



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

YURI RENAN ALVES DE LIMA

**EFEITO LETAL DE FRAÇÃO HEXÂNICA DE *Ricinus communis* E DE PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis israelenses* SOBRE *Aedes spp. L.* (DIPTERA: CULICIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

YURI RENAN ALVES DE LIMA

**EFEITO LETAL DE FRAÇÃO HEXÂNICA DE *Ricinus communis* E DE PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis israelenses* SOBRE *Aedes spp. L.* (DIPTERA: CULICIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi

Londrina  
2024

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

Y95e Lima, Yuri Renan Alves de Lima.  
EFEITO LETAL DE FRAÇÃO HEXÂNICA DE *Ricinus communis* E DE PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis israelenses* SOBRE *Aedes* spp. L. (DIPTERA: CULICIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO / Yuri Renan Alves de Lima Lima. - Londrina, 2024.  
39 f. : il.

Orientador: João Antonio Cyrino Zequi.  
Coorientador: Everton Ricardi Lozano da Silva.  
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 biológico - Tese. 2. *Bacillus thuringiensis israelenses* - Tese. 3. *ricinus communis* - Tese. 4. *aedes* spp. - Tese. I. Cyrino Zequi, João Antonio. II. Lozano da Silva, Everton Ricardi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

YURI RENAN ALVES DE LIMA

**EFEITO LETAL DE FRAÇÃO HEXÂNICA DE *Ricinus communis* E  
DE PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis*  
*israelenses* SOBRE *Aedes spp. L.* (DIPTERA: CULICIDAE) EM  
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador Dr. João Antônio Cyrino  
Zequi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Gislayne Fernandes Lemes  
Trindade Vilas Boas  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 26 de abril de 2024.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me permitir vencer mais este desafio, pois sem ele não sou nada.

À minha esposa Jheniffer Valmira Warmling, posta em meu caminho por Deus, e que sempre esteve comigo nos bons momentos e naqueles momentos nem tão bons assim, mas que, com apenas sua presença ou uma palavra me dava força para continuar.

À minha filha Helena Valentina Warmling Alves de Lima, que muitas e muitas vezes teve mais paciência do que a mim mesmo, apenas aceitando que em certos momentos eu não poderia estar com ela, pois estava estudando, mas que quando eu lhe dava míseros minutos de atenção, esboçava os mais sinceros sorrisos, que me faziam esquecer de todo o resto.

Ao Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi, meu orientador que abriu as portas da Universidade Estadual de Londrina, e me fez sentir em casa, me auxiliando e apontando o melhor caminho a ser tomado.

Ao Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva, que sempre esteve disponível quando necessário e nunca mediu esforços para me ajudar.

À Profa. Dra. Gislayne Fernandes Leme Trindade Vilas-Boas, que teve paciência para me passar conhecimentos importantíssimos em tão pouco tempo, mas que levarei para sempre comigo.

À equipe dos Laboratório de Controle Biológico I e II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, onde a maior parte deste estudo foi realizado.

À Letícia Bernadete da Silva, que me auxiliou em todos os pormenores dos experimentos relacionados ao Bti, na Universidade Estadual de Londrina.

À equipe do Laboratório de Entomologia Geral e Médica que estiveram presentes me ensinando.

À equipe de pesquisa da Universidade Federal do Paraná capitaneada pelo Prof. Dr. Mario Antônio Navarro da Silva e Prof. Dr. Francisco de Assis Marques, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho, a eles, meu agradecimento.

Por fim, agradeço a todos, pois cada um de vocês teve uma participação no desenvolvimento deste estudo.

Muito obrigado a todos!

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

ALVES DE LIMA, Yuri Renan. **Efeito letal de fração hexânica de *Ricinus communis* e de produtos comerciais a base de *Bacillus thuringiensis israelenses* sobre *Aedes spp.* L. (Diptera: culicidae) em condições de laboratório.** 2024. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## RESUMO GERAL

Vetor de arbovíroses como Febre amarela urbana, Dengue, Chicungunya e Zika, o *Aedes aegypti* é um problema complexo na saúde pública mundial. No Brasil a partir de 2002 foi introduzido o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), tendo como principal ferramenta o Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *A. aegypti* (LIRAA) medindo o grau de infestação pelo *A. aegypti* em todos os municípios brasileiros, e empregando concomitantemente estratégias de controle químico e mecânico visando redução populacional desse vetor. Entretanto, o controle químico tem ocasionado a seleção de populações de *Aedes spp.* resistentes. Por esse motivo, se faz necessário a busca por patógenos e produtos naturais que exerçam controle populacional desse vetor. Assim, o presente estudo objetiva avaliar os efeitos letais em laboratório de frações purificadas de *Ricinus communis* e formulados a base de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* BR101 para o controle do *Aedes spp.*. Ovos de *Aedes spp.* foram coletados por meio de ovitrampas, alocadas no Campus da UTFPR – Dois Vizinhos. A produção do formulado em pó de fermentado à base dessa linhagem ocorreu no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sendo testadas cinco dissoluções diferentes, 0,00001 mg/L, 0,00005mg/L, 0,0001 mg/L, 0,0005 mg/L e 0,001 mg/L, respectivamente e um controle água. Foi testado também o formulado bacteriano comercial VectoBac® WG nas seguintes dissoluções 0,005; 0,008; 0,01; 0,02 e 0,04 mg/L e um controle água. Além desses formulados, foi testado a fração hexânica de *R. communis* à uma concentração de 500mg/L e uma testemunha água e outra álcool. Todos os tratamentos foram avaliados em um período de 24, 48 e 72 horas respectivamente. O produto comercial VectoBac®WG apresentou eficácia na mortalidade sobre larvas de *Aedes spp.*, com uma CL50 de 0,0005 e CL90 de 0,040, não apresentando mortalidade acima de 5% para testemunha após 72 h de avaliação. O formulado em pó BR101 apresentou uma porcentagem de mortalidade de 100% em todas as concentrações, após 24 horas de avaliação. Já o extrato hexânico de *R. communis* também demonstrou alta efetividade com 100% de mortalidade já em 24 h de exposição e zero mortalidade das testemunhas água e álcool após as 72 h de avaliação. Esses resultados demonstram que tanto o formulado BR 101 quanto a fração hexânica possuem letalidade equiparada ao produto comercial Vectobac ® WG rotineiramente utilizado no controle do vetor *Aedes spp.*, e podem configurar uma alternativa economicamente viável para este fim.

**Palavras-chave:** Alternativas de controle; Ricina; Formulados *Bti*; Economicamente viável.

ALVES DE LIMA, Yuri Renan. **Lethal effect of hexane fraction of *Ricinus communis* and commercial products based on *Bacillus thuringiensis israelensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions.** 2024. 43 f. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

### GENERAL ABSTRACT

Vector of arboviruses such as Urban Yellow Fever, Dengue, Chikungunya and Zika, *Aedes aegypti* is a complex problem in global public health. In Brazil, from 2002 onwards, the National Dengue Control Program (PNCD) was introduced, with the main tool being the Rapid Survey of Infestation Indexes by *A. aegypti* (LIRAA), measuring the degree of infestation by *A. aegypti* in all municipalities Brazilians, and simultaneously employing chemical and mechanical control strategies aimed at reducing the population of this vector. However, chemical control has led to the selection of resistant *A. aegypti* populations. For this reason, it is necessary to search for pathogens and natural products that exert population control of this vector. Thus, the present study aims to evaluate the lethal effects in the laboratory of purified fractions of *Ricinus communis* and formulated based on *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* BR101 for the control of *A. aegypti*. *A. aegypti* eggs were collected using ovitraps, located on the UTFPR Campus – Dois Vizinhos. The production of the powder formula of fermented Bti took place in the Pharmaceutical Technology Laboratory, of the Pharmacy Department of the Federal University of Paraná (UFPR), five different dissolutions being tested, 0.00001 mg/L, 0.00005mg/ L, 0.0001 mg/L, 0.0005 mg/L and 0.001 mg/L respectively and a water control. The commercial bacterial formula VectoBac® WG was also tested in the following dissolutions 0.005; 0.008; 0.01; 0.02 and 0.04 mg/L and a water control. In addition to these formulates, the hexane fraction of *R. communis* was tested at a concentration of 500mg/L and a control was water and another alcohol. All treatments were evaluated over a period of 24, 48 and 72 hours respectively. The commercial product VectoBac®WG was effective in mortality on *A. aegypti* larvae, with an LC<sub>50</sub> of 0.0005 and LC<sub>90</sub> of 0.040, with no mortality above 5% for controls after 72 h of evaluation. The BR101 powder formula showed a mortality rate of 100% in all concentrations, after 24 hours of evaluation and no mortality after 72 hours of evaluation. The hexane extract of *R. communis* also demonstrated high effectiveness with 100% mortality within 24 hours of exposure and zero mortality in water and alcohol controls after 72 hours of evaluation. These results demonstrate that both the BR101 formula and the hexane fraction have lethality equivalent to the commercial product Vectobac ® WG routinely used to control the *A. aegypti* vector, and can represent an economically viable alternative for this purpose.

**Keywords:** Control alternatives; Ricin; *Bti* formulas; Economically viable.



## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Ilustração anatômica da larva de <i>Aedes aegypti</i> .....                          | <b>17</b> |
| <b>Figura 2.</b> Ilustração anatômica da pupa de <i>Aedes aegypti</i> . ....                          | <b>18</b> |
| <b>Figura 3.</b> Ilustração anatômica da fêmea de <i>Aedes aegypti</i> , totalmente ingurgitada. .... | <b>19</b> |

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Gráficos da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) do produto comercial VectoBac®WG após 24, 48 e 72 horas de exposição. ....**34**
- Gráfico 2.** Mortalidade de extrato hexânico a 10% de *Ricinus communis* sobre larvas de *Aedes spp.*, e testemunhas água e álcool. ....**37**

## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Nome científico, família, nome popular e partes da <i>Ricinus communis</i> que foram utilizadas na preparação do extrato alcoólico a 10%, data, horário e local de coleta. ....                 | <b>29</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Resultados de mortalidade com VectoBac®WG ( <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ) sobre larvas de terceiro instar de <i>Aedes spp.</i> em condições de laboratório...                     | <b>31</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Resultado da CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> do produto comercial VectoBac®WG ( <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ) pela análise de Probit, com 24, 48 e 72 horas de exposição..... | <b>33</b> |
| <b>Tabela 4.</b> Resultados de mortalidade de larvas de terceiro instar de <i>Aedes spp.</i> com produto BR101 ( <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ) em condições de laboratório. ....                   | <b>35</b> |
| <b>Tabela 5.</b> Resultados de mortalidade de larvas de terceiro instar <i>Aedes spp.</i> com Fração Hexânica de <i>Ricinus. communis</i> a 10% em condições de laboratório.....                                 | <b>36</b> |

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>15</b> |
| 1.1      | Biologia Geral <i>Aedes spp.</i> .....   | 15        |
| 1.2      | Ovos .....   | 15        |
| 1.3      | Larva.....   | 16        |
| 1.4      | Pupa .....   | 17        |
| 1.5      | Adulto.....  | 18        |
| 1.6      | Epidemiologia e monitoramento do <i>A. aegypti</i> .....   | 20        |
| 1.7      | <i>Bacillus thuringiensis</i> .....  | 22        |
| 1.8      | Mecanismo de ação das proteínas Cry e Cyt .....  | 23        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>25</b> |
| 2.1      | Objetivo Geral .....   | 25        |
| 2.2      | Objetivos Específicos.....   | 25        |
| 2.3      | Hipótese.....  | 25        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>26</b> |
| 3.1      | Condições abióticas dos Bioensaios e Obtenção de <i>Aedes spp.</i> .....   | 26        |
| 3.2      | Obtenção do formulado BR101 contendo <i>B. thuringiensis israelensis</i> e bioensaio sobre larvas de <i>Aedes spp.</i> ..... | 26        |
| 3.3      | Bioensaio com formulado VectoBac® WG (3,000 UTI/mg) sobre larvas de <i>Aedes spp.</i> .....                                  | 28        |
| 3.4      | Obtenção da fração purificada de <i>R. communis</i> e bioensaio com larvas de <i>Aedes spp.</i> .....                        | 28        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>31</b> |
| 4.1      | Efeito letal de VectoBac®WG ( <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ) sobre larvas de <i>Aedes spp.</i> .....            | 31        |
| 4.2      | Concentração Letal Média (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) do produto comercial Vectobac®WG .....                       | 33        |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.3 | Efeito letal de BR101 ( <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ) sobre larvas de <i>Aedes spp.</i> ..... | 35 |
| 4.4 | Efeito Letal de Fração Hexânica de <i>Ricinus communis</i> a 10% sobre larvas de <i>Aedes spp.</i> .....    | 36 |
| 5   | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 39 |
| 6   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 40 |

## INTRODUÇÃO

### **Biologia Geral *Aedes spp.***

Originário da África, o *Aedes spp.* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) foi primariamente descrito no Egito, mas atualmente é considerado cosmopolita sendo abundantemente encontrado em regiões tropicais e subtropicais (Nelson, 1986; Brasil, 2020), sendo os fatores climáticos como variação de temperatura, umidade, pluviométrica, pressão atmosférica e velocidade do vento, contribuítes em seu sucesso reprodutivo (Nelson, 1986).

Este organismo é vetor de arboviroses, como Febre amarela urbana, Chicungunya, Zika e Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) (Black et al.,2002). O *A. aegypti* geralmente é encontrado em ambientes urbanos, e possui hábito diurno, utilizando-se de reservatórios naturais de água como buracos em árvores ou bromélias (Forattini & Marques, 2000), podendo utilizar também reservatórios artificiais como, tampas de garrafas, vasos de plantas e pneus para sua oviposição (Tauil, 2002).

A fêmea do *Aedes spp.* é hematófaga, ou seja, alimenta-se de sangue, que é necessário para maturação dos ovos. Devido essa necessidade, uma fêmea pode voar por até 800 metros, e têm a capacidade de ingestão de 3,0 a 3,5 mg de sangue por alimentação (Forattini, 2002). Após a alimentação, há a procura por parte da fêmea de lugares propícios à oviposição, com muita umidade, que seja acima da linha d'água (Forattini, 2002; Madeira et al., 2002).

### **Ovos**

Em geral após 3 dias do ingurgitamento, as fêmeas podem ovipositar entre 60 e 200 ovos de cada vez (Christophers, 1960; Jezus et al., 2020), medindo cerca de 1 mm de comprimento, com contorno alongado e fusiforme e valor médio de centro de massa de  $0,012 \pm 0,002 \text{ mm}^3$  (Forattini, 1962; Morais et al., 2019). Logo após a postura, os ovos têm coloração esbranquiçada, e quando em contato com o oxigênio apresenta coloração preta (Morais et al., 2019).

O desenvolvimento embrionário ocorre após 48h, quando em condições favoráveis de temperatura e umidade. Uma vez concluído o desenvolvimento embrionário, os ovos adquirem resistência a longos períodos de dessecação. Tal resistência, permite que sejam transportados a longas distâncias, em diferentes recipientes, caracterizando o principal meio de dispersão do inseto (dispersão passiva) (Brasil, 2001).

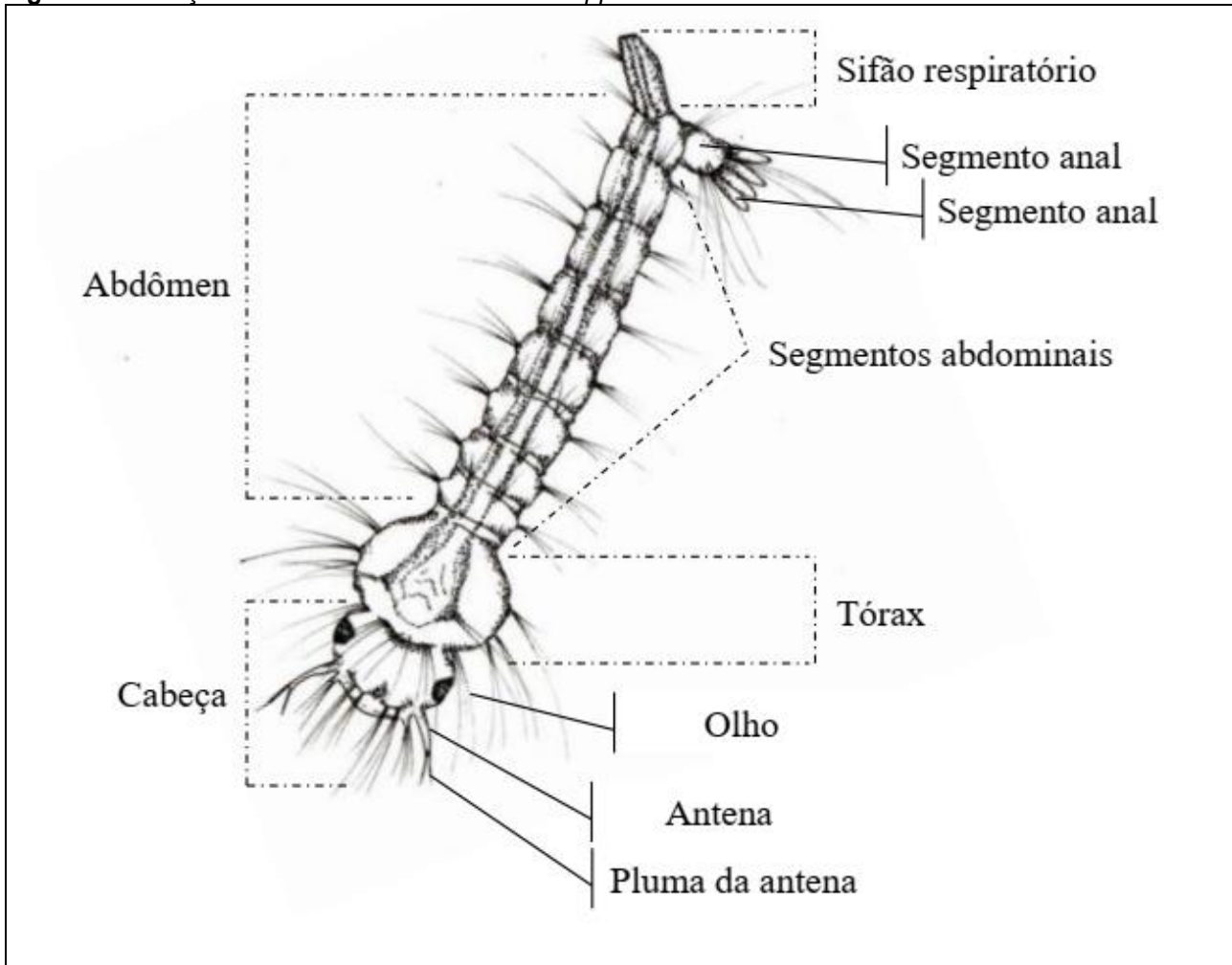
## Larva

Por ser holometabólico (sofre metamorfose completa), o estágio larval do *Aedes spp.* é caracterizado por ser o período de alimentação e crescimento, onde alimenta-se sobretudo de matéria orgânica acumulada no fundo e nas paredes dos depósitos (Brasil, 2001).

Dependente da temperatura, quantidade de alimento e densidade larval nos criadouros, as larvas de *Aedes spp.* passam por quatro estádios evolutivos, e o período entre a eclosão e o empupamento, que em geral dura cinco dias. A larva é composta de cabeça, tórax e abdômen (Figura 1), que é subdividido em nove segmentos (Brasil, 2001; ABED et al. 2007).

O segmento posterior (segmento anal) do abdômen contém quatro brânquias lobuladas utilizadas na regulação somótica. Possui também um sifão para a respiração na superfície da água (Figura 1). Possui uma maior sensibilidade a feixes de luz/ claridade ou movimentos bruscos na água, movimentando-se rapidamente ao fundo do recipiente buscando refúgio (Fotofobia) (Brasil, 2001).

**Figura 1.** Ilustração anatômica da larva de *Aedes spp.*



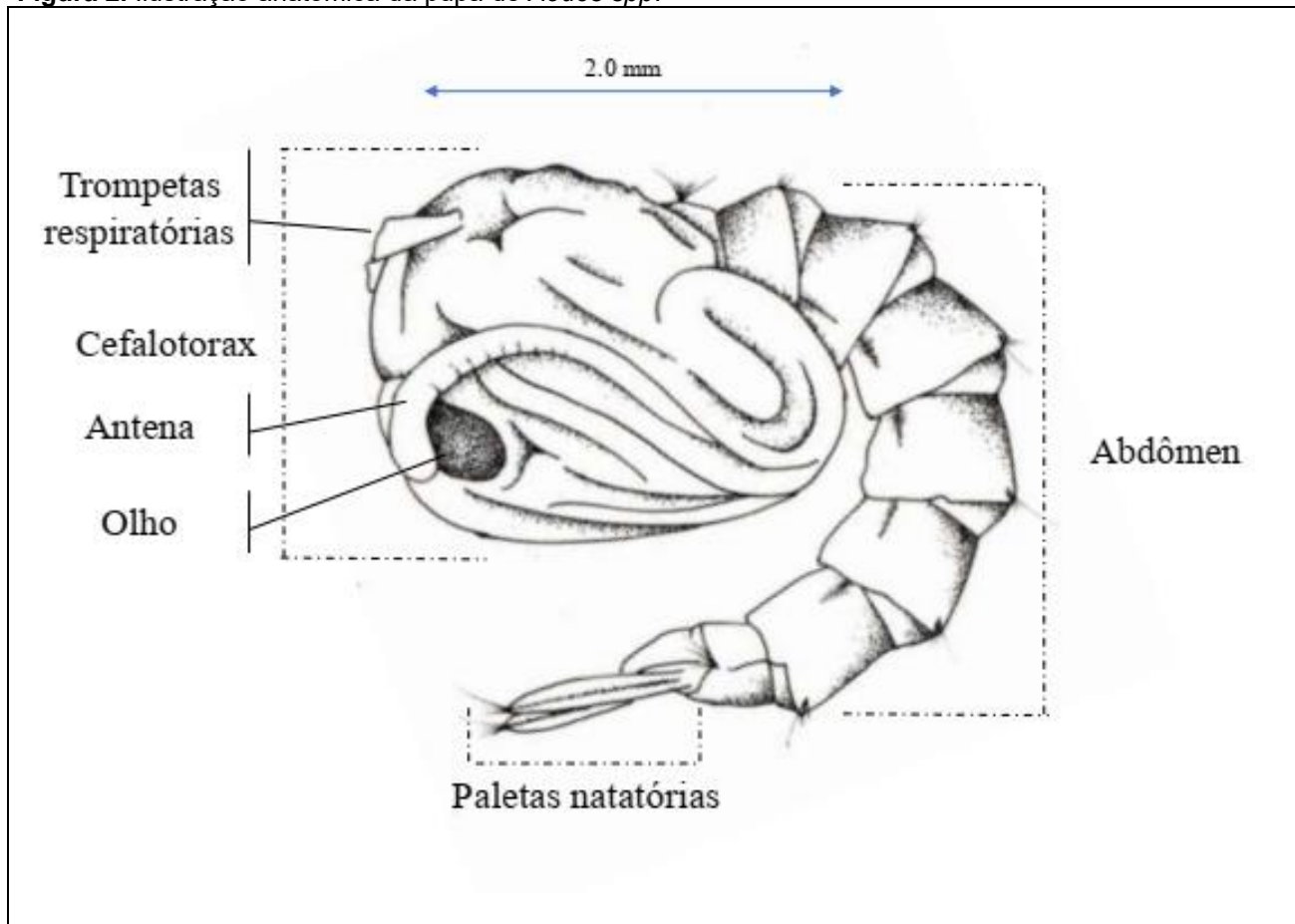
Fonte: Autor, 2022.

## **Pupa**

No período pupal não ocorre a alimentação, é neste estágio que ocorre a metamorfose da larva para o adulto, que dura em média de dois a três dias. Quando em repouso se mantêm em suspensão na superfície da água, facilitando a emergência do adulto. A divisão corporal da pupa se dá em cefalotórax (cabeça e tórax unidos), o qual contém um par de tubulos respiratórios que perpassam a linha da água permitindo a respiração e abdômen, onde no último segmento apresenta um par de pás que auxiliam na locomoção (Figura 2) (Consoli & Oliveira, 1994; Brasil, 2001).



**Figura 2.** Ilustração anatômica da pupa de *Aedes spp.*



**Fonte:** Autor, 2022.

## **Adulto**

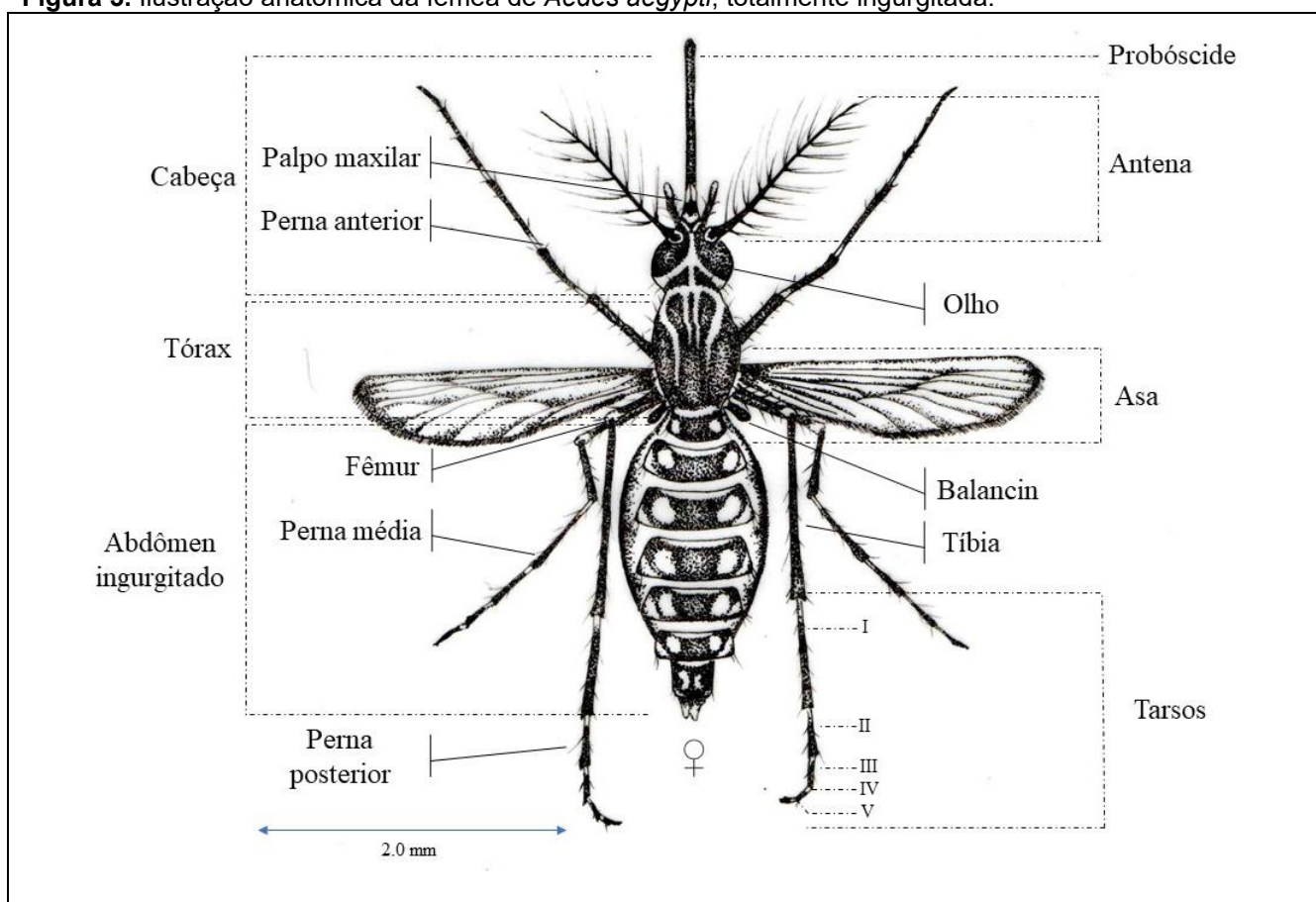
O *Aedes spp.* adulto, é o estágio de reprodução do inseto. Após emergir como adulto da fase pupal, o inseto geralmente pousa nas paredes do recipiente, onde permanece por várias horas, permitindo o endurecimento das asas e do exoesqueleto. Estes podem viver entre 30 e 35 dias (Consoli & Oliveira, 1994).

No adulto o corpo é subdividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça possui os órgãos do sentidos, como os palpos, olhos e antenas. As antenas do *Aedes spp.* são alongadas e estruturadas com 15 a 16 segmentos, o primeiro destes é afunilado e forma um anel, enquanto que o segundo é globoso (pedicelo), e os segmentos restantes, normalmente alongados, são chamados de flagelares (Figura 3) (Consoli & Oliveira, 1994).

Esta porção flagelar da antena pode variar de acordo com o sexo do mosquito. Os machos possuem nesses segmentos, pêlos em maior número e mais alongados que as fêmeas. Assim pode-se diferenciar os sexos através dessas características morfológicas (Figura 3) (Consoli & Oliveira, 1994).

No primeiro ou segundo dia após tornarem-se adultos, ocorre a cópula, que se dá em pleno vôo, com o macho sendo atraído pela fêmea por conta das batidas das asas (Silva et al., 1994; Anjolette, 2016). Na natureza os culicídeos se alimentam de néctar floral e sucos ricos em carboidratos de diferentes frutos, o que é essencial à sua sobrevivência (Leandro, 2012). No entanto a fêmea do *A. aegypti* precisa de sangue para concluir o processo de maturação do folículo ovariano, estando apta a ovipositar após alguns dias completando o ciclo da espécie (Annies, 2017).

**Figura 3.** Ilustração anatômica da fêmea de *Aedes aegypti*, totalmente ingurgitada.



Fonte: Autor, 2022.

Os criadouros de *Aedes spp.* são locais que podem acumular água e que estão dispostos geralmente em ambiente urbano (Do Nascimento et al., 2022), fator essencial para a transmissão de agentes etiológicos a humanos e animais (Gubler, 1998). A oviposição das fêmeas ocorre em “saltos” (depositam vários ovos em diferentes criadouros) visando garantir sucesso reprodutivo, podendo permanecer viáveis por mais de um ano. E uma vez infectada, pode transmitir o arbovírus durante toda sua vida (Carvalho & Moreira 2017; Powell & Tabachnick, 2013).

## **Epidemiologia e monitoramento do *A. aegypti***

Este mosquito é o principal vetor de importantes arboviroses como a Febre Amarela Urbana, Dengue, Chikungunya e Zika, que atualmente representam um dos problemas mais complexos da saúde pública brasileira, pois o *A. aegypti* tem ampla disseminação em território nacional (Bardach et al., 2019).

No ano de 2022, no território brasileiro, ocorreram 174.517 casos prováveis de chikungunya (taxa de incidência de 81,8 casos por 100 mil hab.). Se comparado ao mesmo período de 2021, houve um aumento de 78,9% dos casos, tendo a Região Nordeste apresentado a maior incidência (257,4 casos/100 mil hab.), seguida das Regiões Centro-Oeste (36,6 casos/100 mil hab.) e Norte (26,4 casos/100 mil hab.) (Brasil, 2022).

Em 2023, o pico de casos prováveis registrados se deu nos meses de fevereiro, março e abril com 24.140, 29.786 e 27.282 casos registrados respectivamente, totalizando ao final de 2023, 158.061 ocorrências, evidenciando uma pequena diminuição em relação ao ano anterior. Em 2024, o pico de registro de casos prováveis de chikungunya aconteceu no mês de fevereiro, apresentando 51.132 registros, com um total de 144.985 casos em todo o território brasileiro, até a segunda semana de abril (Brasil, 2024).

Em relação aos índices de Zika, até o mês de novembro de 2022, verificou-se uma taxa de ocorrência de 4,3 casos por mil hab. no país, apresentando um aumento de 98,8% no número de casos se comparado ao mesmo período em 2021, totalizando 9.204 casos (Brasil, 2022).

Em 2023, o pico de ocorrência de casos dessa doença ocorreu entre os meses de março, abril e maio apresentando 2.127, 1.869 e 1.784 registros, totalizando até a semana epidemiológica 52, 11.534 casos. Em contrapartida, em 2024 o número total de casos até a segunda semana de abril foi de 3.600 casos prováveis registrados, demonstrando uma diminuição significativa, quando comparada ao mesmo período do ano anterior (Brasil, 2024).

Até a semana epidemiológica 52 de 2022, foram registrados 1.450.270 casos prováveis de dengue (Taxa de incidência de 679,9 casos por 100 mil hab.) no Brasil. Em comparação com o mesmo período de 2021, houve um aumento de 162,5% dos casos registrados, sendo a Região Centro-Oeste com maior incidência de dengue, com 2.086,9 casos/100 mil hab., seguida da Região Sul (1.050,5 casos/100 mil hab.), Sudeste (536,6 casos/100 mil hab.), Nordeste (431,5 casos/100 mil hab.) e Norte (277,2 casos/100 mil

hab.) (Brasil, 2022).

No ano de 2023, o pico de número de casos prováveis de Dengue em território brasileiro transcorreu entre os meses de março e abril com 340 e 424 mil ocorrências respectivamente, totalizando em conjunto com os outros meses a marca de 1.649,144 registros. Já em 2024, uma situação mais alarmante vem se delineando, com o pico de ocorrências de casos prováveis de Dengue, nos meses de fevereiro e março com 1.117,885 e 1.583,726 de casos registrados respectivamente, enquanto o total de casos prováveis registrados no país até a segunda semana de abril ultrapassa a marca de 3.530,000 casos, número esse que é quase o dobro do que os registros de casos prováveis do ano de 2023 inteiro, demonstrando um aumento preocupante dessas arboviroses em território brasileiro (Brasil, 2024).

Diante do registro de grande número de casos dessas arboviroses ao longo dos anos, a redução do número populacional do vetor têm se tornado uma alternativa eficaz na redução do impacto das mesmas (Bardach et al., 2019; Brasil, 2020). Com esse objetivo posto, em 2002 foi criado pelo Ministério da Saúde o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que previa dentro de seu componente *Vigilância Epidemiológica*, o desenvolvimento de um método capaz de fornecer dados em tempo hábil (Ministério da Saúde, 2013).

Sua principal ferramenta de monitoramento é o Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA), que se baseia em níveis de infestações resultantes de cálculos do Índice de Infestação Predial (IIP) (Relação em porcentagem entre o número de imóveis positivos e o número de imóveis pesquisados) e do Índice de Breteau (IB) (Avaliação da densidade larvária de *A. aegypti* em relação aos imóveis existentes na área urbana infestada; e o tipo de recipiente em relação à existência de larvas, promovendo ao mesmo tempo um controle mecânico através da eliminação do criadouro) (Brasil, 2005; Braga & Valle, 2007).

Nesse cenário, as estratégias de combate mais difundidas, são de controle químico e mecânico, muitas vezes, empregadas por agentes de endemias em locais públicos e nas residências. O controle mecânico se baseia na eliminação de possíveis criadouros ou focos larvais, visando interromper o ciclo de vida desse vetor. Enquanto que no controle químico é utilizado inseticidas (principalmente larvicidas) com objetivo reducional da população de adultos e larvas em possíveis focos de oviposição (Santos & Rocha, 2018; Zara et al., 2016).

Entretanto, o uso de substâncias químicas de origem sintética tem ocasionado a

seleção de mosquitos resistentes a esses biocidas, assim, as atuais tendências, valorizam o uso de técnicas de baixo impacto ambiental, como o emprego de controle biológico e compostos naturais (Funasa, 2001; Lorenz, 2018; Santos & Rocha, 2018). Essas questões têm fomentado o desenvolvimento de estratégias mais efetivas de controle através de armadilhas, bem como sua vigilância (Gois & Rocha, 2021; Santos & Rocha, 2018).

Em sua grande maioria, as armadilhas são de baixo custo e possuem diferentes formas, consistindo em dispositivos com função atrativa para que os adultos permaneçam capturados (Adultrap), para depositarem seus ovos ou serem mortos, por exemplo, com intoxicação ou eletrocussão. Já no caso de dispositivos destinados à oviposição (Ovitrapas), os ovos e fases larvais podem morrer no local, ter seu desenvolvimento atrasado ou barrado, ou ainda, serem descartados antes mesmo que esse desenvolvimento aconteça, com o emprego ou não, de ovicida ou larvicida, estes, químicos ou biológicos (IOC, 2013; IOC, 2014; FUNASA, 2001; Santos, 2008; Zara et al., 2016).

### ***Bacillus thuringiensis***

A espécie *Bacillus thuringiensis* é considerada um dos entomopatógenos mais bem sucedidos atualmente, apresentando inúmeras vantagens no controle de insetos, quando comparado ao controle químico (Bravo et al., 2003; Soares-da-Silva et al., 2015), servindo como matéria prima para produção de inseticida biológico contra insetos por todo o mundo (Polanczyk & Alves, 2003; Galzer e Azevedo Filho, 2016; Liu et al., 2016).

Essa relevância dos estudos sobre *B. thuringiensis* se dá pela alta patogenicidade e toxicidade a inúmeros insetos transmissores de agentes patogênicos e pragas agrícolas (Marrone, 2019; Saraiva et al., 2019). Assim, várias pesquisas em diferentes partes do planeta são realizadas objetivando avaliar a mortalidade e isolar novas linhagens de *B. thuringiensis* (Soares-da-Silva et al., 2017; Lobo et al., 2018).

*Bacillus thuringiensis* pode ser encontrado em diferentes locais como grãos estocados, plantas, solo, água e insetos mortos (Konecka et al., 2012; Argôlo-Filho & Loguercio, 2014; Reyaz et al., 2017), estes últimos, servindo de fonte de alimento para essa espécie no ambiente, e aproveitados como matriz natural dos esporos. Essa grande disponibilidade de substrato para reprodução de *B. thuringiensis* têm potencial gerador de variabilidade genética desse procarionto em condições naturais (Alves, 1998; Ben-Dov,

2014; Raymond, 2017; Viana et al., 2021).

Linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), apresentam toxicidade para insetos pertencentes à ordem Diptera e, por isso são indicadas no controle de inúmeros vetores em várias regiões do planeta (Damgaard, 2000; Delécluse, Juárez-Pérez e Berry, 2000; Saraswathy e Kumar, 2004; Sanchis, 2011; Deng et al., 2014; Zogo et al., 2019; Onofre et al., 2020). Assim, diante do aumento de casos das doenças supracitadas, relacionadas ao sucesso evolutivo do *A. aegypti*, uma opção para o controle dessa espécie bastante difundida dentro do controle biológico, é o uso de uma linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) (Boyce et al., 2013; Land et al., 2019).

### **Mecanismo de ação das proteínas Cry e Cyt**

A ação biocida de *B. thuringiensis* ocorre através da presença de cristais proteicos sintetizados na fase esporolítica da bactéria, em condições limitadas de crescimento, que apresentam ação tóxica. Esses cristais são formados principalmente por proteínas, denominadas Cry (Crystal) e as proteínas Cyt (Citolíticas) (Polanczyk & Alves, 2003; Fernández-Chapa et al., 2019; Zogo et al., 2019; Onofre et al., 2020).

Após a ingestão dos esporos e cristais pelas larvas do inseto, ocorre a solubilização dos cristais no intestino médio e posterior liberação de protoxinas (toxina inativa). Em contato com meio alcalino intestinal ou em solução de enzimas proteolíticas, ocorre a fragmentação destas toxinas inativas, dando origem a moléculas de tamanhos variados de proteínas Cry e Cyt (proteínas/ toxinas ativas) (Bravo et al., 2005; Zhong et al., 2007; Vachon et al., 2012).

Seguidamente essa proteína ativada se liga a receptores do intestino médio, adentram as membranas levando à formação de poros, nas membranas dessas células do inseto, o que provoca a parada de funcionamento do aparelho digestório do inseto. Em seguida, dependendo da espécie de inseto, pode ocorrer a germinação dos esporos, formação de células vegetativas, as quais acessam a hemolinfa do insetos e levam o mesmo a morte por sepse. Assim, os esporos bacterianos também podem auxiliar na atividade patogênica através da sinergia com proteínas com atividade inseticida (Johnson & McGaughey, 1996). Desta forma, o uso de Bti no controle de larvas de insetos pode provocar diminuição populacional de vetores de diferentes patógenos, com baixo impacto ambiental (Irac, 2019).

As proteínas Cry são classificadas em grupos reunidos em inúmeros subgrupos com inúmeros genes identificados. Da mesma forma, as proteínas Cyt estão agrupadas

também em grupos, embora apresentem um menor número de genes já identificados. Outras proteínas com atividade inseticida, bem como a outras classes animais são produzidas por linhagens de *B. thuringiensis* e, por isso, um banco de toxinas com atividade tóxica é mantido sempre atualizado (Crickmore et al., 2020).

Outra opção ao uso de inseticidas sintéticos é o uso de produtos naturais que tem como base a aplicação de formulados botânicos naturais com ação repelente, fago-inibidora, inseticida e capaz de desregular o crescimento do inseto (Costa et al., 2005).

Em razão disso, a produção de extratos botânicos para o combate eficiente de insetos vetores de patógenos que não apresentem toxicidade ao ambiente, vem ganhando força nos últimos anos (Simas et al., 2004), pelo fato de as plantas serem fonte de inúmeras substâncias inseticidas produzidas em seu metabolismo (Rodrigues et al., 2005).

As plantas possuem defesas bioquímicas, em que produzem metabólitos secundários que possuem capacidade inseticida e grande potencial de utilização como método alternativo no controle de insetos vetores, por apresentarem ação específica sobre o inseto alvo, agindo em baixas concentrações além de não apresentarem toxicidade ao ser humano (Pinto et al., 2012).

Dentre as inúmeras espécies de plantas com tal capacidade, é possível citar a mamoneira (*Ricinus communis*), cujas folhas e sementes possuem substâncias que podem atuar sobre uma enorme gama de insetos, impedindo a produção de proteínas e o processo de digestibilidade (Pantoja-Uceda et al., 2003).

Podemos citar como principais compostos da mamona, a ricina e a ricinina, que tem apresentado alta efetividade bioinseticida (Audi et al., 2005; Cazal et al., 2009), sobre espécies *Callosobruchus maculatus* (Almeida et al., 2005), formigas cortadeiras (Hebling, 1996), *Spodoptera frugiperda* (Santiago et al., 2008), *Aedes aegypti* (Lima et al., 2019), *Bemisia tabaci*, *Coccinella*, *Euschistus spp.*, *Schistocerca spp* (Mampasi et al., 2023) dentre outros.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

- Verificar os efeitos letais de formulados bacterianos contendo esporos e cristais proteicos de Bti e fração hexânica de *R. communis* para o controle de larvas de *A. aegypti*, em condições de laboratório.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar efeitos letais do extrato hexânico sobre larvas de *Aedes spp.*;
- Avaliar efeitos deletérios (toxicidade) de diferentes formulados à base de Bti sobre larvas de *Aedes spp.*;

### **Hipótese**

Tanto o novo formulado à base de Bti quanto o extrato hexânico de *R. communis* apresentam alta taxa de mortalidade comparável ao produto comercial Vectobac® WG, sobre larvas de *Aedes spp.* em condição de laboratório, configurando bioinseticidas eficazes.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Condições abióticas dos Bioensaios e Obtenção de *Aedes spp.***

O projeto foi realizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL) e Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Para a realização dos bioensaios, foram controladas e adaptadas as condições de: umidade ( $70 \pm 5\%$ ), temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotofase (12h), conforme a necessidade de *Aedes spp.*, sendo o acondicionamento feito em câmaras climatizadas controladas.

Ovos de *Aedes spp.* foram obtidos através de Armadilhas de Oviposição (Ovitrampas), dispostas no Campus da UTFPR – Dois Vizinhos, estas, compostas por um recipiente plástico de coloração preta com capacidade de 500 mL, medindo 10 cm de altura por 08 cm de diâmetro, contendo em seu interior 300 mL de mistura atrativa (solução de levedo de cerveja à 0,4 g/L de água) para as fêmeas de *Aedes* e palhetas de madeira duratree de 15x3x0,5 cm com uma face áspera para oviposição voltada para cima. Para que as armadilhas não se tornem criadouros, estas foram retiradas e substituídas para que não houvesse a eclosão dos ovos, a cada três dias (Depoli et al., 2016; Silva et al., 2017).

Os ovos de *Aedes spp.* coletados nas armadilhas foram acondicionados no laboratório de Controle Biológico I da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. As palhetas com ovos foram submersas em bandejas plásticas com 1 litro de água destilada para sua eclosão, ocorridos geralmente após 24 h. As larvas foram alimentadas com ração para gato, autoclavada (30% de proteína bruta, 10% de extrato etéreo, 4% de matéria fibrosa, 8% de matéria mineral), moídas em partículas de 1 mm. Estas larvas foram mantidas em incubadora BOD à  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade de  $80 \pm 5\%$  controlados a partir de um termo-higrômetro digital (Center 342), e fotoperíodo de 14 horas de luz para 10 horas de escuro até atingirem terceiro instar inicial, para posterior uso nos bioensaios (Silva et al., 1998; Zequi et al., 2011).

### **Obtenção do formulado BR101 contendo *B. thuringiensis israelenses* e bioensaio sobre larvas de *Aedes spp.***

A linhagem BR101 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) é mantida na forma esporulada no banco de linhagens de *B. thuringiensis* do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da UEL.

Para elaboração do fermentado, o Bti foi recuperado através de hidratação e inoculado em meio sólido Luria-Bertani (LB). Posteriormente, um pré-inóculo em meio de cultura NYSM foi preparado (Myers & Yousten, 1980) em Erlenmeyer com capacidade de 1 L contendo 200 mL de meio, e inoculado através de alça de platina do Bti recuperado, o qual foi mantido em estufa para crescimento à 30°C por 48 h. Após crescimento, alíquotas da amostra foram acondicionadas em microtubos de 2 ml e mantidas à 2°C ± 2 para uso posterior.

A partir dessa fonte de bactéria, um inóculo de fermentado foi preparado. Em dois frascos de rosca de 100 mL com 30 mL de meio líquido LB, foi inoculado 600 µL (2% de seu volume) do pré- inóculo. Os recipientes foram mantidos por 6 horas em agitação à 120 rotações por minuto à 30°C.

Ao término de seu crescimento, os inóculos foram introduzidos ao biorreator (Allbiom - AllMic LAB SCR07 - twin) contendo 6 litros de meio NYSM e mantido à 30°C ± 2, 300 rpm, pH 7,0 e com o provimento de ar constante de 1 L/min para a cada litro de meio, por 40 h até se completar a esporulação. O fermentado resultante, foi centrifugado à 13,700 x g RCF, entre 12 e 15° C, por 15 minutos (Sorvall - RC-5C), descartando-se o sobrenadante. Após, o conteúdo sólido foi congelado à -20°C, e submetido a liofilização (Liotop - L101) por 24 h.

A produção do formulado em pó, ocorreu no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em que o Bti fermentado liofilizado e o excipiente de interesse foram pesados e misturados em almofariz de porcelana, sendo em seguida adicionado água. A massa resultante, foi passada em peneira granulométrica 24 mesh, posta em estufa 35°C por 30 minutos. Decorrido o tempo necessário, a mistura foi transpassada em peneira granulométrica de 60 mesh, resultando no grânulo dispersível em água.

Para a realização dos bioensaios avaliando o efeito larvicida do formulado produzido (2700 UTI/mg), foram utilizadas 6 larvas de terceiro ínstar inicial, para as diferentes concentrações, 0,00001 mg/L, 0,00005mg/L, 0,0001 mg/L, 0,0005 mg/L e 0,001 mg/L respectivamente, e para a testemunha água, que foram alocadas em potes de polietileno circular transparente de 11 cm de diâmetro com 7 cm de profundidade, contendo 300 mL de água destilada, cada um deles com três réplicas. Os recipientes foram alocados em sala com temperatura (25° C ± 2° C ) e umidade (80 ± 5%) controladas.

A avaliação do bioensaio ocorreu nos períodos de 24, 48 e 72 horas

respectivamente, quantificando-se o número de insetos mortos. As larvas foram consideradas mortas quando não emergiram à superfície ou se não responderam ao estímulo de agitação da água (Zequi et al., 2011).

Os dados obtidos foram submetidos à verificação de distribuição normal de Shapiro-Wilk e não apresentaram normalidade. Deste modo, os resultados obrigatoriamente foram subordinados à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis a 5%, através do programa Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

### **Bioensaio com formulado VectoBac® WG (3,000 UTI/mg) sobre larvas de *Aedes spp.***

O formulado comercial VectoBac ® WG foi adquirido através da Secretaria Municipal de Saúde de Londrina. Para realização desses bioensaios foram utilizadas 25 larvas de terceiro ínstar inicial, alocadas em potes de polietileno circular transparente de 11 cm de diâmetro com 7 cm de profundidade, contendo 150 mL de água destilada. O efeito larvicida do Vectobac® WG foi avaliado em cinco concentrações diferentes (0,005; 0,008; 0,01; 0,02 e 0,04 mg/L) e um controle (H<sub>2</sub>O), com 5 réplicas cada uma. Os recipientes foram alocados em sala com temperatura (25° C ± 2° C) e umidade (80 ± 5%) controladas. A avaliação das diferentes concentrações e testemunha ocorreu após 24, 48 e 72 horas de exposição, mesurando o número de insetos mortos, que não emergiram à superfície e que não responderam aos estímulos de agitação do meio (Zequi et al., 2011).

Foi realizado a análise estatística de Probit (Finney, 1971), através do Programa Statgraphics Centurion (Polhemus, 1980), sendo calculadas as Concentrações Letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) com seus intervalos de confiança. Após, os dados foram submetidos ao (r) Teste de Bartlett de homogeneidade e (w) Shapiro-Wilk de normalidade para poderem ser submetidos ao teste de comparação de médias (Teste de Tukey), demonstrando se as diferentes concentrações diferem ou não significativamente entre si e a testemunha, através do programa estatístico Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

### **Obtenção da fração purificada de *R. communis* e bioensaio com larvas de *Aedes spp.***

O extrato vegetal alcoólico foi obtido a partir de exemplares de *R. communis*, previamente

selecionadas por apresentarem potencial inseticida, baseado em pesquisa bibliográfica (Tabela 1).

**Tabela 1.** Nome científico, família, nome popular e partes da *Ricinus communis* que foram utilizadas na preparação do extrato alcoólico a 10%, data, horário e local de coleta.

| Nome científico         | Família       | Partes utilizadas | Data de coleta     | Horário de coleta | Local de coleta  | Latitude  | Longitude |
|-------------------------|---------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------|-----------|
| <i>Ricinus communis</i> | Euphorbiaceae | Fruto com semente | 10/ novembro/ 2021 | Manhã             | Dois Vizinhos/PR | -25.73697 | -53.06829 |

A coleta de todo material vegetal foi realizada em período matutino, sendo estes pré-selecionados, deixando-se somente as partes de interesse (Tabela 1). Em seguida, o material vegetal foi alocado em estufa de secagem (60° C) por 48 h. Uma exsiccata do espécime foi montada e enviada ao Herbário da UEL para a identificação botânica e registro dos exemplares. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas tipo Willey, com granulometria de 0,5 mm, formando um pó fino. Para preparação do extrato a 10%, foi utilizado como solvente extrator uma mistura de etanol: água (80:20 v/v), posteriormente colocados em banho de água termostatizado a 60 °C, por 30 min.

Na sequência o extrato foi filtrado utilizando-se uma bomba a vácuo, com pressão constante de 1,2 kgf/ cm<sup>2</sup>, acoplada a um Kitasato com membrana filtrante de 8µm. Após o processo de filtração, o extrato vegetal de *R. communis* foi fracionado através do solvente hexânico pela técnica de extração líquido-líquido. Para isso, foi adicionado a um funil de separação de 1L, 250 mL de extrato bruto de *R. communis* e 250 mL de hexano. Essa substância foi agitada de maneira manual por dois minutos para completa homogeneização. Em seguida, a mistura ficou por 15 minutos repousando para que ocorresse completa separação em duas fases diferentes, e a fase inferior era composto de extrato bruto e a superior de fração hexânica, que foi coletada a partir da torneira do funil de separação.

A fração obtida foi concentrada em evaporador rotativo a 50° C e após completa remoção do solvente, os compostos foram dissolvidos em álcool 90%, para obtenção da concentração 500 mg/L a 10% e posterior análise da atividade larvicida.

Em laboratório, 25 larvas de terceiro instar inicial em quintuplicata (Para cada extrato e testemunhas (H<sub>2</sub>O e Álcool 90%)) foram alocadas em recipientes de polietileno transparente, com 11 cm de diâmetro e 7 cm de profundidade, contendo 150 mL de água destilada (OMS, 2005). Em seguida, os bioensaios foram acondicionados em sala de

criação. A avaliação foi realizada 24, 48 e 72 h após a aplicação dos tratamentos, quantificando-se o número de insetos mortos.

Os dados de mortalidade foram analisados quanto à distribuição normal, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk, não apresentando normalidade. Assim, os dados foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis a 5% com auxílio do programa estatístico Assistat 7.7 (Silva & Azevedo, 2016).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito letal de VectoBac®WG (*Bacillus thuringiensis israelensis*) sobre larvas de *Aedes spp.*

Verificou-se nos bioensaios com diferentes concentrações do produto Vectobac®WG que este apresentou ação inseticida sobre larvas de *Aedes spp.*, causando mortalidade maior que a ocorrida na testemunha (Tabela 2). Nota-se que o percentual de mortalidade, após 24h, apresentou diferença significativa para os tratamentos T2, T3, T4 e T5 quando comparados a testemunha, diferindo do tratamento T1 que não apresentou essa diferença significativa (Tabela 2).

Quando analisa-se a avaliação, após 48h e 72h, observa-se que todos os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 diferiram significativamente da testemunha, com T5 apresentando o maior percentual de mortalidade. Observa-se que todos os tratamentos, após 72h, apresentaram um percentual de mortalidade acima de 50% (Tabela 2).

Analisando-se o percentual de mortalidade em 24, 48 e 72h respectivamente, percebe-se que o aumento da taxa de mortalidade foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações, com igual comportamento para todos os períodos de exposição ao bioinseticida (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados de mortalidade com VectoBac®WG (*Bacillus thuringiensis israelensis*) sobre larvas de terceiro instar de *Aedes spp.* em condições de laboratório.

| Tratamentos | Concentrações    | % de Mortalidade |                 |                 |
|-------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
|             |                  | 24h              | 48h             | 72h             |
| T1          | 0,005 mg/L       | 14,4% <b>cd</b>  | 33,6% <b>b</b>  | 52% <b>b</b>    |
| T2          | 0,008 mg/L       | 24,8% <b>c</b>   | 44,8% <b>b</b>  | 60% <b>b</b>    |
| T3          | 0,01 mg/L        | 30,4% <b>bc</b>  | 57,6% <b>ab</b> | 70,4% <b>ab</b> |
| T4          | 0,02 mg/L        | 43,2% <b>ab</b>  | 60% <b>ab</b>   | 72% <b>ab</b>   |
| T5          | 0,04 mg/L        | 50,4% <b>a</b>   | 75,2% <b>a</b>  | 89,6% <b>a</b>  |
| Testemunha  | H <sub>2</sub> O | 0,8% <b>d</b>    | 3,2% <b>c</b>   | 4,8% <b>c</b>   |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados seguem a homogeneidade (Bartlett –  $p < 0,05$ ) e normalidade (Shapiro-Wilk –  $p < 0,05$ ) respectivamente.

Em estudo semelhante, Hitipeuw et al. (2023) avaliaram diferentes concentrações do formulado Vectobac®WG (0,001g/L; 0,002g/L; 0,004g/L; 0,006g/L e 0,008g/L) sobre larvas de *A. aegypti*, e verificaram que estas provocaram percentual de mortalidade de 93; 98; 100; 100; 100% respectivamente, demonstrando assim, uma relação diretamente proporcional entre o aumento das concentrações e da mortalidade e o efeito positivo do Vectobac®WG sobre larvas de *A. aegypti*.

Com isso, no trabalho de Busato et al. (2018), estes sugerem que o Vectobac®WG deve ser considerada um forte formulado a base de Bti no controle de larvas de *A. aegypti*, uma vez que ao testarem cinco diferentes concentrações do produto 0,0005g/L; 0,001g/L; 0,0015 g/L; 0,002 g/L; 0,0025 g/L, verificaram 100% de mortalidade em todas as concentrações e períodos de exposição, apresentando efetiva atividade larvicida já nas primeiras 24 horas de exposição.

Em outro trabalho realizaram testes com Vectobac®WG sobre larvas de dípteros (*Culex quinquefasciatus* Say (1823) e *Chironomus calligraphus* Goeldi (1905)) em quatro diferentes concentrações 0,031 mg/L, 0,063 mg/L, 0,125 mg/L, 0,250 mg/L, e verificaram que após 24 h os percentuais de mortalidade foram de 18,8; 32,5; 66,3; 85,0% para *C. calligraphus* e 15; 26,3; 56,3; 76,3% para *C. calligraphus*, respectivamente, tendo após 48h percentuais de mortalidade de 30,0; 50,0; 80,0; 98,8% para *C. quinquefasciatus* e 22,5; 36,3; 67,5; 87,5% para *C. calligraphus*. (Ayala & Badajoz, 2018). Comparando-se tais resultados aos do presente estudo, nota-se que Ayala e Badajoz (2018) utilizaram concentrações mais elevadas para obter resultados semelhantes dentro da mesma ordem de insetos. Entretanto, elucida-se o efeito positivo do formulado Vectobac®WG para controle de larvas de mosquitos.

Além disso, Viana et al. (2021) testaram a eficiência do Vectobac®WG sobre larvas de *A. aegypti* em condições de campo e verificaram que este apresentou 100% de mortalidade e possui capacidade de reciclagem de 77 dias, mostrando a persistência da atividade do produto no ambiente, o que denota sua eficácia no controle de larvas do mosquito.

Já Tadei e Araújo (2022) testaram em seu trabalho o efeito larvicida do Vectobac®WG sobre larvas de *A. aegypti* em seis concentrações diferentes: 0,1mg/L; 0,08mg/L; 0,05mg/L; 0,03mg/L; 0,01mg/L; 0,008mg/L. Os bioensaios foram em três salas com diferentes temperaturas e níveis de gás carbônico, visando entender se o mosquito se mostrava mais sensível às mudanças de concentração de CO<sub>2</sub>. Obtiveram em 24 h, para todas as salas avaliadas, mortalidade acima de 70% para a concentração 0,1 mg/L e após 48 h de avaliação, mortalidade de 90% para as concentrações 0,1 mg/L; 0,08 mg/L e 0,05 mg/L.

A partir dos resultados obtidos e da análise e discussão com diferentes autores, pode-se notar que o Vectobac®WG é um produto promissor e de efeitos positivos para o controle de larvas de *Aedes spp.* em condições de laboratório.

### Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) do produto comercial Vectobac®WG

A Tabela 3, 4 e 5 e o Gráfico 1, mostram a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>), do produto comercial Vectobac®WG, com p-valor menor que 0,05 (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> diferem significativamente). Pode-se inferir que existe uma associação significativa entre as variáveis analisadas (concentração e mortalidade), mostrando que quanto maior a concentração maior a mortalidade. A CL<sub>50</sub> apresentada foi de -0,0005 (50000ppm) variando entre -0,0082 (820000ppm) e 0,0040 (40000ppm), enquanto a CL<sub>90</sub> apresenta um valor de 0,040 (40000ppm) variando entre 0,033 (33000ppm) e 0,052 (520000ppm).

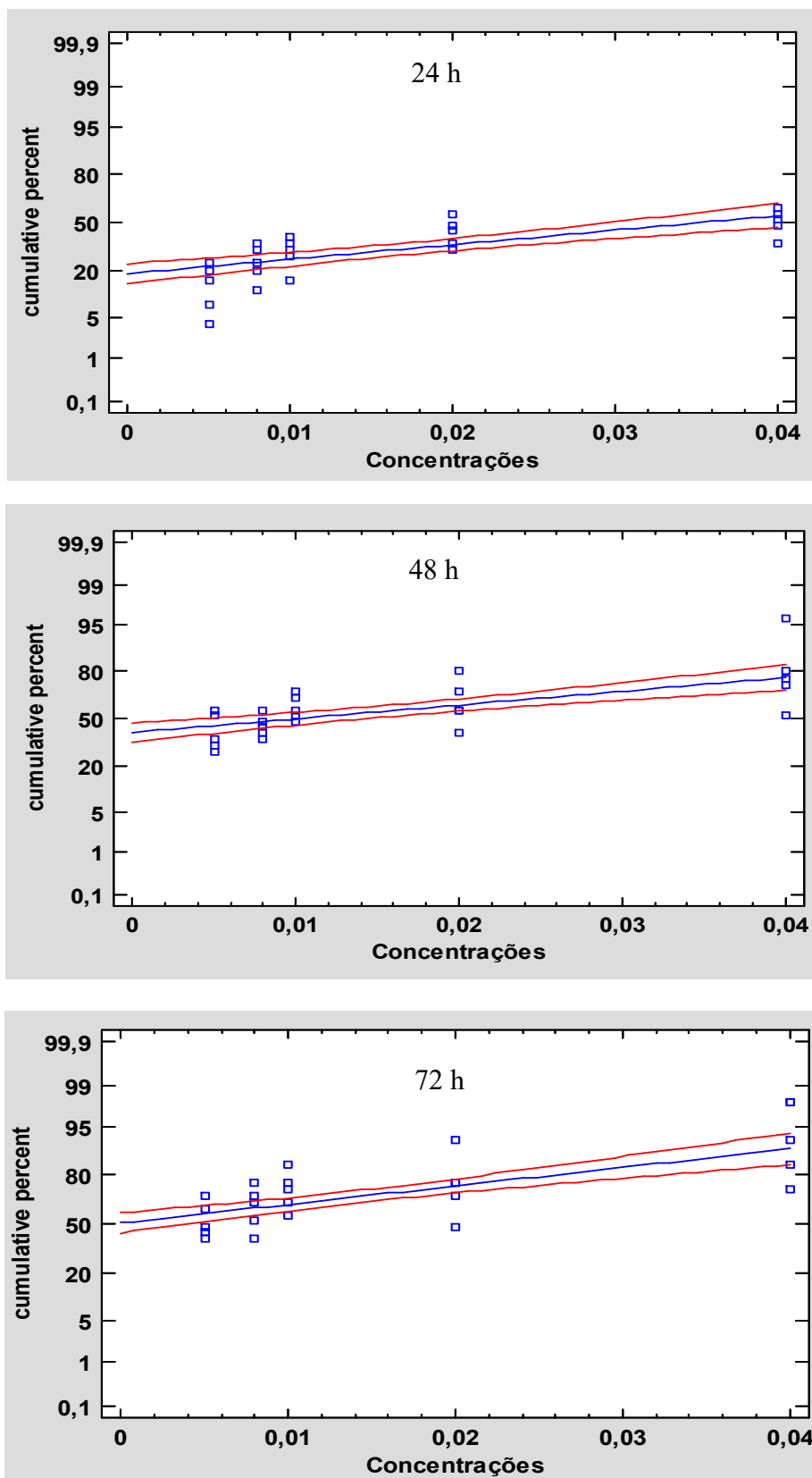
**Tabela 3.** Resultado da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do produto comercial VectoBac®WG (*Bacillus thuringiensis israelensis*) pela análise de Probit, com 24, 48 e 72 horas de exposição.

| Exposição | CL <sub>50</sub> (ppm) | CL <sub>90</sub> (ppm) | CL inferior 95% | CI superior 95% | Qui-quadrado | p-valor |
|-----------|------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|--------------|---------|
| 24 h      | 0,035                  | 0,086                  | 0,029           | 0,045           | 38,06        | 0,00    |
| 48 h      | 0,010                  | 0,063                  | 0,004           | 0,014           | 34,17        | 0,00    |
| 72 h      | -0,0005                | 0,040                  | -0,0082         | 0,0040          | 46,41        | 0,00    |

Fonte: Autor, 2023.



**Gráfico 1.** Gráficos da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) do produto comercial VectoBac®WG após 24, 48 e 72 horas de exposição.



A linha azul representa a CL<sub>50</sub> calculada e as linhas vermelhas representam a variação da CL<sub>50</sub>, podendo variar em concentrações mais altas (linha superior) ou mais baixa (linha inferior).

**Fonte:** Autor, 2024.

Comparando ao trabalho de Ayala e Badajoz (2018), estes encontraram concentração letal média (CL<sub>50</sub>), após 24h e 48h de exposição, para o formulado Vectobac®WG, médias de 0,1175 e 0,0721 mg/L, respectivamente, sobre larvas de *C. quinquefasciatus* e 0,1414 e 0,1052 mg/L, respectivamente, sobre larvas de *C. calligraphus*. Zequi, Lopes e Santos (2011) encontraram concentração letal média (CL<sub>50</sub>) para o formulado Vectobac®WG sobre larvas de *A. aegypti* de 0,10mg/L. Já Tadei e Araújo (2022) obtiveram diferentes concentrações letais média (CL<sub>50</sub>) para os diferentes bioensaios com Vectobac®WG, sobre larvas de *A. aegypti*, com variação de temperatura e níveis de gás carbônico. Nas condições da Sala 1, após 24 e 48h de exposição a CL<sub>50</sub> foi de 0,09mg/L, para Sala 3 e 4 foi de 0,02mg/L. E a CL<sub>90</sub> após 24 e 48h para a Sala 1 foi de 0,53mg/L.

#### **Efeito letal de BR101 (*Bacillus thuringiensis israelensis*) sobre larvas de *Aedes spp.***

Os dados dos bioensaios com o produto BR101 não seguiram uma distribuição de normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Portanto foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, onde o p-valor foi de 0,004, apontando que existe uma diferença significativa entre as cinco diferentes concentrações e a testemunha.

Assim, ao analisarmos a tabela 4, podemos inferir que os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 não diferem estatisticamente entre si, apresentando todos, 100% de mortalidade após 24h de avaliação. Ao mesmo tempo, ao compararmos as cinco concentrações com a testemunha, pode-se notar que houve diferença estatística entre elas. A testemunha não apresentou mortalidade após 24, 48 e 72h de avaliação.

**Tabela 4.** Resultados de mortalidade de larvas de terceiro *instar* de *Aedes spp.* com produto formulado (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelenses* BR101) em condições de laboratório.

| Tratamentos | Concentrações    | % de            | % de            | % de            | p-valor |
|-------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
|             |                  | Mortalidade 24h | Mortalidade 48h | Mortalidade 72h |         |
| T1          | 0,00001 mg/L     | 100% <b>b</b>   | -               | -               | 0,004   |
| T2          | 0,00005 mg/L     | 100% <b>b</b>   | -               | -               |         |
| T3          | 0,0001 mg/L      | 100% <b>b</b>   | -               | -               |         |
| T4          | 0,0005 mg/L      | 100% <b>b</b>   | -               | -               |         |
| T5          | 0,001 mg/L       | 100% <b>b</b>   | -               | -               |         |
| Testemunha  | H <sub>2</sub> O | 0% <b>a</b>     | 0% <b>a</b>     | 0% <b>a</b>     |         |

Os resultados não seguiram a normalidade (Shapiro-Wilk – p > 0,05). As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis (p > 0,05).

**Fonte:** Autor, 2024.

Em estudo realizado por Bocaleti (2020), comparando diferentes produtos de Bti em situação de campo, ao testar os formulados BR101 – C, a uma concentração de

50mg/L, obteve uma taxa média de mortalidade de 82,6 %, taxa essa comparável à mortalidade apresentada por formulados comerciais como VectoBac®WG à 0,003g/L, que apresentou porcentagem média de mortalidade de 91,5 %.

Já Lopes et al. (2010), aplicando as diferentes concentrações 0,50mg/L; 0,30mg/L; 0,23mg/L; 0,17mg/L; 0,10mg/L e 0,06mg/L do formulado BR101 sobre larvas de *A. aegypti* determinou a CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> com valores de 0,332 (± 0,042) e 0,694 (± 0,03) respectivamente, determinando a efetividade do formulado que vem sendo desenvolvido, não somente com *A. aegypti*, mas com *C. quinquefasciatus*, também avaliado quanto à mortalidade, quando exposto ao formulado BR101, tendo apresentado CL<sub>50</sub> 0,271 (± 0,39) e CL<sub>95</sub> 0,634 (±0,099).

Tais estudos, corroboram com o presente trabalho, uma vez que o mesmo também apresentou alta taxa de mortalidade para *Aedes spp.*, mesmo em concentrações menores do que aquelas recomendadas para a efetividade do formulado. Contudo, é importante salientar a importância de se realizar novos estudos com menores concentrações visando determinar a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> deste novo formulado.

### **Efeito Letal de Fração Hexânica de *Ricinus communis* a 10% sobre larvas de *Aedes spp.***

Os dados dos bioensaios com o extrato hexânico a 10% não seguiram distribuição de normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Portanto foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, onde o p-valor foi de 0,021, apontando diferença significativa entre concentração testada e as testemunhas.

Assim, analisando a tabela 5, podemos inferir que o tratamento T1 possui uma diferença significativa tanto da testemunha água quanto da testemunha álcool, apresentando taxa de mortalidade de 100% já nas primeiras 24h de exposição. Ao observarmos a testemunha água e álcool, verifica-se que estas não divergiram de modo significativo, e apresentam taxa de mortalidade zero, às 24, 48 e 72h de avaliação, estando exemplificado na Tabela 5 e Gráfico 2.

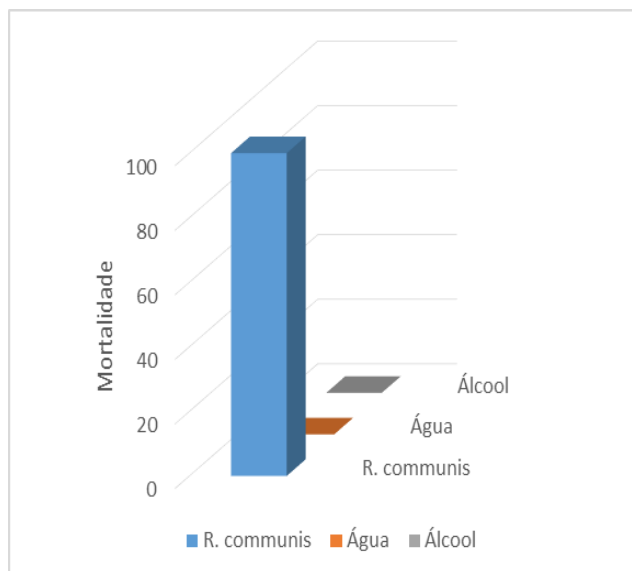
**Tabela 4.** Resultados de mortalidade de larvas de terceiro instar de *Aedes spp.* com Fração Hexânica de *Ricinus communis* a 10% em condições de laboratório.

| Tratamentos | Concentrações    | % de Mortalidade 24h | % de Mortalidade 48h | % de Mortalidade 72h | p-valor |
|-------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------|
| T1          | 500 mg/L         | 100% b               | -                    | -                    | 0,021   |
| Testemunha  | Álcool           | 0% a                 | 0% a                 | 0% a                 |         |
| Testemunha  | H <sub>2</sub> O | 0% a                 | 0% a                 | 0% a                 |         |

Os resultados não seguiram a normalidade (Shapiro-Wilk – p > 0,05). As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis (p > 0,05).

Fonte: Autor, 2024.

**Gráfico 2.** Mortalidade de extrato hexânico a 10% de *Ricinus communis* sobre larvas de *Aedes spp.*, e testemunhas água e álcool.



Fonte: Autor, 2024.

Os resultados deste trabalho assemelham-se com os apresentados em estudo realizado por Lima et al. (2019), que testaram a eficácia do extrato aquoso de *Ricinus communis* (folhas e caule) em diferentes diluições sobre larvas de terceiro ínstar de *Aedes spp.* em laboratório. As diluições v/v (extrato/água) 40:10, 20:30 e 10:40 apresentaram 100% de mortalidade larval decorridos 72h.

Os efeitos obtidos nas análises de Neves et al. (2014), também estão em consonância com o presente trabalho, uma vez que analisaram extrato aquoso de folhas e de frutos de *R. communis* sobre larvas de *A. aegypti*, apresentando uma taxa de 100% de mortalidade decorridos 72h de avaliação.

Assim, podemos inferir que há suscetibilidade das larvas de *Aedes spp.* aos extratos de *R. communis*. Entretanto, os trabalhos supracitados diferem parcialmente deste estudo, uma vez que utilizamos o fracionamento hexânico para extrair diferentes compostos do extrato de *R. communis*.

O hexano é capaz de extrair diferentes substâncias dos extratos vegetais, como lignoides, alcaloides e terpenos que são metabólitos secundários pontualmente envolvidos na ação inseticida e defesa vegetal por sua alta toxicidade (Barbosa et al., 2013).

Um dos alcaloides comumente extraídos pelo hexano da *R. communis* é a Ricina (alcaloide), considerada uma potente citotoxina que inibe a síntese proteica ribossomal, e normalmente encontrada no endosperma da semente da mamona, uma vez que ali é

sintetizada, possuindo enorme efeito letal em diferentes espécies de insetos (Rondelli, 2010), bem como variados efeitos subletais, que incluem inibição de desenvolvimento fisiológico, retardamento no crescimento larval e decréscimo do peso das pupas (Pessoa et al., 2014; Lima et al., 2011).

Diante desse viés, é possível afirmar que o extrato hexânico de *R. communis* na concentração de 500 mg/L possui alta efetividade larvicida sobre *A. aegypti*. Com uma taxa de mortalidade comparável à produtos comerciais e a novos formulados contendo *B. thuringiensis israelensis*.

## CONCLUSÃO

Diante do aumento preocupante no número de casos de arboviroses e a seleção de espécimes vetoriais resistentes, decorrente do uso de substâncias químicas de origem sintética, há a necessidade do desenvolvimento de técnicas de baixo impacto ambiental para o controle dos vetores dessas arboviroses, principalmente com o emprego de controle biológico e compostos naturais. Nesse viés, o formulado bacteriano Vectobac®WG, tem sido uma alternativa adotada como padrão no controle de *Aedes spp.*, por demonstrar alta efetividade na letalidade contra esse vetor.

Diante do contexto da necessidade de novas alternativas aos biocidas sintéticos, o formulado em pó em desenvolvimento pela parceria da UEL e da UFPR se mostrou eficaz no controle larval de *Aedes spp.* em condições de laboratório, mesmo em dissoluções menores do que o recomendado. Apresentando efetividade comparável ao VectoBac®WG. Esse resultado é importante na confirmação da efetividade desse novo formulado bacteriano à base de cristais proteicos.

Em concomitância, o composto natural extrato hexânico de *R. communis* também apresentou alta efetividade no controle larval de *Aedes spp.* condicionados em laboratório. E isso representa um importante resultado na confirmação da efetividade de compostos naturais derivados de *R. communis*, com potencial biocida para *Aedes spp.* que é o vetor de diferentes arboviroses de importância em saúde pública em território brasileiro. Contudo, vale salientar a necessidade novos testes visando compreender o alcance real dessa letalidade sobre esse vetor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, R. A. et al. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaiferareticulada Ducke* (Leguminosae). **Rev Patol Trop** v. 36, p. 75-86, 2007.
- ALVES, S. B. (1998). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, FEALQ.
- ANJOLETTE, A. F. F; MACORIS, M. L. G. **Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório**. v. 13, p. 19-29, 2016.
- ANNIES, V. **Desenvolvimento de metodologias de controle do *Aedes aegypti* baseadas em compostos de baixa toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2017.
- ARGÔLO-FILHO, R. C., & LOGUERCIO, L. L. (2014). *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. **Insects**, 5(1), 62-91. <https://doi.org/10.3390/insects5010062>. (Acesso em Janeiro de 2024).
- AYALA, Y. C.; BADAJOZ, C. E. C. **Mortalidad generada por un preparado comercial de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say 1823 y *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905. (Insecta: Diptera), Ayacucho 2015**. Tese de Doutorado. Universidade Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, 2018.
- AYRES, M. 2007. **Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, Belém
- BARDACH, A. et al. 2019. Interventions for the control of *Aedes aegypti* in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine International Health**. 24 (5), Pp. 530-552. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tmi.13217>. (Acesso em dezembro de 2023).
- BEN-DOV, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. **Toxins**, 6(4), 1222-1243. [https://www.researchgate.net/publication/261256186\\_Bacillus\\_thuringiensis\\_subsp\\_israelensis\\_and\\_Its\\_Dipteran-Specific\\_Toxins](https://www.researchgate.net/publication/261256186_Bacillus_thuringiensis_subsp_israelensis_and_Its_Dipteran-Specific_Toxins). (Acesso em fevereiro de 2024).
- BLACK, W. C. et al. 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**. 33(4):379–88. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234528>. (Acesso em outubro de 2023).
- BOCALETI, A. Da S. 2020. **Novos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para controle de *Culicidae* (diptera)**. Dissertação (Mestrado) - programa de Pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR).

- BOYCE, R. et al. 2013. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine International Health**. 18 (5), Pp. 564-577.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tmi.12087>. (Acesso em janeiro de 2024).
- BARBOSA, A.P.M. Estudo fitoquímico do extrato hexânico dos frutos de *Piper permucronatum* (Piperaceae). In: **Congresso Nacional de Botânica**. 64., 2013, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 2013.
- BRAGA, I. A. & VALLE, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde: **Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, vol. 6, no. 4, Pp. 279-293.  
<http://dx.doi.org/10.5123/S1679-4974200700040000>. (Acesso em março de 2024).
- BRASIL. Brasília: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. 2020. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas. Pp. 1-7. **Boletim Epidemiológico**, no. 10.  
<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/06/Boletim-epidemiologico-SVS-10.pdf>. (Acesso em dezembro de 2024).
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 37 de 2022. Semanas Epidemiológicas 01 a 37. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 53, n. 36, p.1-16, set. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **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. Brasília: Ministério da Saúde, 1º ed., p. 1-13, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil - LIRAA**: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor**: manual de normas técnicas. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 2001.
- BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M. (2005). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science** (pp. 175-206). Elsevier BV, Amsterdam.
- BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S & SOBERÓN, M. (2003). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41 (7), 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>. (Acesso em abril de 2024).



- BUSATO, M. A. et al. Larvicidal effects of supercritical extract of *Melia azedarach* and *Bacillus thuringiensis* var. israelensis product on late instar of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Rev. Colomb. Entomol.**, Bogotá, v. 44, n. 1, p. 39-43, 2018.
- CARVALHO, F. D.; MOREIRA L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species? **Neotrop Entomol.** 2017. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0520-4>. (Acesso em Agosto de 2023).
- CHRISTOPHERS, R. S. (1960) *Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito. Cambridge: **Cambridge University Press**. [https://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers\\_1960.pf](https://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers_1960.pf). (Acesso em Janeiro de 2024).
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5. <http://books.scielo.org/>. (Acesso em julho de 2023).
- COSTA, J. G. M. et al. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, Pp. 304-309. <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/rHBmZkTRYK6TgQKRqf78vCx/abstract/?lang=pt>. (Acesso em setembro de 2023).
- CRICKMORE, N. et al. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** (1998) Vol 62: 807-813. <https://www.btnomenclature.info/>. (Acesso em novembro de 2023).
- CRICKMORE, N., BERRY, C., PANEERSELVAM, S., MISHRA, R., CONNOR, T. R., AND BONNING, B. C. (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>. (Acesso em abril, 2024).
- DAMGAARD, P. H. (2000). Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application** (pp. 23-40). Springer, Dordrecht.
- DELÉCLUSE, A., JUÁREZ-PÉREZ, V., & BERRY, C. (2000). Vector-active toxins: structure and diversity. In **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application** (pp. 101-125). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7_6). (Acesso em novembro de 2023).
- DENG, C., PENG, Q., SONG, F., & LERECLUS, D. (2014). Regulation of cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, 6(7), 2194-2209. <https://doi.org/10.3390/toxins6072194>. (Acesso em outubro de 2023).
- DEPOLI, P.A.; ZEQUI, J.A.C.; NASCIMENTO, K.L.C.; LOPES, J. Eficácia de Ovitampas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*. **Entomobrasilis**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.51-55, 29 abr. 2016.

- FERNÁNDEZ-CHAPA, D., RAMÍREZ-VILLALOBOS, J., & GALÁN-WONG, L. (2019). Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. *Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85756>. (Acesso em fevereiro de 2024).
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp. 453-492. 1962.
- FORATTINI, O. P. & MARQUES, G. R. A. M. M. 2000. Nota sobre o encontro de *Aedes aegypti* em bromélias. **Revista Saúde Pública**. 34(5):543–44. <https://www.scielo.br/j/rsp/a/3699yB6YRGLsMPxFzXKGPS/>. (Acesso em junho de 2023).
- FORATTINI, O. P. 2002. **Culicidologia Médica**, vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo. <https://www.edusp.com.br/livros/culicidologia-medica-2/>. (Acesso em agosto de 2023).
- FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3th ed. Cambridge University Press, London. 25P., 1971.
- FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Dengue, instruções para pessoal de combate ao vetor**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- GALZER, E. C. W., & AZEVEDO FILHO, W. S. (2016). Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, 1(1), 13-16.
- GOIS, A. W. V.; ROCHA, A. M. Potencialização de armadilhas de *Aedes aegypti* a partir de glicerina bruta residual. In: **Congresso virtual UFBA 2021**, TV UFBA, Salvador, 22 fev. 2021. <https://youtu.be/kVMwwcz50KM>. (Acesso em setembro de 2022).
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 11, No. 3. 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.480>. (Acesso março de 2024).
- HITIPEUW et al. (2023) Efikasi Larvasida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Terhadap Larva *Aedes*, *Anopheles*, dan *Culex*. **Journal of public health research and development**. Vol 7 No 2 (2023): HIGEIA: April 2023. <https://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/higeia/article/view/66286>. (Acesso em setembro de 2023).
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - IRAC. 2019. Mode of Action Classification Scheme. **Insecticide Resistance Action Committee (IRAC)**, United States of América (USA). Pp.1-30. <https://irac-online.org/modes-of-action/> (Acesso em Maio de 2021).
- IOC – INSTITUTO OSWALDO CRUZ. *Aedes aegypti* – Introdução aos Aspectos Científicos do Vetor. **Anais eletrônicos** [...]. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2013. [http://157.86.113.53/?page\\_id=310](http://157.86.113.53/?page_id=310). (Acesso em setembro de 2022).

- IOC – INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Nota Técnica n. 3/2014/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA**. Fiocruz, [s.l.], versão 1, p. 1-16. 22 maio 2014.
- JEZUS, S. V. et al. **As estratégias para o controle do *Aedes aegypti* e a prevenção de Arboviroses**. Editora Oiticica, 1 ed, Mato Grosso do Sul: Sinop, 2020.
- JOHNSON, D. E., & MCGAUGHEY, W. H. (1996). Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. **Current microbiology**, 33(1), 54-59. <https://doi.org/10.1007/s002849900074>. (Acesso em Janeiro de 2024).
- KONECKA, E., BARANEK, J., HRYCAK, A., & KAZNOWSKI, A. (2012). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. **The Scientific World Journal**, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/710501>. (Acesso em março de 2024).
- LAND, M. et al. 2019. What are the effects of control of mosquitoes and other nematoceran Diptera using the microbial agent *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) on aquatic and terrestrial ecosystems? A systematic review protocol. **Environmental Evidence**. 8, 32. <https://doi.org/10.1186/s13750-019-0175-1>. (Acesso em março de 2023).
- LEANDRO, R. S. **Competição e dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: culicidae) em áreas de ocorrência no município de João Pessoa – PB**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2012.
- LIMA, A. F. N. Efeito larvicida do extrato da folha e caule de mamona (*Ricinus communis*) sobre o mosquito *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Health Review**. Curitiba, v. 2, n. 4, jul. /Aug. 2019. <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/download/51363/38533/128170>. (Acesso em março de 2024).
- LIMA, B.M.F.V; MOREIRA, J.O.T.; PINTO, H.C.S. Avaliação de Extratos Vegetais no Controle de Mosca Branca em Tomate. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 36-42, 2011.
- 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(10), 1561. <https://doi.org/10.3390/ijms17101561>. (Acesso em janeiro de 2024).
- LOBO, K. D. S. et al. (2018). Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Entomologia**, 62(1), 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.004>. (Acesso em fevereiro de 2024).
- LOPES, J., ARANTES, O. M. N. & CENCI, M. A. (2010). Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Brazilian Journal of Biology**.

<https://www.scielo.br/j/bjb/a/vRsFxzzHL4DGVjjSD38pG8B/>. (Acesso em janeiro de 2024).

LORENZ, C. et al. **O fantástico mundo dos mosquitos**. 1. ed. São Paulo: Livronovo, 2018.

MADEIRA, N. G., C. A. MACHARELLI, & L. R. CARVALHO. 2002. Variation of the oviposition preferences of *Aedes aegypti* in function of substratum and humidity. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97(April):415–20.

MARRONE, P. G. (2019). Pesticidal natural products—status and future potential. **Pest Management Science**, 75 (9), 2325-2340. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>. (Acesso em março de 2024).

MORAIS L. M. O. Morphological study of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs by X-ray computed microtomography. **Micron**. Volume 126, November 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102734>. (Acesso em janeiro de 2024).

MORISHITA, R. 2003. **Estudo das interações entre ovócitos e células foliculares no ovário da aranha marrom, Ixosceles intermedia**. Dissertação (Mestrado) - programa de Pós-graduação em biologia celular e molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR).

MYERS, P.S.; YOUSSTEN, A.A. Localization of a mosquito-larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 1205-1211, 1980.

NASCIMENTO, J. F. do. Influence of abiotic factors on the oviposition of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in Northern Paraná. **International Journal of Tropical Insect Science** (2022) 42:2215–2220. <https://doi.org/10.1007/s42690-022-00742-5>. (Acesso junho de 2023).

NELSON, M. J. 1986. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. **Organización Panamericana de la Salud**. Washington, DC.  
[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28513/PNSP8663\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28513/PNSP8663_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Acesso em junho de 2021).

NEVES, R. T. Efeito larvicida de *Ricinus communis* L. **Revista Eletrônica em Gestão Educação e Tecnologia Ambiental**. 8(1):127-131.  
[https://www.researchgate.net/publication/269929732\\_EFEITO\\_LARVICIDA\\_DE\\_RICINUS\\_COMMUNIS\\_L](https://www.researchgate.net/publication/269929732_EFEITO_LARVICIDA_DE_RICINUS_COMMUNIS_L). (Acesso em outubro de 2023).

OMS, 2005. **Diretrizes da Organização Mundial da Saúde para Testes Laboratoriais e de Campo de Larvicidas de Mosquitos**. Organização Mundial da Saúde, Genebra, 2005.

ONOFRE, J. et al (2020). The Cyt1Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* inserts into target membranes via different mechanisms in insects, red blood cells, and lipid liposomes. **Journal of Biological Chemistry**, 295(28), 9606-9617. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013869>. (Acesso em dezembro de 2023).

- PANTOJA-UCEDA, D. et al. 2003. Solution structure of RicC3, a S2 albumin storage protein from *Ricinus communis*. **Biochemistry**, v.42, Pp.13839-13847, 2003. [https://www.researchgate.net/publication/8992695\\_Solution\\_Structure\\_of\\_RicC3\\_a\\_2S\\_Albumin\\_Storage\\_Protein\\_from\\_Ricinus\\_communis](https://www.researchgate.net/publication/8992695_Solution_Structure_of_RicC3_a_2S_Albumin_Storage_Protein_from_Ricinus_communis). (Acesso em outubro de 2023).
- PESSOA, A.S.; LOZANO, E.R.; VILANI, A.; POTRICH, M.; MATOS, L.L.; OLIVEIRA, T.M.; PESSOA, G.M. **Bacillus thuringiensis Berliner e Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Erebidae) sob ação de extratos vegetais**. Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, v.81, n.4, p. 329-334, 2014.
- PINTO, A. C. S. et al. 2012. Adulticidal activity of dillapiol and semi-synthetic derivatives of dillapiol against *Aedes aegypti* (L.) (Culicidae). **Journal of Mosquito Research**, v. 2, n. 1, Pp. 1-7. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/66194/1/389-1457-3-PB.pdf> (Acesso em junho de 2021).
- POLANCZYK, R. A. & ALVES, S. (2003). **Bacillus thuringiensis**: Uma breve revisão. *Agrociencia* Uruguay, 7(2), 1-10. [https://www.researchgate.net/publication/291896406\\_Bacillus\\_thuringiensis\\_Uma\\_breve\\_revisao](https://www.researchgate.net/publication/291896406_Bacillus_thuringiensis_Uma_breve_revisao). (Acesso em abril de 2024).
- POLHEMUS, N.W. **STATGRAPHICS Centurion**. Virginia, 1980.
- POWELL J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2013. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>. (Acesso Agosto de 2023).
- RAYMOND, B. (2017). The biology, ecology and taxonomy of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. In **Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus** (pp. 19-39). Springer, Cham. [https://www.researchgate.net/publication/318152816\\_The\\_Biology\\_Ecology\\_and\\_Taxonomy\\_of\\_Bacillus\\_thuringiensis\\_and\\_Related\\_Bacteria](https://www.researchgate.net/publication/318152816_The_Biology_Ecology_and_Taxonomy_of_Bacillus_thuringiensis_and_Related_Bacteria). (Acesso em março de 2024).
- REYAZ, A. L., GUNAPRIYA, L., & ARULSELVI, P. I. (2017). Molecular characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Kashmir valley. **Biotech**, 7(2), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0756-z>. (Acesso em março de 2024).
- RODRIGUES, J. M. E. 2005. **Preparação de Poliuretana a base de óleo de Mamona**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN. <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/15883>. (Acesso em julho de 2023).
- RONDELLI, V. **Desempenho do fungo Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. e do óleo de mamona para o controle de Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

- SARAIVA, J.F. ET AL (2019). First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the state of Amapá, northern Brazil. **Acta Amazonica**, 49 (1), 71-74. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201802771>. (Acesso em maio de 2024).
- SARASWATHY, N., & KUMAR, P. A. (2004). Protein engineering of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, 7(2), 178-188.
- SANCHIS, V. (2011). From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. **A review. Agronomy for sustainable development**, 31(1), 217-231. <https://doi.org/10.1051/agro/2010027>. (Acesso em março de 2024).
- SANTOS, S. C. dos; ROCHA, A. M. Análise dos domínios biotecnológicos empregados em patentes para combate ao mosquito *Aedes aegypti*, sob enfoque patentário. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 20-26, jan. -abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v17i1.22358>. (Acesso em setembro 2022).
- SANTOS, M. A. V. de M. ***Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da Região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007**. 2008. 220p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2008.
- SILVA et al. 2016. **Validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para determinação de compostos fenólicos e atividade biológica em coprodutos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.
- SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assstat Software, Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Afr. J. Agric. Res**, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11522.
- SILVA, I. G. et al. Metodologia de criação de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Rev. Goiana Med.**, 39: 23-26, 1994.
- SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; LIRA, K.S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical** 27:51-63, 1998.
- SILVA, W.R. et al. Oviposição de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) em ovitrampas com diferentes atrativos. In: 15º SICONBIOL - SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2017, Ribeirão Preto. **Anais do 15º Siconbiol**. Ribeirão Preto: Sociedade Entomológica do Brasil, 2017.
- SIMAS, N. K. et al. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**. v.27, n.1, Pp.46-49. <https://www.scielo.br/j/qn/a/XYFL4xFy4WshsMd93XyTTbz/?lang=pt>

- SOARES-DA-SILVA, J. et al. (2015). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 59(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.02.001>. (Acesso em abril de 2024).
- SOARES-DA-SILVA, J. et al. (2017). Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Acta Tropica**, 176, 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.006>. (Acesso em janeiro 2024).
- TADEI, W. P.; ARAÚJO, Y. C. Control of *Aedes (stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) acclimated at different temperatures and carbon gas levels using Israeli *Bacillus thuringiensis*, *Saccharopolyspora spinosa* and pyriproxyfen. **Studies In Health Sciences**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 155–170, 2022.
- TAUIL, P. L. 2002. Aspectos Críticos Do Controle Do Dengue No Brasil. **Cad. Saúde Pública** 18(3):867–71. <https://www.scielo.br/j/csp/a/c98RZLMkn9MqxBmHTZTSFD/?format=pdf&lang=pt>. (Acesso em julho de 2023).
- VACHON, V. et al. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**. 111(1), Pp. 1-12. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201112001358?via%3Dihub>. (Acesso em outubro de 2023).
- VAN FRANKENHUYZEN, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of invertebrate pathology**, 101(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>. (Acesso em setembro de 2023).
- VAN FRANKENHUYZEN, K. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, 114(1), 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>. (Acesso em dezembro de 2023).
- VIANA, J. L. et al. Larvicide activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. in simulated field condition/ Atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. em condição simulada de campo. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 43248–43264, 2021.
- WIESBROOK, M. 2004. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, v.17, Pp.1-8. <https://www.ideals.illinois.edu/bitstream/handle/2142/996/v17n604.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- ZARA, A. L. de S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, DF, v. 25, n. 2, p. 391-404, abr.-jun. 2016. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000200017>. (Acesso em setembro 2022).

- ZHONG, W., SHOU, Y., YOSHIDA, T. M., & MARRONE, B. L. (2007). Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using pulsed-field gel electrophoresis. **Applied and environmental microbiology**, 73(10), 3446-3449. <https://doi.org/10.1128/AEM.02478-06>. (Acesso em março de 2024).
- ZOGO, B. et al. (2019). Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Malaria journal**, 18(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2687-0>. (Acesso em outubro de 2023).
- ZEQUI, J.A.C.; LOPES, J.; SANTOS, F.P. Controle de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Culex (Culex) quinquefasciatus* Através de Formulados Contendo *Bacillus thuringiensis israelensis* em Temperaturas Controladas. **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 4, p.130-134, 2011.