento obteve-se uma quantidade 32 vezes maior de esporos viáveis. Em relação a massa celular não houve muita diferença no rendimento quando comparada a condição padrão de cultivo, com a melhor condição.

Ao verificar as mesmas condições para o BtMA-750, as diferentes combinações mostraram mudanças consideráveis no crescimento do isolado, obtendo nas melhores condições de crescimento aproximadamente 1,56 vezes mais esporos viáveis e 2,63 vezes mais rendimento de massa celular, em relação a condição padrão de cultivo.

O BtMA-1114 apresentou diferença em relação a concentração de esporos/mL quando comparado a melhor condição de crescimento com a condição padrão. Na melhor condição de crescimento o isolado atingiu uma concentração 12 vezes maior de esporos viáveis que na condição rotineiramente utilizada. Sobre a massa celular, para as ambas as condições o rendimento celular foi semelhante.

A temperatura de fermentação é um fator crítico para a taxa metabólica e bioatividade do *B. thuringiensis*, verifica-se que a taxa de crescimento da bactéria é gradualmente aumentada com o aumento da temperatura de fermentação. Em estudo sobre a avaliação e monitoramento

da temperatura de fermentação para otimização do crescimento desta bactéria, Pan *et al.*, (2021) verificaram que as condições ideais de temperatura para o crescimento bacteriano seriam entre 30 e 35 °C.

Também em trabalho sobre a influência da temperatura sobre o crescimento celular, produção de endotoxinas e esporulação do *B. thuringiensis*, Panarotto (2006) encontrou que as melhores temperaturas foram 27 °C e 30 °C, sendo que a temperatura de 27 °C foi considerada a mais adequada. Por sua vez, Bernhard & Utz (1993, apud PANAROTTO, 2006, p. 17) relatam que os valores ótimos se encontram entre 25 °C e 35 °C. O que corrobora com o presente estudo, pois, em relação à temperatura, o melhor crescimento dos isolados foram observados em 28 °C, 30 °C e 34 °C.

O pH da cultura é um parâmetro importante, pois pode afetar a carga da superfície celular (KONG *et al.*, 2020), e o crescimento e metabolismo dos microrganismos estão diretamente relacionados a esse valor. Panarotto (2006) em cultivos testando a influência do pH com relação ao crescimento celular, esporulação e produção de endotoxinas de *B. thuringiensis*, encontrou melhores resultados com o pH controlado em 5,5, 6,2, 7,0 ou com variação entre 5,5 e 7,0, indicando que o pH deve ficar próximo à neutralidade. Constatou ainda, que o crescimento celular foi negativamente afetado nos cultivos em que o pH não foi controlado, apontando também que valores de pH baixo afetam a esporulação e o crescimento da bactéria.

Pan *et al.* (2021) em trabalho realizado acerca do efeito da biomassa de *B. thuringiensis* e atividade inseticida por cultivo com resíduos vegetais, mostraram que a concentração bacteriana foi a mais baixa no meio com pH 5,0 e 9,0, implicando que ambas as condições ácidas e alcalinas inibiriam o crescimento, e a faixa de pH inicial ideal era de 7,0 a 7,5 para o crescimento bacteriano. No presente estudo, as melhores condições de crescimento, considerando a concentração de esporos bacterianos, apresentaram pH 7,0 e 8,0. E destaca-se que em relação a massa celular, para todos os isolados, as melhores condições de crescimento apresentaram pH 6,0.

Por meio dos bioensaios realizados com os isolados de *B. thuringiensis* crescidos em diferentes condições, constatou-se que a alteração da temperatura e do pH no cultivo da bactéria mudou a atividade inseticida das linhagens testadas contra larvas de *A. aegypti*, pois verificou-se que quando utilizada a CL₅₀ dos isolados, os índices de mortalidade ou ficaram bem abaixo ou acima dos percentuais esperados, o que pode ser devido alteração na expressão das proteínas inseticidas.

Em trabalho sobre parâmetros nutricionais e culturais que influenciam a síntese de endotoxinas de *B. thuringiensis*, Özkan *et al.* (2003) determinaram que a síntese da toxina Cry4Ba foi a ideal quando o organismo foi cultivado a 25 °C, enquanto a síntese de Cry11Aa foi ideal a 30 °C, ou seja, o estudo evidencia que a temperatura altera a expressão de proteínas inseticidas.

Içgen *et al.* (2002), relatam que a faixa ideal para crescimento durante a produção do *B. thuringiensis* seja de 5,5 a 6,5 e que esta faixa de pH não altera a produção de proteínas. Assim como, Smith *et al.* (1982) constataram que a manutenção do pH entre 5,7 e 8,1 não interfere na produção, e a variação do pH entre 6,5 e 8,0 não afeta significativamente a produção de proteínas. No entanto, no presente estudo observou-se que o pH na faixa de 6,0 a 8,0, mesmo considerando a mesma temperatura, houve mudança na concentração de esporos bacterianos, e possivelmente, na produção e expressão das proteínas.

Nos bioensaios realizados com as melhores condições de crescimento dos isolados, foi possível observar para as três linhagens que das condições analisadas, a de melhor rendimento de esporos/mL obtiveram mortalidades superiores à de melhor massa celular. Logo, possivelmente os esporos sejam mais importantes, do ponto de vista da atividade biológica, do que a massa celular.

Estudos apontam que, além das toxinas, o esporo de *B. thuringiensis* também contribui para sua toxicidade, pois estes podem germinar e crescer vegetativamente no interior do inseto-alvo, ocasionando septicemia; ou potencializando o efeito das toxinas em uma ação sinérgica (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; RAYMOND *et al.*, 2008; GALZER; AZEVEDO-FILHO, 2016).

Existem várias linhas de evidência que sugerem que o crescimento vegetativo de *B. thuringiensis* no intestino pode ser importante em infecções letais. A importância dos esporos vivos na sinergia da mortalidade causada por endotoxinas indica que o crescimento vegetativo de *B. thuringiensis* contribui para a letalidade das toxinas (RAYMOND *et al.*, 2008).

Esses achados são importantes para maximizar a produção da bactéria em condição de laboratório, pois obtemos os parâmetros de crescimento, físicos e químicos, de cada linhagem de *B. thuringiensis*, de forma específica, sendo possível padronizar as condições ideais para o crescimento e esporulação de cada uma delas em laboratório, e de modo geral, melhorar o controle de larvas de *A. aegypti* e de outros vetores, por meio do entendimento das melhores condições para produção de inseticidas biológicos de baixo custo.

7. CONCLUSÃO

Constatou-se que as linhagens de *B. thuringiensis* apresentaram condições ótimas de crescimento diferentes, considerando pH e temperatura. Para BtMA-690 e BtMA-750 a maior concentração de esporos/mL e massa celular foi nas combinações 34 °C com pH 8,0 e 30 °C com pH 6,0, respectivamente. Para o BtMA-1114, obteve-se maior concentração de esporos/mL, nas combinações de 28 °C com pH 7,0 e 34 °C com pH 6,0 para massa celular. Verificou-se também que as condições consideradas adequadas para o crescimento de cada um dos isolados, diferem das utilizadas usualmente em laboratório.

Em relação a atividade larvicida constatou-se que a alteração da temperatura e do pH mudou a toxicidade das linhagens testadas contra larvas de *A. aegypti*, pois, os índices de mortalidade ou ficaram bem abaixo ou acima dos percentuais esperados para cada CL₅₀ das bactérias avaliadas, tanto nas condições extremas de temperatura, como nas condições ótimas de crescimento.

Com isso, a pesquisa possibilitará melhorar a produção de linhagens de *B. thuringiensis*, com perspectiva de no futuro otimizar a produção de um bioproduto brasileiro, de forma que os custos sejam competitivos com os inseticidas químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ARAÚJO, A. P.; MELO-SANTOS, M. A. V.; CARLOS, S. O.; RIOS, E. M. M. M.; REGIS, L. Evaluation of na na experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, v. 41, p. 339-347, 2007.

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. **Toxins**, v. 6, n. 4, p. 1222-1243, 2014.

BORGES, P. F. C. **Monitoramento e controle de mosquitos vetores: uma proposta para avançar no conhecimento e no controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***. Tese (Pós-Graduação em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

BADRAN, A. H. *et al.* Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. **Nature**, v. 533, n. 7601, p. 58-63, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Aedes aegypti*. 2022a.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviruses até a semana epidemiológica 47 de 2022. **Boletim Epidemiológico**. v. 53, n. 44, 2022b.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 11, 2020. **Boletim Epidemiológico**. v. 51, n. 12, 2020.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 4, 2021. **Boletim Epidemiológico**. v. 52, n. 5, 2021.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BRÜHL, C. A. *et al.* Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). **Science of The Total Environment**, p. 137800, 2020.

CAMPANINI, E. B. *et al.* Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 243-247, 2012.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 1994.

COSTA, J. R. V. *et al.* Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 757-766, 2010.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 297-316.

DEVIDAS, P. C.; PANDIT, B. H.; VITTHALRAO, P. S. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

DULMAGE, H. T.; YOUSTEN, A. A.; SINGER, S.; LACEY, L. A. **Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus***. Geneva. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, 1990. 59p.

EL-KERSH, T. A. *et al.* Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (sl). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 647, 2016.

ENGELKIRK, P. G.; ENGELKIRK, J. D. **Microbiologia para as ciências da saúde**, 2012.

ERTHAL-JUNIOR, M.; GUARUS, I. F. F. **Controle biológico de insetos pragas**. Rio de Janeiro: I Seminário Mosaico, 2011.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria journal**, v. 15, n. 1, p. 284, 2016.

FERREIRA-KEPPLER, R. L. *et al.* The community of Diptera (Insecta) colonizing axils of *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don (Araceae), with records of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in urban areas of Manaus, Amazonas. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 3, p. e20160291, 2017.

FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 32-35, 2009.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. USP São Paulo, Brasil. 2002.

FLORES-SUAREZ, A. E. *et al.* Current status of the insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. **Insecticide resistance**, p. 99-109, 2016.

GALZER, E. C. W.; AZEVEDO-FILHO, W. S. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2016.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. 1 ed. Chichester: John Wiley and Sons, 2000.

GUO, S. *et al.* Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 925-937, 2015.

HARBACH, R. E. Culicidae Meigen, 1818. **Mosquito Taxonomic Inventory**, 2022.

HECKEL, D. G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 2020.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. **Research in microbiology**, v. 153, n. 9, p. 599-604, 2002.

KONG, F.; REN, H. Y.; ZHAO, L.; NAN, J.; REN, N. Q.; LIU, B. F.; MA, J. Semi-continuous lipid production and sedimentation of *Scenedesmus* sp. by metal ions addition in the anaerobic fermentation effluent. **Energy Conversion and Management**, v. 203, p. 112216, 2020.

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

Li, RS, Jarrett, P., Burges, HD, 1987. Importância de esporos, cristais e deltaendotoxinas na patogenicidade de diferentes variedades de *Bacillus thuringiensis* em *Galleria mellonella* e *Pieris brassicae*. j.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 36, 2016.

LIU, Q. *et al.* Development of Bt rice and Bt maize in China and their efficacy in target pest control. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1561, 2016.

LOBO, K. S. *et al.* Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 1, p. 5-12, 2018.

MALDONADO-BLANCO, M. G.; SOLÍS-ROMERO, G.; GALÁN-WONG, L. J. O efeito da tensão de oxigênio na produção de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ativa contra larvas de *Aedes aegypti*. **Revista Mundial de Microbiologia e Biotecnologia**, v. 19, n. 7, p. 671-674, 2003.

MARRONE, P. G. Pesticidal natural products—status and future potential. **Pest management science**, 2019.

- MEDEIROS, F. P. M.; SANTOS, M. A. V. M.; REGIS, L.; RIOS, E. M. M.; NETO, P. J. R. Development of a *Bacillus sphaericus* tablet formulation and its evaluation as a larvicide in the biological control of *Culex quinquefasciatus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 431-434, 2005.
- MOURÃO, A. H. C. **Influência e custos de diferentes meios de cultura para produção de *Bacillus thuringiensis* visando o controle de pragas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. 78p. 2017.
- MOYES, C. L. *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, 2017.
- OPAS/OMS. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. **Alerta Epidemiológico: Febre Amarela**. Washington, D.C, 2022.
- ÖZKAN, M. *et al.* Parâmetros nutricionais e culturais que influenciam a produção de delta-endotoxina de antidipteros. **Pesquisa em Microbiologia**, v. 154, n. 1, pág. 49-53, 2003.
- PAHO/WHO. Pan American Health Organization/World Health Organization. **Dengue**. 2022.
- PAN, X. *et al.* Effect of *Bacillus thuringiensis* biomass and insecticidal activity by cultivation with vegetable wastes. **Royal Society open science**, v. 8, n. 3, p. 201564, 2021.
- PANAROTTO, C. Influência de parâmetros operacionais, fontes proteicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelense*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Caxias do Sul, 2006.
- PEÑA, L. C.; PAMPHILE, J. A.; OLIVEIRA, J. A. A. S. Mosquito *Aedes* spp. vetor de importantes arboviroses: do controle clássico ao biotecnológico, uma breve revisão. **Revista Valore**, v. 7, p. 7052, 2022.
- PEREIRA, E. L.; MARTINS, B. A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas doi. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 714-734, 2016.
- PÉREZ, C. *et al.* *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **PNAS**, v. 102, n. 51, 2005.
- PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1529-1535, 2002.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia-Sitio en Reparación**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2003.
- RAYMOND, B. *et al.* Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 98, n. 3, p. 307-313, 2008.
- REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA-FILHA, M. H.; SILVA, S. B.; MACIEL, A.; FURTADO, A. F. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex*

quinquefasciatus in an urban area of Olinda, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 488-492, 2000.

SANTOS, F.P. J. *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 64– 70, 2012.

SCHMITT, A. T. **Avaliação de *Bacillus thuringiensis israelensis* em novo formulado para o controle de larvas de *Aedes aegypti***. 2018.

SCOPEL, W.; ROZA-GOMES, M. F. Programas de controle biológico no Brasil. **Unoesc & Ciência-ACET**, v. 2, n. 2, p. 215-223, 2011.

SMITH, D. B.; HOSTETTER, D. L.; PINNELL, R. E.; IGNOFFO, C. M. Laboratory studies of viral adjuvants: formulation development. **Journal of Economic Entomology**, v. 75, n. 1, p. 16-20, 1982.

SOARES-DA-SILVA, J. *et al.* Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de entomologia**, v. 59, n. 1, p. 1-6, 2015.

SOARES-DA-SILVA, J. *et al.* Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Acta tropica**, v. 176, p. 197-205, 2017.

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of action of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. **Microbial toxins**, p. 1-13, 2016.

TERRA, M. R. *et al.* *Aedes aegypti* e as arboviroses emergentes no Brasil. **Revista UNINGÁ Review**, v. 30, n. 3, p. 52-60, 2017.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12ª Edição. Artmed Editora, 2016.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015.

VARGAS, L. D. L. *et al.* Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle: estado da arte do conhecimento. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 21, n. 1, p. 98-116, 2022.

VIEIRA-NETA, M. R. A. **Seleção e caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911) da restinga e mangue para o controle de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**. 2016. 53f. Dissertação (Pós-graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde) - Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, 2016.

VIEIRA-NETA M. R. A. *et al.* Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). (AHEAD). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 81, p. 872-880, 2021.

VIANA J. L. *et al.* Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). (AHEAD). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 81, p. 114-124, 2021.

WHO. World Health Organization. **Draft global vector control response 2017-2030**. 2017.

WHO. World Health Organization. **Vector-borne diseases**. 2020.

WHO. World Health Organization. **Dengue and severe dengue**. 2022.