



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LETÍCIA BERNADETE DA SILVA

**IMPACTO DA DIETA ARTIFICIAL EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus,  
1762) E DANOS CAUSADOS POR *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*  
DETECTADOS POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA DE  
RAIO X**

---

Londrina  
2024

LETÍCIA BERNADETE DA SILVA

**IMPACTO DA DIETA ARTIFICIAL EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus,  
1762) E DANOS CAUSADOS POR *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*  
DETECTADOS POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA DE  
RAIO X**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: João Antonio Cyrino Zequi  
Coorientador: Gislayne Trindade Vilas Boas

Londrina  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L648i Silva, Letícia Bernadete da.  
Impacto da dieta artificial em *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (1762) e danos causados por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* detectado por microtomografia computadorizada de raio X / Letícia Bernadete da Silva. - Londrina, 2024.  
106 f. : il.

Orientador: João Antonio Cyrino Zequi.  
Coorientador: Gislayne Fernandes Trindade Vilas-Bôas.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2024.  
Inclui bibliografia.

1. controle biologico - Tese. 2. repasto sanguíneo - Tese. 3. culicídeos - Tese. 4. microtomografia computadorizada - Tese. I. Zequi, João Antonio Cyrino. II. Vilas-Bôas, Gislayne Fernandes Trindade. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

LETÍCIA BERNADETE DA SILVA

**IMPACTO DA DIETA ARTIFICIAL EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus,  
1762) E DANOS CAUSADOS POR *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*  
DETECTADOS POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA DE  
RAIO X**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Ciryno Zequi  
Universidade Estadual de Londrina-UEL

---

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas  
Universidade Estadual de Londrina-UEL

---

Prof. Dr. Eduardo Inocente Jussiani  
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 21 de maio de 2024.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por até aqui ter me fortalecido e sustentado durante a execução da pesquisa.

À minha família, pelo apoio em todas as escolhas, torcendo pelo sucesso, por todos os conselhos e por viverem comigo o sonho da vida acadêmica. Por serem meu alicerce em todos os momentos e adversidades da vida e por acreditarem mais em mim do que eu mesma.

Ao Dr<sup>o</sup> João Zequi, meu orientador, por abrir as portas do laboratório para mim e por compartilhar seus ensinamentos e experiências de vida, que me auxiliou com expertise e humildade em todas as etapas deste estudo. Sua dedicação e entusiasmo com a pesquisa, educação e preocupação em levar nossos estudos em benefício da comunidade me incentiva a ser uma profissional melhor e a seguir os seus passos. Obrigado por todo café nervoso e conversas que agregaram a minha vida pessoal e acadêmica.

A Dr<sup>a</sup> Gislayne Trindade Vilas Boas, minha coorientadora, que me auxiliou e me deu conselhos valiosos para a execução deste estudo e vida profissional, além de me ensinar com maestria sobre a parte microbiológica deste estudo.

Aos membros do Laboratório de Entomologia Geral e Médica por auxiliarem em todas as etapas da dissertação, sendo solícitos e curiosos em aprender mais sobre a área.

Ao Edson Kenji Kawabata, grande amigo e membro do Laboratório de Entomologia Geral e Médica, por sempre me ajudar independentemente se era solicitado ou não, pela amizade e ser meu ouvinte em vários momentos durante o mestrado, pela paciência, calma e risadas em meio a correria da vida.

Ao David Leiroza, amigo que o mestrado me deu, obrigado pelos conselhos relacionados à vida acadêmica, pessoal e por ser um suporte em todos os momentos.

A Dr<sup>a</sup> Bianca Piraccini, que me deu suporte e orientações sobre a preparação desta dissertação, além de conselhos sobre a vida acadêmica e por sempre se disponibilizar a me ajudar.

Ao Dr<sup>o</sup> Eduardo Inocente e Doutorando Mateus Gruener, membro do laboratório de Física Nuclear Aplicada por todo auxílio e suporte nas etapas de medidas das amostras.

Aos meus amigos Rita (Mana), Poliana, Talita, Denis, ao Pastor Danilo e Cida, essenciais em minha vida, que me aconselharam, acreditaram e torceram por mim. Obrigado por cada palavra amiga, por cada momento, por serem pessoas em que posso falar das minhas fraquezas e por me animarem, obrigado por sonharem comigo este sonho.

Aos técnicos, Aparecido e Edson, pela disponibilidade de sempre levar para campo e demais necessidades do laboratório.

A Universidade Estadual de Londrina, em destaque ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, pelo suporte durante o mestrado e por agregarem a jornada acadêmica e profissional.

A Capes e demais órgãos de fomento pelo financiamento para a realização desta pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

*It's times like these*

*You learn to live again*

*It's times like these*

*You give and give again*

*It's times like these*

*You learn to love again*

*It's times like these*

*Time and time again*

Time like these- Foo Fighters

SILVA, Letícia Bernadete. **Impacto da dieta artificial em *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (1762) e danos causados por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* detectado por microtomografia computadorizada de raio X.** 2024. 103. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## RESUMO

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um culicídeo que apresenta relevância na Entomologia médica por veicular arbovírus devido à hematofagia realizada pelas fêmeas que é essencial para a maturação de seus ovos. Por essa razão, metodologias inovadoras de monitoramento e controle biológico são buscadas para reduzir a disseminação do vetor, mas muitos desses estudos dependem de biotérios de vertebrados como fonte sanguínea para a fêmea, apresentando risco de contaminação, angústia ao animal e empecilhos para sua utilização, demonstrando a necessidade de uma metodologia que substitua o sangue animal e seja eficaz como fonte de alimento. Por outro lado, o monitoramento do vetor e vírus são ferramentas importantes para subsidiar o controle. Linhagens de *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Bti) apresentam ação inseticida para os culicídeos, liberando pró toxinas no intestino do vetor, levando à sua morte por sepsis, sendo seletivo apenas ao inseto alvo e não se tem registro de seleção de resistentes a campo. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade do sangue artificial como uma ferramenta para a criação massal de *Ae. aegypti*, assim como o controle do vetor por meio da linhagem Bti BR 101. O presente trabalho foi organizado em dois capítulos; o primeiro trata do uso de sangue artificial no desenvolvimento do mosquito e da avaliação por microtomografia computadorizada do ovário das fêmeas alimentadas com as seguintes fontes: sangue artificial SkitoSnake, sangue de *Ratus norvegicus* e solução de açúcar (5%) e mel (5%) em 90% de água para análise da preferência de ingurgitamento e sua influência no desenvolvimento do ovário. O segundo capítulo é sobre o controle biológico das larvas de *Ae. aegypti* por um formulado em desenvolvimento à base de Bti (BR101) e do uso como controle de um produto comercial à base de Bti (Vectobac). Posteriormente, foi executada a análise elementar dos respectivos produtos utilizados para verificação da composição de elementos químicos dos mesmos e a microtomografia das larvas após 24 horas de exposição ao Bti BR 101 e Bti comercial (Vectobac). Os resultados obtidos demonstram que o sangue artificial é capaz de proporcionar a maturação dos ovos e subsequente ciclo de vida alcançando duas gerações consecutivas. Ademais, o volume do ovário de fêmeas alimentadas com sangue de rato (média: 0.049688184 (b), limites [-0.01574603, 0.1151224]) diferiu do volume do sangue artificial (média: 0.01307888 (a), limites [0.008030322, 0.01900323]) e do volume do ovário após alimentação com solução açucarada e mel (0.004269842 (a) limites [0.002253814, 0.00628587]), obtendo uma média 11 vezes maior que a alimentada com açúcar e mel e cerca de três vezes maior em comparação com o sangue artificial, corroborando com a tendência alimentar das fêmeas por mamíferos. Em relação ao controle biológico, o uso do Bti BR101 não diferiu significativamente do Vectobac WG, demonstrando ser uma excelente estratégia para o controle do vetor o que pode ser comprovado pela sua mortalidade em (1,5g/500L) e pela micro-CT, que evidenciou os danos às membranas do epitélio intestinal. Logo, o sangue artificial evidenciou ser uma ferramenta promissora para a criação massal do mosquito, e que na ausência do sangue humano, tanto o sangue artificial como o de rato promoveram o desenvolvimento dos ovócitos das fêmeas, no entanto o sangue artificial apresentou limitações nutricionais. Os produtos biológicos foram eficazes nessas condições para controle de imaturos, sendo a Micro-CT uma excelente ferramenta de validação das estruturas anatômicas perante os tratamentos utilizados

**Palavras-chave:** monitoramento, culicídeos, repasto sanguíneo, microrganismos entomopatogênicos

SILVA, Leticia Bernadete. **Impact of artificial diet on *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (1762) and damage caused by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* detected by X-ray microcomputed tomography.** 2024. 103. Dissertation (Master's in Biological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

### ABSTRACT

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) is a Culicidae that is relevant in medical entomology as a vehicular arbovirus due to the hematophagy carried out by females, which is essential for the maturation of their eggs. For this reason, innovative monitoring and biological control methodologies are sought to reduce the spread of the vector, but many of these studies depend on vertebrate vivariums as a blood source for the female, presenting a risk of contamination, distress to the animal and obstacles to its use. demonstrating the need for a methodology that replaces animal blood and is effective as a food source. On the other hand, monitoring vectors and viruses are important tools to support control. Lineages of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* (Bti) present insecticidal action against culicidae insects, releasing protoxins in the vector's intestine, leading to its death from sepsis, being selective only to the target insect and there is no record of selection of resistant ones in the field. Therefore, the objective of this study was to verify the likelihood of artificial blood as a tool for the mass breeding of *Ae. aegypti*, as well as vector control through the Bti BR 101 lineage. This work was organized into two chapters; the first treatment using artificial blood in the development of the mosquito and the evaluation by microcomputed tomography of the ovaries of females fed with the following sources: artificial blood, Wistar Rat blood and sugar solution (5%) and honey (5%) in 90% water for analysis of engorgement preference and its influence on ovarian development. The second chapter is about the biological control of *Ae. aegypti* by a formula under development based on Bti (BR101) and the use as a control of a commercial product based on Bti (Vectobac). Subsequently, an elemental analysis of the respective products used was carried out to verify their composition of chemical elements and microtomography of the larvae after 24 hours of exposure to Bti BR 101 and commercial Bti (Vectobac). The results obtained demonstrate that artificial blood is capable of providing egg maturation and subsequent life cycle, reaching two consecutive generations. Furthermore, the ovary volume of females fed with rat blood (mean: 0.049688184 (b), limits [-0.01574603, 0.1151224]) differs from the volume of artificial blood (mean: 0.01307888 (a), limits [0.008030322, 0.01900323]) and ovarian volume after feeding with sugar solution and honey (mean: 0.004269842 (a), limits [0.002253814, 0.00628587]), obtained an average 11 times higher than that fed with sugar and honey and about three times higher compared to artificial blood, corroborating the females' food trend for mammals. In relation to biological control, the use of Bti BR101 does not differ significantly from Vectobac WG, proving to be an excellent strategy for controlling the vector which can be proven by its mortality rate (1.5g/500L) and by micro-CT, which showed damage to the membranes of the intestinal epithelium. Therefore, artificial blood proved to be a promising tool for the massive breeding of mosquitoes, and that in the absence of human blood, both artificial and rat blood promoted the development of female oocytes. Biological products were effective in these conditions for controlling immatures, with Micro-CT being an excellent tool for validating anatomical structures in the face of the treatments used.

**Keywords:** monitoring, culicidae, blood meal, entomopathogenic microorganisms

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Localização das ovitrampas (pontos amarelos) instaladas no campus da Universidade Estadual de Londrina no período de outubro de 2022 a dezembro de 2023 para obtenção de ovos para o início dos testes em laboratório.....52
- Figura 2-** Dieta SkitoSnake apresentada em formulação em pó (A) e após diluição (B) utilizadas de maio a dezembro de 2023 para o repasto sanguíneo. ....54
- Figura 3-** Metodologia de repasto sanguíneo das fêmeas de *Aedes aegypti* com sangue artificial. (a) 250µl Sangue artificial distribuído no copo, (b) Sangue coberto com fita veda rosca, (c) Fêmeas realizando repasto.....55
- Figura 4-** Recipiente para a oviposição das fêmeas de *Aedes aegypti* contendo papel filtro e solução atrativa composta por levedo de cerveja colocadas na gaiola após quatro dias de alimentação sanguínea.....55
- Figura 5-** Preparação da amostra para a microtomografia computadorizada: Preparação da amostra para a microtomografia computadorizada: (a) Fêmea de *Ae. aegypti* Rockfeller totalmente ingurgitada, (b) Fêmeas adicionadas em solução Bouin para fixação, (c) Fêmeas expostas a diluição em série de etanol, (d) Fêmea em solução de iodo diluído em etanol, (e) Fêmea submersa a etanol 100% em ponteira de plástico vedada montada sobre porta amostra, (f) Microtomografo SkyScan instalado no LARX/UEL e (g) Mosquito em ponteira sobre o microtomografo. ....57
- Figura 6-** Disco de acrílico no suporte para a deposição da amostra de 10 µl do sangue artificial juntamente com 10 µl do padrão de gálio no suporte fornecido pelo Laboratório de Física Nuclear da Universidade Estadual do Paraná.....59
- Figura 7-** Ciclo de vida de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue artificial (a) Ovos depositados pelas fêmeas após se alimentarem do sangue artificial, (b) larva, (c) pupa, (d) Fêmea ingurgitada e (e) Fêmea de *Aedes aegypti* totalmente ingurgitada com destaque no abdome. Nível 3 de distensão com o abdome quase ou totalmente distendido com dois ou mais escleritos de distância (indicado no tracejado em vermelho), entre os escleritos ventrais (esternitos) e dorsais (tergitos)- considerando o 3º e 4º escleritos abdominais (indicados com flechas vermelhas) Penúltimos escleritos do abdome separados entre si, com ângulo amplo de abertura. (escala: 1.5).....60
- Figura 8-** Desenvolvimento do ciclo de vida do *Aedes aegypti* alimentado com sangue artificial sob condições de laboratório. Linha azul representando a geração 1 e laranja a geração 2 61
- Figura 9-** Fêmeas de *Aedes aegypti* preparadas para a microtomografia computadorizada de Raio X. (a) Fêmea após alimentação com açúcar e mel, (b) fêmea com ingurgitamento

completo por sangue artificial, (c) Fêmea com ingurgitamento completo com sangue de rato. Para (b) e (c) Nível 3 de distensão com o abdome quase ou totalmente distendido com dois ou mais escleritos de distância (indicado no tracejado em vermelho), entre os escleritos ventrais (esternitos) e dorsais (tergitos)- considerando o 3º e 4º escleritos abdominais (indicados com flechas vermelhas) Penúltimos escleritos do abdome separados entre si, com ângulo amplo de abertura. (Escala: 1.5).....61

**Figura 10-** Modelo reconstruído do mosquito *Aedes aegypti* por meio da microtomografia computadorizada de raio X após alimentação. (a) fêmea adulta alimentada com açúcar e mel, (b) fêmea ingurgitada com sangue artificial, (c) fêmea ingurgitada com sangue de rato, (d) ovários isolados das fêmeas após alimentação com açúcar e mel, (e) ovários das fêmeas ingurgitadas com o sangue artificial e (f) ovários das fêmeas ingurgitadas com sangue de rato. .... 62

**Figura 11-** Média do volume dos ovários das fêmeas após se alimentarem de diferentes fontes alimentícias (x representa a média e o risco horizontal da coluna a mediana).....64

**Figura 12-** Espectro da amostra de sangue artificial..... 65

**Figura 13-** Bioensaio de mortalidade das larvas de *Aedes* spp. após exposição ao *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101. (A) Larvas de *Aedes* spp, (B) larvas adicionadas em baldes, (C) Adição de Bti e (D) Bioensaio.....87

**Figura 14-** Bioensaio para determinação da taxa de mortalidade larval de *Aedes aegypti* ao Bti BR101 e Vectobac WG- com larvas de terceiro instar, contendo cinco repetições por tratamento. .... 87

**Figura 15-** Mortalidade e médias percentuais das larvas de *Aedes* spp. após exposição a diferentes lotes de *Bacillus thuringiensis israelensis* (a) Comparação da mortalidade larval de *Aedes* spp. após exposição a *Bacillus thuringiensis israelensis* em diferentes formulações. ....90

**Figura 16-** Mortalidade média das larvas de *Aedes aegypti* após exposição ao Bti BR101 e Vectobac WG. (a) Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* após 24 e 48 de exposição ao Bti BR101 e a Vectobac Wg. (b) Média percentual da mortalidade das repetições nos tratamentos.. ....91

**Figura 17-** Espectro da amostra de *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101(a) e Vectobac WG (b) após espectrometria de fluorescência de raio x por reflexão total.....93

**Figura 18-** Imagens da microtomografia computadorizada de raio X das larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti Rockefeller*. (A) larva controle, (B) larva após 24 horas de exposição ao Bti BR101, (C) larva após 24 horas de exposição ao Bti comercial (Vectobac WG).....95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Composição e concentração final da dieta SkitoSnake fornecida as fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .....	53
<b>Tabela 2-</b> Volume individual dos ovários de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> após alimentadas com diferentes fontes alimentares, medido por microtomografia computadorizada de raio X	63
<b>Tabela 3-</b> Razão entre os grupos das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> após diferentes fontes de alimento.	64
<b>Tabela 4-</b> Elementos medidos por espectrometria de fluorescência em 10 µl de sangue SkitoSnake e suas respectivas concentrações em mg/L. ....	65
<b>Tabela 5-</b> Concentração da Unidade Formadora de Colônias em formulado em pó (T85E1, T85E2, T85E3 e T85E4) e formulação líquida (T85E5).....	91
<b>Tabela 6-</b> Elementos medidos por espectrometria de fluorescência de raio x por reflexão total em amostras de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> - BR101 e Vectobac WG com suas respectivas concentrações em mg/L. ....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae.	<i>Aedes</i>
ATP	Adenosina trifosfato
B	<i>Bacillus</i>
BSA	Albumina sorobovina
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CEUA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
CHIKV	Vírus chikungunya
CONDEAGRO	Cooperativa Mista de Desenvolvimento do Agronegócio
CR	Com repasto
DENV	Vírus dengue
EDXRF	Dispersão por energia
Kdr	Knockdown resistance
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LIRAA	Levantamento Rápido de Índices de Infestação para <i>Aedes aegypti</i>
MICRO- CT	Microtomografia computadorizada
MS	Ministério da Saúde
PNCD	Plano Nacional de Combate à Dengue
SR	Sem repasto
TXRF	Fluorescência de raios X por refração total
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
WHO	World Health Organization
WRBU	The Walter Reed Biosystematics Unit
XRF	Fluorescência de raio X
ZIKV	Vírus Zika

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	15
OBJETIVOS .....	27
HIPÓTESE.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
<b>Capítulo 1: Impacto da dieta artificial em <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus,1762) detectado por microtomografia computadorizada e análise elementar por espectrometria de fluorescência de raio x por reflexão total (TXRF) .....</b>	<b>44</b>
Resumo.....	45
Abstract .....	47
1.Introdução .....	48
2. Material e métodos.....	55
3. Resultados .....	60
4. Discussão .....	66
5. Considerações Finais.....	70
Referências.....	72
<b>Capítulo 2: Danos causados por <i>Bacillus thuringiensis</i> subespécie <i>israelensis</i> às larvas de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> detectados por microtomografia computadorizada de Raio X.....</b>	<b>78</b>
Resumo.....	79
Abstract .....	80
1. Introdução .....	81
2. Material e métodos.....	85
3. Resultados .....	90
4. Discussão .....	96
5. Considerações Finais.....	98
Referências.....	99

## INTRODUÇÃO GERAL

### Biologia da família Culicidae

A família Culicidae Meigen, 1818 pertence à subordem Culicomorpha, ordem Diptera, classe Insecta e Filo Arthropoda, inclui 3.724 espécies descritas, contudo este número tende a aumentar 5% por década devido a sua importância médica e veterinária, além de transitar entre a área urbana, periurbana e rural (Silva, 2002). Representada pelos insetos conhecidos popularmente como mosquitos, pernilongos, muriçocas, carapanãs, sovelas e bicudos, esta família é subdividida em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae com 524 e 3.200 espécies respectivamente (Forattini, 2002; Harbach, 2021; WRBU, 2024).

Os culicídeos possuem um ciclo de vida com o desenvolvimento holometábolo, no qual apresentam quatro estágios - ovo, larva (sendo quatro instares), pupa, adulto alado com duração de sete a vinte dias dependendo do gênero e condições do meio como temperatura, umidade e disponibilidade de alimento (Consoli e Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Rueda, 2008).

A deposição dos ovos diferencia-se em relação ao gênero de acordo com a forma e o número de ovos depositados, podendo ser em grupo, no caso dos *Culex* Linnaeus 1758 simples como em *Aedes* Meigen, 1818 e *Anopheles* Meigen, 1818. Em 2004, a nomenclatura foi alterada para *Stegomyia aegypti* Linnaeus 1762 e *Stegomyia albopictus* Skuse 1894, (Reinert et al. 2004) contudo no presente estudo foi adotado a nomenclatura anterior para atingir maior alcance e entendimento. A oviposição pode ocorrer de diferentes formas, como em criadouros naturais encontrados em cascas e buracos de árvores, acúmulos de água em axilas de bromélias e em criadouros artificiais, como copos e garrafas plásticas, materiais de construção, pneus entre outros que possam acumular água (Lopes et al. 1983; Consoli e Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Zequi, 2005; Rueda, 2008; Lima-Camara, 2016).

As larvas dos mosquitos são aquáticas e possuem uma aparência alongada, com variações de cor que podem ser esverdeadas, avermelhadas ou pretas. Possui o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, e apresenta cerca de vinte e dois pares de cerdas que desempenham funções tanto na flutuação, quanto na percepção sensorial. No primeiro estágio larval, possuem um dente quitinoso utilizado no processo de eclosão e um sifão para trocas gasosas, e se alimentam filtrando matéria orgânica e microrganismos presentes na água. Posteriormente, avançam para o estágio de pupa não se alimentando, tendo como principal função desenvolver-se para adultos (Consoli e Oliveira 1994; Rueda, 2008).

Na fase adulta, os mosquitos são terrestres, os machos se alimentam de seiva, néctar e exsudatos de plantas. Por outro lado, as fêmeas são obrigatoriamente hematófagas, ou seja,

necessitam se alimentar de sangue de animais vertebrados ou invertebrados para a ativação hormonal e obtenção de proteínas necessárias para o desenvolvimento de seus ovos (Winkerson, et al. 2020; Dou et al. 2022). É importante ressaltar que ao se alimentar do sangue de um hospedeiro infectado, as fêmeas podem ingerir patógenos presentes no sangue (Dimond, 1956; Attardo, 2005), que migram do intestino para as glândulas salivares do mosquito, permitindo que eles sejam transmitidos aos novos hospedeiros durante picadas subsequentes (Scoot, 2012; Farjana, 2013; Raquin, 2017).

Os culicídeos são de extrema importância na Entomologia médica por incluírem espécies de hospedeiros para agentes etiológicos como arbovírus (Ex. DENV, ZIKV, CHIKV, MAYV), protozoário (Ex. *Plasmodium* spp.) e filárias (Ex. *Wuchereria bancrofti*) responsáveis por ocasionar patologias como dengue, Chikungunya, febre amarela urbana, malária, filariose, vírus do Oeste do Nilo, encefalite de St. Louis, Oropouche, Mayaro, Rocio e outras arboviroses prejudiciais tanto para humanos quanto para animais silvestres e domésticos causando mortalidade e morbidade mundialmente devido a transmissão desses patógenos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Tadei et al. 1998).

### **Evolução da hematofagia de Culicidae**

O hábito hematófago evoluiu independentemente em diferentes linhagens de insetos, por sua vez dentro da mesma ordem, com origem estimada entre o Jurássico e Cretáceo (Balashov, 1984; Ribeiro, 1995; Wheeler et al. 2001). Atualmente, os grupos de insetos hematófagos conhecidos são: os percevejos e triatomíneos (Ordem Hemiptera); os piolhos (Ordem Phthiraptera); as pulgas (Ordem Siphonaptera), alguns grupos de mariposas (Ordem Lepidoptera); e moscas e mosquitos (Ordem Diptera) (Lehane, 2005; Brusca et al. 2018).

Conforme registros fósseis e análises morfofisiológicas e moleculares, é proposto duas hipóteses macroevolutivas relacionadas a hematofagia, primeiramente, que há uma associação íntima dos insetos com os vertebrados (répteis e mamíferos) no ninho, onde os insetos são atraídos devido as condições que propícias como a disponibilidade de alimento. Anteriormente, acreditava-se que os invertebrados mastigadores se alimentavam de detritos e aproveitavam produtos e secreções tegumentares, sangue e injúrias da pele do hospedeiro (Lehane, 2005).

A segunda hipótese está relacionada a insetos que possuíam pré-adaptações morfofisiológicas, que em conjunto com vertebrados em locais de habitat compartilhado, e alimentação sanguínea ao acaso, evoluíram para uma hematofagia completa. Conforme estudos, acredita-se que insetos originalmente fitófagos (alimentação de néctar) e entomófagos (alimentação de conteúdo interno de outros vertebrados) que continham um aparelho bucal perfurador primitivo

(Beklemishev, 1957; Downes, 1970; Waage, 1979; Lehane, 2005), como o caso de mosquitos hematófagos que em condições de laboratório foram capazes de produzir ovos viáveis por meio de alimentação dos líquidos corporais das larvas (Harris et al. 1969) e de borboletas que originalmente possuíam um aparelho sugador de néctar e que atualmente pode ser utilizado para alimentação sanguínea ocasionalmente (Zaspel et al. 2007). A hematofagia pode estar relacionada a processos de coespeciação e coevolução de vertebrados e invertebrados (Kim et al. 2011; Da Silva Neto, 2013; Cruz, 2017; Ferreira et al. 2018).

### **Digestão e o comportamento hematófago de Culicidae**

As fêmeas de Culicidae são hematófagas. Nesse comportamento, assumem uma postura intitulada solenofagia, no qual os as fêmeas retiram o sangue diretamente do capilar sanguíneo (Gordon et al. 1952).

Diversas adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais favorecem o sucesso na ingestão, armazenamento e digestão do sangue nos culicídeos, como as peças bucais do tipo picador-sugador labial, com apêndices bucais estiliformes e alongados, formados pelo labro, mandíbulas, maxilas e hipofaringe, estruturas estas protegidas pelo lábio, sendo estes retraídos no momento da inserção das peças bucais na derme, e posteriormente, diretamente no capilar, que em conjunto com as bombas do cibário e faringe promovem a sucção sanguínea retirando o sangue (Clements, 1992; Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Araújo et al. 2012; Da Silva Neto, 2013; Cruz, 2017).

No decorrer da alimentação sanguínea, a fêmea pode ingerir até quatro vezes o seu peso, influenciada por adaptações anatômicas do inseto, como a presença de dois divertículos para armazenamento adicional e uma membrana peritrófica (Gwadz, 1969; Nayar & Sauerman, 1977; Castillo et al. 2011).

A fêmea ao perfurar a pele por meio do aparelho bucal retira o sangue diretamente dos vasos sanguíneos, e no decorrer deste processo inocula sua saliva que possui moléculas vasodilatadoras, anticoagulantes e antiplaquetárias que permitem uma alimentação sanguínea de sucesso (Silva, 2009).

Os insetos direcionam o sangue diretamente para o intestino médio onde ele é estocado e digerido (Ribeiro, 1996). O trato digestivo dos mosquitos é constituído por células epiteliais que seguem da boca até o ânus (Romoser, 1996), formando um tubo dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e posterior, cada um com especializações e funções específicas (Consoli e Oliveria, 1994).

O intestino anterior é responsável pela ingestão, condução e armazenamento do alimento,

nele contém a bomba cibarial e faríngea que servem para a ingestão do alimento, o canal da probóscide, as glândulas salivares e o esôfago. Na porção final do esôfago há três divertículos: dois dorsolaterais e um ventral, os primeiros caracterizados por ficarem bastante dilatados na região abdominal, normalmente todos os divertículos apresentam-se cheios de ar e são utilizados como reservatórios de alimentos rico em açúcar (Consoli e Oliveira, 1994).

No final do esôfago há uma estrutura denominada cárdia ou válvula estomodeu, que direciona o alimento ingerido pela fêmea, ao ingerirem sangue a válvula se abre e o sangue é armazenado no intestino médio, contudo, ao se alimentarem de dieta açucarada, a válvula continua fechada e o alimento é encaminhado para o divertículo (Romoser, 1996).

O intestino médio é dividido em duas regiões, a anterior e a posterior, a última expansível, caracterizada por ser o local de destino, armazenamento, digestão do sangue a absorção de nutrientes (Billingsley e Lehane, 1996), favorecidas pela presença de microvilosidades, como o sangue é composto principalmente de proteínas, as proteases como a tripsina, tem papel fundamental na digestão do sangue. No intestino médio é sintetizada a matriz peritrófica, que envolve o alimento e separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o endoperitrófico e ectoperitrófico (Terra, 1990). Por fim, no intestino posterior ocorre a excreção de resíduos provenientes do intestino médio e túbulos de malpighi (Romoser, 1996).

Uma proporção significativa dos aminoácidos presentes no sangue é metabolizada e utilizada para a obtenção de energia, o restante, para a produção de proteínas da gema, com início logo no início da alimentação sanguínea (Kokoza, V.A. et al. 2001; Hansen et al. 2003). Posteriormente, as proteínas são liberadas na hemolinfa e então depositadas nos oócitos por endocitose mediada por receptores, processo este denominado vitelogênese (Sappington, T.W. et al. 1995)

Durante a hematofagia, a fêmea ao se alimentar de um indivíduo infectado, ela se contamina com o agente etiológico, os vírus por exemplo, que irá se replicar no intestino do vetor e se disseminar para as glândulas salivares. Por consequência, ao realizar a próxima alimentação sanguínea o mosquito pode repassar o vírus por meio da sua saliva para o hospedeiro (Oliveira et al. 2017, Guedes et al. 2017).

Compreender o comportamento da alimentação sanguínea das fêmeas é crucial para estudos relacionados a biologia, monitoramento e controle da transmissão do patógeno (Resende e Gama, 2006; Gonzales et al. 2018).

A preferência alimentar dos mosquitos por determinado hospedeiro é um processo complexo por envolver diversos fatores comportamentais, extrínsecos e intrínsecos, como o aparato sensorial presente nas fêmeas para buscar o hospedeiro e a densidade dele em determinado ambiente. A

preferência do hospedeiro pode ocasionar implicações para o desenvolvimento de dietas artificiais de corrente da composição do sangue de animais vertebrados serem diferentes entre si, podendo resultar na variação de ovos produzidos dependendo da espécie hospedeira (Takken, W.; Verhulst, N.O. 2013).

Devido a atração e níveis acentuados de alimentação na natureza, estudos indicam um tendência do *Ae. aegypti* em preferir o sangue humano (McClelland & Weitz, 1963; Gouck, 1972; McBride et al., 2014). Pesquisas afirmam que cerca de 80% da alimentação sanguínea em espécies de *Aedes* domesticadas, é oriunda de humanos, como demonstra Sivan et al. (2015) ao evidenciarem que 87,8% da população de fêmeas ingurgitadas em diferentes paisagens da Índia, alimentaram-se de sangue humano, seguida por uma pequena porcentagem de mamíferos (vacas: 4,8% e cabras: 2,7%), aves (galinha: 0,7%) e amostras de sangue de fontes desconhecidas (4,01%). Phasomkusolsil et al (2013) avaliaram a influência de diferentes fontes de sangue (Hamster anestesiado, sangue desfibrilado de ovelha, sangue desfibrilado de porco e sangue humano) no desenvolvimento do ciclo de vida de *An. dirus*, *An. cracens*, *An. minimus*, *An. sawadwongporni* e *Ae. aegypti* e todas as espécies de vetores apresentaram preferência para uma determinada fonte, *Ae. aegypti* por exemplo preferiu sangue de hamster e de ovelha, já *An. dirus* sangue humano e de porco.

Na Tailândia, foram coletados *Ae. aegypti* em diferentes localidades, sendo registrado que o sangue humano em uma única refeição ultrapassou 80% nas áreas designadas, com o segundo registro mais comum a combinação do sangue humano e de cachorro (4,6 a 16%) (Ponlawat e Harrington, 2005), já na zona rural 88% das alimentações sanguíneas das fêmeas analisadas foi oriunda de sangue humano e 7% de alimentação com múltiplos hospedeiros incluindo o humano, em seguida foi a alimentação realizada em cães com 2% e aves com 1% (Scott et al. 1993)

De acordo com a literatura, os elementos químicos mais estudados e de importância fisiológica presentes o sangue humano são os seguintes: alumínio, cobalto, cobre, molibdênio, manganês, níquel, selênio e zinco, em comparação com o sangue de camundongo Swinss, de acordo com estudos alguns elementos presentes no sangue dos mesmos são sódio, cálcio, potássio e manganês

### **O papel da urbanização na dispersão do *Aedes aegypti***

O crescimento urbano, aliado ao desenvolvimento do agronegócio voltado para a produção de *commodities*, tem provocado uma intensa fragmentação florestal. Decorrente dessa situação, o habitat de diversas espécies, tanto animais quanto vegetais, é reduzido, resultando no declínio ou até mesmo na extinção de algumas delas. Por outro lado, algumas espécies conseguem manter sua estabilidade ou aumentar sua abundância (Laurance, 2008; MS, 2013; Lindenmayer e Fischer,

2013; Haddad et al. 2015).

Os mosquitos estão entre as espécies que sofrem drasticamente com a perda do seu habitat devido a urbanização e fragmentação, podendo migrar para o ambiente urbano onde encontram condições devido ao seu comportamento sinantrópico, rápida reprodução e plasticidade genética (Lopes, 1997; Taípe-Lagos e Natal, 2003; Leisham et al., 2004; Zahouli et al. 2017; Montagner et al. 2017; Sukiato et al. 2019).

Acrescenta-se ainda que o aumento da temperatura, umidade e precipitação são condições favoráveis para o desenvolvimento de Culicidae (Rueda, 2008; Garcia, 2019). Prevê-se que o mundo tenha se tornado aproximadamente de 1,5% mais propício ao desenvolvimento de *Ae. aegypti* por década entre 1950 a 2000. Entretanto, estima-se um aumento dessa tendência para 3,2 a 4,4% por década, ademais, as projeções indicam uma dispersão de 2 a 6 km/ano até 2050 na América do Norte e China (Iwamura, T. 2020).

### *Aedes aegypti* como vetor de arbovíroses

Os arbovírus constituem o maior grupo de vírus, eles são mantidos na natureza por meio da transmissão entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos (Viglietta, M et al. 2021). Dentre os mosquitos, o gênero *Aedes* spp., especialmente o *Ae. aegypti*, encontrado principalmente em áreas urbanas, é o principal vetor de arbovíroses, incluindo dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana. Essas doenças representam uma preocupação global devido à sua rápida disseminação, importância epidemiológica e clínica (Nelson, M.J. 1986; Araújo, N. J. S et al. 2022). Atualmente, surtos de dengue foram registrados na região das Américas com cerca de três milhões de casos suspeitos e confirmados registrados até julho de 2023, com destaque no Brasil, Peru e Bolívia com o maior número de casos (WHO, 2023). A dengue, é causada por um vírus composto de uma fita única de ácido ribonucleico, com uma capa proteica de capsídeo icosaédrico, pertencente ao grupo B dos arbovírus, família *Flaviviridae*. Existem quatro principais sorotipos virais da dengue em circulação entre os humanos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), que estão geneticamente relacionados, porém antígenicamente distintos (Alagarasu, K et al. 2021).

Recentemente, foi relatada a identificação de um quinto sorotipo na Malásia e na Ásia, servindo como alerta para monitoramento. (Wilder et al. 2017). Ambos os sorotipos mencionados podem se apresentar clinicamente em duas formas: a dengue clássica (conhecida como febre de dengue) e a dengue grave (Normile, D.2013; Mustafá, M.S et al.2015).

A primeira epidemia de dengue registrada no Brasil ocorreu nos anos de 1981 e 1982, em Boa Vista, no estado de Roraima, causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. O sorotipo DENV-2

foi introduzido no Rio de Janeiro em 1990, e após nove anos o sorotipo DENV-3 foi registrado nos estados do Amapá, Pará, Roraima e Tocantins. Nas últimas décadas, o Brasil enfrentou várias epidemias de dengue, associadas a diferentes sorotipos virais, incluindo DENV-1 em 1998, DENV-3 em 2002, DENV-2 em 2008 e DENV-4 em 2010 e 2015 (Trindade et al. 2021).

Segundo dados do Ministério da Saúde no período de janeiro a dezembro de 2021 houve 534.743 casos no país, com destaque no estado do Paraná que apresentou 36.693 casos, contudo no período de janeiro a junho de 2022 houve 1.172.882 no Brasil (MS, 2021; MS, 2022).

No período epidemiológico da semana 1 a 37 de 2023 foram confirmados 21.624 casos de dengue do país, demonstrando um aumento de 16,4% em comparação com o mesmo período no ano anterior (MS, 2023). Atualmente, em 2024 nos meses de janeiro a março foram registrados 1.253.919 casos prováveis, com 617,5 casos/ 100 mil habitantes (MS, 2024).

De acordo com o boletim epidemiológico de dengue do estado do Paraná da semana epidemiológica de 31-17 de 2022, o estado apresentou 11.678 casos confirmados, entretanto, dados da mesma semana epidemiológica do ano de 2023 indicou aumento de duas vezes, com 35.433 casos confirmados da arbovirose no estado (S.S, 2022; S.S, 2023). O primeiro informe dos casos de dengue confirmados do estado do Paraná em 2024 demonstra 3.234 novos casos da doença, somando um total de 9.189 casos confirmados (SS, 2024).

### **Estratégias de monitoramento e controle do vetor**

A problemática relacionada a veiculação de arbovírus pelos culicídeos, demonstra a necessidade de metodologias e estratégias que visam a prevenção e o manejo do risco de transmissão dos patógenos. Dentre elas, as mais empregadas estão relacionadas com a detecção da presença ou ausência do vetor e que estimam a densidade e a abundância em campo.

Desde 1996, o Ministério da Saúde implementou programas para o monitoramento e controle do vetor, com destaque no Plano Nacional de Controle de Dengue (PNCD), que está em vigor desde 2022. A implementação desse plano foi motivada pelo aumento do risco de pandemias, casos graves de dengue, pela rápida reintrodução e disseminação do sorotipo 3 no Brasil. Uma das estratégias do PNCD é a realização do Levantamento Rápido de Índice de *Aedes aegypti* (LIRAA), que utiliza a amostragem e coleta de larvas em recipientes encontrados em casas da população, identificando de forma rápida índices de infestação predial que considera o percentual de imóveis com a presença de larvas e o índice de Breteau, que considera a relação entre recipientes com a presença de larvas e a quantidade de imóveis que foram analisados (MS, 2013; Nascimento, 2020; Silva, 2021).

Outra estratégia de monitoramento são as armadilhas, como as ovitrampas para a coleta de

ovos, que consistem em um recipiente preto de boca larga, contendo uma palheta de madeira com um dos seus lados ásperos, sendo preenchido com soluções atrativas ou apenas água. As fêmeas depositam seus ovos na palheta, e a contagem destes ovos permite determinar o índice de abundância indireta de mosquitos, a distribuição local e a temporal, sendo o método mais sensível para detecção do vetor e de menor custo (Fay e Perry, 1965; Regis et al. 2008; Fiocruz, 2014; Depoli et al. 2016).

As armadilhas para coleta de larvas, as Larvitrapas, utiliza também a presença de larvas para o monitoramento do vetor. Geralmente, é feita por meio de pneus cortados transversalmente, permitindo o acúmulo de água das chuvas, para posterior eclosão dos ovos. Esta armadilha é vistoriada semanalmente, e a partir da presença de larvas são tomadas ações para evitar a proliferação do vetor (Brasil, 2009; Brasil, 2013; Miró et al. 2018).

A aduiltrap tem como objetivo capturar fêmeas adultas grávidas em oviposição, simulando condições favoráveis para a postura sem se tornar um criadouro, consiste em uma forma cilíndrica com a extremidade côncava, contendo um espaço para a passagem do mosquito. Lateralmente, é revestida por uma tela fina, conectada a um recipiente para a adição de água ou solução atrativa. Internamente, possui dois compartimentos separados por um material transparente em formato de cone, proporcionando um espaço suficiente para a passagem da fêmea (Gomes, 2007; Arduino, 2023).

Para coleta ativa de adultos utiliza-se o aspirador de nasci, este equipamento consiste em um aspirador cilíndrico de zinco com um tecido tule e uma hélice conectada a uma bateria de 12 volts para o seu funcionamento. O aspirador é eficiente para a busca dos insetos, capturando-os em pleno voo ou escondidos em abrigos (Nasci, 1981).

Os inseticidas químicos à base de organofosforados e carbamatos eram comumente utilizados para o controle de larvas e adultos no Brasil, tanto por ações governamentais como pela sociedade em geral, motivadas pelo baixo custo e fácil manuseio. No entanto, esses produtos são generalistas, ou seja, têm ação a demais insetos, não apenas ao inseto alvo. Acrescenta-se ainda que a utilização destas substâncias a base de piretróide aumenta a seleção de indivíduos resistentes, devido a alelos *Kdr* como demonstrado por Lopes et al. (2021), que afirmam que 55% da população de *Ae. aegypti* de Londrina apresenta resistência a essa formulação. Atualmente, o inseticida comumente utilizado é à base de piretróide e neonicotinóide, chamado Cielo (MS, 2020b). São produtos prejudiciais à saúde humana e ambiental devido à toxicidade, que, por meio da lixiviação, acaba levando seus compostos para áreas distantes do alvo, contaminando solos, rios, lagos, águas superficiais e fontes de águas subterrâneas. Além disso, a exposição humana a estes compostos pode ocorrer na inalação, via oral e absorção pela pele (Lima e Gurgel, 2018).

Devido ao cenário atual e a problemática da utilização de inseticidas químicos, métodos originais são recomendados (Corbel et al. 2016). Neste contexto, agentes de controle biológico têm se destacado devido a sua capacidade de interação específica com o inseto alvo, por não selecionar indivíduos resistentes em campo e não causarem danos ao ambiente (Lacey et al. 2015; Saldanã et al. 2017).

Diversas estratégias inovadoras para o controle biológico de mosquitos estão sendo desenvolvidas e aprimoradas (Zara et al. 2016; Macias et al. 2017), como técnicas de manipulação genética (ex: *sterile insect technique*) (Alphey et al. 2010), utilização de fêmeas infectadas com a bactéria *Wolbachia* sp. capaz de bloquear a infecção do mosquito pelos patógenos (Oliveira et al. 2015; Oliveira et al. 2017), fora técnica de edição de genes (Macias et al. 2017). Assim como a utilização de mosquitos transgênicos com gene letal ou mosquitos estéreis, a esterilização por irradiação, onde os insetos machos são tratados com uma dose de raios X para a indução de reajustes cromossômicos aleatórios que levam a esterilização do inseto e agentes microbianos com atividade inseticida contra larvas de mosquitos transmissores de agentes etiológicos estão em andamento. Nesta perspectiva, as bactérias entomopatogênicas como *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911, têm ganhado notoriedade em relação com a sua especificidade de mecanismo de ação (Costa et al. 2010; Sarmiento et al. 2016; Fukruksa et al. 2017).

### ***Bacillus thuringiensis* como microrganismo entomopatogênico e seu mecanismo de ação**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria com ação inseticida principalmente para insetos pertencentes às ordens Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Coleoptera. Diferentes linhagens de *B. thuringiensis* têm a capacidade de formar diferentes toxinas, as quais são eficazes para o controle de pragas agrícolas e contra mosquitos vetores de patógenos em humanos, como malária e dengue. Essas toxinas apresentam alta especificidade entomopatogênica, o que permite o uso de produtos à base de Bt que não provoquem danos a outros insetos, inimigos naturais, ao meio ambiente e vertebrados. Adicionalmente, produtos à base de Bt não selecionam resistência, mesmo após cerca de 100 anos de uso (Boyce et al. 2013; Schnef et al. 1998; Bravo et al. 2007; Zequi et al. 2015) devido ao sinergismo de ação entre toxinas e à grande variedade delas.

Linhagens de *B. thuringiensis* são isoladas mundialmente a partir de diversos substratos como solos, animais mortos, plantas entre outros (Höfte e Whiteley 1989; Polanczyk e Alves 2003; Ricieto et al. 2013; Glazer e Filho 2016; Liu et al. 2016). Com o avanço das pesquisas o *B. thuringiensis* tem ganhado destaque e a comunidade científica passou a focar em estudos relacionados a variabilidade genética, a prospecção e caracterização de novos genes é feita por Reação em Cadeia da Polimerase, e análises genéticas como transcriptoma e proteômicas tem

contribuído para descoberta de fatores de virulência expressos pelas cepas do *B. thuringiensis* (Rosas García et al. 2008) Ademais, diferentes linhagens dessa bactéria têm sido empregadas para a fabricação de diversos inseticidas biológicos por serem de fácil produção em larga escala (Kumar et al. 2008; Andrade Angelo et al. 2010; Bravo et al. 2011).

O mecanismo de ação inseticida de *B. thuringiensis* se dá graças à presença de cristais proteicos produzidos durante a esporulação, os quais são compostos por proteínas com ação tóxica (Alves, 1998; Polanczyk e Alves, 2003). Estes cristais podem ser compostos por duas famílias proteicas, Cry (cristal) e Cyt (citolíticas). Por sua vez, linhagens de *B. thuringiensis* também podem produzir outras toxinas, inclusive na fase de crescimento vegetativo, como a toxina Vip, que também apresenta ação sobre diferentes ordens de insetos (Höfte e Whiteley 1989; Alves 1998; Bravo e Soberón 2007; Frankenhuyzen 2013; Badran et al. 2016). Após os insetos ingerirem os esporos e cristais da bactéria, no intestino com pH alcalino, os cristais são solubilizados liberando as proteínas na forma de protoxinas, as quais são ativadas pela ação de enzimas digestivas, sendo convertidas em polipeptídeos tóxicos. Após ativação as toxinas ligam-se a receptores celulares na borda apical do epitélio do intestino do inseto, criando canais iônicos ou poros, levando a lise celular e liberação de componentes celulares. As proteínas Cry e Cyt causam a paralisação das funções digestivas do inseto, ruptura das membranas celulares, paralisação dos músculos e infecção generalizada (sepsis), resultando na morte do inseto hospedeiro (Hofte e Whiteley 1989; Bravo et al. 2007; Copping e Menn 2000; Zhang et al. 2016).

### **O sangue artificial como ferramenta para a criação massal de *Aedes aegypti***

Diversas estratégias de controle do vetor têm sido desenvolvidas como mencionadas anteriormente, entretanto todas essas abordagens exigem a produção em massa de mosquitos, além da manutenção de um biotério de vertebrados vivos, como roedores ou aves, que servem como fonte sanguínea para alimentação das fêmeas (Gonzales Hansen, 2016). Acrescenta-se, o risco de contaminação, as exigências de armazenamento e a baixa vida útil é um obstáculo para o seu uso (Kandel et al. 2020). Dessa forma, o Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEUA) seguindo orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), incentiva a substituição, redução e refinamento em relação à utilização de animais vivos. Nesse sentido, é recomendado o uso de alimentadores com sangue artificial como alternativa. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos estudos com o objetivo de identificar substitutos do sangue animal que sejam de baixo custo para a manutenção das criações e eficaz como fonte de alimento (Gonzales et al. 2018; Herculano, 2020).

Uma alternativa para reduzir os custos e eliminar o uso de animais vivos é formulação de

dietas, porém isso requer a observância de certos padrões, que incluem garantir que as fêmeas ingiram a quantidade suficiente da refeição, que a dieta promova a vitelogenese, resultando em uma grande oviposição de ovos, que não altere o comportamento e a imunidade do inseto ao ingerir a dieta (Gonzales, 2016).

Para o sucesso da vitelogenese, a dieta apresenta alguns requisitos em sua composição, dentre eles uma fonte de proteína (Kogan, 1990). Diversos estudos foram realizados para determinar diferentes dietas com o objetivo do desenvolvimento adequado dos ovos, segundo Lea et al. (1955) demonstraram que o *Ae. aegypti* e *Ae. quadrimaculatus* ao serem alimentados com uma solução de leite desnatado e mel ou mel com sangue obtiveram uma produção de ovos viáveis. O *Ae. aegypti* ao ser alimentado com uma refeição a base de três proteínas suínas ( $\gamma$ -globulinas, hemoglobina e albumina) dissolvidas em cloreto de sódio e adenosina trifosfato apresentou um aumento significativo na oviposição dos ovos devido a concentração de proteína ter sido alterada de 60 mg/mL para 125 mg/ml (Kogan, 1990). Pitts (2014) formulou uma refeição para *Ae. albopictus* com ausência de sangue que consistia em 100 e 200 mg/ml de BSA em solução salina tamponada com fosfato (PBS), resultando em uma oviposição dos ovos das fêmeas de 57 e 92,2 com a refeição respectivamente. Ainda segundo Pitts (2014) a concentração de 200 mg/mL mostrou-se possuir a quantidade suficiente de proteína para suportar a vitelogenese, onde *Ae. albopictus* alcançou até a sexta geração por meio da dieta artificial.

Em 2018, foi desenvolvido o SkitoSnake, um substituto do sangue composto por um sistema tampão, adenosina trifosfato (ATP), albumina bovina, gema de ovo e albumina. Fêmeas alimentadas com SkitoSnack apresentaram taxas elevadas de ingurgitamento, oviposição e eclosão dos ovos, semelhantes às fêmeas alimentadas com sangue animal. No entanto, houve diferenças na microbiota presente no intestino médio do inseto. Adicionalmente, destaca-se a longa vida útil da dieta quando armazenada em pó, tornando-se uma alternativa eficaz para substituir o sangue (Kendal, 2020) e contribuir para manutenção de insetário visando diferentes estudos básicos ou experimentais com Culicidae sem comprometer sua biologia.

### **Estudo morfológico do abdome de *Aedes (Stegomyia) aegypti* por meio da microtomografia computadorizada por raio x (Micro- CT)**

A microtomografia computadorizada (micro CT) é uma técnica não destrutiva que utiliza raio - X para mapear o coeficiente de atenuação do material presente na amostra, fornecendo imagens tridimensionais com alta qualidade de resolução do objeto em estudo. A atenuação ocorre quando um feixe de fótons atravessa o objeto, sendo influenciado pelos materiais presentes naquele

ponto e pelo espectro do feixe de fótons, que consiste em diferentes níveis de energia. Não são todos os fótons incidentes que conseguem atravessar a amostra, resultando em atenuação (Sena, 2015; Lima, 2022)

A atenuação é medida por meio de uma câmera CCD (sigla em inglês para Dispositivo de Carga Acoplada), a partir de projeções em diferentes ângulos e utilizando modelos matemáticos é possível inferir a atenuação da radiação em menor área amostral (pixel), ou imagens em 3D. O coeficiente de atenuação é representado em escala de cinza, distribuídos entre elementos de pixel/voxel com maior e menor atenuação de radiação (Jussiani, 2015)

A micro CT é uma tecnologia utilizada em diferentes áreas, incluindo a farmacêutica, onde é aplicada para analisar a microestrutura de grânulos farmacêuticos e determinar parâmetros como a porosidade total (Farber, 2013). Na caracterização das rochas de reservatório (Appoloni et al. 2007; Marques et al. 2011; Fernandes et al. 2012) e em hipóteses taxonômicas (Heim e Nickel 2010; McPeck et al. 2011; Csösz, 2012). Por meio da micro CT, novas informações sobre morfologia e anatomia foram descobertas (Golding e Jones 2006, Greco et al. 2008, Dinley et al. 2010, Huckstorf e Wirkner, 2011), além da utilização da técnica na morfologia funcional (Nickel et al. 2006; Patek et al. 2007; Bond et al. 2008, Wilhelm et al. 2011; Alba-Tercedor e Sánchez-Tocino 2011) e na paleontologia (Hendrickx et al. 2006, Molineux et al. 2007, Penney et al. 2007; Dierick et al. 2007, Sutton, 2008; Dunlop et al. 2011). A micro CT também tem sido utilizada para o estudo dos insetos, como por exemplo na faringe de *Ascioplaga mimeta* Neboiss (Coleoptera) (Hornschemeyer et al. 2006) a cabeça de *Tetraphalerus bruchi* (Coleoptera) (Beutel et al. 2008), *Quedius beesoni* Cameron (Coleoptera) (Zhang et al. 2010).

Apesar de existirem diversos estudos que utilizam a micro- CT, há uma escassez de trabalhos que exploram esta técnica para o *Ae. aegypti*, inseto de importância médica (Lima, 2022). Alguns estudos utilizaram a micro-CT para analisar as diferenças entre os ovos de diferentes espécies do gênero *Aedes* spp. (Lima et al. 2022), no entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a morfologia desses insetos, a fim de contribuir com o entendimento de seus hábitos, como a hematofagia realizada pelas fêmeas, podendo comparar o desenvolvimento do seu ovário antes e depois do repasto sanguíneo, considerando diferentes fontes sanguíneas (Suman et al.2011; Faull.K.L; De Morais et al. 2019).

### **Análise elementar por meio de espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total**

A fluorescência de Raio X (XRF) é uma técnica analítica multielementar que permite a obtenção de dados qualitativos e quantitativos sobre a composição elementar de uma amostra, além de não destrutiva. A amostra é irradiada com partículas aceleradas, como prótons, elétrons, íons, ou

com partículas alfa, beta ou gama, que possuem energias apropriadas ou raios X. Essa radiação faz com que a amostra emita raios X característicos dos elementos presentes nela (Melo Junior, 2007).

A XFR apresenta duas variações: dispersão de comprimento de onda (WDXRF) e a dispersão por energia (EDXRF). A EDXRF é subdividida em fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) e a microfluorescência de raio X. Na TXRF, um feixe de radiação gerado por tubos com elemento alvo, como molibdênio, ródio, e outros, passa pelo vácuo ou ar e atinge a superfície da amostra. Neste processo, o feixe pode sofrer refração, reflexão ou propagação, dependendo da energia de radiação incidente, da densidade eletrônica da amostra e do ângulo de incidência da radiação (Cunha e Silva et al. 2004).

A TXRF possui diversas vantagens em relação a outras técnicas, como a capacidade de análise de amostras líquidas e sólidas e a menor distância entre a amostra e o detector, resultando em uma maior sensibilidade na detecção dos raios X emitidos. Além disso, a TXRF requer quantidades mínimas de amostra para a análise, em torno de 10 µl ou 10 µg (Cunha e Silva et al. 2004)

A técnica TXRF tem sido amplamente utilizada em diversos estudos, entre as aplicações, destacam-se a análise de elementos presentes no sangue humano (Pinto et al. 2010), resíduos de armas de fogo (Ferreira, 2020), saliva e plasma de atletas após esforços físicos (Cleto, 2017). Além disso, a TXRF é empregada na análise de ligas, pigmentos, rochas, cerâmicas e diversos outros materiais encontrados em obras artísticas (Santos et al. 2013) e análise sanguínea de animais utilizados em experimentos como hamster, entre outros (Redígolo, 2011)

A fêmea *de Ae. aegypti* utiliza diferentes fontes sanguíneas para a maturação de seus ovos, contudo não há estudos sobre os elementos presentes no mesmo.

## OBJETIVOS

- Objetivo Geral:
  - Analisar a viabilidade do uso de sangue artificial para criação massal de *Aedes aegypti*, assim como os danos causados nas larvas de inseto, pela linhagem *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101 detectados por microtomografia computadorizada de Raio X.
- Objetivos específicos:
  - Avaliar a capacidade de ingurgitamento de fêmeas *de Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue artificial e de mamíferos e sua influência no ciclo de vida do vetor.
  - Obter dados referentes aos elementos químicos presentes no sangue artificial.

- Caracterizar morfológicamente o ovário de fêmeas de *Aedes aegypti* após alimentação sanguínea e açucarada por meio de micro-CT.
- Caracterizar genotipicamente a linhagem *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101.
- Avaliar a toxicidade de diferentes formulações à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101 contra larvas de *Aedes aegypti* em comparação com a avaliação de um produto comercial à base de Bti.
- Caracterizar os danos ocasionados pelo produto à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101 às larvas de *Aedes aegypti*.

### **HIPÓTESE**

- O sangue artificial demonstrará ser eficaz para a manutenção da criação de *Aedes aegypti* em laboratório.
- A linhagem *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101 é eficiente como agente de controle biológico do *Aedes aegypti*.

## REFERÊNCIAS

- Alagarasu, K., Patil, J.A., Kakade, M.B., More, A.M., Yogesh, B., Newase, P., Jadhav, S.M., Parashar D., Kaur, H., Gupta, N., et al. (2021). Serotype and genotype diversity of dengue viruses circulating in India: A multi-centre retrospective study involving the Virus Research Diagnostic Laboratory Network in 2018. *International Journal of Infectious Diseases*, 111, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.08.045>
- Alba-Tercedor J, Sánchez-Tocino L. (2011). The use of the SkyScan 1172 high-resolution micro-CT to elucidate if the spicules of the sea slugs (Mollusca: Nudibranchia, Opisthobranchia) have a structural or a defensive function. In: *SkyScan Users Meeting*. Belgium: Leuven, 2011. p. 113-12.
- Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G. G., Dame, D. A.; Service, M. W.; Dobson, S. L. (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10 (3), 295-311. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0014>
- Alves, S.B. (1998). *Controle microbiano de insetos*. (2ª ed). Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 1163p.
- Andrade Angelo, E., Vilas-Bôas, G.T., Castro-Gómez, R.J.H. (2010). *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(4).
- Appoloni, C.R., Fernandes, C.P., Rodrigues, C.R.O. (2007). X-ray microtomography study of a sandstone reservoir rock. *Nuclear instruments and methods in physics research section A. Accelerators, Spectrometers, detectors and associated equipment*. Res. 580,629–632. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2007.05.027>
- Araújo, N.J.S., Macedo, M.F., de Moraes, L.P., da Cunha, F.A.B., de Matos, Y.M.L.S., de Almeida, R.S; Braga, M.F.B.M., Coutinho, H. D. M. (2022). Control of arboviroses vectors using biological control by *Wolbachia pipientis*: A short review. *Archives of Microbiology*. 204(2), 376. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02983-x>
- Araújo, R. N., Gontijo, N. F., Lazzari, C. R.; Pereira, M. H. Interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros vertebrados. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, p. 1-15, 2012.
- Arduino, M. B., Santos, G. V., & Rangel, O. (2023). Adultrap® trap optimized for collecting vector mosquito eggs, larvae and adults. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 75, 633-643. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12843>
- Attardo, G. M., Hansen, I. A., & Raikhel, A. S. (2005). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), 661-675. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.02.013>
- Awono-Ambene, H.P., Diawara, L., Robert, V. (2001). Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 64 (1), 32-34. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.32>

- Badran, A.H., Guzov, V.M., Huai, Q., Kemp, M.M., Vishwanath, P., Kain, W., Nance, A.M., Evdokimov, A.; Moshiri, F.; Turner, K.H.; et al. (2016). Continuous evolution of *B. thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533: 58-63. <https://doi.org/10.1038/nature17938>.
- Beutel R. G., GE S. Q., Hornschemeyer T. (2008). On the Head Morphology of Tetraptera, the Phylogeny of Archostemata and the Branching Events in Coleoptera. *Cladistics*, 24, 270-298. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-0031.2007.00186.x>
- Billingsley, P.F., Lehane, M.J., 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, M.J. & Billingsley, P.F. (Eds.), *Biology of the insect midgut*, Londres, Chapman & Hall, 1a. edição, p. 86-114.
- Bond J, Hörschmeyer T, Young P, Yang L (2008) *Malha de dados XMT para estudar a função e morfologia do besouro Priacma serrata cabeça e mandíbula*. In: Anais da 2ª Conferência Internacional de Engenharia Biônica (ICBE'08), Changchun (China) outubro
- Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A., Velayudhan, R., Roberts, B; Hobstick, O. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Tropical medicine Health*, 18(5), 564-77. <https://doi.org/10.1111/tmi.12087>
- Balashov, Y. S. (1984). Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. *Annual review of entomology*, v. 29, n. 1, p. 137-156.
- Beklemishev, V. N. (1957) Some general problems of the biology of blood-sucking lower Diptera. *Meditinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni*, v. 26, n. 5, p. 562- 566.
- Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue*. Brasília. (2009). 157 p. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_controle\\_dengue.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf).
- Brasil. Ministério Da Saúde. 2013. *Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti-LIRAA para vigilância entomológica do Aedes aegypti no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipiente*. Brasília, Brasil, 86.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423-435. <https://doi.org/10.1016%2Fj.toxicon.2006.11.022>
- Brusca, R.C.; Moore, W.; Shuster, S. M. Invertebrados. 3a edição. Editora Guanabara-Koogan, 2018.
- Castillo, J., Brown, M. R., Strand, M. R. (2011). Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS pathogens*, 7 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002274>
- Clements, A. N. (1992). *The biology of mosquitoes*. Volume 1: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall.
- Clements, A. N. (1999). *The biology of mosquitoes*. Vol. 2. Sensory reception and behaviour. CAB International, Wallingford, United Kingdom,

- Cleto, D. A. M. (2017). Aplicação da técnica de fluorescência de raio x por reflexão total (txrf) para análises de amostras de saliva e plasma de atletas pré e pós esforço físico. Tese (Doutorado em Física) Universidade Estadual de Londrina.
- Consoli, R.A.G.B; Oliveira,R.L.1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz.Rio de Janeiro.
- Copping, L.G.; Menn, J.J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56, 651-676. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8%3C651::AID-PS201%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8%3C651::AID-PS201%3E3.0.CO;2-U)
- Corbel, V., Achee, N. L., Chandre, F., Coulibaly, M. B., Dusfour, I., Fonseca, D. M., ... & David, J. P. (2016). Tracking insecticide resistance in mosquito vectors of arboviruses: the Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). *PLoS neglected tropical diseases*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005054>
- Costa, J.R.V., Rossi, J.R., Marucci, S.C., Alves, E.C.C., Volpe, H.X.L., Ferraudo, A.S., Lemos, V.F.M., Desidério, J.A. (2010). Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (l.) (Diptera: culicidae). *Neotropical Entomology*, 39, 757-766. <http://hdl.handle.net/11449/1487>.
- Cruz, L. Comportamento hematófago em dípteros (Insecta: Diptera): caracterização, evolução, bases morfo-anatômicas e mecanismos fisio-moleculares. *Boletim PETBio UFMA / n° 41*, 2017.
- Csösz S. (2012). Nematode infection as significant source of unjustified taxonomic descriptions in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*. 17, 27–31. [http://www.myrmecologicalnews.org/cms/images/pdf/volume17/mn17\\_27-31\\_non-printable.pdf](http://www.myrmecologicalnews.org/cms/images/pdf/volume17/mn17_27-31_non-printable.pdf)
- Cunha e Silva. R.M., Nascimento Filho, V.F., Appoloni, C.R. (2008). Fluorescência de raios X por dispersão de energia. *LFNATEC Publicação Técnica do Laboratório de Física Nuclear Aplicada*. v. 08, n. 01.
- Da Silva Neto, M. A. C., Winter, C., Termignoni, C. (2013) *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. Itabajara da Silva Vaz Junior
- Day, M. F. (1954). The mechanism of food distribution to midgut or diverticula in the mosquito. *Australian journal of biological sciences*, 7(4), 515-524. <https://doi.org/10.1071/bi9540515>
- De Moraes L.M.O., Jussiani E.I., Zequi J.A.C., dos Reis P.J., Andrello A.C. (2019). Morphological study of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs by X-ray computed microtomography. *Micron*, 13(1), <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28510-6>
- Depoli, P.A.C., Zequi, J.A.C., Nascimento, K.L.C., Lopes, J. (2016). Eficácia de Ovitampas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*. *EntomoBrasilis*. 9, 51–55 <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v9i1.509>
- Dierick M., Cnudde V., Masschaele B., Vlassenbroeck J., Van Hoorebeke L., Jacobs P. (2007). Micro CT de fósseis preservados em âmbar. *Instrumentos Nucleares e Métodos em Pesquisa Física A*, 580, 641–643.

- Dimond JB., Lea AO., Hahnert WF., DeLong DM. (1956). The amino acids required for egg production in *Aedes aegypti*. *The Canadian Entomologist*. 88 (2), 57–62. <https://doi.org/10.4039/Ent8857-2>
- Dinley J., Hawkins L., Paterson GLJ., Ball AD., Sinclair I., Sinnott-Jones P., Lanham S. (2010). Tomografia de raios-X microcomputadorizada: um novo método não destrutivo de avaliação de imagens seccionais, fly-through e 3D de um verme marinho de corpo mole. *Journal of Microscopy*. 238, 123–33.
- Dou, X., Chen, K., Brown, M.R., Strand, M.R. (2022). Multiple endocrine factors regulate nutrient mobilization and storage in *Aedes aegypti* during a gonadotrophic cycle. *Insect Science*. Online Version of Record. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13110>
- Downes, John A. 1971. The ecology of blood-sucking Diptera: an evolutionary perspective. *Ecology and physiology of parasites*, p. 232-258.
- Dunlop JA., Wirth S., Penney D., McNeil A., Bradley RS., Withers PJ., Preziosi RF. (2011). A ácaro fóssil minúsculo recuperado por tomografia computadorizada de raios-X de contraste de fase. *Biologia cartas*, 8, 457-460
- Eiras, A. Culicidae. In: Neves, D.P et al. (2016). *Parasitologia Humana*. 13 ed. Atheneu, São Paulo, pp. 411-424.
- Farber, L., Tardos, G. and Michaels, J. N. (2003). Use of X-ray tomography to study the porosity and morphology of granules. *Powder Technol.* 132, 57-63. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(03\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(03)00043-3)
- Farjana T, Tuno N. (2013). Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 50 (4), 838–846. <https://doi.org/10.1603/ME12146>
- Faull, K. J., Willians, C. R. (2016). Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) eggs using scanning electron microscopy. *Arthropod structure & development*, 45 (3), 273–280 <https://doi.org/10.1016/j.asd.2016.01.009>
- Fay, R.W., Perry, A.S., 1965. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 25(3), 276–281.
- Fernandes, J.S., Appoloni, C.R., Fernandes, C.P., (2012). Determination of the representative elementary volume for the study of sandstones and siltstones by X-ray microtomography. *Materials Research*. 15, 662–670. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392012005000081>
- Ferreira, C. M.; Stiebler, R.; Saraiva, F. M.; Lechuga, G. C.; Walternuno, A. B.; Bourguignon, S. C.; ... & Oliveira, M. F. 2018. Heme crystallization in a Chagas disease vector acts as a redox-protective mechanism to allow Insect 75 reproduction and parasite infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 7.
- Ferreira, L.P. (2020). Identificação e discriminação de resíduos de disparo de uma arma de fogo por fluorescência de raios x por reflexão total, espectromia de massas com ionização por spray e

técnicas quimiométricas. Tese (Doutorado em ciências) Universidade Federal de Minas Gerais.

Fiocruz. Fundação Oswaldo Cruz. Avaliação de armadilhas para a vigilância entomológica de *Aedes aegypti* com vistas à elaboração de novos índices de infestação. *Nota técnica* N.º 3/2014/ioc-fiocruz/diretoria. 2014

Foratinni, O.P. (2002). *Culicidologia Médica*. vol.2.864p.

Frankenhuyzen, K.V. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>

Fukruksa, C., Yimthin, T., Suwannaroj, M., Muangpat, P., Tandhavanant, S., Thanwisai, A., Vitta, A. (2017). Isolation and identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria associated with entomopathogenic nematodes and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 10, 440

Garcia da Silva et al.(1998). Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Revista de patologia tropical*, 27 (1). <https://doi.org/10.5216/rpt.v27i1.17196>

Garcia GA, Sylvestre G, Aguiar R, da Costa GB, Martins AJ, et al. 2019. Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure *Wolbachia* invasion. *Plos Neglected tropical*. 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007023>

Golding RE., Jones AS .(2006). Micro-CT como uma nova técnica para reconstrução 3D de moluscos pode anatomia. *Molluscan Research*,27,123–128.

Gomes, A. D. C., Silva, N. N. D., Bernal, R. T. I., Leandro, A. D. S., Camargo, N. J. D., Silva, A. M. D. & Moura, S. M. D. (2007). Especificidade da armadilha Adultrap para capturar fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 216-219. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200014>

Gonzales, K. K., & Hansen, I. A. (2016). Artificial Diets for Mosquitoes. *International journal of environmental research and public health*, 13(12), 1267. <https://doi.org/10.3390/ijerph13121267>

Gonzales, K.K., Rodriguez, S.D., Chung, H.N., Kowalski, M., Vulcan, J., Moore, E.L., Li, Y., Willette, S.M., Kandel, Y., Van Voorhies, W.A., et al. (2018). The effect of SkitoSnack, an artificial blood meal replacement, on *Aedes aegypti* life history traits and gut microbiota. *Scientific Reports*, 8, 11023. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29415-5>

Gordon, R., Crewe, W. 1952. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of Chrysops and Cimex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 42, 335-356.

- Greco, M., Jones, A., Spooner-Hart, R., & Holford, P. (2008). X-ray computerised microtomography (MicroCT): a new technique for assessing external and internal morphology of bees. *Journal of Apicultural Research*, 47(4), 286-291.
- Guedes, Duschinka RD et al. (2017). Zika vírus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging microbes & infections*, 6 (1),1-11. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59>
- Gwadz, R. W. (1969) Regulation of blood meal size in the mosquito. *Journal of Insect Physiology*, 15(11), 2039–2044. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(69\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(69)90071-7)
- Haddad et al. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth’s ecosystems. *Science advance* 1(2), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052>
- Hansen, I.A.; Gutschmann, V.; Meyer, S.R.; Scheller, K. 2003. Functional dissection of the hexamerin receptor and its ligand arylphorin in the blowfly *Calliphora vicina*. *Insect Mol. Biol.* 12, 427–432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2003.00426.x>
- Harbach, R. (2021). *Mosquito Taxonomic Inventory*. <Http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045> (accessed 01 mai. 2022)
- Heim I., Nickel M. (2010). Descrição e filogenia molecular de *Tethya leysaesp. nov.* (Porifera, Demospongiae, Hadromerida) do nordeste do Pacífico canadense com comentários sobre o uso da microtomografia na taxonomia de esponjas. *Zootaxa* ,21, 1–21. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.194503>
- Hendrickx H, Cnudde V, Masschaele B, Dierick M, Vlassenbroeck J, Van Hoorebeke L (2006) Description of a new fossil *Pseudogarypus* (Pseudoscorpiones: Pseudogarypidae) with the use of X-ray micro-CT to penetrate opaque amber. *Zootaxa*, 1305, 41–50.
- Herculano, Pedro Henrique.(2020). Manutenção de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae) em condições de laboratório: uma revisão sistemática. Dissertação (Mestrado em Entomologia em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, University of São Paulo, São Paulo.
- Höfte, H., & Whiteley, H. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological reviews*, 53(2), 242-255. <https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989>
- Hörschemeyer, T., Goebels, J., Weidemann, G., Faber, C., & Haase, A. (2006). The head morphology of *Ascioplaga mimeta* (Coleoptera: Archostemata) and the phylogeny of Archostemata. *European Journal of Entomology*, 103(2), 409. <https://doi.org/10.14411/eje.2006.055>
- Huckstorf K, Wirkner CS (2011) Morfologia comparativa do sistema vascular da hemolinfa em krill (Euphausiacea; Crustacea). *Estrutura e desenvolvimento de artrópodes* 40 (1)39 53. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2010.07.004>
- Iwamura, T., Guzman-Holst, A. & Murray, K.A. (2020). Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications*, 11 <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16010-4>.

- Jussiani, E. I., & Appoloni, C. R. (2015). Effective atomic number and density determination of rocks by X-ray microtomography. *Micron*, 70, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.11.005>.
- Kandel Y., Mitra S., Jimenez X., Rodrigues SD., Romaro A., Blakely BN, et al. (2020). Long-Term Mosquito culture with SkitoSnack, an artificial blood meal replacement. *Plos Neglected Tropical Diseases* 14 (9) e0008591. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008591>
- Kim, B. H.; Kim, H. K.; Lee, S. J. (2011) Experimental analysis of the blood-sucking mechanism of female mosquitoes. *Journal of Experimental Biology*, v. 214, n. 7, p. 1163-1169.
- Kogan, PH. (1990). Substitute blood meal for investigating and maintaining *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 27(4), 709-712. <https://doi.org/10.1093/jmedent/27.4.709>
- Kokoza, V.A.; Martin, D.; Mienaltowski, M.J.; Ahmed, A.; Morton, C.M.; Raikhel, A.S.2001. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene*, 274, 47–65. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00602-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00602-3)
- Kumar, S., Chandra, A., Pandey, K. C. (2008). *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *Journal of Environmental Biology*, 29: 641-653.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132,1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Laurance, W.F., 2008. Theory meets reality: How habitat fragmentation research has transcended island biogeographic theory. *Biological Conservation* 141(7), 1731–1744. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.05.011>
- Lea, A.O., Knierim, J.A., Dimond, J.B., DeLong, D.M. (1955) A Preliminary Note on Egg Production from Milk-Fed Mosquitoes *The Ohio journal of science*. 55, 21–22.
- Lehane, M. J. (2005) *The biology of blood-sucking in insects*. Cambridge University Press.
- Leisnham, P., Lester, P., Slaney, D., Weinstein, P., (2004). Anthropogenic Landscape Change and Vectors in New Zealand: Effects of Shade and Nutrient Levels on Mosquito Productivity. *Ecohealth* 1(3), 306–316. <https://doi.org/10.1007/s10393-004-0026-5>
- Lima- Camara, T.N. (2016) Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública do Brasil. *Revista Saúde Pública*. 50, 36. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006791>
- Lima, A. F. T. DE., Gurgel, A. M. (2018). Perigos associados ao malation e seus metabólitos no controle vetorial do *Aedes aegypti*. In: Ed. Universitária da UFPE (Ed.); *Agrotóxicos: vulnerabilidades socioambientais, político-institucionais e teórico-metodológicas*. 1st ed., p.32–50.

- Lima, M.G. (2022). Influência do tempo e marcação na qualidade das imagens microtomográficas obtidas por dice- CT em amostras de adultos de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus,1760). Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Física). Universidade Estadual de Londrina.
- Lindenmayer, D.B., Fischer, J. (2013). Habitat fragmentation and landscape change: na ecological and conservation synthesis. *Island Press*, 352.
- Liu, Q., Hallerman, E., Peng, Y., Li, Y. (2016). Development of Bt rice and Bt maize in China and their efficacy in target pest control. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1561. <https://doi.org/10.3390%2Fijms17101561>
- Lopes, J. (1997). Ecology of mosquitoes (Diptera, Culicidae) in natural and artificial rural breeding places in Northern Paraná state, Brazil: VI. Larvae collections in their home surroundings. *Revista Brasileira De Zoologia* 14(3), 571-578. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751997000300007>
- Lopes, J., Arias, J.R., Yood, D.C. (1983). Evidências preliminares da estratificação vertical de postura de ovos por alguns culicidae (Diptera) em florestas do município de Manaus- Amazonas. *Acta Amazonas*,13, 431-439. <https://doi.org/10.1590/1809-43921983132431>
- Lopes, T. B. F. et al. (2021) Genetic study in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) from Londrina (Paraná State, Brazil): an approach to population structure and pyrethroid resistance. *Revista Brasileira de Entomologia*, 65, <https://doi.org/10.1590/1806-9665-RBENT-2020-0088>
- Luo, Yi-Pey. (2014). A novel multiple membrane blood-feeding system for investigating and maintaining *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, 39 (2), 271-277, <https://doi.org/10.1111/jvec.12101>
- Machado JP., Oliveira, Magalhães R., Souza-Santos R. (2009). Análise espacial da ocorrência de dengue e condições de vida na cidade de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Publica*. 25(5):1025–3. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000500009>
- Macias, V.M., Ohm, J.R., Rasgon, J.L.(2017). Gene Drive for Mosquito Control: Where Did It Come from and Where Are We Headed?. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14: 1006. <https://doi.org/10.3390/ijerph14091006>
- Magnarelli, L.A., Freier, J.E., Anderson, J.F. 1987. Experimental infections of mosquitoes with *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases*, 156 (4) 694-695. <https://doi.org/10.1093/infdis/156.4.694>
- Marques, L.C., Appoloni, C.R., Fernandes, C.P., (2011). Porosity study of synthetic sand-stones by non-destructive nuclear techniques. *Materials Research*. 14, 394–402. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392011005000048>
- McPeck MA., Symes LB., Zong DM., McPeck CL .(2011). Reconhecimento de espécies e padrões de variação populacional nas estruturas reprodutivas de um gênero de libelinha. *Evolução*, 65,

419–428. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01138.x>

- Mcclelland, G. A. H.; Weitz, B. 1963. Serological identification of the natural hosts of *Aedes aegypti* (L.) and some other mosquitoes (Diptera, Culicidae) caught resting in vegetation in Kenya and Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 57, n. 2, p. 214-224, 1963.
- Melo Junior, A. S. (2007). Análise quantitativa do material particulado na região de campinas através das técnicas de microfluorescência de raios-X e reflexão total usando radiação síncrotron. Tese (Doutorado em Química) - Unicamp, Campinas, São Paulo.
- Miró, V., Reyes Arencibia, M., Bandomo Abreu, N., Leyva Silva, M., & Marquetti Fernández, M. D. C. (2018). Evaluación de Las Larvitrapas como Método de Vigilancia de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) y Otros Culícidos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, vol. 70, no. 3, 2018.
- Molineux A., Scott RW., Ketcham RA., Maisano JA (2007) Rudist taxonomy using x Ray computed tomography. *Palaeontologica Electronica*, 10, [http://palaeo-electronica.org/2007\\_3/135/index.html](http://palaeo-electronica.org/2007_3/135/index.html)
- MS. Ministério da Saúde. (2013). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypti* (LIRAA) para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Brasília, DF.
- MS. Ministério da Saúde. (2020b). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação da Vigilância de Arboviroses. Nota Técnica No 1/2020-CGAR/DEIDT/SVS/MS.
- MS. Ministério da Saúde. (2021). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. *Ministério da Saúde*, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF.
- MS. Ministério da Saúde. (2022). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 29, 2021. *Ministério da Saúde*, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF.
- MS. Ministério da Saúde. (2023). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Monitoramento das arboviroses urbanas, semanas 1 a 35 de 2023, volume 54. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Brasília, DF.
- MS. Ministério da Saúde (2024) Secretária de Vigilância em Saúde. Informe semanal nº 4- Centro de operações de emergências semana 9. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Brasília, DF.
- Mustafa, M.S., Rasotgi, V., Jain, S., Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces*.

71, 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>

- Nasci, R. S. A. (1981). Lightweight battery-powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. *Mosquito News* 41(4), 808–811.
- Nascimento, K. L. C. et al. (2020). Comparison between Larval Survey Index and Positive Ovitrap Index in the Evaluation of Populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) North of Paraná, Brazil. *Environmental Health Insights*. <https://doi.org/10.1177%2F1178630219886570>
- Nayar, J. K., Sauennan Jr, D. M. (1977). The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. Part 4. Effects of blood source on oocyte development. *Journal of Medical Entomology*, 14 (2), 167-174. <https://doi.org/10.1093/jmedent/14.2.167>
- Nelson, M.J.(1986).*Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington, DC. Organizacion Panamericana de la Salud.
- Nickel M., Donath T., Schweikert M., Beckmann F. (2006). Morfologia funcional de *Tétia* especies (Porifera): 1. Análise 3D quantitativa de *Tethya wilhelma* por microtomografia de raios X baseada em radiação síncrotron. *Zoomorfologia* 125, 209–223. <http://dx.doi.org/10.1007/s00435-006-0021-1>
- Nikbakhtzadeh, M. R., Buss, G. K., & Leal, W. S. (2016). Toxic effect of blood feeding in male mosquitoes. *Frontiers in physiology*, 7, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00004>
- Normile, D. (2013). Surprising New dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*.342, 415.
- Novak, M. G., Berry, W. J., Rowley, W. A. (1991). Comparison of four membranes for artificially blood feeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(2), 327-329,
- Oktarianti, R., Senjarini, K., and Hayano, T. (2015). Proteomic analysis of immunogenic proteins from salivary glands of *Aedes aegypti*. *Journal Infect Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.04.022>
- Oliveira, C.D., Gonçalves, D.S., Baton, L.A., Shimabukuro, P.H.F., Carvalho, F.D., Moreira, L.A. (2015). Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential human disease vectors. *Bulletin of Entomological Research*, 105, 305-315. <https://doi.org/10.1017/s0007485315000085>
- Oliveira, José Henrique M. et al. (2017) Catalase protects *Aedes Aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. *PLoS neglected tropical diseases*, 11 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005525>
- Oliveira, S.P., de Oliveira, C.D., Sant’Anna, M.R.V., Dutra, H.L.C., Caragata, E.P., Moreira, L.A. (2017). *Wolbachia* infection in *Aedes aegypti* mosquitoes alters blood meal excretion and delays oviposition without affecting trypsin activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87, 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.010>

- Owen, W.B. 1963. The contact chemoreceptor organs of the mosquito and their function in feeding behaviour. *Journal of Insect Physiology*, 9 (1), 73-87. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(63\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(63)90085-4)
- Patek SN., Nowroozi BN., Baio JE., Caldwell RL., Summers AP .(2007). Mecânica de ligação e amplificação de poder do ataque do camarão mantis. *O Jornal de Biologia Experimental* 210, 3677-3688. <https://doi.org/10.1242/jeb.006486>
- Penney D., Dierick M., Cnudde V., Masschaele B., Vlassenbroeck J., Van Hoorebeke, L., Jacobs P. (2007). First fossil Micropholcommatidae (Araneae), imaged in Eocene Paris amber using X-Ray Computed Tomography. *Zootaxa*, 53, 47–53. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1623.1.3>
- Pinto, N. G. V. et al. (2010). Avaliação de multielementos em amostras de sangue humano usando SR-TXRF. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 32 (3), 195–202. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000300002>
- Pitts, R.J. (2014). A blood-free protein meal supporting oogenesis in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *Journal Insect Physiology*. 64, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.012>
- Polanczyk, R.; Alves S. (2003). *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. *Agrociência*. 2, 1-10. <https://doi.org/10.2477/VOL7ISS2PP1-9>
- Ponlawat, A.; Harrington, L. C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of medical entomology*, v. 42, n. 5, p. 844- 849, 2005.
- Raquin V., Lambrechts L.(2017). Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. *Virology*. 507, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.009>
- Redígolo, M.M. (2011). Determinação de elementos químicos inorgânicos em amostras de sangue total humano e de animais de experimentação (hamster dourado e cavalo de raça crioula) pela técnica de fluorescência de raio X (EDXRF). Dissertação (Instituto de Pesquisas Nucleares e Energéticas). Universidade de São Paulo
- Regis L., Silva-Filha MH., Nielsen-LeRoux C., Charles JF. (2001). Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol*, 17,377-80. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)01953-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)01953-5)
- Regis, L et al. (2008). Developing new approaches for detecting and preveting *Aedes aegypti* population outbreaks: Basis for surveillance, alerand control system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103(1). 50-59. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100008>
- Resende, M. C., Gama, R. A.(2006). Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39 (1), 72-75. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000100014>
- Ribeiro, J. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, 4, 143-152.

- Ricieto, A. P. S., Fazon, F. A. P., Carvalho Filho, C. D., Vilas-Boas, L. A., & Vilas-Bôas, G. T. (2013). Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Canadian journal of microbiology*, 59(1), 28-33. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0462>
- Romoser, W.S., 1996. The vector alimentary system. BJ Beaty, WC Marquardt, *The Biology of Disease Vectors*. 1a. edição. Colorado: University.
- Rosas-García NM. (2006). Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. *Pest Manag Sci* 9: 855-86. <https://doi.org/10.1002/ps.1245>.
- Rueda, L. M. (2008). Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in fresh water. *Hydrobiologia*. 595. 477-487. <http://doi.org/10.1007/s10750-007-9037-x>
- Salama, H. S. (1996). The function of mosquito taste receptors. *Journal of insect physiology*, 12 (9),1051-1060. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(66\)90120-x](https://doi.org/10.1016/0022-1910(66)90120-x)
- Saldaña, M.A., Hegde, S., Hughes, G.L. (2017). Microbial control of arthropod-borne disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 81-93. <https://doi.org/10.1590%2F0074-02760160373>
- Santos, E. Santos, E., Gama, E., França, R., Souza, A., & Matos, R. (2013).Espectrometria de fluorescência de raios-X na determinação de espécies químicas. *Enciclopedia Biosfera*, 9 (17)
- Sappington, T.W.; Hays, A.R.; Raikhel, A.S. 1995. Mosquito vitellogenin receptor: Purification, developmental and biochemical characterization. *Insect Biochem. Mol. Biol.*25, 807–817. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00016-O](https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00016-O)
- Sarmiento, U.C.; Miguita, C.H.; Almeida, L.H.O.; Gaban, C.R.G.; Silva, L.M.G.E.; Souza, A.S.; Garcez, W.S.; Garcez, F.R. (2016). Larvicidal efficacies of plants from Midwestern Brazil: melianodiol from *Guarea kunthiana* as a potential biopesticide against *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111: 469-474
- Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J. V., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology review*. 62 (3), 755-806. <https://doi.org/10.1128%2Fmmbr.62.3.775-806.1998>
- Scott TW, Takken W. (2012). Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in Parasitology*. 28 (3), 114–121
- Scott, T. W.; Clark, G. G.; Lorenz, L. H.; Amerasinghe, P. H.; Reiter, P.; Edman, J. D. 1993. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *Journal of medical entomology*, v. 30, n. 1, p. 94-99.
- Sena, G.(2015). Microtomografia Usando Radiação Síncrotron (SR-MicroCT) como Técnica não Invasiva para Identificação de Estruturas Externas e Internas do

- Rhodnius prolixus*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Nuclear) Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Silva, A. M. D. (2002). Imaturos de mosquito (Diptera, Culicidae) de áreas urbana e rural no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Série Zoologia*, 92, 31-36. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212002000400005>
- Silva, F. S. (2009). A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. *Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas*, 3(3), 4.
- Silva, K. R. (2021). Diversidade de Culicidae (Diptera) e análise da circulação viral em estabelecimentos públicos e fragmentados de vegetação ripária urbana no norte do Paraná, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Londrina.
- Silva, W. R. et al (2017). Oviposição de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) em ovitampas com diferentes atrativos. In: 15º Siconbiol-simpósio de controle biológico, 2017, Ribeirão Preto. Anais do 15º Siconbiol. Ribeirão Preto: Sociedade Entomológica do Brasil.
- Sivan, A.; Shriram, A. N.; Sunish, I. P.; Vidhya, P. T. (2015) Host-feeding pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in heterogeneous landscapes of South Andaman, Andaman and Nicobar Islands, India. *Parasitology research*, v. 114, n. 9, p. 3539-3546 research, v. 114, n. 9, p. 3539-3546, 2015.
- SS (Secretaria de Saúde do estado do Paraná). 2022. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico. Arbovirus dengue, semanas epidemiológicas 31 a 17. Secretaria de saúde, Curitiba, Paraná.
- SS (Secretaria de Saúde do estado do Paraná). 2023. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico. Arbovirus dengue, semanas epidemiológicas 31 a 17. Secretaria de saúde, Curitiba, Paraná.
- SS (Secretaria de Saúde do estado do Paraná). 2024. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim da dengue, Informe epidemiológico 26, semanas epidemiológicas 31 a 9. Secretaria de Saúde, Curitiba, Paraná.
- Sukiato, F., Wasserman, R. J., Foo, S. C., Wilson, R. F., & Cuthbert, R. N. (2019). The effects of temperature and shading on mortality and development rates of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 264-270. <https://doi.org/10.1111/jvec.12358>
- Suman, D. S. et al. (2011). Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. *Arthropod structure & development*, 40, (5), 479–483. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2011.04.003>
- Sutton MD (2008) Técnicas tomográficas para o estudo de fósseis excepcionalmente preservados. *Proceedings of the Royal Society of London, Série B* 275: 1587–1593.
- Tadei, W. P., Thatcher, B. D., Santos, J. M. M., Scarpassa, V. M., Rodrigues, I. B., & Rafael, M. S.

- (1998). Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 59 (2), 325-335. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.325>
- Taibe-Lagos, C. B; Natal,D. (2003). Culicidae mosquito abundance in preserved metropolitan área and its epidemiological implications. *Revista Saúde Pública*. 37 (3).275-279. <http://doi.org/10.1590/s0034-89102003000300003>
- Takken, W.; Verhulst, N. O. 2013. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual review of entomology*, v. 58, p. 433-453.
- Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev.. Entomol.* 35, 181-200.
- Trindade Bezerra, (2021). Entry of dengue virus serotypes and their geographic distribution in Brazilian federative units: a systematic review. *Revista Brasileira Epidemiologia*. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210020>.
- Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A.A., Failloux, A.-B. (2021). Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Frontiers in microbiology*. 12, 3446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773211>
- Wahid, I., Sunahara, T., & Mogi, M. (2003). Maxillae and mandibles of male mosquitoes and female autogenous mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 40(2), 150–158. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.150>
- Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). Culicidae. (2023). Disponível em: [www.wrbu.si.edu/taxonomy/term/1194](http://www.wrbu.si.edu/taxonomy/term/1194). Acesso em 9 Jan. 2023
- Wheeler, W. C.; Whiting, M.; Wheeler, Q. D.; Carpenter, J. M. (2001) The phylogeny of the extant hexapod orders. *Cladistics*, v. 17, n. 2, p. 113-169.
- WHO (World Health Organization). 2020. Dengue severe dengue. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. *Ministério da Saúde*, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF. [HTTPS://WWW.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-severe-dengue](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-severe-dengue) (accessed 03 may 2022).
- Wilhelm G., Handschuh S., Plant J., Nemeschkal HL .(2011). Dimorfismo sexual na estrutura da cabeça do gorgulho *Rhopalapion longirostre* (Olivier 1807) (Coleoptera: Curculionoidea): uma resposta às demandas ecológicas de deposição de ovos. *Biological Journal of the Linnean Society* ,104 (3), 642–660, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01751.x>
- Wilkerson, R.C; Linton, Y.M. Strickman, S (2021). *Mosquitoes of de Word*. Volume 1 e 2. Johns Hopkins University. 1332 p.
- Zahouli, J. B. Z., Koudou, B. G., Muller, P., Malone, D., Tano, Y., Utzinger, J. (2012). Urbanization is a main driver for the larval ecology of *Aedes* mosquitoes in arbovirus-endemic settings in south- eastern Cote d' Ivoire. *PLoS neglected tropical diseases*. 11 (7), 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005751>

- Zara, A. L. S. A., Santos, S. M., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e serviços de saúde*, 25, 391-404. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000200017>
- Zaspel, J. M.; Kononenko, V. S.; Goldstein, P. Z. 2007. Another blood feeder? Experimental feeding of a fruit-piercing moth species on human blood in the Primorye territory of far eastern Russia (Lepidoptera: Noctuidae: Calpinae). *Journal of Insect Behavior*, v. 20, n. 5, p. 437-451.
- Zequi, J. A. C., Lopes, J., Medri, Í. M. 2005. Imaturos de Culicidae (Diptera) encontrados em recipientes instalados em mata residual no município de Londrina, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22 (3), 656-661. <https://doi.org/10.1590/s0101-81572005000300021>
- Zequi, J. A. C., Lopes, J., Santos, F. P., Vilas-Boas, G. T. (2015). Efficacy and persistence of two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) under simulated Field conditions. *International Journal of mosquito Research*, 2, 5-9.
- Zhang, K., Li, D., Zhu, P., et al. (2010). 3D Visualization of the Microstructure of *Quedius besoni* Cameron Using Micro-CT. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2143-2148. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3696-6>
- Zhang, Q., Hua, G., Adang, M.J. (2016). Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, 24, 714-729. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12401>

## **CAPÍTULO 1**

**Impacto da dieta artificial em  
de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) detectado por microtomografia  
computadorizada e análise elementar por espectrometria de fluorescência de raio X por  
reflexão total (TXRF)**

Artigo a ser submetido ao periódico Acta Tropica

Link para consulta das normas do periódico: <https://www.elsevier.com/journals/acta-tropica/0001706x/guide-for-authors>

## Resumo

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um culicídeo vetor de arboviroses como dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana, apresentando relevância na entomologia médica devido a hematofagia realizada pelas fêmeas, que necessitam de sangue para a maturação dos seus ovos. Neste processo, após se alimentarem de sangue de diferentes pessoas, pode ocorrer a disseminação de arbovírus entre pessoas, por meio da saliva do vetor. Devido a esta problemática, metodologias que visam o monitoramento e controle do vetor têm sido estudadas, contudo, para os experimentos faz-se necessário uma criação massal dos insetos e um biotério para obtenção de sangue necessário para a fêmea maturar seus ovos. Diante desta situação, nos últimos anos destacam-se pesquisas visando a substituição do sangue animal, sendo o sangue artificial considerado uma alternativa promissora. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade do sangue artificial no desenvolvimento de *Ae. aegypti*, assim como a análise dos elementos presentes no mesmo e as diferenças morfológicas dos ovários de fêmeas após serem alimentadas com diferentes fontes alimentares, incluindo sangue artificial, sangue de *Ratus norvegicus* e solução açucarada com açúcar (5%), mel (5%) e água (90%). Para tanto, os insetos foram alimentados com o sangue à base da dieta Skitosnake duas vezes, respeitando um intervalo de 48 horas. Posteriormente, na gaiola foi adicionado um aparato para oviposição dos ovos, os quais foram colocados para eclosão para a sequência do ciclo. Para a microtomografia, foram utilizadas fêmeas alimentadas com solução açucarada com mel, sangue artificial e sangue de *Ratos wistar* que foram refrigeradas e colocadas em solução Bouin por 20 horas, seguindo-se diluição seriada de etanol entre 20% e 100% e adição de solução de iodo, quando as fêmeas foram transferidas para uma ponteira vedada. Por fim, as amostras foram colocadas no microtomografo para as medidas. Na espectrometria de fluorescência de raios x por reflexão total, discos de acrílico foram utilizados para a análise, onde foi depositado 10 µl da amostra do sangue artificial. Após a deposição do sangue, foi adicionado 10 µl do padrão de gálio com concentração de 10 mg/L. Em seguida os discos foram transferidos para secagem em estufa a 55°C por 35 minutos. Para análise quantitativa e qualitativa foi utilizado o sistema de bancada S2 PICOFOX e a obtenção do espectro foi realizada por meio do software Espectra. A dieta SkitoSnake foi capaz de proporcionar a maturação dos ovos e duas gerações consecutivas do mosquito, adicionalmente, os resultados obtidos corroboram com a tendência alimentar do mosquito por mamíferos considerando que a fêmea alimentada com sangue de rato apresentou um melhor desenvolvimento do seu ovário (0.049688184 mm<sup>3</sup>), sendo 11 vezes superior que a solução açucarada (0.004269842 mm<sup>3</sup>) e três vezes maior que o sangue artificial (0.01307888 mm<sup>3</sup>). Conclui-se que o sangue artificial demonstrou ser uma ferramenta promissora para a criação do

mosquito, onde na ausência do sangue humano, tanto o sangue artificial como o de rato promoveram o desenvolvimento dos ovócitos das fêmeas.

**Palavras-chave:** Repasto sanguíneo, aparato superficial, reprodução, vitelogênese

## Abstract

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) is a culicidae vector of arboviruses such as dengue, Zika, Chikungunya and urban yellow fever, presenting relevance in medical entomology due to the hematophagy carried out by females, which releases blood for the maturation of their eggs. In this process, after feeding on blood from different people, arboviruses can spread between people through the vector's saliva. Due to this problem, methodologies aimed at monitoring and controlling the vector have been studied, however, for experiments it is necessary to massively breed insects and a vivarium to obtain the blood necessary for a female to mature her eggs. Given this situation, in recent years research into the replacement of animal blood has been highlighted, with artificial blood being considered a promising alternative. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of artificial blood in the development of *Ae. aegypti*, as well as the analysis of the elements presented in it and the morphological differences of female ovaries after being fed with different food sources, including artificial blood, *Ratus norvegicus* blood and sugar solution with sugar (5%), honey (5%) and water (90%). To this end, the insects were fed blood based on the Skitosnake diet twice, respecting an interval of 48 hours. Subsequently, an apparatus was added to the cage for oviposition of eggs, which were placed for hatching for the cycle sequence. For microtomography, females were used, fed with a sugar solution with honey, artificial blood and blood from *Ra. norvegicus*, which were refrigerated and placed in Bouin's solution for 20 hours, observing serial dilution of ethanol between 20% and 100% and addition of solution of iodine, when the females went tiny into a sealed tip. Finally, the samples were placed in the microtomography machine for measurements. In x-ray fluorescence measurement by total reflection, acrylic discs were used for the analysis, where 10  $\mu\text{l}$  of the artificial blood sample were deposited. After deposition of the blood, 10  $\mu\text{l}$  of gallium standard with a concentration of 10 mg/L was added. The discs were then transferred to dry in an oven at 55°C for 35 minutes. For quantitative and qualitative analysis, the S2 PICOFOX bench system was used and the spectrum was granted using the Espectra software. The SkitoSnake diet was able to provide the maturation of eggs and two consecutive generations of the mosquito, in addition, the results found corroborate the mosquito's feeding tendency for mammals considering that a female fed with rat blood showed better development of her ovary (0.049688184 mm<sup>3</sup>), being 11 times greater than the sugar solution (0.004269842 mm<sup>3</sup>) and three times greater than artificial blood (0.01307888 mm<sup>3</sup>). It is concluded that the declared artificial blood is a promising tool for mosquito breeding, where in the absence of human blood, both artificial and rat blood promoted the development of female oocytes.

**Keywords:** Blood meal, superficial apparatus, reproduction, vitellogenesis

## 1. Introdução

### *Biologia Geral e classificação de Culicidae*

A família Culicidae Meigen, 1818, pertence à subordem Culicomorpha, ordem Diptera, sendo representada pelos insetos conhecidos como mosquitos, pernilongos, muriçocas, carapanãs e bicudos. Os culicídeos se dividem em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae, com 524 e 3.200 espécies, respectivamente (Forattini, 2002; Harbach, 2017; Harbach, 2021; WRBU, 2024).

Os culicídeos apresentam um desenvolvimento holometábolo, com quatro estágios: ovo, larva, pupa e adultos (Forattini, 2002; Consoli e Oliveira, 1994; Rueda, 2008). Eles transitam em áreas urbanas, periurbanas, rurais e silvestres influenciados pelas modificações decorrentes da atividade humana, ocasionando a perda e fragmentação de seu habitat natural. Como consequência, os vetores migram de seu habitat e encontram condições favoráveis devido ao seu comportamento sinantrópico, rápida reprodução e plasticidade genética (Lopes, 1997; Silva, 2002; Taípe-Lagos e Natal, 2003; Leisnham et al. 2004; Zahouli et al. 2017; Montagner et al. 2018; Sukiato et al. 2019)

Adicionalmente, o aumento da temperatura, umidade e precipitação são condições favoráveis para o desenvolvimento e dispersão do vetor. Iwamura, T. (2020), em seu estudo, demonstra que o mundo se tornou 1,5% mais propício ao desenvolvimento de *Ae. aegypti* por década entre 1950 e 2000. Contudo, estima-se um aumento dessa tendência para 3,2 a 4,4% por década. Acrescenta-se ainda, projeções que elucidam uma dispersão de 2 a 6 Km até 2050 na América do Norte e na China.

### *Evolução do comportamento hematófago*

Os culicídeos, com exceção da família *Toxorhynchitini*, destacam-se na Entomologia médica devido ao comportamento hematófago das fêmeas, caracterizado por se alimentarem obrigatoriamente de sangue para a obtenção de aminoácidos, proteínas e hormônios necessários para a maturação e desenvolvimento de seus ovócitos.

Acrescenta-se, a fêmea apresenta adaptações morfológicas, anatômicas e comportamentais que favorecem o sucesso na ingestão, armazenamento e digestão do sangue, como o aparelho bucal picador- sugador labial e a solenofagia, comportamento onde o inseto obtém o sangue diretamente do capilar sanguíneo (Gordon et al. 1952; Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994, Wahid et al. 2003; Nikbakhtzadeh et al. 2016).

No decorrer da alimentação sanguínea, a fêmea inocula sua saliva que possui propriedades anticoagulantes, antiplaquetárias e anestésicas no tecido do hospedeiro, em seguida, ocorre a passagem do sangue que serviu de alimento por meio da membrana peritrófica, responsável por

isolar o sangue e proteger o intestino do inseto (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994, (Clements, 1992; Araújo et al. 2012; Da Silva Neto, 2013; Cruz, 2017). Em razão de se alimentar de sangue de animais vertebrados, ao picar um vertebrado infectado, o inseto acaba se infectando com o vírus, que se replica no intestino do inseto e migra para suas glândulas salivares. Em sequência, o inseto, na próxima alimentação sanguínea, pode repassar o vírus por meio da sua saliva para o hospedeiro (Oliveira et al. 2017, Guedes et al. 2017).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea pode ingerir por meio da sua saliva demais agentes etiológicos como arbovírus, plasmódios e filárias, responsáveis por ocasionar patologias como dengue, Zika, Chikungunya, febre amarela, malária, filariose, dentre outras doenças prejudiciais tanto para humanos quanto para animais silvestres e domésticos, ocasionando a mortalidade e morbidade em todo mundo devido a transmissão desses patógenos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Tadei et al. 1998).

#### *Epidemiologia, metodologias de monitoramento e controle de Ae. aegypti*

A dengue é a principal doença reemergente da atualidade, ocasionada por um vírus da família *Flaviviridae*, possuindo quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) virais em circulação relacionados geneticamente, porém que diferem antigenicamente (Machado et al. 2009; Alagarasu, K et al. 2021).

No Brasil a primeira epidemia ocorreu nos anos de 1981 e 1982 em Roraima, ocasionada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. Nos últimos anos o Brasil enfrentou diversas epidemias de dengue, associadas a diferentes sorotipos virais, como DENV-1 em 1998, DENV-3 em 2002, DENV-2 em 2008 e DENV-4 em 2010 e 2015 (Trindade et al. 2021).

Devido a crescentes pandemias, o Ministério da Saúde implementou programas visando o monitoramento e controle do vetor, neste momento foi lançado o Plano Nacional de Controle de Dengue (PNCD). Uma das estratégias utilizadas pelo plano é a realização do Levantamento Rápido de Índice de *Ae. aegypti* (LIRA), que por meio de amostragem e coleta de larvas em criadouros encontrados em residências, obtém-se dados de Infestação Predial, levando em consideração o percentual de imóveis com a presença de larvas e pelo Índice de Breteau, que avalia a relação dos recipientes com larvas e a quantidade de imóveis analisados (MS, 2013; Nascimento, 2020; Silva, 2021).

Outras estratégias visando monitoramento do vetor têm sido tomadas, como a utilização de armadilhas, tais como as ovitrampas, larvitampas e adultrap por meio de coletas passivas. A ovitrampa consiste em um vaso preto com uma solução atrativa e uma palheta de madeira para a oviposição dos ovos. Posteriormente, a contagem dos ovos permite a obtenção de dados referentes a

abundância indireta, distribuição local e temporal dos mosquitos (Fay e Perry, 1965; Regis et al. 2008; Fiocruz, 2014; Depoli et al. 2016).

A larvitrapa consiste em pneus cortados transversalmente que propiciam o acúmulo de água e consequente eclosão dos ovos ali ovipositados. Por fim, a Adultrap, armadilha que simula condições favoráveis para se tornar um criadouro, com uma solução atrativa e passagem suficiente para a fêmea, sendo a mesma capturada (Gomes, 2007; Arduino, 2023).

Para coletas ativas de adultos, tem-se o Aspirador de Nasci, que consiste em um aspirador cilíndrico de ferro, juntamente com um tecido de tule e uma hélice conectada a uma bateria a 12 volts, esse dispositivo permite a captura de mosquitos em pleno voo ou escondidos em abrigos (Nasci, 1981).

Para o controle do vetor, os primeiros inseticidas químicos utilizados eram a base de organofosforados e carbamatos, contudo, devido a seleção de indivíduos resistentes eles pararam de ser usados, o Cielo (neonicotinóide e piretróide) tem sido a mais empregada atualmente. No entanto, esses produtos possuem um amplo espectro de ação, afetando não apenas o inseto-alvo, como demais ordens. Adicionalmente, o manuseio de produtos à base de piretróide, conforme demonstrado por Lopes et al. (2021), revela que 55% da população de *Ae. aegypti* em Londrina, Paraná, apresenta resistência a essa formulação devido ao alelo *Kdr*. Adiciona-se o fato que o uso desses produtos pode causar danos ao ambiente, à saúde humana e animal, evidenciando a necessidade de estratégias menos prejudiciais e com espectro de ação mais específico (Lima e Gurgel, 2018).

#### *Medidas de substituição de fonte animal em laboratório para criação massal de Aedes spp.*

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas nos últimos anos visando o controle de *Ae. aegypti*. No entanto, a maioria delas requer a produção em larga escala dos mosquitos, além da criação de biotério de vertebrados vivos, como roedores, ou aves, como fonte sanguínea (Gonzales Hansey, 2016). Adicionalmente, o Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEUA) sob orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) incentiva a implementação da substituição, redução e refinamento relacionados à utilização de animais vivos (Kandel et al. 2020). Nesse contexto, têm sido desenvolvidos estudos com o objetivo de substituir o sangue animal de maneira que seja de baixo custo para a manutenção das criações e eficaz como fonte de alimento (Gonzales et al. 2018; Herculano, 2020).

Entretanto, as formulações de dietas requerem cuidados que garantam certos padrões, como assegurar que as fêmeas possam ingerir quantidade suficiente de nutrientes para atingir a sua saciedade durante a refeição. Adicionalmente, é crucial que a dieta seja eficaz para a vitelogenese e

consequente oviposição de uma grande quantidade de ovos, sem alterar o comportamento e a imunidade do inseto (Gonzales, 2015).

Diversas dietas foram desenvolvidas até o momento, como uma dieta a base de leite desnatado e mel, conforme Lea et al (1955); outra opção é uma refeição de proteínas suínas dissolvidas em cloreto de sódio e ATP, albumina sorobovina juntamente com solução tamponada com fosfato. Em 2018, foi desenvolvida a dieta SkitoSnake, composta por ATP, sistema tampão, albumina bovina e gema de ovo, que tem se mostrado eficaz como substituto do sangue (Gonzales et al. 2018). Fêmeas alimentadas com SkitoSnake apresentaram altas taxas de oviposição e eclosão semelhantes às encontradas com o sangue humano, embora tenham diferido quanto à microbiota presente no intestino do inseto. Salienta-se que a SkitoSnake apresenta viabilidade maior que o sangue humano quando armazenada em pó, revelando-se como uma alternativa promissora de substituição conforme apontado por Kendal (2020).

#### *Microtomografia computadorizada de raio x*

A microtomografia computadorizada (Micro CT) é uma tecnologia não destrutiva da amostra a ser estudada, que por meio de raio X consegue mapear o coeficiente de atenuação da amostra. Quando o feixe de fótons atravessa a amostra, sofre influência dos materiais presentes na amostra e pelo espectro do feixe, pois nem todos os fótons conseguem atravessar a amostra, resultando na atenuação (Sena, 2015; Lima et al. 2022).

Essa atenuação é medida por uma câmera CCD (sigla em inglês para Dispositivo de Carga Acoplada) por meio de projeções de diferentes ângulos, que através de modelos matemáticos pode-se inferir a atenuação da radiação em pixel, ou imagem em 3D. O coeficiente de atenuação é representado em escala de cinza, distribuídos entre elementos de pixel/voxel com maior e menor atenuação de radiação (Jussiani, 2015). A micro-CT é utilizada em diversas áreas, dentre elas a entomologia, apesar dos malefícios ocasionados pelo *Ae. aegypti*, poucos trabalhos utilizaram esta tecnologia para explorar sua morfologia e outros parâmetros. Como a utilização da técnica para diferenciar os ovos de espécies do gênero *Aedes* spp. (Suman et al.2011; Faull.K.L; Willians, C.R. 2016; De morais et al. 2019; Lima, 2022).

#### *Espectrometria de fluorescência de raio X*

A espectrometria de fluorescência de raio X é uma técnica multielementar, para a obtenção de dados referentes a composição elementar da amostra após ser irradiada com partículas aceleradas, como prótons, elétrons ou íons, ou com partículas alfa, beta ou gama, que possuem energias apropriadas e raio X. Essa radiação faz com que a amostra emita raios X característicos

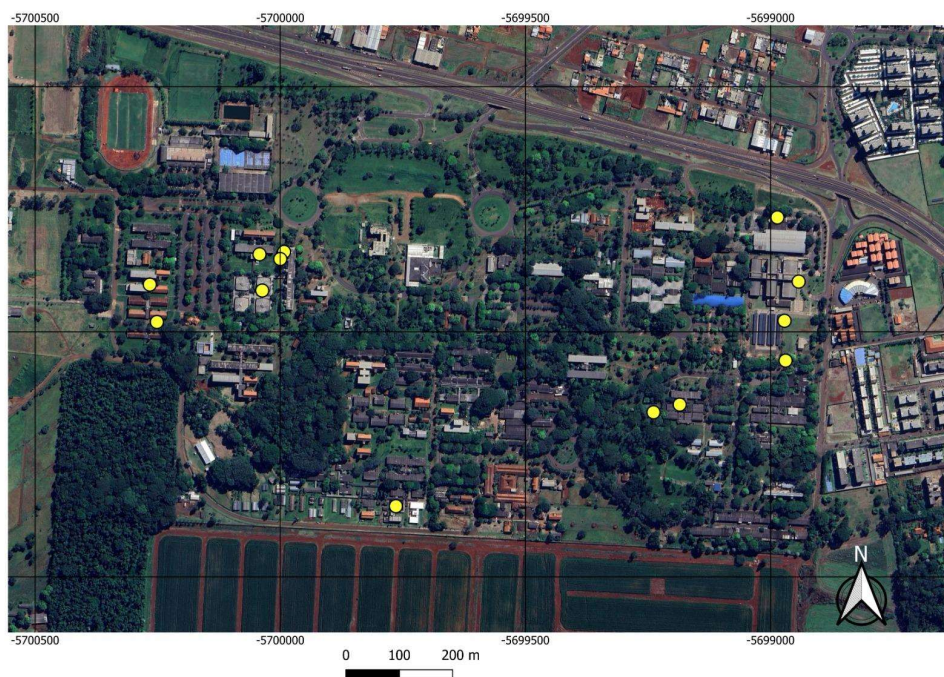
dos elementos presentes nela (Melo Junior, 2007). Esta técnica tem sido utilizada em estudos que envolvem amostras líquidas e sólidas, dentre elas o sangue (Pinto et al. 2010).

Nesta expectativa, este estudo tem por objetivo realizar a análise elementar do sangue artificial e avaliar os efeitos no desenvolvimento de *Ae. aegypti*. Assim como, analisar por meio da Micro CT, as diferenças morfológicas do ovário de fêmeas após se alimentar com diferentes fontes alimentares.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Manutenção de *Aedes aegypti*

Para a obtenção das fêmeas do mosquito foi mantida uma criação no Laboratório de Entomologia Geral e Médica da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A criação teve início a partir de ovos coletados por ovitrampas que consistem em um vaso preto com boca larga (12 x 11 cm) com capacidade de 500 mL (Figura 1). Cada ovitrampa contém uma palheta de madeira, e foi adicionado em seu interior 200 mL de uma solução atrativa composta por levedo (0.4 g/L) (Depoli et al. 2016).



**Figura 1-** Localização das ovitrampas (pontos amarelos) instaladas no campus da Universidade Estadual de Londrina no período de outubro de 2022 a dezembro de 2023 para obtenção de ovos para o início dos testes em laboratório

Após quatro dias, as ovitrampas foram coletadas e as palhetas submersas em água destilada para a eclosão das larvas que foram alimentadas com ração composta por gérmen de trigo e levedo

de cerveja autoclavados e utilizados em proporções iguais. Após a emergência, os adultos foram mantidos em gaiolas de acasalamento, tendo como fonte de alimento, um recipiente com gaze embebida por água açucarada e mel além de outro recipiente com água (Consoli e Lourenço 1994; Forattini, 2002).

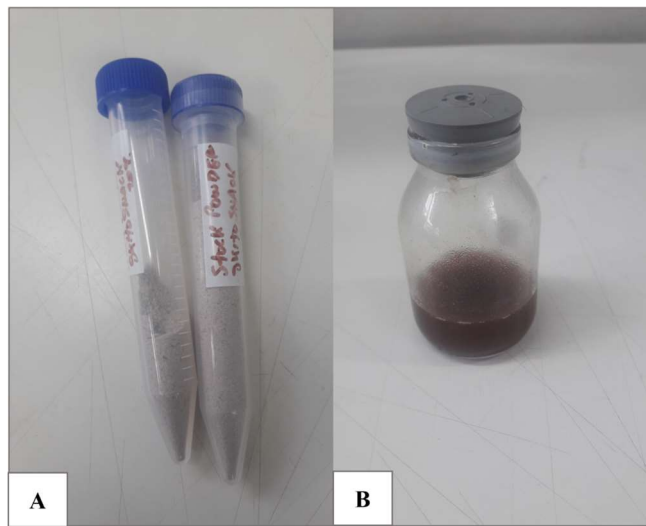
## 2.2 Dieta SkitoSnake

O sangue artificial SkitoSnake é composto pelos componentes apresentados na Tabela 1. Para tanto, os componentes são pesados, diluídos em 100 mL de água destilada, seguindo-se agitação em vórtex para obtenção de uma mistura homogênea e colocados em banho-Maria a 37°C por 5 minutos para produzir uma solução aquosa com coloração marrom (Figura 02) (Gonzales et al. 2018)

**Tabela 1-** Composição e concentração final da dieta SkitoSnake fornecida as fêmeas de *Aedes aegypti*

Composição	Quantidade em g/200 mL
Albumina Bovina	20
Hemoglobina	1
Gema de ovo	1
ATP	0.33
Glucose	1.8
Cloreto de Sódio	1.75
Bicarbonato de sódio	0.39
Cloreto de Potássio	0.059
Cloreto de Cálcio	0.055
Cloreto de Magnésio	0.0152

**Fonte:** Gonzales et al. (2018)

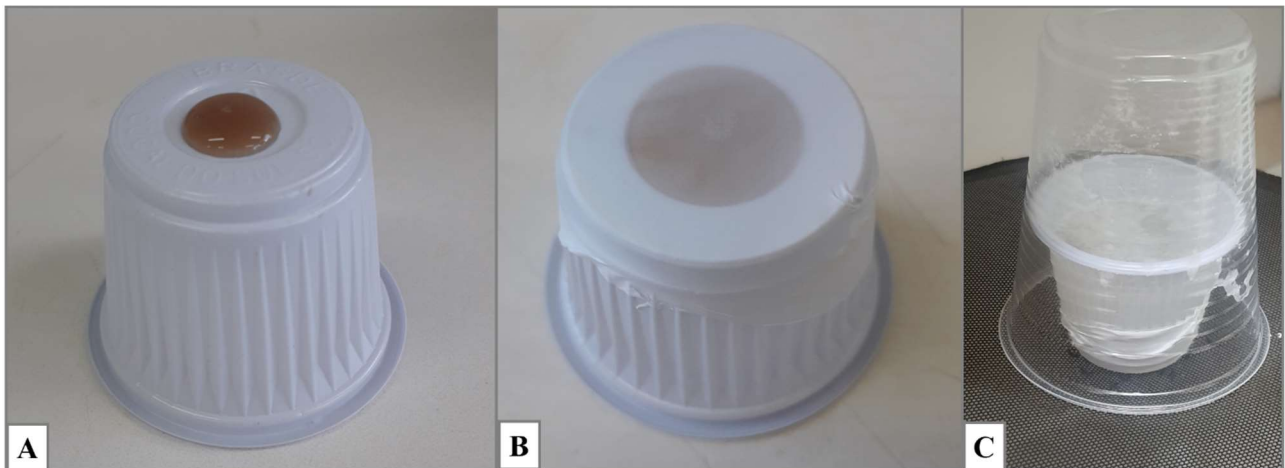


**Figura 2-** Dieta SkitoSnake apresentada em formulação em pó (A) e após diluição (B) utilizadas de maio a dezembro de 2023 para o repasto sanguíneo.

### *2.3 Alimentação dos mosquitos*

Para a alimentação dos insetos foi utilizada a metodologia de Anjolette (2016) com algumas alterações, como a utilização de um copo descartável de 50 mL invés de 200 mL e veda rosca no lugar do TNT. Após 7 dias da eclosão dos insetos, eles foram alimentados com sangue SkitoSnake, sendo o alimento fornecido duas vezes às fêmeas, respeitando um intervalo de 48 horas.

Para tanto, a base de um copo descartável de 50 mL foi preenchida com 250  $\mu$ l do sangue artificial. Em seguida, a base foi coberta com fita veda rosca, posteriormente o copo foi invertido, deixando o sangue para baixo, tendo sido também adicionado dentro do copo fermento biológico para atração das fêmeas e água a 35°C. Posteriormente o copo foi coberto por um segundo copo de 300 ml e o sangue ficou disponível para os mosquitos por 30 minutos. Após este período a água foi trocada por outra água aquecida de modo que a fonte sanguínea permaneceu na gaiola por 60 minutos ao todo. A alimentação foi fornecida no horário entre 10 e 14 horas devido ao período de atividade das fêmeas (Figura 03).



**Figura 3-** Metodologia de repasto sanguíneo das fêmeas de *Aedes aegypti* com sangue artificial. (a) 250µl Sangue artificial distribuído no copo, (b) Sangue coberto com fita veda rosca, (c) Fêmeas realizando repasto. **Fonte:** Da autora

Após cinco dias do início do fornecimento do sangue artificial, em cada gaiola foi adicionado um vaso preto de 300 mL preenchido pela metade com água juntamente com 0.03 mg de levedo de cerveja para a atração das fêmeas. No vaso foi adicionado um funil coberto com papel filtro para a oviposição das fêmeas (Figura 04). O papel filtro foi coletado quatro dias após a alimentação e transferido para sala aclimata em  $27^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  para a secagem dos ovos. Após sete dias da secagem, o papel filtro foi submerso em água destilada para o início da geração seguinte do mosquito. Este processo foi repetido por duas gerações consecutivas.



**Figura 4-** Recipiente para a oviposição das fêmeas de *Aedes aegypti* contendo papel filtro e solução atrativa composta por levedo de cerveja colocadas na gaiola após quatro dias de alimentação sanguínea. **Fonte:** Da autora

## *2.4 Microtomografia computadorizada do ovário da fêmea de Aedes aegypti*

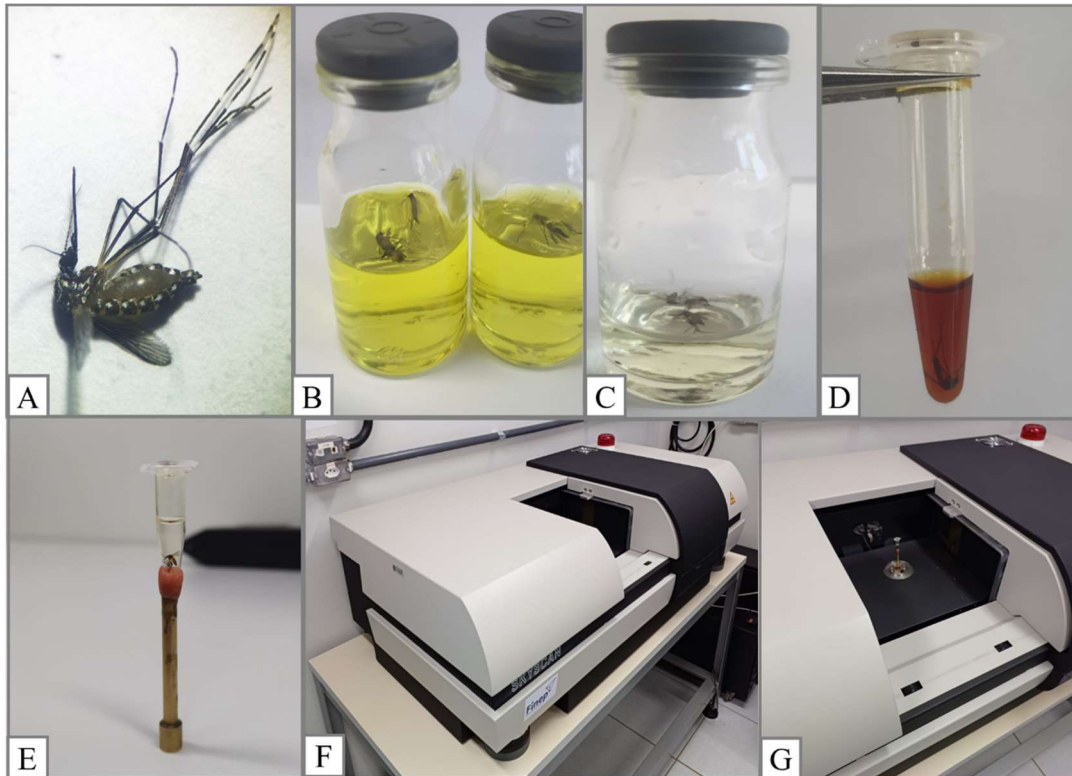
### *2.4.1 Amostras*

Para a micro-CT foram utilizadas cinco fêmeas adultas que foram alimentadas duas vezes, respeitando o intervalo de 48 horas. Foram utilizadas diferentes fontes alimentícias, são elas: solução açucarada com mel (açúcar e mel ambos com 5% e 90% água), sangue artificial (250 µl) e sangue de rato (250 µl) oriundo do projeto 13750 da Universidade Estadual de Londrina com o CEUA nº 062.2021. Após três horas da segunda alimentação os mosquitos com o abdômen repleto de sangue, com distensão do mesmo em nível 2 e 3 foram resfriados (5°C) para interromper o movimento e posteriormente foram submersos em solução de Bouin, composta de ácido pícrico aquoso e saturado, ácido acético puro e 10% de solução de formaldeído, com ação fixadora para não ocorrer alterações nas estruturas dos mosquitos durante o manuseio e obtenção das medidas (Sombke et al. 2015).

### *2.4.2 Preparo das amostras*

Os mosquitos permaneceram em solução de Bouin por 20 horas. Após a fixação, para que houvesse a desidratação, as fêmeas foram submetidas a diluição em série de etanol de 20% a 100% com incremento de 10% na concentração. Cada etapa de diluição teve duração de 30 minutos.

Após a desidratação, os mosquitos foram transferidos para a solução de iodo, agente de contraste. Foi utilizada uma solução de iodo diluído em etanol concentrado a 1%. Durante a marcação, os mosquitos ficaram submersos na solução por um período pré-determinado de 24 horas. Depois de finalizar a marcação, os mosquitos foram lavados em etanol super concentrado para que o excesso de iodo fosse retirado da amostra. Posteriormente, ainda submersos em álcool, as amostras foram inseridas em uma ponteira de plástico vedada para as medidas. Após o preparo da amostra, esta foi levada para o microtomografo onde foram feitas as medidas (Figura 5) (Lima et al. 2023).



**Figura 5-** Preparação da amostra para a microtomografia computadorizada: Preparação da amostra para a microtomografia computadorizada: (a) Fêmea de *Ae. aegypti Rockefeller* totalmente ingurgitada, (b) Fêmeas adicionadas em solução Bouin para fixação, (c) Fêmeas expostas a diluição em série de etanol, (d) Fêmea em solução de iodo diluído em etanol, (e) Fêmea submersa a etanol 100% em ponteira de plástico vedada montada sobre porta amostra, (f) Microtomógrafo SkyScan instalado no LARX/UEL e (g) Mosquito em ponteira sobre o microtomógrafo. **Fonte:** Da autora

### 2.4.3 Microtomografia e análise

Para as medições foi utilizado o microtomógrafo de bancada SkyScan 1172 pertencente ao Laboratório Multiusuário de Aplicações de Raio X da Universidade Estadual de Londrina (LARX/UEL). Os parâmetros utilizados para os mosquitos foram: resolução espacial de 3,00  $\mu\text{m}$  por pixel, com 4000 x 2624 pixels em cada projeção; tensão e corrente aplicadas de 44kV e 226  $\mu\text{A}$ , respectivamente; tempo de exposição foi definido em 950 ms; foram registrados 3 frames para cada projeção e a amostra foi rotacionada em 360° com passo angular de 0,25°. Como os parâmetros utilizados foram os mesmos, a duração da medida para cada mosquito foi de 2 horas e 18 minutos (Lima et al. 2023).

### 2.4.4 Software NRecon

Para a reconstrução das projeções 2D em um modelo 3d foi utilizado o software NRecon,

que permite a pré-visualização de uma fatia da projeção, dessa forma pode-se selecionar os parâmetros de reconstrução destinados a amenizar os artefatos imagéticos produzidos durante a medida. Foram utilizados os seguintes parâmetros: *Smoothing* (suavização) para amenizar o ruído na imagem, correção de *Ring Artifact* e correção de *Beam Hardening*, para correção de artefatos imagéticos. *Ring* para o tratamento do aparecimento de anéis concêntricos nas imagens que ocorrem devido à medição diferente de cada detector na câmera CCD. *Beam Hardening*, ou endurecimento dos feixes, se trata da maior absorção de fótons menos energéticos pelas extremidades da amostra. Após a reconstrução foram utilizados outros softwares para o tratamento, manipulação, análise e registro das imagens (Lima et al. 2023).

#### 2.4.5 Análises estatísticas

Para a análise da normalidade dos dados referentes ao volume dos ovários pertencentes aos seus respectivos grupos (açúcar, artificial e rato) eles foram submetidos a Shapiro Wilk a 5% de significância. Para comparação das médias do volume dos ovários dos três grupos foi aplicado o teste de Kruskal Wallis a 5% de variância. O software utilizado foi o Rstudio versão 4.3.2.

### 2.5 Espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total

#### 2.5.1 Disco de acrílico

Os discos de acrílico que foram utilizados para a análise da amostra de sangue no TXRF são compostos por uma pastilha cilíndrica com diâmetro de 3 cm e espessura de 3 mm fornecido pela empresa Bruker S.A (Atibaia, Brasil). O disco contém uma película para proteção contra contaminações, ela foi retirada anteriormente a deposição da amostra.

As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas a 8°C até o momento da sua utilização, posteriormente foi retirado uma alíquota de 10 µl da amostra de sangue com auxílio de uma micropipeta e ponteiros descartáveis, as amostras foram colocadas sobre o disco de acrílico que possuem dois lados utilizáveis, uma das superfícies contém uma marcação para diferenciar a repetição, foram utilizadas três repetições por sangue. Após a deposição do sangue, foi adicionado 10 µl do padrão de gálio com concentração de 10 mg/L. Em seguida os discos de acrílico foram transferidos para o suporte adequado para a secagem da amostra e armazenamento da mesma até a execução da análise TXRF (Figura 6) (Cleto, 2017).



**Figura 6-** Disco de acrílico no suporte para a deposição da amostra de 10  $\mu$ l do sangue artificial juntamente com 10  $\mu$ l do padrão de gálio no suporte fornecido pelo Laboratório de Física Nuclear da Universidade Estadual do Paraná. **Fonte:** Da autora

### 2.5.2 Sistema de fluorescência de Raio X por reflexão total (TXRF)

Visando obter análises quantitativas e qualitativas dos elementos presentes na amostra sanguínea, foi utilizado o sistema de bancada S2 PICOFOX de Bruker S.A do Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O tubo de raio X em linha reta possui potência de 30W voltagem de 50 kV. Possui um monocromador de Ni/C, 17,5 Kev com 80% de refletividade, seu detector é de sílico drift (si- Drift, XFlash). O feixe que colide com a amostra possui um ângulo  $< 0,1^\circ$ .

Para a obtenção dos espectros foi utilizado o software SPECTRA, responsável por coletar informações proveniente da eletrônica e, por fim, gerar um espectro e energia para a análise. Com o software pode-se alterar o tempo de irradiação na amostra, adicionar elementos identificados, entre outros fatores. O software disponibiliza dados referentes a concentração de cada elemento, e também disponibiliza valores referentes a background (contagem de fundo), desvio padrão (sigma) ajuste do espectro médio (chi), e o limite mínimo de detecção (Cleto, 2017).

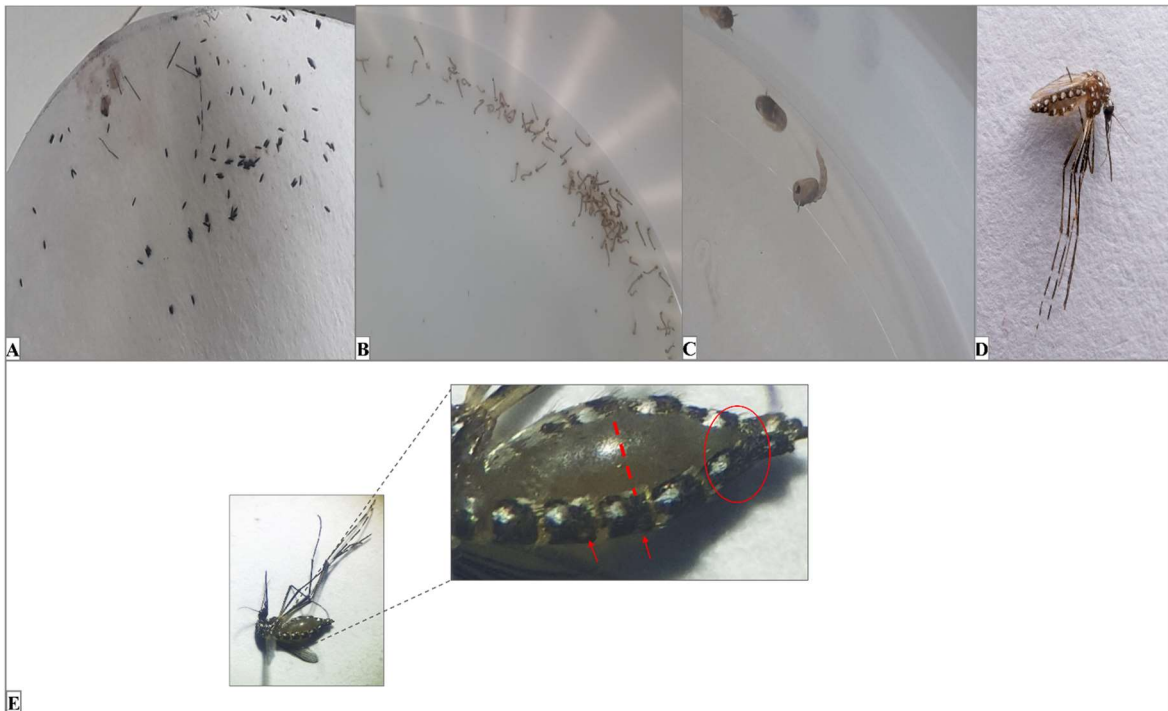
### 2.5.3 Medidas de fluorescência de raios X por reflexão total

O sistema foi ligado uma hora antes das análises para a sua estabilização, em seguida o sistema foi calibrado e as amostras medidas. As medidas das amostras foram realizadas com irradiação de 200s. Os discos com as amostras foram rotacionados manualmente em cerca de  $120^\circ$  no suporte do sistema para a triplicata, resultando em 600 s medidos por amostra (Cleto, 2017).

### 3. Resultados

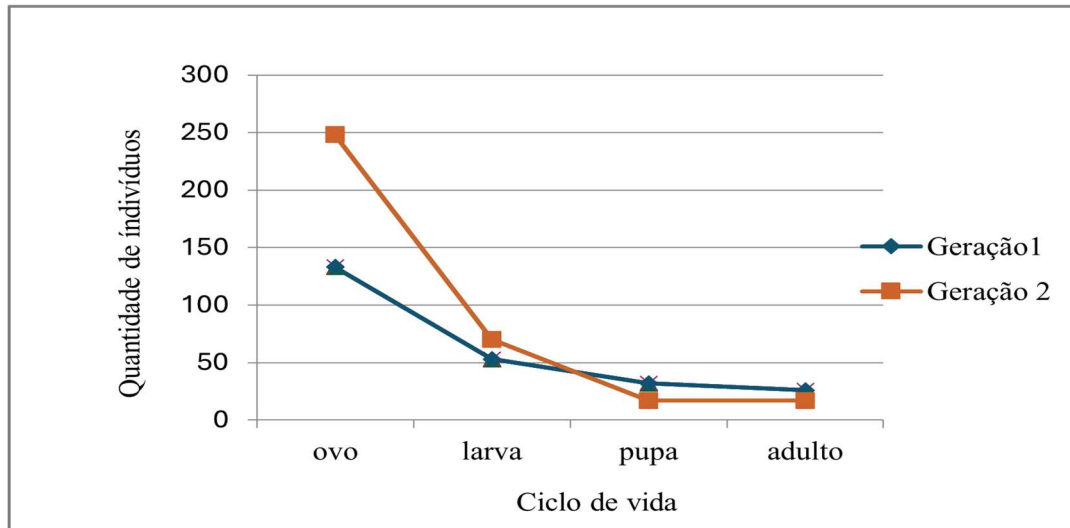
#### 3.1 Manutenção da criação de *Aedes aegypti* e efeitos do sangue artificial em seu desenvolvimento

Foram observados dois ciclos de vidas consecutivos completos de *Ae. aegypti* alimentado com sangue artificial (Figura 7).



**Figura 7-** Ciclo de vida de *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo com sangue artificial (a) Ovos depositados pelas fêmeas após se alimentarem do sangue artificial, (b) larva, (c) pupa, (d) Fêmea ingurgitada e (e) Fêmea de *Aedes aegypti* totalmente ingurgitada com destaque no abdome. Nível 3 de distensão com o abdome quase ou totalmente distendido com dois ou mais escleritos de distância (indicado no tracejado em vermelho), entre os escleritos ventrais (esternitos) e dorsais (tergitos)- considerando o 3º e 4º escleritos abdominais (indicados com flechas vermelhas) Penúltimos escleritos do abdome separados entre si, com ângulo amplo de abertura. (escala: 1.5). **Fonte:** Da autora.

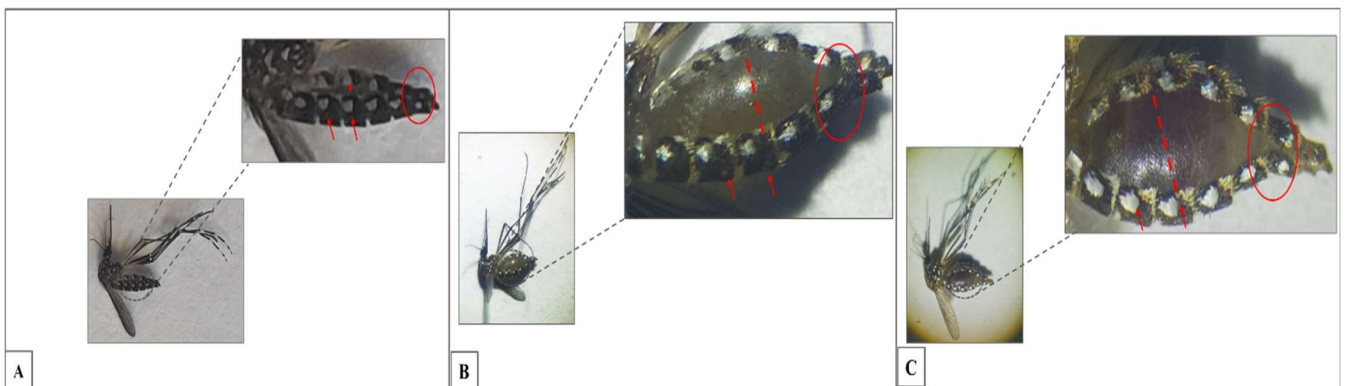
Acrescenta-se ainda, a ocorrência de oviposição, com a postura de 133 ovos na G1 e 248 na G2. Na primeira geração, os ovos alcançaram taxa de eclosão de 39% (53), sendo que cerca de 61% (32) entraram no estágio de pupa e, subsequentemente, 84% (26) atingiram a fase adulta. Ou seja, 19% dos ovos depositados completaram todo o ciclo de vida. Na G2, aproximadamente 23% (70) dos ovos eclodiram e se desenvolveram para larvas. No entanto, somente 24% (17) conseguiram atingir o estágio de pupa. Contudo, todas as pupas conseguiram atingir o estágio adulto (17) (Figura 08).



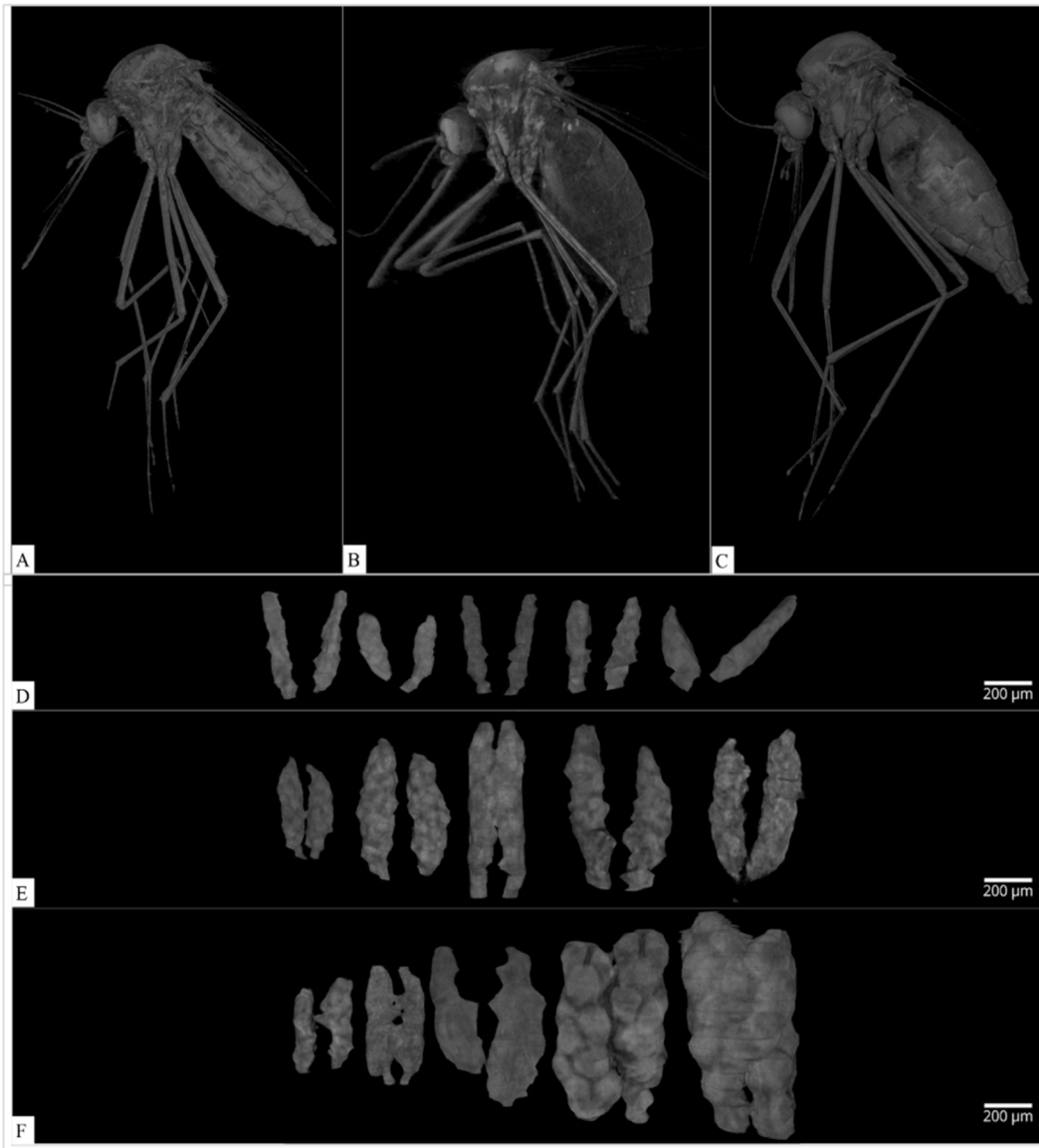
**Figura 8-** Desenvolvimento do ciclo de vida do *Aedes aegypti* alimentado com sangue artificial sob condições de laboratório. Linha azul representando a geração 1 e laranja a geração 2

### 3.2 Microtomografia computadorizada por Raios X

Para a obtenção de imagens tridimensionais dos ovários das fêmeas após alimentação foi utilizado a microtomografia computadorizada, a fim de elucidar as diferenças no volume e desenvolvimento dos ovários após a alimentação com diferentes fontes: açúcar e mel, sangue artificial e sangue de rato (Figura 9 e 10)



**Figura 9-** Fêmeas de *Aedes aegypti* preparadas para a microtomografia computadorizada de Raio X. (a) Fêmea após alimentação com açúcar e mel, (b) fêmea com ingurgitamento completo por sangue artificial, (c) Fêmea com ingurgitamento completo com sangue de rato. Para (b) e (c) Nível 3 de distensão com o abdome quase ou totalmente distendido com dois ou mais escleritos de distância (indicado no tracejado em vermelho), entre os escleritos ventrais (esternitos) e dorsais (tergitos)- considerando o 3º e 4º escleritos abdominais (indicados com flechas vermelhas) Penúltimos escleritos do abdome separados entre si, com ângulo amplo de abertura. (Escala: 1.5).



**Figura 10-** Modelo reconstruído do mosquito *Aedes aegypti* por meio da microtomografia computadorizada de raio X após alimentação. (a) fêmea adulta alimentada com açúcar e mel, (b) fêmea ingurgitada com sangue artificial, (c) fêmea ingurgitada com sangue de rato, (d) ovários isolados das fêmeas após alimentação com açúcar e mel, (e) ovários das fêmeas ingurgitadas com o sangue artificial e (f) ovários das fêmeas ingurgitadas com sangue de rato. **Fonte:** Matheus Gruener.

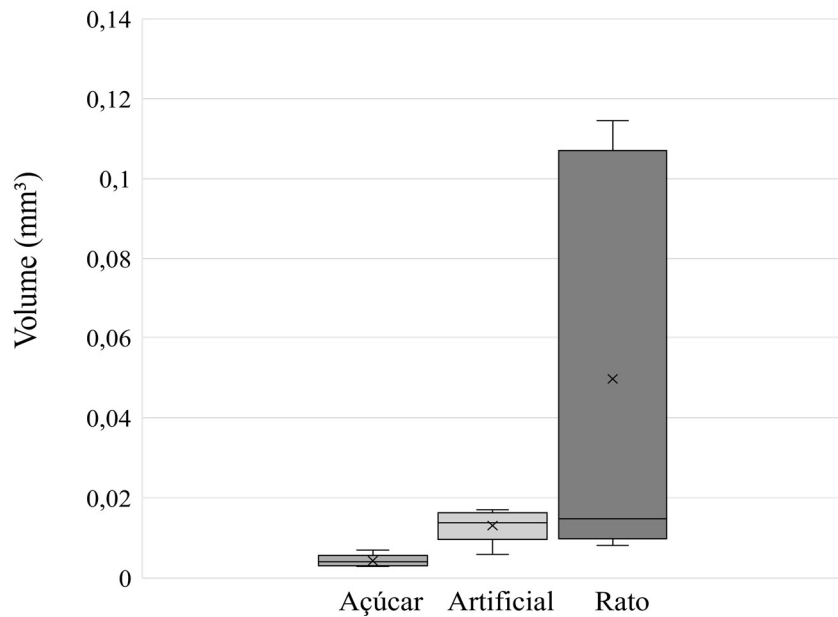
Aplicando o teste de Shapiro Wilk para verificar se os dados dos volumes dos diferentes grupos apresentaram distribuição normal, constatou-se que os grupos açúcar e sangue artificial não apresentaram diferenças significativas devido ao p-valor obtido ter sido de 0,1919 e 0,209 respectivamente, maior que nível de significância a 0.05, o que indica distribuição normal dos dados. Entretanto, o grupo sangue de rato apresentou um valor de 0,03846, menor que o nível de significância, indicando que os dados desse grupo não apresentaram distribuição normal (Tabela 2).

Diante desses dados foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para as médias dos grupos obtendo o p-valor de 0,01216 indicando que um dos grupos apresenta uma média significativamente diferente dos demais grupos (Tabela 2).

**Tabela 2-** Volume individual dos ovários de fêmeas de *Aedes aegypti* após alimentadas com diferentes fontes alimentares, medido por microtomografia computadorizada de raio X

Volume dos ovários (mm <sup>3</sup> )			
Nº amostra	Solução açucarada e mel	Sangue artificial	Sangue de rato
1	0.00404922	0.01373953	0.01478889
2	0.00697573	0.00588738	0.11451582
3	0.00314152	0.01547678	0.00810351
4	0.00429162	0.01547678	0.01140936
5	0.00289112	0.01700342	0.09962334
Média	0.004269842 (a)	0.01307888 (a)	0.049688184 (b)
Desvio padrão	0.00162365	0.004418632	0.05269881
Limite inferior/superior	[0.002253814, 0.00628587]	[0.008030322, 0.01900323]	[-0.01574603, 0.1151224]

\*As médias seguidas das mesmas letras não possuem diferenças significativas de acordo com Kruskal Wallis



**Figura 11-** Média do volume dos ovários das fêmeas após se alimentarem de diferentes fontes alimentícias (x representa a média e o risco horizontal da coluna a mediana).

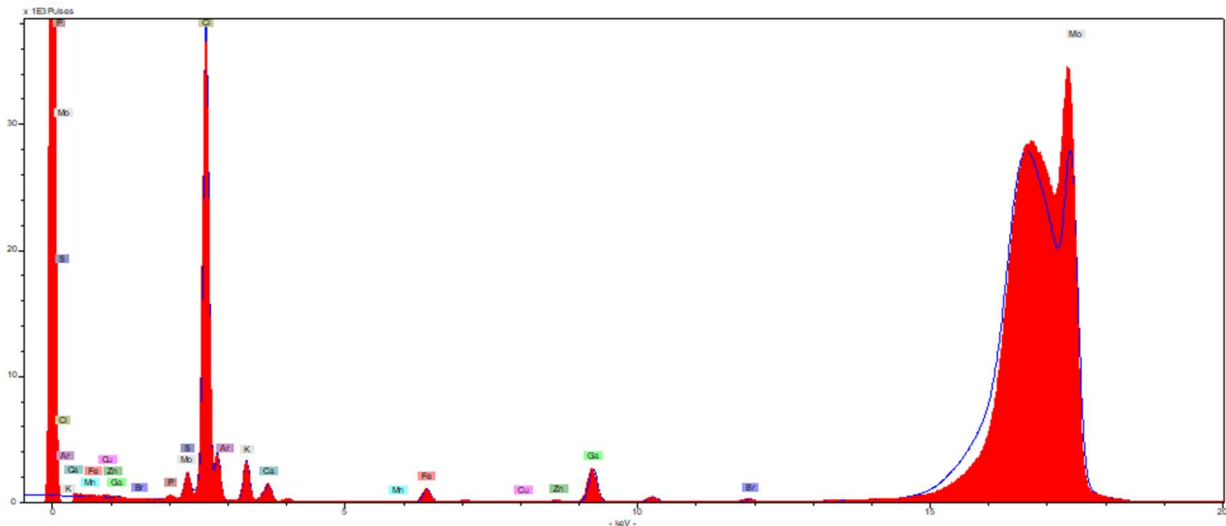
Para verificar a razão entre um conjunto, combinando pares de grupos, foi elencado que o volume das fêmeas alimentadas com sangue de rato foi 11.63 vezes maior em comparação com as fêmeas alimentadas com açúcar e 3.79 vezes maior que as fêmeas alimentadas com sangue artificial, o qual, por sua vez, apresentou volume 3.06 vezes superior que ao volume apresentado pelas fêmeas do grupo açúcar, evidenciando que as fêmeas alimentadas com sangue de rato apresentaram um maior desenvolvimento do seu ovário em comparação com as demais (Tabela 3).

**Tabela 3-** Razão entre os grupos das fêmeas de *Aedes aegypti* após diferentes fontes de alimento.

Grupo	Razão (≈)
Artificial / Açúcar	3.06
Rato / Açúcar	11.63
Rato / Artificial	3.79

### 3.3 Espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total do sangue artificial

O espectro da amostra de sangue artificial obtido por meio da TXRF pode ser observado na figura tal, a abcissa representa a energia característica de cada elemento já a ordenada, quantidade de pulsos eletrônicos (Figura 12). A partir dessa relação foi calculada a concentração de cada elemento medido determinados pelo pico da área de Gálio, resultando nos seguintes elementos: P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br (Tabela 04).



**Figura 12-** Espectro da amostra de sangue artificial.

**Tabela 4-** Elementos medidos por espectrometria de fluorescência em 10 µl de sangue SkitoSnake e suas respectivas concentrações em mg/L.

Elementos	Sangue artificial*
P	63,39 ± 3,11
S	55,19 ± 8,73
Cl	3291,41 ± 22,43
K	116,73 ± 0,99
Ca	31,81 ± 1,30
Fe	7,32 ± 0,09
Cu	0,17 ± 0,05
Zn	0,38 ± 0,01
Br	0,441 ± 0,01

\* Média da concentração dos elementos (mg/l) ± Desvio Padrão

#### 4. Discussão

Neste estudo, foi verificada a influência do sangue artificial nos seguintes parâmetros: taxa de oviposição, taxa de eclosão, número de pupas e número de adultos. Os culicídeos, em condições naturais, apresentam uma postura podendo variar de 50 a 500 ovos (Forattini, 2002). Lea et al. (1955) ao alimentarem *Ae. aegypti* e *Ae. quadrilatus* com dietas à base de mel e leite desnatado e outra de mel e sangue, descobriram que ambas as espécies foram capazes de produzir ovos viáveis, porém obtiveram uma produção em média de 5 ovos/fêmea.

Dimond et al. (1955) desenvolveram uma dieta artificial composta por 18 aminoácidos, (dentre eles a isoleucina), em 10 mL de água e mel, com ela houve a produção de 2.600 ovos por 500 fêmeas, quantidade bem abaixo do normal a ser ovipositado por uma fêmea. A oviposição apresentada nos trabalhos citados anteriormente demonstrou ser inferior (5 ovos/ fêmea) a obtida pelo presente estudo com 11 ovos/fêmea.

Gonzales et al. (2015) com uma dieta artificial à base de hemoglobina bovina (200 mg/mL), ATP e cloreto de ferro fornecida para *Ae. aegypti* obtiveram uma postura de 66 ovos/fêmea e uma taxa de eclosão de 33, 06%, logo, a oviposição obtida no presente estudo foi inferior, contudo, a taxa de eclosão demonstrou-se superior em comparação com os autores. Em 2018, os mesmos autores desenvolveram a SkitoSnake, fornecida por meio de uma membrana artificial de Parafilme, alcançando uma oviposição de 55 ovos/fêmea, mais elevada do que a apresentada no presente estudo.

Acrescenta-se ainda, que apesar das taxas mais baixas de oviposição e eclosão neste estudo, a taxa de sobrevivência das larvas até a fase de pupa e sua subsequente emergência como adultos na G1 foram altas, semelhante aos resultados de Pitts (2014) que relatou uma sobrevivência de 90% das larvas e números equivalentes de machos e fêmeas.

Dentre alguns fatores que podem influenciar diretamente ou indiretamente no estabelecimento da população do inseto, incluem-se alimentação, reprodução, transmissão de patógenos, fatores morfológicos e fisiológicos, além de temperatura e umidade (Delatte et al. 2009; Marchoux et al. 1903; Rowley e Graham 1968). No estudo conduzido por Nascimento et al. (2022), foi observado que a temperatura desempenha um papel crucial na produção de ovos, pois após atingir 22°C, houve um aumento significativo no número de ovos depositados. Em contraste, temperaturas mais baixas resultaram em uma produção de ovos consideravelmente reduzida.

De acordo com Amaral et al. (2020) ao examinarem os parâmetros biológico de *Aedes aegypti* em diversas faixas de temperaturas, observaram que temperaturas entre 5 a 29°C foram propícias para o desenvolvimento do mosquito, enquanto quaisquer valores fora dessa faixa

resultam em efeitos prejudiciais ao inseto.

Em relação às imagens tridimensionais dos ovários, obtidas por microtomografia computadorizada, pode-se observar que apesar do padrão de seleção das fêmeas com sangue para esta etapa (ingurgitamento nível 2 e 3) serem os mesmos, o volume dos ovários diferiram, podendo confirmar a influência da fonte alimentícia no nível de ingurgitamento e consequente desenvolvimento dos ovários, técnica esta não atualizada até o momento deste estudo, demonstrando o ineditismo da utilização da micro-CT para analisar o volume do ovário da fêmea de *Ae. aegypti* após alimentação em diferentes fontes sanguíneas.

Foi observado o menor desenvolvimento dos ovários das fêmeas alimentadas com açúcar e mel, uma possível justificativa seria o hábito alimentar dos mosquitos, que independentemente do sexo, necessitam de recursos nutricionais à base de néctar e seiva, que contenham carboidratos (Foster, 1995), os quais são responsáveis pelo fornecimento de energia para a manutenção, reservas metabólicas e prolongamento da vida útil do inseto (Barredo e DeGennaro, 2020). Contudo, a maioria das fêmeas são anautógenas, ou seja, não conseguem produzir seus ovos apenas com alimentação açucarada, necessitando de uma fonte sanguínea, pois dependem de nutrientes presentes no sangue para o desenvolvimento dos ovos e ativação hormonal (Clements, 1992), dessa forma justifica-se o menor volume do ovário das fêmeas apenas com refeição à base de açúcar e mel.

Em contrapartida, o sangue de rato promoveu um melhor desenvolvimento para os ovários das fêmeas em comparação com as demais fontes utilizadas. De acordo com a literatura, os mosquitos produzem mais ovos ao se alimentarem de uma fonte sanguínea, por apresentarem propriedades que contribuem com o ingurgitamento e reprodução destes mosquitos, fora a relação entre as adaptações e semelhança com o sangue humano, além da seleção de cepas de mosquito oriundas de laboratório comumente alimentadas com sangue de ratos e demais camundongos, logo visando uma criação massal estes animais são amplamente utilizados (Chang Y-YH, Judson C, 1976; Klowden e Lea, 1978; Briegel e Rezzonico, 1985; Harrison et al. 2021). Adicionalmente, a utilização de ratos e camundongos, têm apresentado boas taxas de alimentação sanguínea e fecundidade (Finlayson C, Saingamsook J, Somboon P, 2015).

Acrescenta-se ainda, a capacidade das fêmeas de detectar e identificar fontes sanguíneas adequadas para a sua reprodução. Essa situação ocorre devido a presença de estruturas e adaptações para a realização do repasto sanguíneo e para a verificação da qualidade do sangue disponível. Dentre as estruturas têm-se as sensilas que recebem energia oriunda de estímulos e converte em informação por meio do impulso nervoso, quimiorreceptores do cibário, quimiossensilas nos tarsos, labela e labro que auxiliam na identificação e destino do alimento e por fim o CO<sub>2</sub> estímulo emitido

pelo hospedeiro que auxilia na detecção de sua presença (Owen, 1963; Salama 1966; Clements, 1999).

Outros fatores influenciam nos processos fisiológicos dos mosquitos, como a sua espécie (Briegel, 1990), a quantidade de refeição sanguínea disponibilizada (Roitberg BD, Gordon I, 2005), a fonte sanguínea (Harrison, 2021), as membranas sintéticas utilizadas (Suresh, 2024) pois as membranas animais aparentam serem mais adequadas para a alimentação apresentando uma porcentagem maior de mosquitos ingurgitados em comparação com as membranas sintéticas. Conforme Novak et al. (1991), a pele de rato e codorna demonstrou uma maior porcentagem de mosquitos ingurgitados com sangue, 83 e 76%, respectivamente, ainda de acordo com os autores, ao utilizarem uma membrana artificial com lastex, a porcentagem de mosquitos ingurgitados foi de 0.66%. Essa situação ocorre pois os mosquitos detectam seus hospedeiros por estímulos químicos e odores provenientes da pele do hospedeiro, por essa razão a utilização de membranas artificiais poderá ser influenciada pela busca do mosquito pelo sangue oferecido (Takken e Verhulst , 2013).

De acordo com trabalhos realizados anteriormente a fêmea das espécies domesticadas de *Aedes* spp. apresenta preferência alimentar variada, contudo, ela tende a preferir sangue de mamíferos (Turell et al. 2005), em especial de humanos (Gunathilaka et al. 2017), uma justificativa seria devido a espécie ser sinantrópica e apresentar plasticidade genética se beneficiando das condições fornecidas pelo humano com criadouro e disponibilidade de fonte sanguínea, sendo a humana mais sobressalente Conforme Tuno et al. (2010) e Simpson et al. (2012), a disponibilidade de determinado hospedeiro está intimamente relacionada com a preferência no momento da escolha, assim como a heterogeneidade e contato direto do hospedeiro com o vetor, de acordo com os autores, se uma determinada espécie de mosquito vive em um ambiente onde a quantidade de seres humanos sobressai a de outros vertebrados, a preferência sanguínea do mosquito será, nesse caso, os humanos.

Essa situação acaba impactando nas diferenças morfológicas, fisiológicas, genéticas e comportamentais das populações de mosquito oriundas de diferentes localidades da natureza e das populações estabelecidas em laboratório. Logo, as populações selvagens tendem a preferir sangue de mamíferos e répteis, já populações domesticadas, vivendo próximo ao ambiente urbano tem preferência a sangue humana (McClelland & Weitz, 1963; Lopes, 1997; Forattini, 2002; Braga & Valle, 2007; McBride, 2016).

Por mais que haja variações no hábito alimentar humano, sabe-se que o sangue de vertebrados é composto por glóbulos vermelhos em suspensão no plasma, com quantidade alta de proteínas e lipídeos, carboidratos e moléculas inorgânicas em menor quantidade, que variam entre as espécies e organismos (De Smet, 1978). No caso dos mamíferos, as hemácias são menores,

anucleadas e cilíndricas, sendo que as demais classes apresentam hemácias maiores e com núcleos em formato achatado oval (Lewis, 1996).

Acrescenta-se ainda a influência da presença da isoleucina na produção dos ovos, de acordo com Harrington et al. (2001), o sangue humano com baixo teor de isoleucina promove estoques de energia, assim como processos fisiológicos em comparação com demais vertebrados com alto teor deste aminoácido. Adicionalmente, o sangue humano apresenta 2% de elementos químicos como potássio, sódio, cloro, cálcio, ferro, magnésio e bromo que apesar da baixa porcentagem são essenciais para a manutenção da saúde humana (Zamboni et al. 2005). Dessa forma, visando o desenvolvimento de dietas artificiais, é importante levar em consideração que seja constituído por componentes semelhantes ao sangue humano, que supra as necessidades do mosquito garantindo um ingurgitamento completo e gerações consecutivas saudáveis.

Comparando os elementos químicos presentes no sangue humano elencados acima, com os achados no sangue artificial por meio da espectrometria realizada no presente estudo, a fim de relacioná-los para possíveis interferências ocasionadas com a ausência ou excesso dos mesmos e visando um sangue artificial mais próximo à constituição do sangue humano, foram medidos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, e Br.

Com base na tendência da fêmea em preferir sangue humano, um indivíduo saudável de 70 kg, contém cerca de 4g de ferro, destes, 2.600 mg circulam no sangue em forma de hemoglobina, em um volume sanguíneo médio de 5 litros, resultando em uma concentração de 520 mg/l de ferro. No entanto, essa concentração pode variar conforme a saúde do indivíduo, como evidenciado Zamboli et al. (2016), que encontraram concentrações médias de ferro em atletas de 443 mg/l, já o controle de 345 mg/l.

Em relação a metodologias alternativas para substituir o sangue humano/animal, a Skitosnake proposta por Gonzales et al. (2018), investigou a suplementação de BSA (albumina sérica bovina) com diferentes fontes de ferro, incluindo hemoglobina e citrato de ferro, ambas com a concentração de 5 mg/l. No entanto, no presente estudo utilizando a Skitosnake e realizando a espectrometria, foi identificada a presença de 7, 32 mg/l de ferro, ou seja inferior a quantidade de ferro ideal, o que pode ter influenciado na produção e consequente viabilidade dos ovos.

A presença de um sistema tampão no sangue artificial é determinante pois suas propriedades químicas e osmóticas são essenciais para iniciar o processo de ingurgitamento do sangue pela fêmea (Friend e Smith, 1977). De acordo com Gonzales (2018), esse sistema é constituído por potássio, enxofre, bicarbonato, cálcio e magnésio, destes, com exceção do último, todos foram medidos no sangue artificial. Os demais elementos medidos são de suma importância como o fósforo constituinte do ATP, importante para estimular o ingurgitamento completo da fêmea (Zhou et al.

2007; Gonzales et al. 2016), o ferro, que auxilia diretamente da produção e viabilidade dos ovos, porém quando em baixa concentração pode ocasionar anemia independentemente do organismo, acrescenta-se ainda o zinco, importante para a manutenção do sistema imune (Mafra e Cozzolino, 2004).

## 5. Considerações Finais

- O sangue artificial demonstrou ser promissor como uma ferramenta para a criação massal de *Ae. aegypti* em laboratório promovendo a produção e desenvolvimento do ciclo de vida do mosquito. Ao comparar com as metodologias disponíveis no mercado, o uso de sangue artificial apresenta baixo custo, além de propiciar a diminuição da utilização de animais em experimentos. Contudo, necessita de melhorias na sua formulação para promoção de melhores resultados sobre seu uso em relação ao mosquito.
- Através da tecnologia da microtomografia computadorizada de raio X comprovou-se a influência da fonte alimentar em relação ao nível de ingurgitamento e posterior desenvolvimento do inseto, se beneficiando em sua maioria por sangue de mamíferos, podendo relacionar a essa condição com o comportamento sinantrópico e a plasticidade genética do mosquito.
- O uso da microtomografia computadorizada de raio X permitiu a obtenção de avanços importantes no estudo do desenvolvimento de novas fontes alimentares de *Ae. aegypti*. Assim, os resultados obtidos permitiram comprovar a influência da fonte alimentar em relação ao nível de ingurgitamento e posterior desenvolvimento das fêmeas de *Ae. aegypti*. Pôde-se demonstrar que o uso de sangue artificial permitiu o ingurgitamento das fêmeas em níveis semelhantes ao uso do sangue de rato, porém, com diferenças importantes quanto ao volume ovariano, sendo o do grupo alimentado com sangue artificial menor que o do grupo alimentado com sangue de rato.
- Por meio da espectrometria de fluorescência de raio x pode-se obter insights valioso da composição elementar do sangue artificial utilizado no presente estudo e sua influência sobre a biologia do vetor.

- Para pesquisas futuras, demonstra-se relevante estudos relacionados a microtomografia computadorizada em conjunto com a espectrometria de fluorescência de raio x para a melhoria da composição do sangue artificial. Assim como, propõe-se também estudar outras estruturas do mosquito como os ovos gerados após alimentação com diferentes fontes sanguíneas e elencar se apresentam turgidez ou possível colapso. Acrescenta-se ainda a necessidade de estudos da análise elementar de outras fontes sanguíneas utilizadas pelo mosquito e elencar semelhanças e diferenças entre os mesmos.

## Referências

- Amaral, E., Felipe da Silva, A., Ribeiro da Silva, W., Rossi da Silva, K., Aparecida Roque, R., Pedro Tadei, W., & Antonio Cyrino Zequi, J. (2020). Post-Embryonic Development of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 at Different Temperatures and CO<sub>2</sub> Concentrations, and Their Influences on Hatching and Development of Stabilized Population. *Life Cycle and Development of Diptera*. doi: 10.5772/intechopen.93100
- Alagarasu, K., Patil, J.A., Kakade, M.B., More, A.M., Yogesh, B., Newase, P., Jadhav, S.M., Parashar D., Kaur, H., Gupta, N., et al. (2021). Serotype and genotype diversity of dengue viruses circulating in India: A multi-centre retrospective study involving the Virus Research Diagnostic Laboratory Network in 2018. *International Journal of Infectious Diseases*, 111, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.08.045>
- Anjolette, A. F. F., & da Graça Macoris, M. D. L. (2016). Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista*, 13(156), 19-29.
- Barredo, E., & DeGennaro, M. (2020). Not just from blood: mosquito nutrient acquisition from nectar sources. *Trends in Parasitology*, 36(5), 473-484. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.02.003>
- Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A., Velayudhan, R., Roberts, B; Hobstick, O. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: sistematic literature review. *Tropical medicine Health*, 18(5), 564-77. <https://doi.org/10.1111/tmi.12087>
- Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423-435. <https://doi.org/10.1016%2Fj.toxicon.2006.11.022>
- Briegel, H., & Rezzonico, L. (1985). Concentration of host blood protein during feeding by anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 22(6), 612–618. <https://doi.org/10.1093/jmedent/22.6.612>
- Briegel, H. (1990). Fecundity, metabolism, and body size in Anopheles (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of medical entomology*, 27(5), 839-850. <https://doi.org/10.1093/jmedent/27.5.839>
- Chang, Y. H., 1976. The effect of various blood components on oogenesis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). Ph.D. dissertation, University of California, Davis
- Clements, A. N. (1992). *The biology of mosquitoes*. Volume 1: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall.
- Clements, A. N., Kerkut, G. A. (1963). The physiology of mosquitoes: international series of monographs on pure and applied biology. *Oxford: Pergamon Press*, 17, 410.
- Cleto, Daniele Aparecida Maia. Aplicação da técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) para análise de amostras de saliva e plasma de atletas pré e após esforço físico. Tese

de doutorado (Programa de Pós-graduação em Física).2017. Universidade Estadual de Londrina.

- Consoli, R.A.G.B., Oliveira,R.L.1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Delatte H., Gimonneau G., Triboire A., Fontenille D. (2009). Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *Journal medical Entomology*. <https://doi.org/10.1603/033.046.0105>
- De Moraes L.M.O., Jussiani E.I., Zequi J.A.C., dos Reis P.J., Andrello A.C. (2019). Morphological study of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs by X-ray computed microtomography. *Micron*, 13(1), <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28510-6>
- Depoli, P.A.C., Zequi, J.A.C., Nascimento, K.L.C., Lopes, J. (2016). Eficácia de Ovitampas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*. *EntomoBrasilis*. 9, 51–55 <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v9i1.509>
- Dimond, J. B.; Lea, A. O.; Brooks, R. F.; De Long, D. M.(1955). A preliminary note on some nutritional requirements for reproduction in female *Aedes aegypti*. *The Ohio Journal of Science*,55(5) 209-21.
- Eiras, A. Culicidae. In: Neves, D.P et al. (2016). *Parasitologia Humana*. 13 ed. Atheneu, São Paulo, pp. 411-424.
- Faull, K. J., Willians, C. R. (2016). Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) eggs using scanning electron microscopy. *Arthropod structure & development*, 45 (3), 273–280 <https://doi.org/10.1016/j.asd.2016.01.009>
- Fay, R.W., Perry, A.S., 1965. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 25(3), 276–281.
- Finlayson, C., Saingamsook, J., & Somboon, P. (2015). A simple and affordable membrane-feeding method for *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae). *Acta tropica*, 152, 245-251.
- Fitzpatrick, D. M., Hattaway, L. M., Hsueh, A. N., Ramos-Niño, M. E., & Cheetham, S. M. (2019). PCR-Based Bloodmeal Analysis of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in St. George Parish, Grenada. *Journal of medical entomology*, 56(4), 1170–1175. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz037>.
- Foratinni, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. vol.2.864 p.
- Foster, W. A. (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual review of entomology*, 40(1), 443-474.

- Garcia GA, Sylvestre G, Aguiar R, da Costa GB, Martins AJ, et al. (2019). Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure *Wolbachia* invasion. *Plos Neglected tropical*. 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007023>
- Gonzales, K. K., & Hansen, I. A. (2016). Artificial diets for mosquitoes. *International journal of environmental research and public health*, 13(12), 1267. <https://doi.org/10.3390/ijerph13121267>
- Gonzales, K.K., Rodriguez, S.D., Chung, H.N., Kowalski, M., Vulcan, J., Moore, E.L., Li, Y., Willette, S.M., Kandel, Y., Van Voorhies, W.A., et al. (2018). The effect of SkitoSnack, an artificial blood meal replacement, on *Aedes aegypti* life history traits and gut microbiota. *Scientific Reports*, 8, 11023. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29415-5>
- Gunathilaka, N., Ranathunge, T., Udayanga, L., Abeyewickreme, W. (2017). Efficacy of blood sources and artificial blood feeding methods in rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for sterile insect technique and incompatible insect technique approaches in Sri Lanka. *BioMed Research International*, 2017, 3196924. <<https://doi.org/10.1155/2017/3196924>>
- Harbach, R. 2021. *Mosquito Taxonomic Inventory*. [Http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045](http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045) (accessed 01 may 2022)
- Harrison, R., Fischer, S., Walpola, R. L., Chauhan, A., Babalola, T., Mears, S., & Le-Dao, H. (2021). Where Do Models for Change Management, Improvement and Implementation Meet? A Systematic Review of the Applications of Change Management Models in Healthcare. *Journal of healthcare leadership*, 13, 85–108. <https://doi.org/10.2147/JHL.S289176>
- Kandel Y., Mitra S., Jimenez X., Rodrigues SD., Romaro A., Blakely BN, et al. (2020). Long-Term Mosquito culture with SkitoSnack, an artificial blood meal replacement. *Plos Neglected Tropical Diseases* 14 (9) e0008591. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008591>
- Klowden, M. J., & Lea, A. O. (1978). Blood meal size as a factor affecting continued host-seeking by *Aedes aegypti* (L.). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 27(4), 827–831. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.827>
- Lima, A. F. T. DE., Gurgel, A. M. (2018). Perigos associados ao malation e seus metabólitos no controle vetorial do *Aedes aegypti*. In: Ed. Universitária da UFPE (Ed.); *Agrotóxicos: vulnerabilidades socioambientais, político-institucionais e teórico-metodológicas*. 1st ed., p.32–50.
- Lima, M.G. (2022). Influência do tempo e marcação na qualidade das imagens microtomográficas obtidas por dice- CT em amostras de adultos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus,1760). Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Física). Universidade Estadual de Londrina
- Machado JP., Oliveira, Magalhães R., Souza-Santos R. (2009). Análise espacial da ocorrência de dengue e condições de vida na cidade de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Publica*. 25(5):1025–3. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000500009>

- McBride C. S. (2016). Genes and Odors Underlying the Recent Evolution of Mosquito Preference for Humans. *Current biology: CB*, 26(1), R41–R46. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.032>
- Mcclelland, G. A. H., Weitz, B. (1963). Serological identification of the natural hosts of *Aedes aegypti* (L.) and some other mosquitoes (Diptera, Culicidae) caught resting in vegetation in Kenya and Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 57, (2), 214-224, 1963.
- MS. Ministério da Saúde. (2013). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypti* (LIRAA) para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Brasília, DF.
- Nascimento, J.F., Palioto-Pescim, G.F., Pescim, R.R. et al. (2022). Influence of abiotic factors on the oviposition of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in Northern Paraná, Brazil. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42, 2215–2220. <https://doi.org/10.1007/s42690-022-00742-5>
- Nayar, J. K., & Sauerman Jr, D. M. (1975). The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes: Part 2. Utilization of a blood meal for survival. *Journal of Medical Entomology*, 12(1), 99-103. <https://doi.org/10.1093/jmedent/12.1.99>
- Novak, M., Berry, W., Rowley, W., 1991. Comparison of four membranes for artificially blood feeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 7, 327–328
- Owen, W. B. (1963). The contact chemoreceptor organs of the mosquito and their function in feeding behaviour. *Journal of Insect Physiology*, 9(1), 73-87. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(63\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(63)90085-4)
- Phasomkusolsil, S., Tawong, J., Monkanna, N., Pantuwatana, K., Damdangdee, N., Khongtak, W., Kertmanee, Y., Evans, B. P., & Schuster, A. L. (2013). Maintenance of mosquito vectors: effects of blood source on feeding, survival, fecundity, and egg hatching rates. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 38(1), 38–45. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12006.x>
- Pinto, N. G. V. et al. (2010). Avaliação de multielementos em amostras de sangue humano usando SR-TXRF. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 32 (3), 195–202. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000300002>
- Raikhel, A. S., Kokoza, V. A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S., Li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N., Attardo, G. (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32 (10), 1275–1286. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(02\)00090-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00090-5)
- Regis, L et al. (2008). Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: Basis for surveillance, alert and control system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103(1). 50-59. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100008>
- Resende, M. C., Gama, R. A.(2006). Persistência e eficácia do regulador de crescimento piriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39 (1), 72-75. <https://doi.org/10.1590/S0037->

86822006000100014

- Richards, S. L., Anderson, S. L., Yost, S. A. (2012). of blood meal source on the reproduction of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 37(1), 1-7. <<https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00194.x>>
- Rutledge, L.; Ward, R.; Gould, D. (1964). Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News*. 24, 407–419
- Roitberg, B. D., & Gordon, I. (2005). Does the Anopheles blood meal-fecundity curve, curve? *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 30(1), 83-86.
- Rowley, W. A., & Graham, C. L. (1968). The effect of temperature and relative humidity on the flight performance of female *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 14(9), 1251-1257. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90018-8)
- Roubaud, E. (1929). Autogenous Cycle of Winter Generations of *Culex pipiens* L. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences*, 188(10).
- Rueda, L. M. (2008). Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in fresh water. *Hydrobiologia*. 595. 477-487. <http://doi.org/10.1007/s10750-007-9037-x>
- Salama, H. S. (1966). The function of mosquito taste receptors. *Journal of insect physiology*, 12(9), 1051-1060
- Sena, G. (2015). Microtomografia Usando Radiação Síncrotron (SR-MicroCT) como Técnica não Invasiva para Identificação de Estruturas Externas e Internas do *Rhodnius prolixus*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Nuclear) Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Silva, K. R. (2021). Diversidade de Culicidae (Diptera) e análise da circulação viral em estabelecimentos públicos e fragmentados de vegetação ripária urbana no norte do Paraná, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Londrina.
- Simpson, B. K., Nollet, L. M., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., & Hui, Y. H. 2012. *Food biochemistry and food processing*. John Wiley & Sons.
- Sombke, A., Lipke, E., Michalik, P., Uhl, G., & Harzsch, S. (2015). Potential and limitations of X-Ray micro-computed tomography in arthropod neuroanatomy: a methodological and comparative survey. *The Journal of comparative neurology*, 523(8), 1281–1295. <https://doi.org/10.1002/cne.23741>
- Suman, D. S. et al. (2011). Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. *Arthropod structure & development*, 40, (5), 479–483. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2011.04.003>
- Suresh, Y., Azil, A. H., & Abdullah, S. R. (2024). A scoping review on the use of different blood sources and components in the artificial membrane feeding system and its effects on blood-feeding and fecundity rate of *Aedes aegypti*. *Plos one*, 19(1), e0295961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295961>

- Takken, W., Verhulst, N., 2013. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual review of entomology* 58, 433-453
- Tauil, P. L. (2001). Urbanização e ecologia do dengue. *Cadernos de Saúde Pública*, 17, S99-S102. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700018>
- Trindade Bezerra, (2021). Entry of dengue virus serotypes and their geographic distribution in Brazilian federative units: a systematic review. *Revista Brasileira Epidemiologia*. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210020>.
- Turell, M. J., Dohm, D. J., Sardelis, M. R., O'guinn, M. L., Andreadis, T. G., & Blow, J. A. (2005). An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *Journal of medical entomology*, 42(1), 57-62. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.1.57>
- Tuno, N., Kjaerandsen, J., Badu, K., & Kruppa, T. (2010). Blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* and *Anopheles melas* in Ghana, western Africa. *Journal of medical entomology*, 47(1), 28-31. <https://doi.org/10.1093/jmedent/47.1.28>
- Wermelinger, E. D., & Ferreira, A. P. (2013). Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 4(3), 6-6. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232013000300007>
- Zamboni, M., Mazzali, G., Zoico, E., Harris, T. B., Meigs, J. B., Di Francesco, V., Fantin, F., Bissoli, L., & Bosello, O. (2005). Health consequences of obesity in the elderly: a review of four unresolved questions. *International journal of obesity* 29(9), 1011–1029. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803005>
- Zequi, J. A. C., Lopes, J., Santos, F. P., Vilas-Boas, G. T. (2015). Efficacy and persistence of two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) under simulated field conditions. *International Journal of Mosquito Research*, 2, 5-9
- Zhou, G., & Miesfeld, R. (2009). Differential utilization of blood meal amino acids in mosquitoes. *Open Access Insect Physiology*, 1-12. <https://doi.org/10.2147/OAIP.S7160>

## **CAPÍTULO 2**

**Danos causados por *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis*  
às larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* detectados por microtomografia computadorizada de  
Raio X**

Artigo a ser submetido ao periódico Acta Tropica

Link para consulta das normas do periódico: <https://www.elsevier.com/journals/acta-tropica/0001706x/guide-for-authors>

## Resumo

*Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) é um culicídeo de relevância na Entomologia médica por ser vetor de arbovírus como dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana. Devido à patogenicidade, buscaram-se metodologias inovadoras de monitoramento e controle para reduzir a circulação do vetor, como ovitrampas para monitoramento, por meio das quais são obtidos dados referentes à abundância indireta, distribuição local e temporal do vetor. Para o controle, o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) se destaca por ser uma bactéria específica de algumas ordens de insetos, liberando endotoxinas em seu intestino, que, quando ativadas, provocam uma infecção generalizada, levando à morte do hospedeiro por sepse. Portanto, este estudo teve como objetivo analisar a eficácia do Bti como agente de controle biológico para *Ae. aegypti*, bem como os danos causados pela bactéria ao mosquito. Primeiramente foi realizado o sequenciamento genético do Bti a partir da multiplicação de uma colônia da bactéria. Posteriormente foram realizados dois testes de mortalidade. Para o primeiro foram utilizadas cinco formulações diferentes de Bti BR101 na concentração de 0,02 mg/10L da formulação em grânulo (T85E1, T85E2, T85E3 e T85E4) e 25mg/10L do líquido formulado. (T85E5), que foram adicionados em baldes com 10L de água juntamente com 4 larvas de terceiro ínstar, onde cada formulação continha três repetições e houve um tratamento controle. Para o segundo teste foram utilizados 0,0015 mg/500 mL dos seguintes tratamentos: Bti BR101 (T85E2) e Vectobac WG adicionados em copos plásticos com capacidade de 700 mL, cada copo continha 15 larvas, cada tratamento teve cinco repetições e continha um controle do tratamento apenas com água. Ambos os testes foram avaliados após 24 e 48 horas. Para avaliar os danos causados pelo Bti à larva, uma larva de cada tratamento foi separada para microtomografia computadorizada para obtenção de imagens tridimensionais da mesma e por fim foi realizada espectrometria de Bti BR101 e Vectobac WG para obtenção de dados elementares. No primeiro bioensaio constatou-se que ambas as fórmulas foram eficazes na mortalidade de larvas, com destaque para os T85E2 e T85E4. Em relação ao segundo bioensaio, Bti BR101 e Vectobac causaram mortalidade de 75% e 100% respectivamente, não diferindo significativamente. Na espectrometria BR101 e Vectobac WG foram medidos os seguintes elementos: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn, Rb, Sr. Observou-se através de micro-CT que Bti BR101 e Vectobac WG ocasionaram a degradação de estruturas e órgãos internos como o epitélio intestinal e rompimento de membranas que levou à lise celular e consequente morte das larvas. Pode-se concluir que o Bti BR101 e Vectobac WG foi eficaz no controle das larvas nessas condições, e que a técnica empregada por meio de Micro-CT foi eficaz para detectar os danos causados pelo Bti as larvas, abrindo possibilidades de novos estudos na área de interação patógeno e morfologia do hospedeiro.

**Palavras-chave:** Controle biológico, bioinseticida, culicídeos, mosquitos.

## Abstract

*Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) is a culicidae of relevance in medical entomology as it is a vector of arboviruses such as dengue, Zika, Chikungunya and urban yellow fever. Due to pathogenicity, innovative monitoring and control methodologies are sought to reduce vector circulation, such as ovitraps for monitoring, through which data regarding the indirect abundance, local and temporal distribution of the vector are obtained. For control, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) stands out because it is a specific bacterium from some orders of insects, releasing endotoxins in their intestine, which, when activated, cause a generalized infection, leading to the death of the host due to sepsis. Therefore, this study aimed to analyze the effectiveness of Bti as a biological control agent for *Ae. aegypti*, as well as the damage caused by the bacteria to the mosquito. Firstly, the genetic sequencing of Bti was carried out from the multiplication of a colony of the bacteria. Two mortality tests were subsequently carried out. For the first, five different formulations of Bti BR101 were used at a concentration of 0.02 mg/10L of the granule formulation (T85E1, T85E2, T85E3 and T85E4) and 25mg/10L of the formulated liquid. (T85E5), which were added in buckets with 10L of water along with 4 third-instar larvae, where each formulation contained three replications and there was a control treatment. For the second test, 0.0015 mg/500 mL of the following treatments were used: Bti BR101 (T85E2) and Vectobac WG added in plastic cups with a capacity of 700 mL, each cup contained 15 larvae, each treatment had five replications and contained a control treatment with water only. Both tests were evaluated after 24 and 48 hours. To evaluate the damage caused by Bti to the larva, one larva from each treatment was separated for microcomputed tomography to obtain three-dimensional images of the same and finally spectrometry of Bti BR101 and Vectobac WG was performed to obtain elementary data. In the first bioassay it was found that both formulas were effective in larvae mortality, with emphasis on T85E2 and T85E4. In relation to the second bioassay, Bti BR101 and Vectobac caused mortality of 75% and 100% respectively, not differing significantly. In BR101 and Vectobac WG spectrometry, the following elements were measured: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn, Rb, Sr. It was observed through micro-CT that Bti BR101 and Vectobac WG caused the degradation of internal structures and organs such as the intestinal epithelium and rupture of membranes that led to cell lysis and consequent death of the larvae. It can be concluded that Bti BR101 and Vectobac WG were effective in controlling the larvae under these conditions, and that the technique used through Micro-CT was effective in detecting the damage caused by Bti to the larvae, opening up possibilities for new studies in the area. of pathogen interaction and host morphology.

**Keywords:** Biological control, bioinsecticide, culicides, mosquitoes.

## 1. Introdução

### *Biologia Geral e classificação de Culicidae*

A família Culicidae Meigen 1818, está incluída na subordem Culicomorpha, ordem Diptera, Classe Insecta e Filo Arthropoda com 3.724 espécies descritas. Esta família é representada pelos insetos conhecidos popularmente como mosquitos, muriçocas, mosquitos, pernilongos, carapanãs e bicudos, e estão divididos em duas subfamílias de importância médico e veterinária, são elas: Anophelinae e Culicinae que incluem espécies hematófagas relevantes para a saúde pública devido a capacidade vetorial para diversos agentes etiológicos que ocasionam patologias ao ser humano e a animais domésticos e silvestres (Forattini, 2002; Harbach, 2021, WRBU, 2024).

Os culicídeos são holometábolos, no qual apresentam quatro estágios, ovo, larva com quatro instares larvais, pupa e adulto alado, com ciclo de vida variando entre sete a vinte dias dependendo do gênero e condições do meio como umidade, temperatura e alimento. O ciclo de vida é dependente do ser humano, pois as espécies urbanizadas se beneficiam das ações antrópicas para a sua reprodução, desenvolvimento e sobrevivência (Consoli e Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Rueda, 2008; Eiras, 2016).

### *A expansão de Aedes aegypti no ambiente urbano*

Em decorrência do crescimento urbano, juntamente com o desenvolvimento do agronegócio, os mosquitos estão entre as espécies que sofrem drasticamente com a fragmentação e consequente perda do seu habitat, ocasionando a migração para o ambiente urbano onde encontram condições favoráveis devido ao seu comportamento sinantrópico, rápida reprodução, disponibilidade de criadouro e alimentação, além da plasticidade genética se adaptam facilmente ao ambiente urbano (Lopes, 1997; Taípe-Lagos e Natal, 2003; Leisnham et al., 2004; Zahouli et al., 2017; Montagner et al. 2018; Sukiato et al, 2019).

Acrescenta-se que o aumento da temperatura, umidade e precipitação são condições que tornam o ambiente favorável para o desenvolvimento de Culicidae, como demonstra Iwamura, T (2020) que prevê que o mundo se tornou 1,5% mais propício para o desenvolvimento de *Ae. aegypti* entre as décadas de 1950 a 2000, contudo estima-se o aumento para 3,2 a 4,4% por década e uma dispersão de 2 a 6 % Km/ano até 2050 na América do Norte e China.

### *O comportamento hematófago das fêmeas de Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* destaca-se na entomologia médico veterinária devido a hematofagia realizada pelas fêmeas, pois necessitam de sangue para a obtenção de proteínas, aminoácidos e hormônios

necessários para a maturação dos seus ovos (Wilkerson, et al. 2020; Dou et al. 2022). A fêmea apresenta diversas modificações anatômicas, fisiológicas e comportamentais para garantir sucesso durante o repasto sanguíneo, dentre elas, a presença de um aparelho bucal sugador- picador labial (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994).

Quando a fêmea hematófaga encontra uma fonte alimentar, ela perfura a pele por meio do seu aparelho bucal retirando o sangue direto dos vasos sanguíneos utilizando uma probóscide longa. Durante este processo os insetos hematófagos inoculam sua saliva com propriedades anticoagulantes, antiplaquetárias e anestésicas no tecido do hospedeiro, na sequência ocorre a passagem do conteúdo alimentar através da membrana acelular (peritrófica), responsável por isolar o sangue proteger o intestino do inseto. (Clements, 1992; Araújo et al. 2012; Da Silva Neto, 2013; Cruz, 2017).

Por se alimentar de vertebrados, ao picar um indivíduo infectado, o inseto se infecta com o vírus que se replica no intestino do vetor se disseminando para as glândulas salivares. Ao ocorrer a próxima alimentação sanguínea, o mosquito pode infectar o hospedeiro com o vírus por meio da sua saliva (Oliveira et al. 2017, Guedes et al. 2017).

#### *Os culicídeos como vetores de arbovírus*

Dentre os culicídeos, destacam-se espécies de vetores para agentes etiológicos, como arbovírus (Ex. DENV, ZIKV e CHIKV), protozoário (Ex. *Plasmodium* spp.) e filárias (Ex. *Wuchereria bancrofti*), que são responsáveis por patologias como dengue, Chikungunya, febre amarela urbana, malária, filariose, vírus do Oeste do Nilo, encefalite de St. Louis, Oropouche, Mayaro, Rocio (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Tadei et al. 1998).

O *Ae. aegypti* é responsável por transportar o vírus DENV, da família Flaviviridae, desde 1981 o Brasil foi acometido por diversas epidemias, a primeira ocasionada pelo sorotipo DENV-1 e DENV-4, as seguintes epidemias foram causadas pelo DENV-1 em 1998, DENV-3 em 2022, DENV-2 em 2008 e DENV-4 em 2010 e 2015 (Trindade et al. 2011).

#### *Medidas de monitoramento e controle de Aedes aegypti*

Diante desse problema, metodologias visando o monitoramento e estratégias de prevenção e manejo do risco da transmissão dos patógenos, têm sido estudadas. Dentre as metodologias de manejo, tem se o Levantamento Rápido de índice de *Ae. aegypti* (Liraa), estratégia implementada pelo Plano Nacional de Controle de Dengue (PNCD) do Ministério da Saúde, está técnica se baseia na amostragem e coleta de larvas encontradas em residências, identificando índices de infestação predial, que leva em consideração a quantidade de recipientes positivos para a presença larvas e o

índice de Breteau, considerando a relação entre recipientes com a presença de larvas e a quantidade de imóveis analisados (MS, 2013; Nascimento, 2020; Silva, 2021)

Outras metodologias de monitoramento são as armadilhas para a coleta de ovos, larvas e adultos. Para a coleta de ovos, tem-se a ovitrampa, consiste em um vaso preto com uma palheta de madeira, juntamente com uma solução atrativa ou apenas água para as fêmeas oviposição. As fêmeas irão depositar seus ovos na palheta, e a partir da contagem dos ovos determina-se índices de abundância indireta dos mosquitos, a distribuição local e temporal, as ovitrampas destacam-se sendo um dos métodos mais sensíveis para detecção do vetor, além no baixo custo.

A larvitrapas permite a coleta das larvas do vetor, é constituída de pneu cortado transversalmente, permitindo o acúmulo de água e conseqüente eclosão das larvas, a partir da coleta são tomadas ações que visam evitar a proliferação do vetor. Para a coleta de indivíduos adultos, tem-se a coleta por meio passivo e ativo, por meio de adultrap e Aspirador de Nasce respectivamente (Brasil, 2009; Brasil, 2013; Miró et al. 2018). A Adultrap consiste em um recipiente cilíndrico com a extremidade côncava, possuindo uma passagem para o mosquito, lateralmente é envolta de uma tela fina conectada ao recipiente para a adição da solução atrativa (Gomes, 2007; Arduino, 2023). Por fim, o Aspirador de Nasce, equipamento cilíndrico de ferro com tecido tule e uma hélice conectada a uma bateria 12 volts, durante o seu manuseio captura os insetos em pleno voo e escondidos (Nasce, 1981)

Visando o controle do vetor, os inseticidas químicos têm sido os mais empregados para o controle larval e de adultos no Brasil devido ao baixo custo e facilidade de manuseio. Os primeiros inseticidas eram a base de organofosforados, piretróides e carbamatos, no entanto, esses produtos apresentam um espectro de ação amplo, acometendo não apenas o inseto alvo, como as demais espécies e selecionando indivíduos resistentes. Adicionalmente, podem provocar prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente devido à elevada toxicidade, através da lixiviação compostos destes produtos são levados para os solos, rios, lagos, águas superficiais e fontes de água subterrâneas, poluindo essas localidades e prejudicando a fauna e flora ali presente (Lima e Gurgel, 2018).

Acrescenta-se ainda, que a utilização de inseticidas a base de piretróide aumenta a seleção de indivíduos resistentes, devido a ocorrência dos alelos *Kdr*, conforme Lopes et al. (2021), 55 % da população de *Ae. aegypti* de Londrina apresenta esse comportamento a essa formulação. Diante dessa problemática, metodologias mais específicas e menos danosas têm sido buscadas, dentre elas, a utilização de agentes biológicos por causa da interação específica com o inseto alvo, não selecionarem resistência e não ocasionarem danos ao ambiente.

Variadas metodologias de controle biológico têm sido estudadas, como técnicas de manipulação genética (Alphey et al. 2010), utilização de fêmeas infectadas com *Wolbachia* sp.

(Oliveira et al. 2015; Dutra et al. 2017), mosquitos transgênicos com gene letal ou mosquitos estéreis, outra alternativa de controle é a esterilização por irradiação, onde os insetos machos são tratados com uma dose de raios-X para a indução de reajustes cromossômicos aleatórios que levam a esterilização do inseto (Alphey et al. 2010; Boye, 2012) e a utilização de agentes microbianos com atividade inseticida contra larvas de mosquitos, nesse contexto, o *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 tem se destacado em relação a sua especificidade e mecanismo de ação (Costa et al. 2010; Sarmiento et al. 2016; Fukruksa et al. 2017).

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica isolada mundialmente em solos, animais mortos e plantas, destaca-se devido a sua empregabilidade para a fabricação de inseticidas biológicos, além de mais fácil produção em larga escala (Höfte e Whiteley 1989; Polanczyk e Alves 2003; Galzer e Filho 2016; Liu et al. 2016). A efetividade desta bactéria ocorre, principalmente, pela presença de cristais protéicos produzidos durante a esporulação, os quais são compostos por proteínas denominadas Cry e Cyt, produzidas na forma de protoxinas (Höfte e Whiteley 1989; Alves 1998; Bravo e Soberón 2007; Frankenhuyzen 2013; Badran et al. 2016).

O mecanismo de ação tem início após o inseto ingerir os esporos e cristais da bactéria. Uma vez no intestino, os cristais são solubilizados devido ao pH alcalino e, por meio de enzimas digestivas, as protoxinas são convertidas em toxinas ativas. Após ativadas, as protoxinas ativas ligam-se a receptores celulares específicos na borda do epitélio do intestino do inseto, criando canais iônicos e poros que acarretaram a lise celular, liberação de componentes celulares, paralisação das funções digestivas, ruptura das membranas celulares e consequente morte do inseto por sepse (Hofte e Whiteley 1989; Bravo et al. 2007; Copping e Menn, 2000; Zhang et al. 2016).

*Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* é uma bactéria com espectro de ação em insetos pertencentes à ordem Diptera, com destaque principalmente das famílias Culicidae e Simuliidae (Lacey, 2007; Boyce et al., 2013). Devido ao complexo mecanismo de ação, diferentemente de inseticidas químicos, o potencial de desenvolvimento de resistência dos insetos aos produtos à base de Bti é reduzido, inclusive pela ação sinérgica entre as toxinas. Dentre as proteínas que compõem os cristais proteicos sintetizados por linhagens de Bti, destacam-se as proteínas Cry4Ba, Cry4Aa, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba, que agem sinérgicamente (Schnepf et al. 1998, Van Frankenhuyzen, 2009).

#### *Microtomografia computadorizada de raio x*

A microtomografia computadorizada (Micro CT) técnica para obtenção de imagem tridimensional do material destaca-se por fornecer informações detalhadas da morfologia do objeto de estudo e por ser uma tecnologia não destrutiva para amostra de estudos. Através do raio X é

capaz de mapear o coeficiente de atenuação das amostras, pois quando o feixe de fótons atravessa uma amostra, sofre influência dos materiais que constituem a amostra e pelo espectro do feixe, decorrente que nem todos os fótons atravessaram amostra, resultando na atenuação (Sena, 2015; Lima, 2022)

A atenuação é medida por uma câmera CCD (sigla em inglês para Dispositivo de Carga Acoplada) que por meio de projeções de diferentes ângulos e modelos matemáticos pode inferir a atenuação da radiação em pixel, ou imagem em 3D. O coeficiente de atenuação é representado em escala de cinza, distribuídos entre elementos de pixel/voxel com maior e menor atenuação de radiação (Jussiani, 2015). A micro-CT é uma técnica utilizada em diversas áreas, como entomologia, entretanto, apesar dos danos mencionados causados pelo *Ae. aegypti*, poucos trabalhos utilizaram esta tecnologia para explorar sua morfologia e outros parâmetros. Como a utilização da técnica para diferenciar os ovos de espécies do gênero *Aedes* spp. (Suman et al.2011; Faull.K.L; Willians, C.R. 2016; De morais et al. 2019; Lima et al. 2023).

### *Espectrometria de fluorescência por reflexão total*

A espectrometria de fluorescência de raio X é uma técnica onde por meio dela é possível conseguir dados sobre a composição elementar da amostra, após ela ser irradiada por partículas aceleradas, por exemplo, prótons, elétrons ou íons, partículas alfa, beta e gama, caracterizadas por terem energias apropriadas e raio X. A irradiação, permite que a amostra emita raios X característicos dos elementos que constituem a amostra (Melo Junior, 2007).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os danos causados pelo uso de uma nova formulação à base da linhagem BR 101 de Bti às larvas de *Ae. aegypti* detectado por microtomografia computadorizada e o controle biológico do mosquito pela respectiva bactéria.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Extração do DNA e Sequenciamento do Genoma*

Para o sequenciamento do genoma total da bactéria, o DNA foi extraído das culturas crescidas em 16 horas utilizando o kit *Wizard Genomic Dna Purification* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi sequenciado a partir da plataforma Miseq (Illumina, EUA) no modo paired-end por se tratar de fragmentos a partir de ambas as extremidades (Andrews, 2015).

### *2.2 Isolado de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)*

A linhagem *Bacillus thuringiensis* BR101 faz parte de um banco de bactérias entomopatogênica localizado no Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina. Essa linhagem foi cultivada em meio LB (Tryptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 10 g/l, agar 15 g/l, pH 7.0), sendo incubados em estufa à 30° C no período de 16 horas. Posteriormente, uma colônia foi inoculada com auxílio da alça de platina esterilizada em 5 mL de meio LB e levadas para a agitação a 200 rpm, por 16 horas a 30°C para a posterior extração do DNA (Alves, 2017).

### 2.3 Obtenção de *Aedes aegypti*

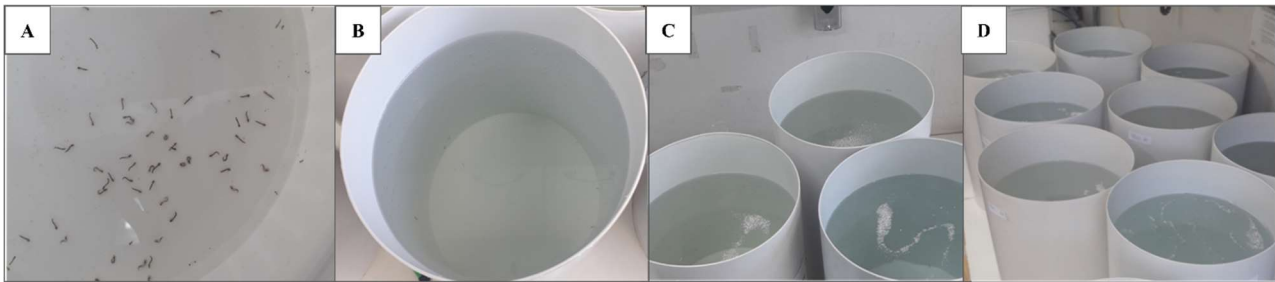
Para a obtenção das fêmeas do mosquito foi mantida uma criação no Laboratório de Entomologia Geral e Médica da Universidade Estadual de Londrina. A criação teve início com ovos de *Ae. aegypti Rockefeller* doados pela Fundação Oswaldo Cruz-RJ (Fiocruz)

O papel filtro contendo ovos foi submerso em água destilada para a eclosão das larvas que foram alimentadas até atingirem o terceiro instar larval com ração de gato triturada e autoclavada (Consoli and Lourenço 1994; Forattini, 2002).

### 2.4 Avaliação prévia da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* por meio de diferentes lotes de bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis israelensis*

A mortalidade de larvas de *A. aegypti* foi avaliada após exposição a cinco formulados à base de Bti BR101 que estão sendo desenvolvidos numa cooperação entre a UEL, UFPR, o Instituto Matogrossense do Algodão e a Cooperativa Mista de Desenvolvimento do Agronegócio (COMDEAGRO/MT). Para tanto, foram utilizadas quatro larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti*, adicionadas em baldes de 10 litros de água. Posteriormente, aos baldes foram adicionados 0.02 mg/10L dos formulados em pó (T85E1, T85E2, T85E3 e T85E4) e 25mg/10L do formulado líquido (T85E5) (Tabela 05). Cada lote foi avaliado em três repetições, totalizando 12 larvas por lote (Figura 12). O experimento permaneceu em uma sala climatizada a 27° C por 24 horas. Após avaliação da mortalidade, os formulados que apresentaram melhor atividade entomopatogênica foram avaliados quanto à contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e à presença de contaminantes. Para tanto, foram diluídos e semeados em placas contendo meio LB, seguindo-se a contagem de colônias após 24 e 48 horas (Figura 12).

Para a análise estatística da mortalidade foram utilizados o Shapiro Wilk e Teste T no programa estatístico R-Studio.



**Figura 13-** Bioensaio de mortalidade das larvas de *Aedes* spp. após exposição ao *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101. (A) Larvas de *Aedes* spp, (B) larvas adicionadas em baldes, (C) Adição de Bti e (D) Bioensaio. **Fonte:** Da autora

### 2.5 Bioensaio da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* Rockefeller após exposição a diferentes formulações de *Bacillus thuringiensis israelensis*

Para a avaliação da mortalidade, foram utilizadas quinze larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* Rockefeller por repetição, em seguida foram adicionadas em copos contendo 500 mL de água destilada. Posteriormente foi acrescentado 0.0015 mg/500 mL das formulações de Bti, são elas: BR101 Lote T85E2 e Vectobac WG. Cada formulação continha cinco repetições, totalizando 75 larvas por formulação e houve tratamento controle com apenas água. O experimento permaneceu em câmara climatizada a 27° C e a avaliação ocorreu após 24 e 48 horas (Figura 13). Após 24 horas, as larvas mortas foram retiradas com auxílio de uma peneira e preparadas para a etapa descrita em 2.7.



**Figura 14-** Bioensaio para determinação da taxa de mortalidade larval de *Aedes aegypti* ao Bti BR101 e Vectobac WG- com larvas de terceiro instar, contendo cinco repetições por tratamento. **Fonte:** Da autora.

## 2.6 Espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total

### 2.6.1 Disco de acrílico utilizado

Os discos de acrílico que foram utilizados para a análise da amostra de *Bacillus thuringiensis israelensis* UEL e Vectobac são uma pastilha cilíndrica com diâmetro de 3 cm e espessura de 3 mm fornecido pela empresa Bruker S.A (Atibaia, Brasil). Os discos contêm uma película para protegê-los de contaminações, elas foram retiradas antes da deposição da amostra.

As amostras de Bti foram mantidas refrigeradas a 8°C até o momento da sua utilização, posteriormente foi retirado uma alíquota de 10 µl da amostra de Bti com auxílio de uma micropipeta e ponteiros descartáveis, as amostras foram colocadas sobre o disco de acrílico que possuem dois lados utilizáveis, uma das superfícies contém uma marcação para diferenciar a repetição, três repetições foram utilizadas.

Após a deposição do Bti, foi adicionado 10 µL do padrão de gálio com concentração de 10 mg/L. Em seguida os discos de acrílico foram transferidos para o suporte adequado para a secagem da amostra e armazenamento dela até a execução da análise TXRF. Os suportes com os discos foram realocados em uma estufa para a secagem com temperatura de 55°C por 35 minutos (Cleto, 2017).

### 2.6.2 Sistema de fluorescência de Raio X por reflexão total (TXRF)

Visando obter análises quantitativas e qualitativas dos elementos presentes na amostra de Bti BR101, foi utilizado o sistema de bancada S2 PICOFOX de Bruker S.A do Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) DA Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O tubo de raio X em linha reta possui potência de 30W. voltagem de 50 kV. Possui um monocromador de Ni/C, 17,5 Kev com 80% de refletividade, seu detector é de sílico drift (si- Drift, XFlash). O feixe que colide com a amostra possui um ângulo  $< 0,1^\circ$ .

Para a obtenção dos espectros foi utilizado o software SPECTRA, responsável por coletar informações proveniente da eletrônica e, por fim, gerar um espectro e energia para a análise. Com o software pode-se alterar o tempo de irradiação na amostra, adicionar elementos identificados, entre outros fatores. O software disponibiliza dados referentes a concentração de cada elemento, e também disponibiliza valores referentes a background (contagem de fundo), desvio padrão (sigma) ajuste do espectro médio (chi), e o limite mínimo de detecção (Cleto, 2017).

### 2.6.3 Medidas de fluorescência de raios X por reflexão total

Uma hora antecedendo as análises o sistema foi ligado para a sua estabilização, posteriormente foi calibrado e as amostras medidas com irradiação de 200s. Os discos contendo as

amostras foram rotacionados manualmente em cerca de 120° no suporte do sistema para a triplicata, obtendo 600 s medidos por amostra (Cleto, 2017).

## 2.7. Microtomografia computadorizada de Raio X das larvas de *Aedes aegypti* Rockefeller após exposição a diferentes formulações de *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101

### 2.7.1. Preparo das amostras

Para a microtomografia computadorizada foi utilizada uma larva após exposição a diferentes tratamentos, sendo eles: Bti BR101, Vectobac WG e controle (larva morta no álcool 70%). Posteriormente, as larvas mortas foram submersas por 20 horas em solução Bouin composta por ácido pícrico saturado, ácido acético puro e 10% de solução de formaldeído. Após este período, as larvas foram expostas a uma diluição em série de etanol com início em 20% e incremento de 10% até atingir 100% de concentração, cada etapa de diluição teve duração de 30 minutos (Lima et al. 2023).

Sequentemente, as larvas foram transferidas para uma solução de iodo, agente de contraste, diluído em etanol a 1%, onde ficaram submersas por 24 horas, finalizada a marcação, as larvas foram lavadas em etanol para a retirada do excesso de iodo da amostra. Após o preparo, as amostras foram levadas para o microtomografo onde foram realizadas as medidas (Lima et al. 2023).

### 2.7.2 Microtomografia e análise

As medidas foram realizadas por meio do microtomografo de bancada SkyScan 1172, pertencente ao Laboratório de Multiusuário de Aplicações de Raio X da Universidade Estadual de Londrina- UEL. Os parâmetros utilizados para as medidas foram: resolução espacial de 3,00  $\mu\text{m}$  por pixel, com 4000 x 2624 pixels em cada projeção; tensão e corrente aplicadas de 44kV e 226  $\mu\text{A}$ , o tempo de exposição foi definido em 950 ms, além disso, foram registrados 3 frames para cada projeção e a amostra é rotacionada a 360° com passo angular de 0.25°. A medida de cada amostra teve duração de 18 minutos (Lima et al. 2023).

### 2.7.3 Software NRecon

Para a reconstrução das imagens dimensionais obtidas em imagens tridimensionais foi utilizado o software NRecon, dessa forma foram selecionados parâmetros de reconstrução a fim de diminuir os efeitos imagéticos produzidos no decorrer da medida, os parâmetros utilizados foram: Smoothing para amenizar o ruído da imagem, correção de *Ring Artifact* e de *Beam Hardening*. A correção de *Ring* para o tratamento de anéis concêntricos nas imagens que acontece por causa da

medição diferente de cada detector na câmera CCD, já *Beam* é responsável pelo tratamento da maior absorção de fótons menos energéticos pelas extremidades da amostra. Posteriormente, foram utilizados software para o tratamento, manipulação, análise e registro da imagem (Lima et al. 2023).

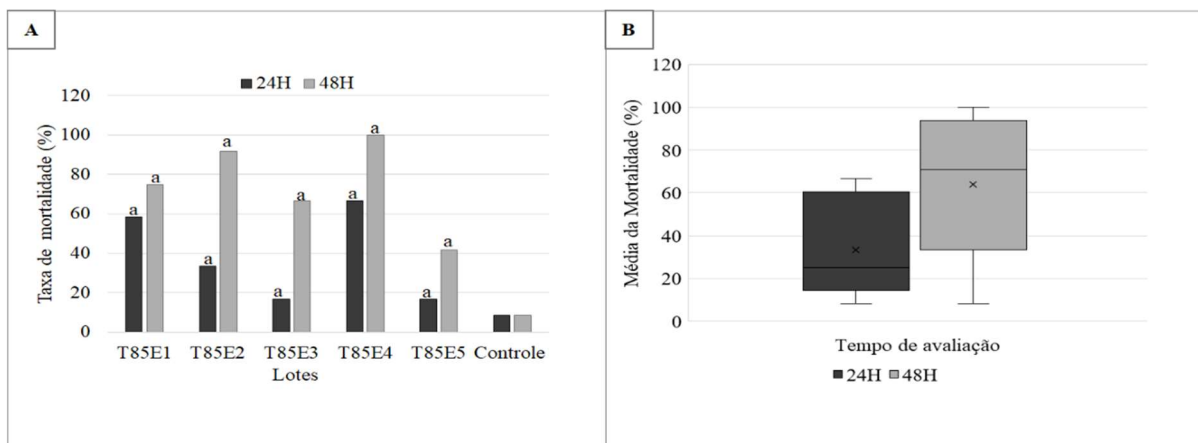
### 3. Resultados

#### 3.1 Sequenciamento do Genoma da linhagem BR101

Ao todo, foram identificadas oito proteínas com função biopesticida, as quais foram divididas em três classes estruturais, sendo quatro proteínas da classe Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa e Cry11Aa), duas da classe Cyt (Cyt1Aa e Cyt2Ba), e duas da classe Mpp (Mpp60Aa e Mpp60Ba), as quais são similares às proteínas Cry e, provavelmente, também apresentam ação sobre larvas de mosquitos.

#### 3.2 Avaliação prévia da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* por meio de bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis israelensis* em diferentes formulações

Para avaliar se houve diferenças significativas na mortalidade em 24 e 48 horas entre lotes foi utilizado Shapiro Wilk e Teste –T em nível de significância 0,05. Foi constatado que não houve diferenças em relação à mortalidade pelo p-valor correspondendo a 0.1447 ser maior que o nível de variância. A média estimada de mortalidade para os lotes em 24 e 48 horas foi de 38 e 75%, respectivamente, embora haja uma diferença aparente nas médias, o intervalo de confiança de 95% inclui o zero, indicando que a não há diferença estatisticamente significativa (Figura 14). Todos os lotes apresentaram potencialidade na mortalidade das larvas de *Aedes*, com destaque ao lote T85E2 e T85E4, contudo, o lote T8E5 (formulação líquida) obteve a menor taxa de mortalidade.



**Figura 15-** Mortalidade e médias percentuais das larvas de *Aedes* spp. após exposição a diferentes lotes de *Bacillus thuringiensis israelensis* (a) Comparação da mortalidade larval de *Aedes* spp. após exposição a *Bacillus thuringiensis israelensis* em diferentes formulações. \*De acordo com Shapiro Wilk e Teste T os

lotes não diferiram significativamente em relação a mortalidade a 24 e 48 horas (representado por letras iguais). P-valor corresponde a 0.1447 presente na figura.

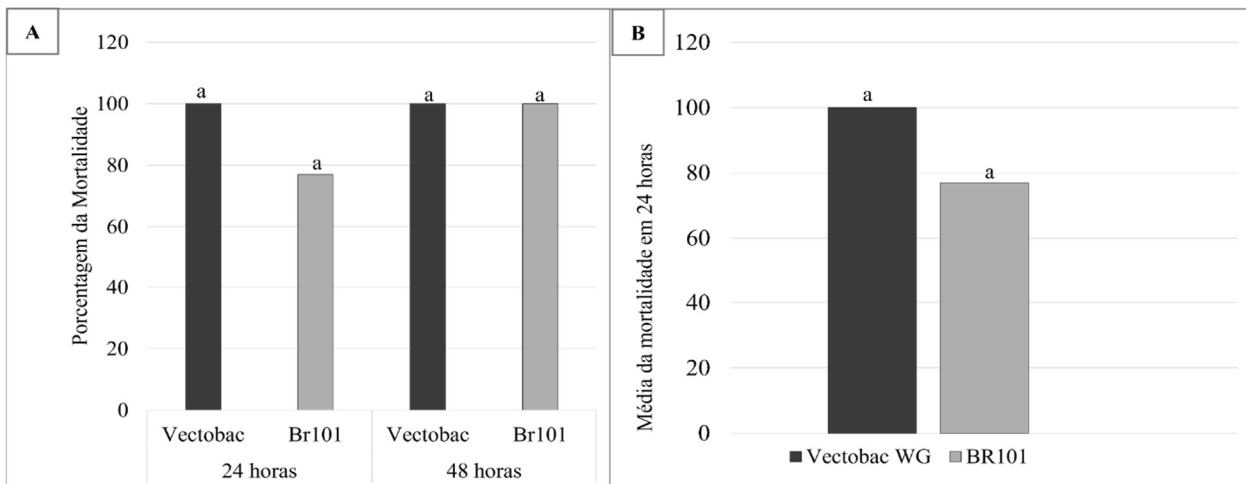
A contagem de unidades formadoras de esporos foi determinada por cinco lotes diferentes de Bti BR101, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 05. Os valores de UFC apresentados mostram que o lote T85E5 obteve uma maior concentração de UFC com  $3,0 \pm 1,0 \cdot 10^8$ , enquanto, o lote T85E4 possuiu a menor concentração de esporos  $1,17 \pm 1,3 \cdot 10^8$ .

**Tabela 5-** Concentração da Unidade Formadora de Colônias em formulado em pó (T85E1, T85E2, T85E3 e T85E4) e formulação líquida (T85E5).

Lote	UFC/g $\pm$ CV
T85E1	$1,8 \pm 0,45 \cdot 10^8$
T85E2	$2,2 \pm 0,84 \cdot 10^8$
T85E3	$2,4 \pm 0,89 \cdot 10^8$
T85E4	$1,17 \pm 1,3 \cdot 10^8$
T85E5	$3,0 \pm 1,0 \cdot 10^8$

### 3.3. Bioensaio da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* Rockefeller após exposição a diferentes formulações de *Bacillus thuringiensis israelensis*

A média de mortalidade das larvas com Vectobac WG e Bti BR101 após 24 horas foi de 100 e 75% respectivamente, como demonstra na figura 15, em 48 horas, ambas alcançaram 100% de mortalidade. Ao analisar as diferenças significativas entre as médias de mortalidade das larvas após serem expostas aos tratamentos por meio do teste de Wilcoxon a 0,05 foi constatado que não houve diferenças significativas entre o Bti BR101 e Vectobac em 24 horas, assim como nos tempos de exposição avaliados, devido ao p-valor ( $<0.05$ ) 0.05791, ou seja, maior que o nível de significância.

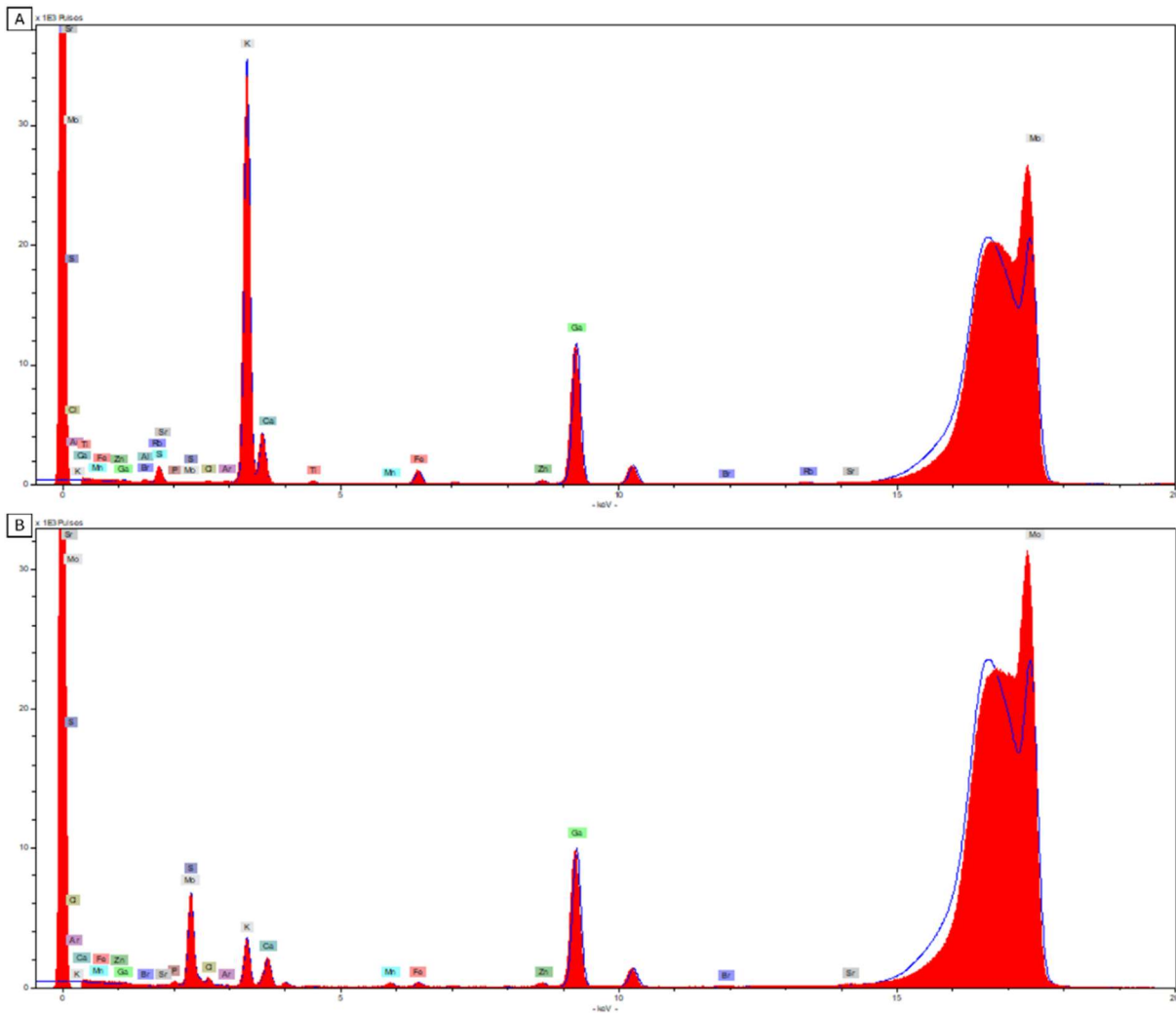


**Figura 16-** Mortalidade média das larvas de *Aedes aegypti* após exposição ao Bti BR101 e Vectobac WG. (a) Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* após 24 e 48 de exposição ao Bti BR101 e a Vectobac Wg. (b) Média percentual da mortalidade das repetições nos tratamentos. \*De acordo com Teste Wilcoxon os tratamentos não diferiram significativamente (representado por letras iguais) em relação a mortalidade a 24 e 48 horas. P-valor corresponde a 0.05791.

### 3.4. Espectrometria de fluorescência por reflexão total de raio x de *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101 e comercial

A figura 16 ilustra o espectro da amostra de Bti BR101 e Vectobac WG analisadas por meio de TXRF, sendo a abcissa como a energia característica de cada elemento e na ordenada a quantidade de pulsos eletrônicos.

Desta relação foi calculada a concentração de cada elemento medido determinadas pelo pico na área de Gálio, resultando nos seguintes elementos: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn, Rb, Sr como demonstra na figura. Entretanto, no Bti-UEL foi registrado maior quantidade de elementos químicos e em sua maioria, em maior concentração que o Bti Vectobac (Tabela 6).



**Figura 17-** Espectro da amostra de *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101(a) e Vectobac WG (b) após espectrometria de fluorescência de raio x por reflexão total

**Tabela 6-** Elementos medidos por espectrometria de fluorescência de raio x por reflexão total em amostras de *Bacillus thuringiensis israelensis*- BR101 e Vectobac WG com suas respectivas concentrações em mg/L.

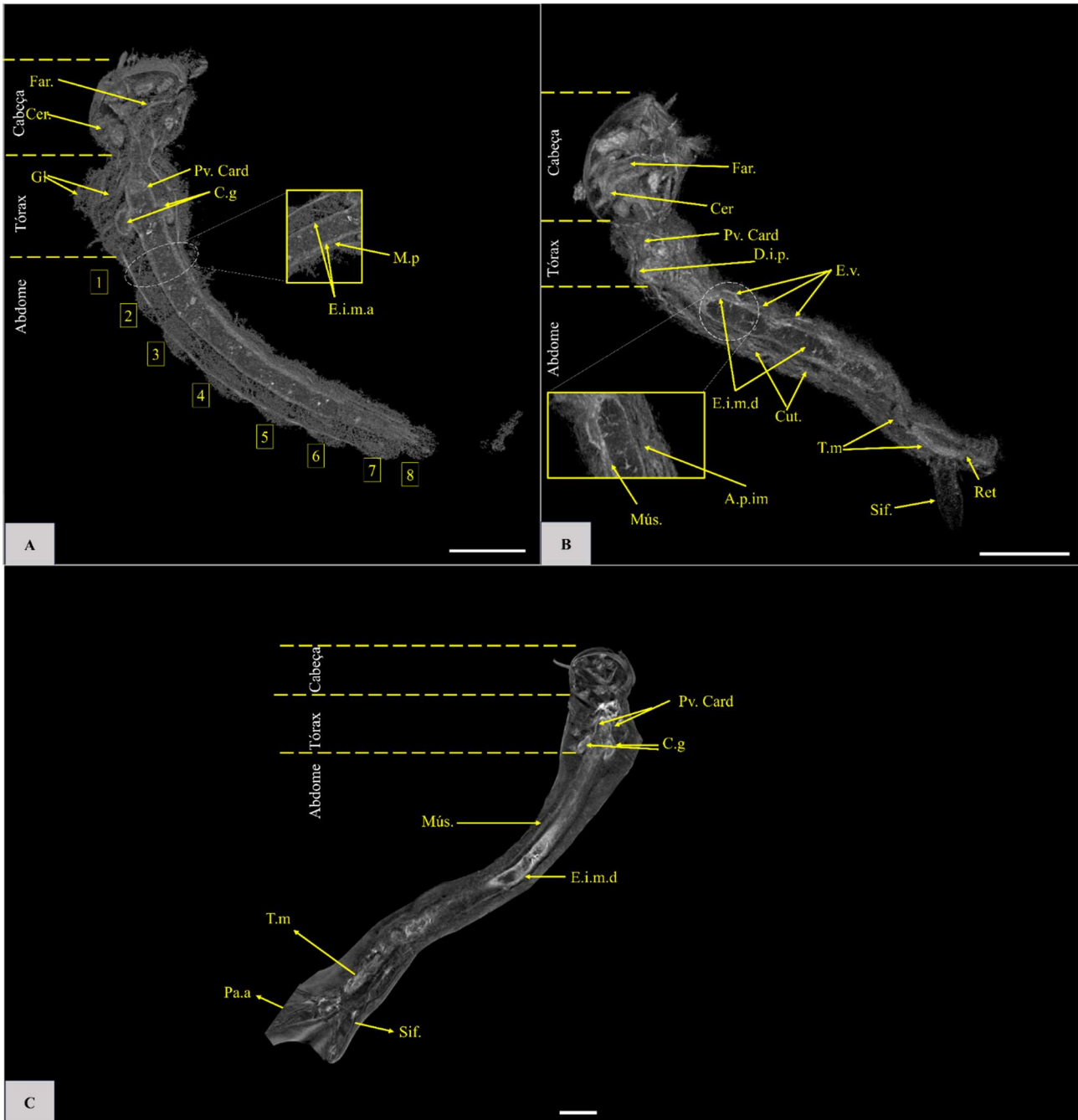
Elementos	Bti BR101*	Vectobac*
Al	37,12 ± 3,27	-
Si	80,66 ± 10,83	-
P	2,85 ± 0,14	14,51 ± 1,65
S	1,10 ± 0,03	145,01 ± 25,63
Cl	2,24 ± 0,07	7,766 ± 8,33
K	257,55 ± 19,09	26,21 ± 5,34
Ca	1,79 ± 0,14	10,44 ± 1,77
Ti	1,18 ± 10,38	-
Mn	0,02 ± 0,02	0,53 ± 0,10
Fe	1,85 ± 0,05	0,58 ± 0,006
Zn	0,23 ± 0,01.	0,232 ± 0,05
Rb	0,13 ± 0,05	-

\* Média da concentração dos elementos (mg/l) ± Desvio Padrão

### 3.5 Microtomografia computadorizada de Raio X das larvas de *Aedes aegypti* Rockefeller após exposição a diferentes formulações de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

As imagens obtidas por meio da micro-CT revelaram as estruturas internas, externas e os tagmas (cabeça, tórax e abdome), e forneceram detalhes do cérebro, faringe, proventrículo, ceco gástrico, reto e abertura anal, pode-se também observar a membrana peritrófica e o epitélio do trato digestivo. Acrescenta-se ainda a presença das glândulas salivares e discos imaginiais da perna.

Após a exposição das larvas ao Bti BR101 e Vectobac WG as larvas ficaram menos ativas, com as primeiras mortes registradas depois de três horas da adição do Bti. Ao comparar a larva controle (Fig 17 a) com as demais (Fig 17 b,c) pode-se observar a deformação gradativa de suas estruturas internas, assim como a presença de espaços vazios entre a cutícula e a epiderme das estruturas internas, consequência da ruptura das membranas. Acrescenta-se ainda, danos severos ao epitélio do intestino médio após a exposição.



**Figura 18-** Imagens da microtomografia computadorizada de raio X das larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* Rockefeller. (A) larva controle, (B) larva após 24 horas de exposição ao Bti BR101, (C) larva após 24 horas de exposição ao Bti comercial (Vectobac WG). 1-8 segmentos abdominais, Far faringe, Cer cérebro, Gl glândulas salivares, Pv Card proventrículo cardíaco, Cg ceco gástrico, Mp membrana peritrófica, Eima epitélio do intestino médio anterior, Dip discos imaginais da perna, Ev espaço vazio, Eimd epitélio do intestino médio danificado, Cut cutícula, Tm túbulos de malpighi, Ret reto, Apim abertura do epitélio do intestino médio, Mús músculos. Escala: 500 micrometros.

#### 4. Discussão

Os resultados apresentados relacionados a utilização do *B. thuringiensis israelensis* corroboram com a eficiência deste microrganismo no controle de *Ae. aegypti*, o presente estudo demonstrou que o Bti BR 101 que está sendo desenvolvido em cooperação com as empresas já mencionadas não se diferiu em relação a mortalidade que causou as larvas em relação a formulação comercial Vectobac WG, produto este com custo alto e importado. Dessa forma o Bti BR101 que está sendo desenvolvido no Brasil tem se demonstrado promissor. Acrescenta-se ainda, que conforme Ward (1984) para o desenvolvimento de novas formulações deve-se considerar alguns aspectos como o hábito do inseto-alvo e características do ambiente, adicionalmente, a utilização de formulações permite o acréscimo de adjuvantes inertes para melhorar suas características, entretanto, segundo o autor, pode ocorrer uma interação negativa entre o entomopatógeno e moléculas surfactantes e óleos, ocasionando diferentes resultados como demonstrado neste estudo.

A literatura afirma que a produção de bactéria entomopatogênica varia em relação à toxicidade resultando em pequenas diferenças em parâmetros como temperatura, oxigênio, pH e perdas de cristais durante a recuperação da biomassa concentrada (Couch 2000; Skovmand et al. 2000). Ainda, de acordo com Skomand et al. (2000) nem sempre há uma relação entre a concentração de esporos e a quantidade de cristais tóxicos produzidos na esporulação. Os resultados corroboram com as afirmações do autor, vide tabela 06 relacionado com a concentração de esporos e a taxa de mortalidade no presente trabalho.

Lea et al. (2023) ao avaliarem a ação inseticida da mesma cepa utilizada neste estudo em comparação com o Vectobac comercial contra simulídeos, constataram que o Bti BR101 causou mortalidade de 50,6% e 64,2% na concentração de 50 e 60 mg/L, respectivamente, não se diferenciando significativamente do Bti comercial. Bocaleti (2020) ao avaliar a formulação em comprimido e em grânulo dispersível da cepa Br14, constatou que também não houve diferenças significativas entre BioUel-C e formulações comerciais, como Vectobac WDG e dengueTech, com mortalidade de 82.6, 91.5 e 86.9%, respectivamente. Os resultados apresentados no presente estudo estão em concordância com as afirmações dos autores em relação ao Bti BR não se diferenciar do Bti comercial.

Zequi et al. (2011) avaliaram o controle de *Culex quinquefasciatus* (Wiedmann,1828) e *Ae. aegypti* através de diferentes formulados: Aquabac, Teknar, Vectobac As (formulações líquidas) e, Vectobac WDG, Vectobac T e Bti BR101 (sólidos), evidenciaram que apesar de Vectobac WDG e T ocasionarem uma mortalidade maior a 25°C ±2 com CL50 de 0.10 mg/L, se considerar a UTI (175 UTI/mg), o Bti BR 101 apresentou melhores resultados.

A respeito da análise elementar a fim de obter os elementos químicos e as respectivas concentrações deles em Bti 101 e Bti-comercial (Vectobac), foi observado que o Bti BR 101 obteve uma quantidade de elementos superior, contudo a maioria dos elementos presentes no Bti-comercial (Vectobac) possui uma concentração maior comparando com o Bti BR 101.

Os elementos químicos desempenham papel importante na funcionalidade do Bti, como o potássio na produção da toxina pelo Bti. Íons como Ca, Mg e Mn, são essenciais para a esporulação e formação da  $\delta$ -endotoxina, o Ca por exemplo tem a função de manutenção da estabilidade térmica dos esporos e estimulação deles. O Mg é responsável pelo crescimento, esporulação e síntese proteica cristalina, por fim o Mn influencia na alta produção dos esporos, co- regulador do metabolismo secundário e diferenciação de *Bacillus*, contudo, vale salientar que em altas concentrações dos respectivos íons, acarretam a toxicidade ao crescimento e inibição da formação dos cristais proteicos (Özcengiz et al. 1990; İçgen et al. 2002; El-Bendary, 2006; Hoefer, 2016). Ambos os elementos químicos citados foram medidos na espectrometria de fluorescência no presente trabalho, corroborando com estudos anteriores.

A *inhA 2*, gene identificado em Bti, codifica uma metaloprotease que possui um domínio que se liga a zinco, possuindo um papel fundamental na virulência quando o hospedeiro é infectado via oral (Fedilha et al. 2002). De acordo com dados encontrados no presente trabalho, o zinco foi medido em ambos Btis em concentração similar, colaborando com as afirmações de Fedilha (2002)

Considerando a mortalidade das larvas pelo Bti BR101 e Vectobac WG demonstradas no presente estudo, foi realizada a microtomografia computadorizada de raio X, pois a utilização de imagens tridimensionais das larvas de *Ae. aegypti obtidas* permitem a observação de estruturas com mais clareza, descritos anteriormente para Culicidae por Snodgrass (1959) e Christophers (1960), ademais, esta técnica demonstra-se muito superior em relação a qualidade das imagens obtidas por outras técnicas como a *Optical Coherence Tomography*, utilizada recentemente para a descrição dos mosquitos (Ravichandran, 2017). Destaca-se ainda, que há apenas um estudo que utiliza esta técnica para verificar a influência do patógeno sobre os mosquitos, o presente estudo em questão, diferencia-se, pois, utilizamos uma linhagem de Bti diferente e pela utilização do Bti comercial (Vectobac WG).

Como afirmado, afirmado anteriormente, as toxinas Cry e Cyt produzidos durante a esporulação possuem função inseticida, as toxinas Cyt atuam diretamente nos lipídeos presentes na membrana, afetando na permeabilidade dela, já a Cry cria poros após se ligarem ao receptor levando à morte por sepsse.

Nas imagens obtidas, notou-se uma deterioração das células epiteliais após exposição às toxinas, conforme previamente documentado (Clark, T. M. et al. 2005; Silva, V. C. et al. 2008;

Lavarias, S. 2017). Observou-se também a presença de espaços vazios entre as membranas celulares, destacando essa característica de maneira mais evidente na larva exposta ao Vectobac WG. Adicionalmente, foram indicadas deformações no intestino médio, induzindo ao choque osmótico, acúmulo de água e consequente lise celular, situações também corroboradas por Alba-Tercedor e Vilchez, S. (2023).

Adicionalmente, a degradação da membrana intestinal é atribuída a liberação gradativa de sucos gástricos alcalinos diretamente na hemolinfa. Dessa forma, altera o pH alcalino, impactando o funcionamento do sistema nervoso, especialmente os movimentos da larva que enfrenta dificuldades para retornar à superfície da água a fim de realizar trocas gasosas pelo sifão. Essa condição foi previamente discutida por Cerstiaens (2001) e as conclusões desses estudos são corroboradas pelas imagens tridimensionais obtidas por microtomografia computadorizada no presente estudo.

## 5. Considerações Finais

- O *Bacillus thuringiensis israelensis* BR101 demonstrou ser efetivo como agente de controle biológico de *Ae. aegypti* como o Bti comercial (Vectobac WG), servindo como uma estratégia amigável ambiente em comparação com os inseticidas químicos, ademais, uma alternativa estável para futura disposição ao uso pela população.
- A microtomografia computadorizada de raio X revelou-se uma ferramenta inovadora para adquirir imagens tridimensionais das larvas, tanto antes quanto após a exposição a diversas formulações do Bti. Isso viabilizou a observação detalhada de estruturas e órgãos internos, permitindo a avaliação dos danos causados.
- A espectrometria de fluorescência de raio X aplicada às diversas formulações do Bti forneceu informações cruciais sobre a composição do mesmo, sendo fundamental para comparações entre elas

## Referências

- Alba-Tercedor, J., & Vilchez, S. (2023). Anatomical damage caused by *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis* in yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (L.) larvae revealed by micro-computed tomography. *Scientific Reports*, 13(1), 8759. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35411-1>.
- Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G. G., Dame, D. A.; Service, M. W.; Dobson, S. L. (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: na analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10 (3), 295-311. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0014>
- Alves, Giselly Batista. Análises de genomas de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* isolados em Tocantins com toxicidade para mosquitos de interesse em saúde pública. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Gurupi, 2017.
- Alves, S.B. (1998). *Controle microbiano de insetos*. (2ª ed). Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 1163p.
- Araújo, R. N., Gontijo, N. F., Lazzari, C. R.; Pereira, M. H. (2012). Interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros vertebrados. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, p. 1-15.
- Arduino, M. B., Santos, G. V., & Rangel, O. (2023). Adultrap® trap optimized for collecting vector mosquito eggs, larvae and adults. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 75, 633-643. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12843>
- Badran, A.H., Guzov, V.M., Huai, Q., Kemp, M.M. Vishwanath, P., Kain, W., Nance, A.M.,Evdokimov, A.; Moshiri, F.; Turner, K.H.; et al. (2016). Continuous evolution of *B. thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533: 58-63. <https://doi.org/10.1038/nature17938>.
- Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A., Velayudhan, R., Roberts, B; Hobstick, O. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: sistematic literature review. *Tropical medicine Health*, 18(5), 564-77. <https://doi.org/10.1111/tmi.12087>
- Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. *Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue*. Brasília. (2009). 157 p. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_controle\\_dengue.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf).
- Brasil. Ministério Da Saúde.2013. *Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti-LIRAA para vigilância entomológica do Aedes aegypti no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipiente*. Brasília, Brasil, 86
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423-435. <https://doi.org/10.1016%2Fj.toxicon.2006.11.022>
- Clark, T. M., Hutchinson, M. J., Huegel, K. L., Moffett, S. B., & Moffett, D. F. (2005). Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti*

(Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Tissue and Cell*, 37(6), 457-468. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2005.08.001>

Clements, A. N. (1992). *The biology of mosquitoes*. Volume 1: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall.

Consoli, R.A.G.B; Oliveira,R.L.1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz.Rio de Janeiro.

Copping, L.G.; Menn, J.J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56, 651-676. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8%3C651::AIPS201%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8%3C651::AIPS201%3E3.0.CO;2-U)

Couch, T. L. (2000). Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. *Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application*, 297-316.

Christophers, S. R. (1960). *Aedes aegypti: the yellow fever mosquito*. CUP Archive.

Cruz, L. 2017. Comportamento hematófago em dípteros (Insecta: Diptera): caracterização, evolução, bases morfo-anatômicas e mecanismos fisio-moleculares. *Boletim PETBio UFMA / nº 41*,

Da Silva Neto, M. A. C., Winter, C., Termignoni, C. (2013) *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. Itabajara da Silva Vaz Junior

Depoli, P.A.C., Zequi, J.A.C., Nascimento, K.L.C., Lopes, J. (2016). Eficácia de Ovitampas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*. *EntomoBrasilis*. 9, 51–55 <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v9i1.509>

Dimond JB., Lea AO., Hahnert WF., DeLong DM. (1956). The amino acids required for egg production in *Aedes aegypti*. *The Canadian Entomologist*. 88 (2), 57–62. <https://doi.org/10.4039/Ent8857-2>

Dou, X., Chen, K., Brown, M.R., Strand, M.R.(2022). Multiple endocrine factors regulate nutrient mobilization and storage in *Aedes aegypti* during a gonadotrophic cycle. *Insect Science*. Online Version of Record. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13110>

Dutra, H.L.C., Rodrigues, S.L., Mansur, S.B. *et al.* Development and physiological effects of an artificial diet for *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti*. *Scientific report*, 7, 15687 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16045-6>

Eiras, A. Culicidae. In: Neves, D.P et al. (2016). *Parasitologia Humana*. 13 ed. Atheneu, São Paulo, pp. 411-424.

El-Bendary, M. A. (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of basic microbiology*, 46(2), 158-170. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510585>

- Farjana T, Tuno N. (2013). Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 50 (4), 838–846. <https://doi.org/10.1603/ME12146>
- Fay, R.W., Perry, A.S., 1965. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 25(3), 276–281
- Fedhila, S., Nel, P., & Lereclus, D. (2002). The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *Journal of bacteriology*, 184(12), 3296–3304. <https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3296-3304.200>
- Foratinni, O.P. (2002). *Culicidologia Médica*. vol.2.864p
- Frankenhuyzen, K.V. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>
- Fukruksa, C., Yimthin, T., Suwannaroj, M., Muangpat, P., Tandhavanant, S., Thanwisai, A., Vitta, A. (2017). Isolation and identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria associated with entomopathogenic nematodes and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 10, 440
- Galzer, E., & Azevedo Filho, W. (2016). Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. *Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 1(1), 13-16.
- Gomes, A. D. C., Silva, N. N. D., Bernal, R. T. I., Leandro, A. D. S., Camargo, N. J. D., Silva, A. M. D. & Moura, S. M. D. (2007). Especificidade da armadilha Adultrap para capturar fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 216-219. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200014>
- Guedes, Duschinka RD et al. (2017). Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging microbes & infections*, 6 (1),1-11. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59>
- Harbach, R. (2021). *Mosquito Taxonomic Inventory*. [Http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045](http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045) (accessed 01 mai. 2022)
- Höfte, H., & Whiteley, H. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological reviews*, 53(2), 242-255. <https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989>
- Içgen, Y., Içgen, B., & Ozcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Research in microbiology*, 153(9), 599–604. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(02\)01367-0](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(02)01367-0)
- Katak, R. M., Rocha, E. M., Oliveira, J. C., Muniz, V. A., Oliveira, M. R., Ferreira, F. A., ... & Tadei, W. P. (2021). Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of supernatant and pellet fractions from cultured *Bacillus* spp. isolated from Amazonian microenvironments. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(2), 104. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020104>

- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132,1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lavarias, S., Arrighetti, F., & Siri, A. (2017). Histopathological effects of cypermethrin and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on midgut of *Chironomus calligraphus* larvae (Diptera: Chironomidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 139, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.04.002>
- Leisnham, P., Lester, P., Slaney, D., Weinstein, P., (2004). Anthropogenic Landscape Change and Vectors in New Zealand: Effects of Shade and Nutrient Levels on Mosquito Productivity. *Ecohealth* 1(3), 306–316. <https://doi.org/10.1007/s10393-004-0026-5>
- Lima, A. F. T. DE., Gurgel, A. M. (2018). Perigos associados ao malation e seus metabólitos no controle vetorial do *Aedes aegypti*. In: Ed. Universitária da UFPE (Ed.); *Agrotóxicos: vulnerabilidades socioambientais, político-institucionais e teórico-metodológicas*. 1st ed., p.32–50.
- Lis, C P., Alves Sr, L. F. A., Zequi Sr, J. A. C., Cardoso, P. F., Vilas Boas, G. T., Marques, F. A., ... & Molina, O. S. (2023). Susceptibility of Simuliidae larvae (Diptera) to a new solid formulation based on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), and bioecological aspects of the breeding sites in Cascavel-Parana, Brazil. *bioRxiv*, 2023-05. <https://doi.org/10.1101/2023.05.23.541956>
- Liu, Q., Hallerman, E., Peng, Y., Li, Y. (2016). Development of Bt rice and Bt maize in China and their efficacy in target pest control. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1561. <https://doi.org/10.3390%2Fijms17101561>
- Lopes, J. (1997). Ecology of mosquitoes (Diptera, Culicidae) in natural and artificial rural breeding places in Northern Paraná state, Brazil: VI. Larvae collections in their home surroundings. *Revista Brasileira De Zoologia* 14(3), 571-578. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751997000300007>
- Lopes, T. B. F. et al. (2021) Genetic study in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) from Londrina (Paraná State, Brazil): an approach to population structure and pyrethroid resistance. *Revista Brasileira de Entomologia*, 65, <https://doi.org/10.1590/1806-9665-RBENT-2020-0088>
- Markland, S. M., & Hoover, D. G. (2016). *Bacillus cereus* mechanisms of resistance to food processing. In *The diverse faces of Bacillus cereus* (pp. 45-59). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801474-5.00004-9>
- Miró, V. V. et al. (2018). Evaluación de Las Larvitrapas como Método de Vigilancia de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) y Otros Culícidos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, vol. 70 (8)
- MS. Ministério da Saúde. (2013). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypti* (LIRAA) para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Brasília, DF.

- Oliveira, C.D., Gonçalves, D.S., Baton, L.A., Shimabukuro, P.H.F., Carvalho, F.D., Moreira, L.A. (2015). Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential human disease vectors. *Bulletin of Entomological Research*, 105, 305-315. <https://doi.org/10.1017/s0007485315000085>
- Oliveira, José Henrique M. et al. (2017) Catalase protects *Aedes Aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. *PLoS neglected tropical diseases*, 11 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005525>
- Nasci, R. S. A. (1981). Lightweight battery-powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. *Mosquito News* 41(4), 808–811
- Nascimento, K. L. C. et al. (2020). Comparison between Larval Survey Index and Positive Ovitrap Index in the Evaluation of Populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) North of Paraná, Brazil. *Environmental Health Insights*. <https://doi.org/10.1177%2F1178630219886570>
- Özcengiz, G., & Alaeddinoglu, N. G. (1991). Bacilysin production and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 23, 61-64. <https://doi.org/10.1007/BF02092250>
- Polanczyk, R.; Alves S. (2003). *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. *Agrociência*. 2, 1-10. <https://doi.org/10.2477/VOL7ISS2PP1-9>
- Polidorio, N. F., Silva, L. B., Zequi, J. A., Vilas-Boas, L. A., & Vilas-Bôas, G. T. (2023). Concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis israelensis* em diferentes formulações. *Anais do Congresso de Biologia da Universidade Estadual de Londrina*
- Raquin V., Lambrechts L.(2017). Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. *Virology*. 507, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.009>
- Ravichandran, N. K., Wijesinghe, R. E., Lee, S. Y., Choi, K. S., Jeon, M., Jung, H. Y., & Kim, J. (2017). Non-destructive analysis of the internal anatomical structures of mosquito specimens using optical coherence tomography. *Sensors*, 17(8), 1897. <https://doi.org/10.3390/s17081897>
- Regis, L et al. (2008). Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: Basis for surveillance, alert and control system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103(1). 50-59. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100008>
- Ritchie, S. A., Rapley, L. P., & Benjamin, S. (2010). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(6), 1053. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0603>
- Rueda, L. M. (2008). Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in fresh water. *Hydrobiologia*. 595. 477-487. <http://doi.org/10.1007/s10750-007-9037-x>
- Sarmiento, U.C.; Miguita, C.H.; Almeida, L.H.O.; Gaban, C.R.G.; Silva, L.M.G.E.; Souza, A.S.; Garcez, W.S.; Garcez, F.R. (2016). Larvicidal efficacies of plants from Midwestern Brazil: melianodiol from *Guarea kunthiana* as a potential biopesticide against *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111: 469-474

- Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J. V., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology review*. 62 (3), 755-806. <https://doi.org/10.1128%2Fmmbr.62.3.775-806.1998>
- Scott TW, Takken W. (2012). Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in Parasitology*. 28 (3), 114–121
- Silva, V. C., Pinheiro, N. L., Scherer, P. O., Falcão, S. S., Ribeiro, V. R., Mendes, R. M. M., ... & Dos Santos-Mallet, J. R. (2008). Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut infected with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Microscopy Research and Technique*, 71(9), 663-668. <https://doi.org/10.1002/jemt.20605>
- Silva, K. R. (2021). Diversidade de Culicidae (Diptera) e análise da circulação viral em estabelecimentos públicos e fragmentados de vegetação ripária urbana no norte do Paraná, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Londrina.
- Snodgrass, R. E. (1959). The anatomical life of the mosquito. *Smithsonian Miscellaneous Collections*
- Sukiato, F., Wasserman, R. J., Foo, S. C., Wilson, R. F., & Cuthbert, R. N. (2019). The effects of temperature and shading on mortality and development rates of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 264-270. <https://doi.org/10.1111/jvec.12358>
- Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of invertebrate pathology*, 101(1), 1-16.
- Ward, M.G (1984). Formulation of biological insecticides surfactant and diluent selection. In SCHER, M.B. (Ed.) *Advances in pesticide formulation technology*. Washington: *American Chemical Society*. p. 175-184. 10.1021/bk-1984-0254.ch013
- Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). Culicidae.(2023). Disponível em: [www.wrbu.si.edu/taxonomy/term/1194](http://www.wrbu.si.edu/taxonomy/term/1194). Acesso em 9 Jan. 2023
- Wilkerson, R.C; Linton, Y.M. Strickman, S (2021). *Mosquitoes of de Word*. Volume 1 e 2. Johns Hopkins University. 1332 p.
- Yap, H. H., Lee, Y. W., & Zairi, J. (2002). Indoor thermal fogging against vector mosquitoes with two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations, Vectobac ABG 6511 water-dispersible granules and Vectobac 12AS liquid. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18(1), 52–56.
- Zahouli, J. B. Z., Koudou, B. G., Muller, P., Malone, D., Tano, Y., Utzinger, J. (2012). Urbanization is a main driver for the larval ecology of *Aedes* mosquitoes in arbovirus-endemic settings in south- eastern Cote d' Ivoire. *PLoS neglected tropical diseases*. 11 (7), 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005751>
- Zequi, J. A. C., Lopes, J., Santos, F. P., Vilas-Boas, G. T. (2015). Efficacy and persistence of two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) under simulated Field conditions. *International Journal of mosquito Research*, 2, 5-9.

Zequi, J. A. C., Lopes, J., & Santos, F. P. (2011). Controle de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Culex (Culex) quinquefasciatus* Através de Formulados Contendo *Bacillus thuringiensis israelensis* em Temperaturas Controladas. *EntomoBrasilis*, 4(3), 130-134.

Zhang, Q., Hua, G., Adang, M.J. (2016). Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, 24, 714-729. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12401>