



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'  
Campus de Botucatu**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA MICROBIOTA  
INTESTINAL CULTIVÁVEL DE MOSQUITOS *Aedes spp.***

**Mariana Cristina de Freitas Porto**

**BOTUCATU-SP**

**2021**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA MICROBIOTA  
INTESTINAL CULTIVÁVEL DE *Aedes spp.***

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, no Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia.

**Candidata: Mariana Cristina de Freitas Porto**  
**Orientador: Profº Dr. Jayme Augusto de Souza-Neto**

**BOTUCATU – SP**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Porto, Mariana Cristina de Freitas.

Avaliação da atividade larvicida da microbiota intestinal cultivável de mosquitos *Aedes spp.* / Mariana Cristina de Freitas Porto. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto  
Capes: 21303002

1. *Aedes*. 2. Controle de vetores. 3. Microbiota.  
4. Bactérias.

Palavras-chave: *Aedes*; Bactérias; Bioensaio larvicida;  
Controle vetorial; Microbiota.

**“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que você sabe.”**

**Aldous Huxley**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me permitir que essa jornada fosse cumprida.

À minha família, em especial minha mãe, pelo amor, apoio e incentivo. A eles dedico inteiramente este trabalho, que mesmo à distância, estiveram presentes em todos os momentos.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Jayme Augusto de Souza-Neto, da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP Botucatu, pela orientação, compreensão e confiança depositada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código financiamento 001, pela concessão de bolsa e financiamento do projeto.

Aos membros do Laboratório de Genômica Funcional e Microbiologia de Vetores (Vectomics), pelo companheirismo e ajuda nos momentos que precisei.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), ao Instituto de Biotecnologia de Botucatu, ao Laboratório Central Multiusuários (LACEM) da FCA/UNESP Botucatu, onde este trabalho foi desenvolvido.

Ao Programa e a coordenação de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu.

Aos funcionários da Pró-reitoria de Pós-graduação que sempre estiveram prontos a ajudar com eficiência e disposição.

À Secretaria de Saúde de Botucatu, pela parceria na realização de coletas.

## Resumo

Mosquitos são grandes responsáveis por sérios problemas de saúde pública no mundo e transmissores de diversas arboviroses. Até o momento, não existem vacinas ou medicamentos eficazes disponíveis contra essas arboviroses, dessa maneira, o controle vetorial ainda é a principal estratégia de intervenção para reduzir a disseminação dos principais arbovírus urbanos transmitidos pelos mosquitos do gênero *Aedes*. No entanto, a eliminação dos mosquitos tornou-se muito desafiadora no ambiente urbano moderno, onde a crescente ocorrência de resistência a inseticidas tornou o uso de tais compostos químicos cada vez menos eficazes. Neste contexto, o desenvolvimento de novos produtos é extremamente necessário. Recentemente, a microbiota intestinal do mosquito provou ser um ótimo recurso utilizando bactérias com atividades antivirais e entomopatogênicas. O objetivo deste trabalho foi identificar e analisar a atividade larvicida de bactérias cultiváveis isoladas da microbiota intestinal de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* coletados em Avaré e Botucatu/SP. As bactérias isoladas do intestino do mosquito foram purificadas em meios seletivos e foram realizadas extrações de DNA e a identificação foi realizada a partir da amplificação e sequenciamento do fragmento do rDNA 16S. Posteriormente, avaliou-se a ação larvicida das bactérias que foram identificadas e isoladas sobre larvas do segundo estágio de *Ae. aegypti* (Rockefeller), em condições de laboratório. Os bioensaios foram preparados com dez larvas, em triplicata, colocadas em placas de seis poços, contendo os pellets de cultura bacteriana resuspendida em 5ml de PBS 1X e o controle negativo contendo 5ml de PBS 1X. As suspensões bacterianas foram ajustadas para  $DO_{600} = 1.0$ . Os bioensaios foram mantidos no insetário à temperatura de 28°C, umidade relativa de  $80 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 horas. Os resultados do bioensaio larvicida foram registrados diariamente após a inoculação do meio bacteriano nos poços contendo as larvas por quatro dias. Foram identificadas 26 diferentes espécies de bactérias de 10 gêneros. Os gêneros *Bacillus* (30,76%) e *Chryseobacterium* (15,38%) apresentaram a maior porcentagem dos isolados obtidos. Nossas análises revelaram que três isolados bacterianos, *Bacillus sp.* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D12) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), apresentaram elevada atividade na mortalidade nas larvas de *Ae. aegypti* (Rockefeller), sendo 70%, 80% e 90% , respectivamente após 96 horas. Essas bactérias por apresentarem mais de 50% de mortalidade em 96 horas foram utilizadas em bioensaios para estimar as doses letais ( $DL_{50}$ ) contra larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti*. Considerando as avaliações nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas, verificou-se que o isolado *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) obteve maior toxicidade, para os quais foram obtidos os menores valores de  $DL_{50}$  nos quatro intervalos de leitura. Nossos resultados demonstram que o uso dessas bactérias podem ser uma alternativa viável no controle dos vetores futuramente.

**Palavras-chave:** controle vetorial; *Aedes*; microbiota; bactérias; bioensaio larvicida.

## Abstract

Mosquitoes are largely responsible for serious public health problems in the world and transmitters of several arboviruses. To date, there are no effective vaccines or drugs available against these arboviruses, thus, the vector control is still the main intervention strategy to reduce the spread of the main urban arboviruses transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. However, mosquito elimination has become very challenging in the modern urban environment, where the increasing occurrence of resistance to insecticides has made the use of such chemical compounds less and less effective. In this context, the development of new products is extremely necessary. Recently, the mosquito's intestinal microbiota proved to be a great resource using bacteria with antiviral and entomopathogenic activities. The objective of this work was to identify and analyze the larvicidal activity of cultivable bacteria isolated from the intestinal microbiota of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes collected in Avaré and Botucatu/SP. The bacteria isolated from the mosquito's intestine were purified in selective media and DNA extractions were performed. and identification was carried out by amplifying and sequencing the 16S rDNA fragment. Subsequently, the larvicidal action of the bacteria that were identified and isolated on larvae of the second stage of *Ae. aegypti* (Rockefeller), under laboratory conditions, placed in six-well plates, containing bacterial culture pellets resuspended in 5ml of 1X PBS and the negative control containing 5ml of 1X PBS. The bacterial suspensions were adjusted to  $OD_{600} = 1.0$ . The bioassays were maintained in the insectarium at a temperature of 28°C, a relative humidity of  $80 \pm 5\%$  and a photoperiod of 12 hours. The results of the larvicidal bioassay were recorded daily after inoculation of the bacterial medium in the wells containing the larvae for four days. 26 different species of bacteria from 10 genera were identified. 26 different species of bacteria from 10 genera were identified. The genera *Bacillus* (30.76%) and *Chryseobacterium* (15.38%) presented the highest percentage of the isolates obtained. Our analyzes revealed that three bacterial isolates, *Bacillus sp.* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D12) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), showed high activity in mortality in larvae of *Ae. aegypti* (Rockefeller), 70%, 80% and 90%, respectively. These bacteria, for having more than 50% mortality in 96 hours, were used in bioassays to estimate lethal concentrations ( $LD_{50}$ ) against second stage larvae of *Ae. aegypti*. Considering the evaluations in the intervals of 24, 48, 72 and 96 hours, it was found that the isolate *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) obtained greater toxicity, for which the lowest  $LD_{50}$  values were obtained in the four reading intervals. Our results demonstrate that the use of these bacteria may be a viable alternative to control vectors in the future.

**Keywords:** vector control; *Aedes*; microbiota; bacteria; larvicidal bioassay.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Anatomia do mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto dividindo em cabeça, tórax e abdômen. ....	14
<b>Figura 2:</b> Escamas dorsais do tórax em formato de lira dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . ....	15
<b>Figura 3:</b> Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Ae. aegypti</i> . ....	16
<b>Figura 4:</b> Larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> . ....	17
<b>Figura 5:</b> <i>Aedes albopictus</i> . ....	18
<b>Figura 6:</b> Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2019 e 2020* .....22	22
<b>Figura 7:</b> Distribuição geográfica dos casos de dengue relatados em todo o mundo, janeiro a dezembro de 2020. ....	23
<b>Figura 8:</b> Os efeitos de <i>Csp_P</i> na mortalidade larval também foram testados, colocando larvas de <i>An. gambiae</i> (G) e larvas de <i>Ae. aegypti</i> (H) de 2 a 4 dias de idade em água contendo <i>Csp_P</i> . Os efeitos de <i>Csp_P</i> na mortalidade larval também foram testados, colocando larvas de <i>An. gambiae</i> (G) e larvas de <i>Ae. aegypti</i> (H) de 2 a 4 dias de idade em água contendo <i>Csp_P</i> . ....	31
<b>Figura 9:</b> Localização dos locais de coleta, Municípios de Avaré e Botucatu no Estado de São Paulo. ....	32
<b>Figura 10:</b> Agentes de saúde da SUCEN coletando mosquitos manualmente. ....	33
<b>Figura 11:</b> A: Manutenção de mosquitos no insetário. B: Alimentação sanguínea das fêmeas adultas. C: Larvas em bacias com água. D: Gaiolas teladas com mosquitos. ....	35
<b>Figura 12:</b> Dissecção do Ovários, túbulos de Malpighi e intestinos médio e posterior do mosquito <i>Ae. aegypti</i> . A seta branca indica o intestino médio do mosquito. ....	36
<b>Figura 13:</b> Isolamento bacteriano por esgotamento de estrias cruzadas em Ágar BHI, Ágar LB e Ágar Sangue. ....	37
<b>Figura 14:</b> A: Incubadora do bioensaio Eletrolab. B: Placas contendo o bioensaio para ser armazenado. C: Placas contendo bioensaio com bactérias e controle negativo. ....	41
<b>Figura 15:</b> Gel de agarose (A e B) 1,0% para confirmação da extração do DNA genômico com amplificação do fragmento de 1500 pb do 16 S rRNA. M: marcador de peso molecular; 1: 1: A3-1; 2: 1A 4-2; 3: 1A 5-1; 4: 1B1-1; 5: 1B1-2; 6: 1B1-3; 7: 1B2-2; 8: 1C1-1; 9: 1C-3; 10: 5F3; 11: 4A 1; 12: 5B1; 13: 5D1; 14: 5D2; 15: 7A 1; 16: AV1; 17: AV2; 18: AV3. ....	46
<b>Figura 16:</b> Gel de agarose (C e D) 1,0% para confirmação da extração do DNA genômico com amplificação do fragmento de 1500 pb do 16S rRNA. M: marcador de peso molecular; 19: AV6; 20: 27D1 ; 21: 27D1-2; 22: 224H3B; 23: 224H; 24: POOL 4D; 25: R2-1; 26: R4-1 ....	47
<b>Figura 17:</b> Representação dos gêneros com base na identificação bacteriana. ....	48
<b>Figura 18:</b> Análise filogenética do sequenciamento da região do gene 16S rRNA do isolado bacteriano de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> . A linha horizontal refere-se à distância genética. Os números dos nós referem-se aos valores estimados de apoio com 1000 réplicas de bootstrap. ....	50
<b>Figura 19:</b> Gráfico de barras dos bioensaios dos diferentes isolados bacterianos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W) contra larvas de segundo estágio de <i>Ae. aegypti</i> durante quatro dias de incubação mostrando as médias e desvio padrão da taxa de mortalidade dos diferentes isolados bacterianos. A suspensão de PBS foi usada como controle negativo. ns: Não houve diferença significativa na mortalidade larval entre o isolado bacteriano e o controle. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre as mortalidades do grupo teste e do grupo controle ( $p < 0,05$ ). ....	64
<b>Figura 20:</b> Gráficos de barras dos bioensaios dos diferentes isolados bacterianos (A, B e C) contra larvas de segundo estágio de <i>Ae. aegypti</i> durante quatro dias de incubação mostrando as médias e desvio padrão da taxa de mortalidade dos diferentes isolados bacterianos. Suspensão de PBS foi usada como controle negativo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente	

significativas entre as mortalidades do grupo teste e do grupo controle ( $p < 0,05$ ). ..... 66

**Figura 21:** Representações gráficas em barras (A, B e C) dos valores de  $DL_{50}$  das bactérias *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) nas  $DO_{600}$  (0,5; 1,0; 2,0) contra larvas de 2º estágio de *Ae. aegypti*, nas leituras de 24, 48, 72 e 96 horas. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre as mortalidades do grupo teste e do grupo controle ( $p < 0,05$ ). ..... 71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Reação de PCR utilizando DNA extraído de culturas pura.....	39
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação da região 16S rDNA das estirpes bacterianas isoladas do intestino do mosquito <i>Ae. aegypti</i> . ....	39
<b>Tabela 3:</b> Dados da coleta de amostra de campo e laboratório. ....	43
<b>Tabela 4:</b> Identificação pelo método Gram das bactérias intestinais isoladas.....	45
<b>Tabela 5:</b> Identificação molecular dos isolados bacterianos, obtidos pelo sequenciamento Sanger da região 16S rDNA. ....	49
<b>Tabela 6:</b> Mortalidade média e desvio padrão nos intervalos 24, 48, 72 e 96 horas para os isolados <i>Bacillus cereus</i> (1C1-1), <i>Chryseobacterium cucumeris</i> (27D1-2) e <i>Chryseobacterium indologenes</i> (POOL 4D) em três concentrações (DO <sub>600</sub> =0,5; DO <sub>600</sub> =1,0 e DO <sub>600</sub> =2,0).....	68
<b>Tabela 7:</b> DL <sub>50</sub> nos intervalos 24, 48, 72 e 96 horas para os isolados <i>Bacillus cereus</i> (1C1-1), <i>Chryseobacterium cucumeris</i> (27D1-2) e <i>Chryseobacterium indologenes</i> (POOL 4D) em três concentrações (DO <sub>600</sub> =0,5; DO <sub>600</sub> =1,0 e DO <sub>600</sub> =2,0) .....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABI 3500 - Applied Biosystems  
*Ae. aegypti* - *Aedes aegypti*  
*Ae. albopictus* - *Aedes albopictus*  
*An. gambiae* - *Anopheles gambiae*  
ANOVA- Análise de variância  
ANVISA - Agência Nacional da Vigilância Sanitária  
BHI - Brain Heart Infusion  
BOD - Demanda Biológica do Oxigênio  
Bt- *Bacillus thuringiensis*  
*C. quinquefasciatus* - *Culex quinquefasciatus*  
CHIKV - Vírus Chikungunya  
CL<sub>50</sub> – Concentração Leal Mediana  
*cry*- Crystal (Proteínas Inseticidas de *Bacillus thuringiensis*)  
*Csp\_P* - *Chromobacterium sp.* Panamá  
DDT - Diclorodifeniltricloroetano  
DENV - Dengue Vírus  
DL- Dose Letal  
DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)  
DO - Densidade Óptica  
DP- Desvio Padrão  
E1 (E1-A226V) - Proteína do envelope viral de Chikungunya  
ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control  
EPM- Escola Paulista de Medicina  
*et al.* - e outros  
FCA- Faculdade de Ciências Agronômicas  
g - Gramas  
GBS- Síndrome de Guillain-Barré  
GMMs- Mosquitos Geneticamente Modificados  
h- Horas  
H<sub>2</sub>O- Água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>S- Ácido sulfídrico  
HCN- Cianeto de Hidrogênio  
IB- Índice de Breteau  
IBTEC- Instituto de Biotecnologia  
kb - Quilo base  
KDa- Kilo Dalton  
LACEM- Laboratório Central Multiusuários  
LB - Meio Luria-Bertani  
mL – Mililitro  
μl- Microlitro  
NCBI- THE National Center for Biotechnology Information  
O<sub>2</sub> - Gás oxigênio  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
OPAS- Organização Pan-Americana da Saúde  
pb - Pares de bases  
PBS - Salina tamponada com fosfatos

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)  
rDNA - Ácido Desoxirribonucléico ribossomal  
rpm- Rotação por minuto  
rRNA - Ácido Ribonucléico ribossomal  
SE- Semana Epidemiológica  
SIT - Sterile Insect Technique (Técnica de Esterilização de insetos)  
SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias  
T – Temperatura  
UFC- Unidade Formadora de Colônia  
UNESP - Universidade Estadual Paulista  
UR - Umidade Relativa  
v- Variável  
v/v- Volume/Volume  
XX- Vinte  
WHO - World Health Organization  
WNV - West Nilus virus  
YFV - Yellow Fever vírus (Vírus da Febre Amarela)  
ZIKV - Zika Vírus  
 $\mu$ l - Microlitros  
°C - Grau Celsius  
% - Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>13</b>
1.1	O mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	13
1.2	O mosquito <i>Aedes albopictus</i> .....	18
1.3	Arboviroses: Dengue, Zika, Chikungunya .....	19
1.4	Vacinas contra as arboviroses.....	25
1.5	Controle vetorial.....	26
1.6	Utilização de bactérias como potenciais estratégicos no controle vetorial .....	28
<b>2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>31</b>
2.1	Objetivo geral .....	31
2.2	Objetivos específicos.....	31
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>32</b>
3.1	Local, Coleta e Manutenção de mosquitos adultos de campo de Avaré e Botucatu/SP .....	32
3.2	Criação de mosquitos da linhagem Rockefeller .....	34
3.3	Dissecção dos intestinos-médios de mosquito adulto .....	35
3.4	Cultivo e Isolamento bacteriano .....	36
3.5	Identificação bacteriana pelo método Gram .....	38
3.6	Caracterização molecular .....	39
3.6.1	Extração do DNA genômico de bactérias.....	39
3.6.2	Amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA bacteriano.....	39
3.6.3	Purificação dos produtos da PCR do gene 16S rRNA bacteriano.....	40
3.6.4	Quantificação dos produtos de PCR do gene 16S rRNA bacteriano e Sequenciamento Sanger.....	40
3.7	Bioensaios.....	40
3.7.1	Bioensaios seletivos para larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	40
3.7.2	Bioensaio de dose letal (DL <sub>50</sub> ) contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> (Rockefeller).....	42
3.8	Análise de dados .....	42
<b>4</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>42</b>
4.1	Isolamentos bacterianos obtidos dos intestinos dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> coletados em Avaré e Botucatu/SP. ....	42
4.2	Teste de coloração GRAM .....	44
4.3	Amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA bacteriano.....	46
4.4	Identificação molecular das bactérias pelo sequenciamento Sanger .....	47
4.5	Bioensaio seletivo larvicida com as bactérias intestinais identificadas de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> . ....	50
4.6	Bioensaio de dose letal (DL <sub>50</sub> ) das bactérias intestinais selecionadas no bioensaio com larvas.....	66
<b>5</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Anexo 1:</b> .....	<b>94</b>

## 1 Introdução

### 1.1 O mosquito *Aedes aegypti*

A ocorrência do *Aedes aegypti* foi primeiramente descrita no Egito por Linnaeus, em 1762 (CHRISTOPHERS, 1960). Não se sabe ao certo como a espécie chegou à América, mas a principal teoria para sua disseminação preconiza sua vinda por embarcações de tráfico de escravos entre os séculos XVI e XIX, e conseqüentemente avançaram por todo território explorado (BENNETT et al., 2016). Esse mosquito é encontrado nas regiões dos trópicos e subtropicais e em praticamente todo o continente americano, assim como no Sudeste da Ásia e em toda a Índia (KRAMER et al., 2015).

Desde o século XX, o combate ao *Ae. aegypti* foi intensificado no Brasil, considerando como principal objetivo erradicar os casos de febre amarela urbana, que havia levado milhares de pessoas a óbito nesse período. O controle vetorial tinha como objetivo a eliminação mecânica de criadouros, mesmo que improvável a eliminação do vetor, tratavam-se os criadouros por meio de larvicidas e outros tipos de inseticidas também eram aplicados (COSTA et al., 2010).

Nos anos de 1958 e 1973, o *Ae. aegypti* foi erradicado do país (SOPER, 1965; NOBRE, ANTEZANA, TAUIL, 1994). Porém, sua eliminação não recobriu a totalidade do continente americano e o vetor permaneceu em áreas como Venezuela, sul dos Estados Unidos, Guianas e Suriname, além de toda a extensão insular que engloba Caribe e Cuba (FIOCRUZ, 2016).

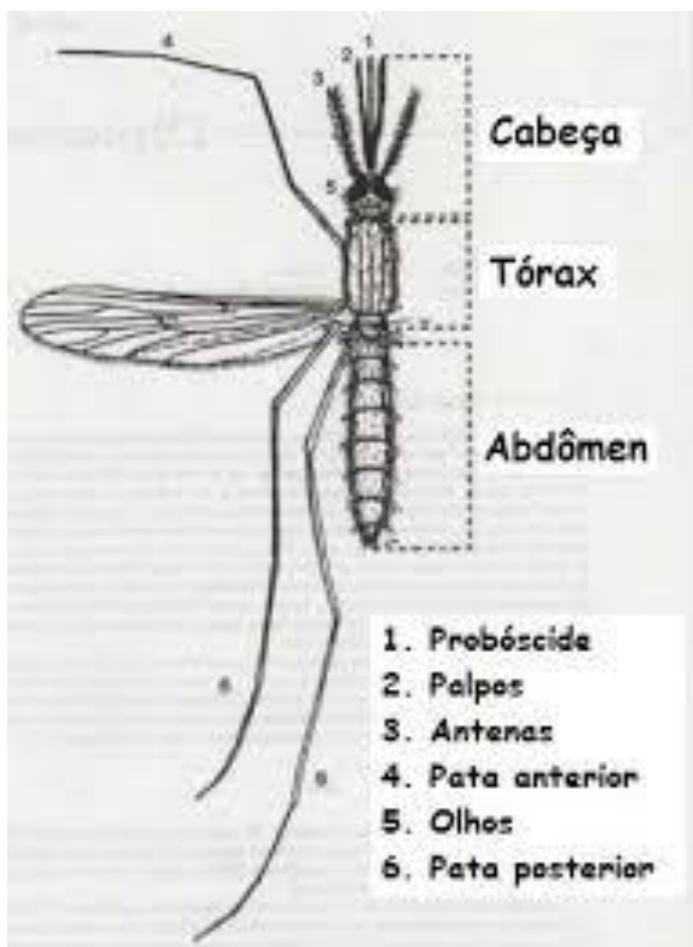
Desta forma, em 1976, vieram os primeiros registros da reintrodução do vetor no Brasil, acarretada por falhas na vigilância epidemiológica, pelo crescimento populacional acelerado e grande fluxo de pessoas vindas de outros países (TAUIL, 2001; MACIEL, JUNIOR, MARTELLI, 2008), além da grande resistência dos ovos do mosquito e pelo relaxamento das medidas de controle após a erradicação do *Ae. aegypti*. Desde 1976, o *Ae. aegypti* se encontra atualmente em todos os estados do Brasil e até hoje não se conseguiu erradicá-lo novamente (FIOCRUZ, 2016).

O mosquito *Ae. aegypti* é principal vetor responsável pela transmissão de diversas arboviroses (doenças virais transmitidas por artrópodes) de grande importância para saúde pública, como dengue, Zika, febre amarela urbana, chikungunya, febre do mayaro, entre outras.

Este inseto pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (SILVA; SILVA, 1999). Esse vetor sofreu diversas adaptações que o permitiram se estabilizar nos centros urbanos e, assim, espalhar-se por diversos ambientes (DYE, 1992). A fêmea do mosquito *Ae. aegypti* consegue

fazer ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, sendo um vetor eficiente, além de ampliar a sua capacidade de se infectar e de transmitir os vírus (SCOTT et al., 1993).

O mosquito *Ae. aegypti*, em sua fase adulta, tem o seu corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen (Figura 1), sendo a divisão mais evidente do que em sua fase larval. Na cabeça ficam situados seus olhos, antenas e palpos, que são os órgãos do sentido. No tórax, ficam situados os apêndices para locomoção, asas e patas. Seu abdômen, dividido em 10 segmentos, são característicos para sua reprodução e excreção (RUEDA, 2008).

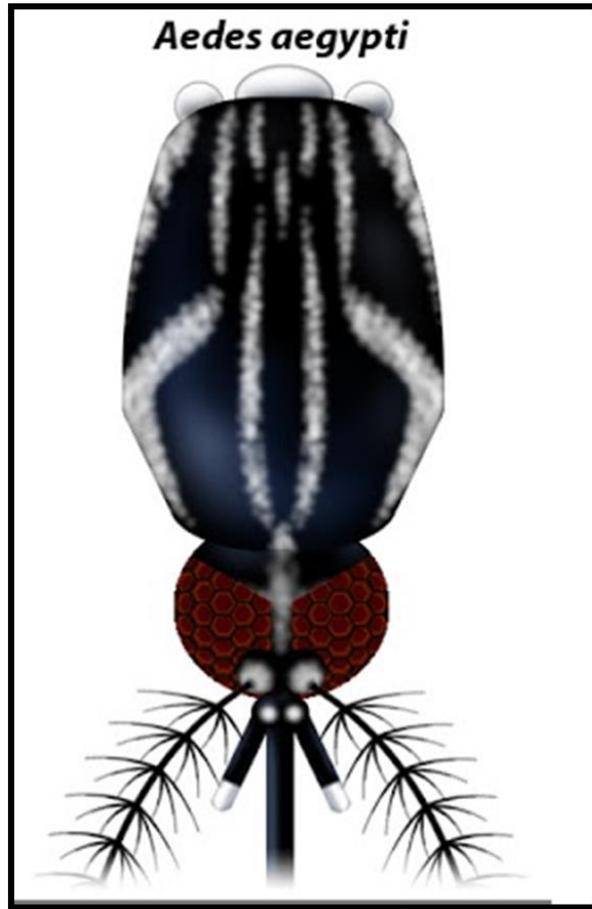


**Figura 1:** Anatomia do mosquito *Aedes aegypti* adulto dividindo em cabeça, tórax e abdômen.

Fonte: <http://deolhonoaedesaeegypti.blogspot.com/p/mitos-e-verdades.html>

Em relação ao gênero *Aedes*, diversos mosquitos possuem em seu corpo uma coloração preta, com listras e manchas brancas (TAVEIRA et al., 2001). Particularmente, *Ae. aegypti* é identificado através do dorso de seu tórax ornamentado com escamas branco-prateadas,

estabelecendo um desenho em forma de lira (MARCONDES, 2001) (Figura 2).

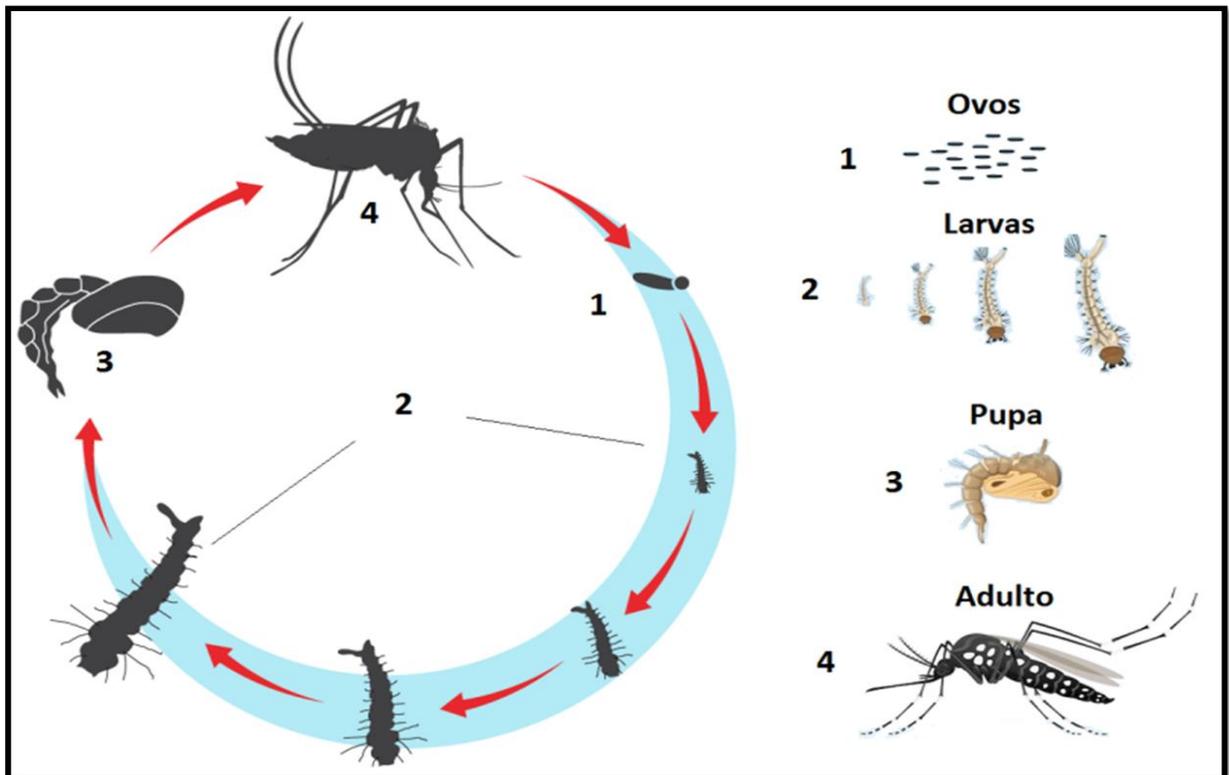


**Figura 2:** Escamas dorsais do tórax em formato de lira dos mosquitos *Ae. aegypti*.

Fonte: Planeta Invertebrados Brasil

O mosquito *Ae. aegypti* possui um desenvolvimento holometábolo, com o ciclo de vida composto por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adultos (Figura 3). Os ovos do vetor são muito resistentes e podem permanecer por até um ano em locais secos, sendo capazes de eclodir rapidamente quando imersos em água (MEBRAHTU et al., 1997).

As larvas são de vida aquática e possuem quatro estádios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4) que duram cerca de 7 a 10 dias em ambiente natural (FORATTINI, 2002). Posteriormente, as larvas se transformam em pupa, que corresponde ao período mais curto do ciclo do mosquito, com duração de apenas dois dias. Nesta fase elas não se alimentam, porém sua respiração e movimentação continuam ativas, e após o período de dois dias, ocorre a emersão do mosquito adulto (SILVA et al., 2018).



**Figura 3:** Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*.

Fonte: Ciclo de vida do mosquito-da-dengue (*Ae. aegypti*). Modificado de <https://www.tuasaude.com/> (Acesso em 13/08/19)

As larvas mesmo sendo aquáticas, precisam chegar até à superfície da água, pois necessitam do oxigênio do ar para respirar (Figura 4). Sua respiração acontece por meio de um sifão (FUNASA, 2001). A fase aquática é influenciada diretamente pela qualidade da água dos reservatórios (BESERRA, 2010). As larvas possuem fotofobia e são sensíveis a movimentos bruscos na água, deslocando-se rapidamente na direção ao fundo do recipiente e geralmente ficam perpendiculares ao nível da água (CONSOLI e OLIVEIRA, 1998). As larvas são divididas em cabeça, tórax e abdômen. O abdômen da larva é composto por oito segmentos, sendo que o último segmento apresenta quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão respiratório (FUNASA, 2011). A duração da fase larvária assim como seu desenvolvimento podem ser favorecidos por diversas substâncias e passam por diversas interferências, como por exemplo, luz, salinidade, temperatura, matéria orgânica, presença de micro-organismos, movimento da água, entre outros (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; BESERRA, 2010).



**Figura 4:** Larvas do mosquito *Ae. aegypti*.

Fonte: Paulo Whitaker/Reuters

O mosquito *Ae. aegypti* é um inseto que possui atributos como voos rápidos, escapes durante o repasto sanguíneo a qualquer movimento do hospedeiro e a alternância entre hospedeiros (NEVES, 2009). Ao final da metamorfose, um mosquito adulto e alado emerge já conseguindo instantaneamente voar e se reproduzir. São insetos adultos de hábitos diurnos, possuem hábitos alimentares diferentes de acordo com o sexo, sendo que somente a fêmea se alimenta com sangue, elemento fundamental para a produção de ovos (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Neste sentido, somente a fêmea adulta tem a capacidade de transmitir os arbovírus para humanos através de sua picada durante a alimentação sanguínea, quando o mosquito se alimenta do sangue de uma pessoa infectada (FIOCRUZ, 2016).

## 1.2 O mosquito *Aedes albopictus*

O mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) 1984, conhecido como “Tigre Asiático”, pertence ao grupo Scutellaris do subgênero *Stegomyia* (Figura 5). É considerada a segunda espécie de Culicidae em importância para o homem, sendo superado apenas pelo *Ae. aegypti* (Linnaeus)1762 (KNUDSEN, 1995).

Considerado como vetor secundário do vírus do dengue, o mosquito *Ae. albopictus*, apresenta características morfológicas similares e a mesma competência do *Ae. aegypti* para se proliferar, assim sendo a causa de preocupação em países do continente asiático, onde é responsável por alguns surtos da doença (FIOCRUZ, 2008).

*Ae. albopictus* possui hábitos diurnos, sendo nos períodos matutino e vespertino, o seu pico de atividade hematofágica (FORATTINI, 2002). A espécie tem uma capacidade ecológica com alta amplitude, sendo considerada como silvestre, eclética e oportunista em relação ao seu hábito hematofágico (BORGES, 2001). Dificilmente entra nas casas, não apresentando antropofilia acentuada como ocorre com *Ae. aegypti* (TAUIL, 2001; GOMES et al., 2005).



**Figura 5:** *Aedes albopictus*.

Fonte: Veja Saúde

Por ser um mosquito de espécie invasora, *Ae. albopictus* tem elevada capacidade de dispersão e adaptação, sendo assim habil para atingir diversos locais. Possui o hábito de

alimentar de sangue dos mamíferos, além de estudos nas Américas revelarem que a espécie pode também atuar como vetor da febre amarela e dengue (SHROYER, 1986; ALI & NAYAR, 1997; BORGES, 2001; FORATTINI, 2002; GRATZ, 2004; ALENCAR et al., 2008). Sua capacidade vetorial está sendo bastante estudada devido ao seu habitat silvestre, o qual pode determinar um elo entre o ciclo de arbovírus em mamíferos e no homem (ALENCAR et al., 2008; BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

O mosquito ocupou todos os cinco continentes nas últimas quatro décadas sendo apontado como a espécie de mosquito mais invasora do mundo (ISSG, 2020). A espécie se espalhou de sua área nativa no sudeste da Ásia para todos os outros continentes América, Europa, África, Austrália e várias ilhas do Pacífico. Assim como as outras espécies invasoras do gênero *Aedes*, os ovos de *Ae. albopictus* são diretamente espalhados nos continentes por meio do comércio internacional de pneus usados e plantas ornamentais (ERITJA et al., 2017).

O primeiro registro de *Ae. albopictus* no Brasil ocorreu em 1986 no Estado do Rio de Janeiro (FORATTINI, 1994). No mesmo ano, a espécie também foi identificada nos estados de Minas Gerais e São Paulo e, no ano seguinte, no Espírito Santo (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Desse modo, *Ae. albopictus* já se encontrava instalado em todos os Estados da região Sudeste.

O mosquito *Aedes albopictus* atualmente é considerado como vetor de dengue, chikungunya e zika vírus, e é capaz de transmitir em torno de 22 arboviroses diferentes (GRAZT, 2004), além disso possui um papel fundamental na transmissão de vírus por artrópodes, ao qual futuramente deverá ser ampliado, devido à sua competência de habitar regiões temperadas (KRAEMER et al., 2015). Além disso, *Ae. albopictus* obteve um relevante papel epidemiológico por sua oviposição ocorrer em pneus, favorecendo assim sua disseminação (MOORE & MITCHELL, 1997; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2003; MACIEL-DE-FREITAS et al., 2006).

### **1.3 Arboviroses: Dengue, Zika, Chikungunya**

O termo arbovirose originou da expressão inglesa “ARtropod BOrne VIRUSES”, em 1942 para denominar um grupo de infecções virais, os quais seus vetores foram isolados de animais que causavam encefalites (FORATTINI, 2002).

As arboviroses são doenças virais transmitidas ao homem através da picada de artrópodos vetores. Logo, os arbovírus (Arthropod-borne virus) são assim identificados por apresentarem ciclo de replicação nos artrópodes hematófagos e por serem transmitidos destes

para os humanos através de sua picada (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Em 1967, a Organização Mundial de Saúde (OMS) ampliou a definição de arbovírus, assinalando também a importância da transmissão transovariana e venérea desses agentes. Vírus de diferentes famílias são incluídos nesse grupo, como Asfarviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae e Togaviridae (WEAVER, 1997; MURPHY, 1999).

Existem mais de 545 espécies de arbovírus, sendo que mais de 150 estão associadas com doenças em seres humanos. Esses arbovírus são mantidos em ciclo de transmissão entre artrópodes (vetores) e vertebrados, ambos responsáveis pela manutenção do ciclo (CLETON et al., 2012; GLUBER, 2001).

Segundo Rust (2012), as arboviroses apresentam elevados riscos em regiões tropicais devido às rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas, precariedade das condições sanitárias, as quais contribuem para seu acréscimo e transmissão.

As arboviroses são consideradas um grande problema de saúde pública no mundo, principalmente pela sua capacidade de dispersão, de adaptação a novos ambientes e hospedeiros (vertebrados e invertebrados), além da alta probabilidade de causar epidemias extensas, pela susceptibilidade universal e pela ocorrência de grande número de casos graves, com fatores neurológico, articular e hemorrágico. O enfrentamento de arboviroses emergentes requer políticas, além de diferentes formas de intervenções, visando o enfrentamento das múltiplas e singulares situações de saúde, incluindo diversas áreas da sociedade (DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017).

No Brasil, dentre as arbovirus que apresentam maior circulação atualmente estão o vírus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) (BRASIL, 2015). Em geral, os arbovírus pertencem aos gêneros Alphavirus, família Togaviridae (CHIKV) e Flavivirus, família Flaviviridae (DENV e ZIKV), contudo alguns membros das famílias Bunyaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae também possuem relevância quanto à saúde humana (WEAVER; REISEN, 2010). A co-circulação dos vírus DENV, CHIKV e ZIKV tem complicado o diagnóstico clínico- epidemiológico das arboviroses devido às semelhanças de manifestações sintomáticas destas doenças, além do seu efeito ser pouco conhecido (DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017).

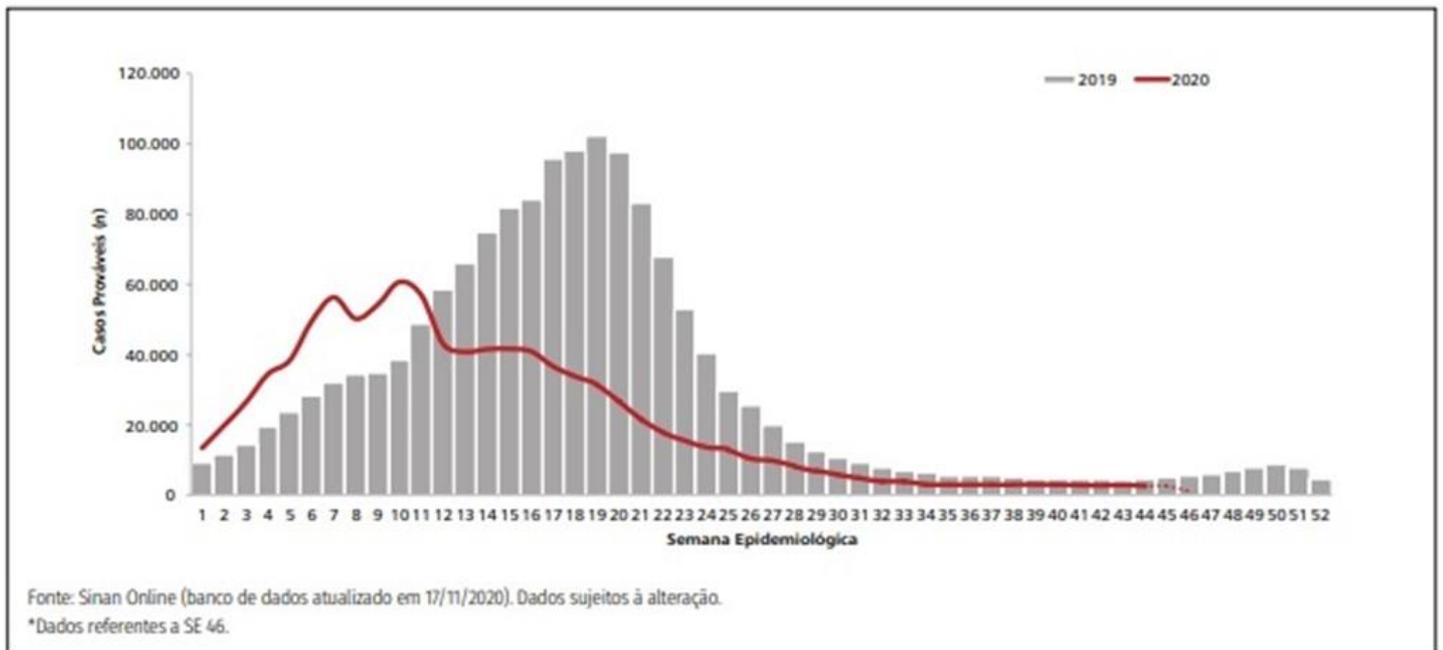
O vírus da dengue circulou nas Américas desde o século passado até as primeiras décadas do século XX, quando então foi erradicado, retornando e tendo casos dos sorotipos 2 e 3 novamente registrados nos anos 60, estando relacionada à novos casos epidêmico de dengue clássica (DONALISIO, 1995).

A dengue é identificada por uma infecção aguda, em sua maioria assintomática, apresentando quadros de manifestações hemorrágicas com ou sem choque, sendo causados por um dos quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (MARCONDES, 2009). Um novo sorotipo (DENV-5) foi encontrado em um surto ocasionado na Ásia em 2007, sendo este sorotipo filogeneticamente distinto dos demais (NORMILE, 2013). Pesquisas mostram que anualmente acontecem cerca de 390 milhões de infecções por dengue (BHATT et al., 2013), que acometem 3.9 milhões de pessoas mundialmente, que estão distribuídas em 128 países, encontram-se em risco de se infectarem com o vírus (BRADY et al., 2012).

A infecção pelo vírus da dengue no ser humano pode se manifestar de diversas formas com diferentes níveis de gravidade de acordo com o seu risco e manejo. Estes níveis de gravidade são diferentes e podem ser classificados como: Dengue inaparente, Dengue autogerida, Dengue não grave, Dengue grave, Dengue fatal (WHO, 2018).

Há muitos anos, DENV é o arbovírus de maior relevância no Brasil. Um possível surto da doença no estado do Rio de Janeiro, foi registrado em 1846, causando febre, mialgia e artralgia. No século XX, há evidências que outros surtos ocorreram no Nordeste, sudeste e sul do Brasil. Em 1917, houve surtos em Curitiba, Estado do Paraná e em localidades do Estado do Rio Grande do Sul. Em 1922 e 1923, um novo grande surto ocorreu no Rio de Janeiro e nas cidades vizinhas (FIGUEIREDO, 2000). No início da década de 80, o sorotipo DENV foi reintroduzido no Brasil e, desde então, importantes surtos de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 têm ocorrido (MONDINI et al., 2007).

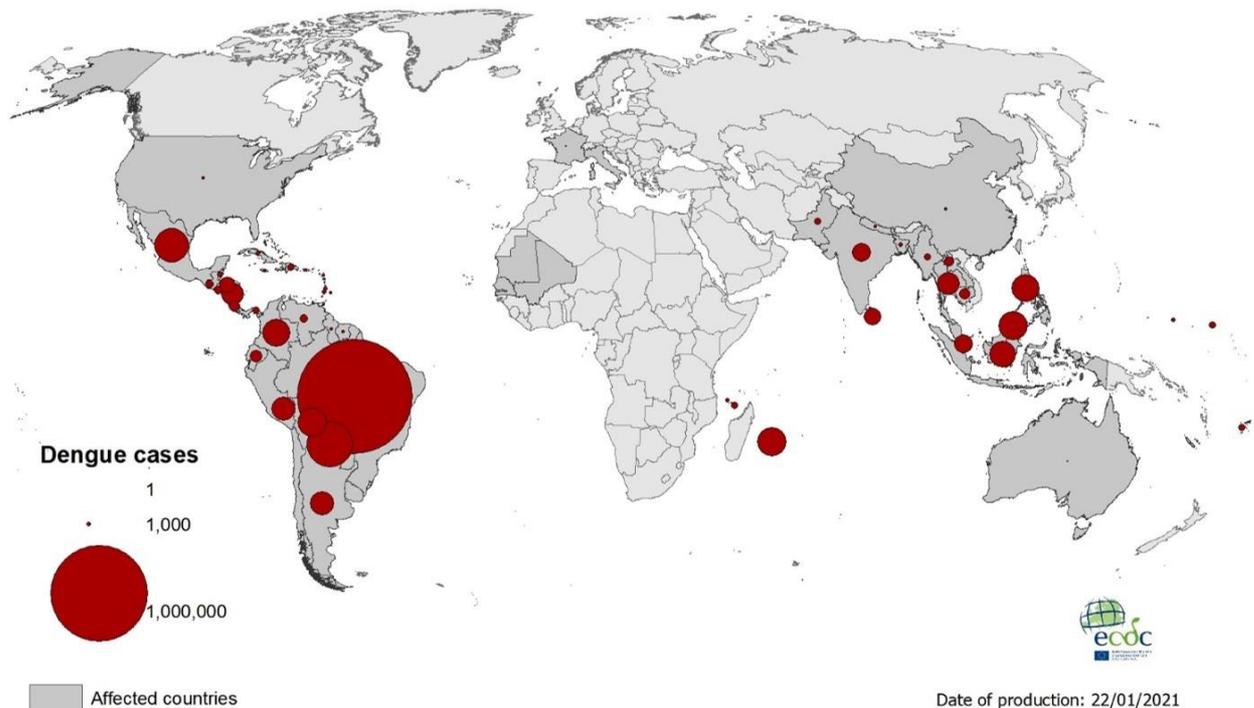
Em 2020, até a SE 46 (29/12/2019 a 14/11/2020), foram registrados 931.303 casos prováveis de dengue no país com taxa de incidência de 462,1 casos por 100 mil habitantes. Durante o ano de 2020 até a SE 11, a distribuição dos casos prováveis de dengue no Brasil por semanas epidemiológicas no início dos sintomas demonstra que, a curva epidêmica dos casos prováveis ultrapassa o número de casos do mesmo período para o ano de 2019. Entretanto, a partir da SE 12, verifica-se uma diminuição dos casos prováveis em relação ao ano de 2019 (Figura 6). Essa diminuição pode ser atribuída a mobilização que as equipes de vigilância epidemiológica estaduais estão realizando diante do enfrentamento da emergência da pandemia do coronavírus (COVID-19), após a confirmação dos primeiros casos no Brasil em março de 2020, originando um atraso ou subnotificação para os casos das arboviroses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).



**Figura 6:** Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2019 e 2020\*

Fonte: Ministério da Saúde

Houve um aumento substancial nas notificações de infecções por dengue em 2019 em comparação com 2018. Em 2020, França e Itália relataram casos autóctones, sendo 12 casos registrados na França e 10 na Itália. Na Europa continental, há risco muito baixo de transmissão, pois as condições ambientais não são favoráveis à atividade do vetor e à replicação do vírus. Porém, os países como Brasil, Paraguai, México, Vietnã e Malásia, são os países com mais casos no mundo (Figura 7). Em 2020, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) notificou 2.144.841 casos suspeitos e confirmados de dengue e 853 óbitos, na região das Américas (ECDC, 2020).



**Figura 7:** Distribuição geográfica dos casos de dengue relatados em todo o mundo, janeiro a dezembro de 2020.

Fonte: ECDC

O vírus Zika, um flavivírus (família Flaviviridae) transmitido no Brasil pelo mosquito *Ae. aegypti*, foi originalmente isolado de uma fêmea de macaco Rhesus que estava febril na Floresta Zika, localizada próximo de Entebbe na Uganda, em 20 de abril de 1947 (DICK et al., 1952; KARABATSOS, 1985). Esse vírus está relacionado com outros flavivírus de relevância para a saúde pública, incluindo o dengue (DENV), febre amarela (YFV, Yellow Fever virus) e vírus do Nilo Ocidental (WNV, West Nilus virus) (PIERSON; DIAMANTE, 2013; FAYE et al., 2014).

O ZIKV causa tipicamente doença aguda febril, acompanhada por discreta ocorrência de outros sintomas gerais, tais como cefaleia, conjuntivite não purulenta, exantema, artralgia, mialgia, astenia, mal-estar, erupção cutânea maculo-papular, edema e dores articulares, por vezes intensas. Pode se manifestar com sintomas leves ou não específicos, equivalentes a outras doenças virais prevalentes no Brasil, como a dengue, prejudicando as tentativas de realizar um diagnóstico preciso por razões clínicas (ESTOFOLETE et al., 2016). No entanto, apesar da aparente incapacidade da doença, mais recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil, quadros mais severos, incluindo comprometimento do sistema nervoso central (Síndrome de Guillain-Barré (GBS), mielite transversa e meningite), associados ao Zika têm sido comumente

registrados, o que mostra quão pouco conhecida ainda é essa doença (OEHLER et al., 2014; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015).

Novas descobertas demonstraram que o ZIKV pode ser transmitido através de relações sexuais (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015), transfusão sanguínea (BESNARD et al., 2014; MUSSO et al., 2014), sendo ainda encontrado em outros fluídos corporais como urina e saliva (MIZUNO et al., 2007; POLONI et al., 2010; TURMEL et al., 2016).

As mais graves manifestações em decorrência de infecção por ZIKV são certamente as más-formações congênitas detectadas em bebês cujas mães contraíram a doença durante sua gestação. Inicialmente definida apenas como microcefalia, sabe-se hoje que há outros tipos de lesões que o vírus pode causar em fetos, tais quais alterações no nervo óptico e calcificação no cérebro. Desta forma atribui-se a tais más-formações a nomenclatura de Síndrome Congênita do Vírus Zika (EICKMANN et al., 2016; FRANÇA et al., 2016).

Com relação aos dados de zika, foram notificados 6.220 casos prováveis (taxa de incidência 3,0 casos por 100 mil habitantes) no país. A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (7,8 casos/100 mil habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (3,4 casos/100 mil habitantes) e Norte (2,0 casos/100 mil habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Outro arbovírus emergente é o CHIKV, pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus* originário da África, agente etiológico da febre chikungunya, causador de uma doença febril aguda com poliartralgia, grave e incapacitante. Foi descoberto na Tanzânia em 1952 e inicialmente produziu epidemias esporádicas na África e na Ásia (HALSTEAD, 2015), tendo seu primeiro incidente registrado com sua introdução no sudeste asiático e na Índia, ocasionando ciclos eventuais de transmissão urbana que continua até hoje, onde nesse caso o *Ae. aegypti* é o principal vetor (NASCI, 2014).

Desde 2004, foi registrada sua disseminação pandêmica. Não está evidente qual o principal vetor da febre Chikungunya no Brasil, porém estudos atuais demonstram que tanto as populações brasileiras de *Ae. aegypti* quanto as de *Ae. albopictus* possuem alta competência vetorial para transmitir esse vírus, tornando-o uma grande ameaça para o país (VÉGA-RUA et al., 2014).

Porém em 2005, o vírus tornou-se capaz de mutação, evidenciando que ele pode ser comprovadamente transmitido através do *Ae. albopictus*, um mosquito distribuído em todo o mundo. Desde então, tem havido uma série de epidemias na África, no sudeste da Ásia e nas ilhas do Oceano Índico e da Europa (HALSTEAD, 2015).

No Brasil, em 2014, a febre chikungunya teve seu primeiro registro autóctone, na cidade do Oiapoque, no Amapá. Atualmente, além desse estado, juntamente com os estados da Bahia

e Pernambuco são os que mais tiveram casos no país (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; TEIXEIRA et al., 2015).

Em 2020, até a SE 36 (29/12/2019 a 05/09/2020), foram notificados 69.702 casos prováveis (taxa de incidência de 33,2 casos por 100 mil habitantes) no país. As regiões Nordeste e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência, 84,3 casos/100 mil habitantes e 22,2 casos/100 mil habitantes, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

#### **1.4 Vacinas contra as arboviroses**

Não existem tratamentos específicos e não há fármacos antivirais disponíveis contra as arboviroses, principalmente quando falamos em dengue, Zika vírus e febre chikungunya. Até o momento não há vacinas licenciadas contra o ZIKV e CHIKV, somente para DENV (GARG, MEHMETOGLU-GURBUZ, & JOSHI, 2018; POWERS, 2018; POWERS, 2019).

Estão sendo desenvolvidas três vacinas para o vírus da dengue, com estágios mais avançados em suas pesquisas. Sendo uma delas, produzida pela Sanofi-Aventis que está licenciada desde 2016, ao qual está sendo utilizada em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil, na qual sua aquisição é feita somente em clínicas particulares. Uma está sendo produzida pela Takeda Pharmaceutical Company Limited e a outra, pela parceria entre o National Institutes of Health (EUA) e o Instituto Butantan, estão na fase III de ensaios clínicos (PRECIOSO et al., 2015).

Em relação ao Zika vírus, os pesquisadores estão desenvolvendo uma vacina que previna a transmissão vertical do vírus para o feto (DURHAM et al., 2018). Atualmente, há mais de 30 vacinas candidatas sendo desenvolvidas, porém 11 estão na fase I do estudo clínico, que é a etapa em que são feitos os primeiros testes em seres humanos para avaliar a sua segurança (DIAMOND, LEDGERWOOD & PIERSON, 2018; DURHAM et al., 2018; ESCOSTEGUY, 1999).

Já para a febre Chikungunya, devido ao aumento global da doença concomitante com o elevado número de doentes que desenvolveram sintomas crônicos, vários estudos estão sendo feitos para o desenvolvimento de uma vacina que consiga prevenir a doença. A vacina candidata está com os estudos mais avançados na fase II dos ensaios clínicos que avalia o seu efeito, em um pequeno número de indivíduos. Os resultados encontrados são promissores e já há preparativos para a fase III (avaliação do efeito da vacina em larga escala) (ESCOSTEGUY, 1999; POWERS, 2018; REISINGER et al., 2018).

## 1.5 Controle vetorial

A eficácia do controle vetorial de mosquitos é bastante desafiadora. Para o controle do mosquito *Ae. aegypti*, por exemplo, novas tecnologias têm sido empregadas para o controle desse vetor contra arboviroses.

O controle mecânico sugere a eliminação de criadouros onde há oviposição e focos do mosquito. Esse mecanismo tenta impedir o desenvolvimento do ciclo do mosquito em médio prazo, implementando armadilhas e retirando ou adequando locais com potencial de acúmulo de água parada, os criadouros. Pode-se também diminuir diretamente a disseminação dos adultos, utilizando telas em ralos, janelas, portas e outros meios de acesso aos domicílios (ZARA et al., 2016).

Além do controle mecânico, inseticidas químicos têm sido amplamente utilizados (GOINDIN et al., 2017). Porém, o intenso uso desses inseticidas pode causar danos ao homem e ao meio ambiente, contaminando o solo, alimentos, água, além de favorecer a seleção de insetos resistentes. No Brasil, as populações de *Ae. aegypti* já apresentam fenótipos de resistência aos principais inseticidas utilizados para o controle vetorial (MACORIS et al., 2018).

Os inseticidas químicos são amplamente utilizados no controle de vetores de doenças com início na segunda guerra mundial. Desde 1943, após a descoberta do inseticida DDT, se obteve uma revolução nos métodos de controle de doenças. Houve diversos programas que tentaram erradicar doenças e esses programas de controle se apoiaram amplamente na sua aplicação em decorrência da sua eficácia e pela disponibilidade em baixos custos (NICOLAS, 1986).

Diversos inseticidas também foram comercializados como os organofosforados, carbamatos e os piretróides. Devido ao uso indiscriminado desses produtos, foram relatadas que diversas espécies de insetos provocaram uma grande resistência (BROGDON; MCALLISTER, 1998; WHO, 2008). Atualmente, o controle do mosquito vetor ainda é a principal estratégia para se combater a transmissão das arboviroses urbanas relacionadas ao *Ae. aegypti* (ZARA et al., 2016). Porém, controlar somente mosquitos adultos não é suficiente para se obter a erradicação da doença. Como resultado das diversas adaptações do vetor, torna-se essencial o desenvolvimento de novos produtos que tenham baixa toxicidade para o ambiente (VAN RIE et al., 1990).

O combate ao mosquito na fase adulta apresenta algumas dificuldades, como as aplicações espaciais ineficazes dos inseticidas que podem interferir no desenvolvimento de

resistência (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2018). Desse modo, uma das principais estratégias para o controle desse vetor seria o uso de compostos com ação letal sobre as larvas (larvicidas) ou ovos (ovicidas) do mosquito (RAGAVENDRAN et al., 2017).

Devido ao uso contínuo do larvicida temephos, as populações de *Aedes aegypti* no Brasil ficaram resistentes a eles, ao longo dos anos, e por isso está ocorrendo a sua substituição. Os organofosforados (malationa, fenitrothion e temefós) foram os primeiros a substituir os organoclorados. Atualmente, como alternativa para substituição dos organofosforados, os piretroides (cipermetrina e deltametrina) têm sido usados devido à sua alta eficiência contra mosquitos adultos, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, por conta do impacto ambiental, além de possuir um alto custo (BRAGA; VALLE, 2002; GUZMAN et al., 2010). Outras substâncias utilizadas, principalmente na América do Sul, são o piriproxifeno e espinosade. Espinosade tem um favorável perfil ecotoxicológico, ele atua tanto nos receptores nicotínicos da acetilcolina assim como nos receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), ocasionando uma excitação do sistema nervoso do inseto, que causa paralisia e morte (THOMPSON et al., 1995; WATSON, 2001). Apesar de ser um neurotóxico, ele também tem um alvo molecular distinto quando relacionado aos organofosforados e piretróides, pois estes inseticidas, respectivamente, possuem como alvo a enzima acetilcolinesterase e o canal de sódio voltado para a voltagem (HEMINGWAY et al., 2004).

Uma outra estratégia favorável, é o mapeamento de risco. Essa técnica é desenvolvida para avaliar e identificar áreas de risco que tem aumentado a transmissão das arboviroses, utilizando estatísticas espaciais locais. Ao relacionar os dados espaciais com dados da vigilância entomológica (características, presença, índices de infestação, avaliação da eficácia dos métodos de controle), da vigilância epidemiológica, da rede laboratorial e de saneamento, as ações específicas de controle vetorial são direcionadas para áreas prioritárias (VAZQUEZ-PROKOPEC, 2010; LACON et al., 2014).

Diversas estratégias genéticas estão sendo desenvolvidas para o controle de vetores (MASSONNET-BRUNEEL et al., 2013; YAKOB et al., 2008). Uma delas está em compreender como conter ou eliminar espécies de mosquitos por meio do desenvolvimento de genes letais ou capazes de tornar os insetos estéreis. A outra, abrange a alteração ou substituição da população, pela introdução de um gene efetor para limitar ou bloquear a transmissão da doença na população selvagem (ARAÚJO et al., 2015; CARVALHO et al., 2014).

O controle biológico consiste na eliminação de pragas e doenças por meio de fatores bióticos, tais como a predação, o parasitismo ou a competição, que lhes são tóxicos e/ou letais (RODRIGUES, 1996; ALVES, 1998). A finalidade desse modo de controle é a diminuição da

população de um organismo hospedeiro, com o uso de inimigos naturais. Entretanto, o excesso destes hospedeiros influencia a população de inimigos naturais. Estas relações resultam em um equilíbrio dinâmico, onde nenhuma das populações elimina a outra, causando efeitos ecológicos indesejáveis (FONTES, 1992; FOWLER; DI ROMAGNANO, 1992).

Existem diversas alternativas para controle biológico vetorial disponíveis, entre as de predadores estão os peixes (SHULSE et al., 2013; HOY, 1985) e os invertebrados aquáticos, que se alimentam das larvas e das pupas, além de patógenos como bactérias, fungos e parasitas que liberam toxinas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; CHAVASSE et al., 1997; BRAGA; VALE, 2007).

Metsechnikoff em 1879, propôs o uso de entomopatogênicos no seu clássico trabalho de controle de pragas, onde usou o fungo *Metarhizium anisopliae* no controle de larvas do besouro *Anisopia austiaca* (ALVES, 1998).

No controle biológico podemos ressaltar a bactéria do gênero *Bacillus thuringiensis*, essa espécie produz proteínas Cry, codificadas por um único gene, que formam cristais protéicos com atividade inseticida, e são expressas apenas quando atingem o intestino médio da larva (HABIB, 1989; GERMANI, 1993). Este controle das formas imaturas de mosquitos vem sendo empregada pela toxicidade de cerca de 130 espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera bem como os vetores de doenças humana, como contra os gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* (LERECLUS et al., 1993; BÜCKER et al., 2007a). Não se tem relatos de prejuízos causados ao homem e ao meio ambiente gerados por esse tipo de controle nos últimos 60 anos de uso (ARANTES et al., 2002).

#### 1.6 Utilização de bactérias como potenciais estratégicos no controle vetorial

As bactérias são microrganismos procariotos, com estrutura simples, porém bastante complexos do ponto de vista bioquímico e metabólico. Podem ser encontrados em inúmeros locais do planeta, podem ser considerados como cosmopolitas, auxiliando na reciclagem de compostos orgânicos, sendo consideradas importantes na maioria dos ecossistemas naturais. Elas podem ser classificadas em formas de cocos, bacilos, espirilos, vibriões, entre outros (CARVALHO et al., 2008; MALAJOVICH, 2009).

A utilização de micróbios simbioses para reduzir a competência vetorial dos mosquitos aos patógenos humanos e, desta forma, controlar a disseminação das doenças transmitidas por estes vetores é uma abordagem inovadora que vem ganhando força nos últimos anos (CIRIMOTICH et al., 2011b; WANG et al., 2012; BANDO et al., 2013).

Nos insetos, há uma enorme variedade de colônias bacterianas (DILLON; DILLON, 2004) que são responsáveis por ajudar na nutrição, desenvolvimento e reprodução, além de promover proteção contra patógenos, modular respostas imunes e a comunicação com outros insetos (MINARD et al., 2013; ENGEL; MORAN, 2013; COON et al., 2014).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos sobre as relações simbióticas entre insetos e bactérias intestinais para tentar esclarecer os mecanismos relacionados às relações de associação entre estes indivíduos. O intestino dos insetos possui uma grande abundância de organismos simbiotes, provavelmente por ser um ambiente rico em nutrientes, além de possuir diferentes estruturas e funções. Também propicia a ocupação e colonização de diversos grupos de microrganismos, em diferentes estruturas e funções (RANI et al., 2009).

Inicialmente, foram utilizados diversos produtos tóxicos (inseticidas) para o controle de vetores. Por causa disso, os mosquitos desenvolveram resistência a esses produtos químicos, o que torna cada vez mais difícil o combate desses insetos. Assim, o controle biológico demonstrou uma possibilidade promissora, utilizando nematóides, bactérias, fungos e até mesmo extratos de plantas para a controle de vetores.

Diversas bactérias apresentam propriedades entomopatogênicas, esses microorganismos entram no corpo dos insetos junto com o alimento, resistem às respostas imunes do hospedeiro e passam a produzir metabólitos que comprometem o funcionamento fisiológico dos mosquitos, podendo levar à morte dos mesmos (VILCINSKAS, 2010). Essas podem oferecer possibilidades possíveis para produção de bioinseticidas e sua utilização em programas de controle biológico. A eficácia desses bioinseticidas foi apresentada através da atuação direta sobre os insetos-praga das plantações, que não prejudicavam os insetos polinizadores e podiam ser utilizados juntamente com outros inseticidas e técnicas de manejo ambiental, sendo uma forma eficaz de controle biológico, sem desenvolver risco ao homem (COPPING; MENN, 2000).

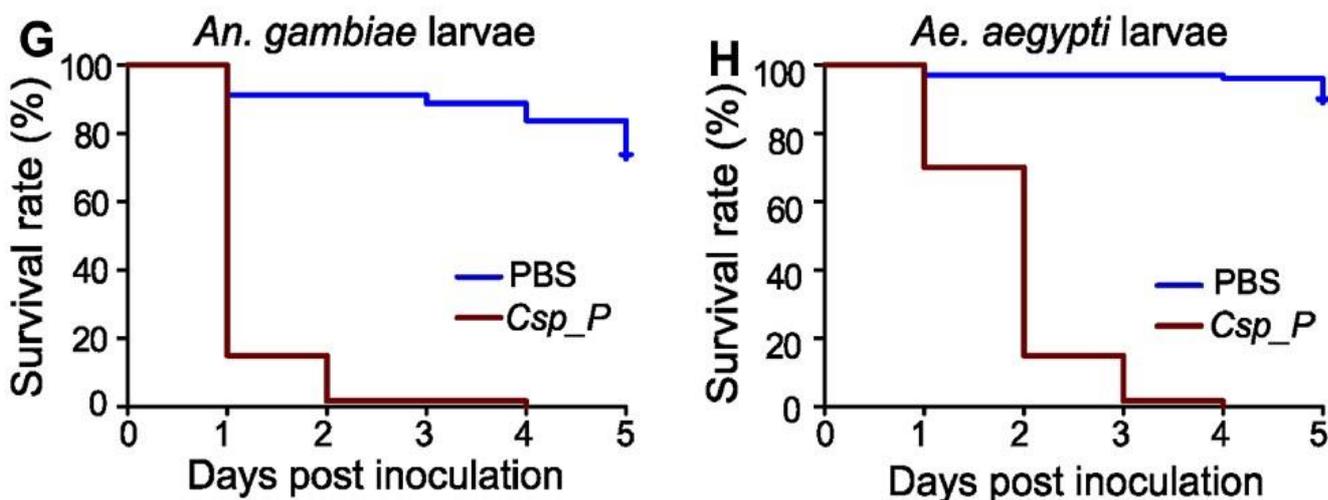
*Bacillus thuringiensis var. israelensis*, uma bactéria gram positiva, formadora de esporos, entomopatogênica, comumente utilizada no controle de mosquitos (KOVENDAN et al., 2011), produz corpos de inclusões denominados cristais, como a proteína Cry. Esta proteína é capaz de penetrar a matriz peritrófica de mosquitos do gênero *Aedes*, levando a morte do inseto (LACEY et al., 2001; DE MAAGD et al., 2003; CIRIMOTICH et al., 2011; GLARE et al., 2012). *Bacillus thuringiensis var. israelensis* ganhou importância como um método alternativo para controle de vetores devido a sua resistência à inseticidas em insetos vetores, e essa resistência foi atribuída ao uso de inseticidas químicos em muitas partes do mundo (BOYCE et al., 2013).

A grande variedade de bactérias entomopatogênicas com atividade inseticida são representadas pelos componentes da família Bacillaceae, principalmente por *B. thuringiensis* e *Brevibacillus laterosporus* Laubach, que pertencem à classe Gammaproteobacteria os quais compõem os entomopatógenos simbioses de nematóides *Photorhabdus spp.* e *Xenorhabdus spp.* Novas espécies de Betaproteobacteria apresentam características com largo espectro inseticida. Este grupo inclui cepas específicas de *Burkholderia spp.* e *Chromobacterium spp.* Enfim, algumas espécies de Actinobacteria possuem interesse científico e comercial elevado devido sua alta produção de metabólitos que capazes de agir como potentes inseticidas, como exemplo pode-se citar várias espécies de *Streptomyces* e de *Saccharopolyspora*. Como resultado das atividades de triagens industriais e acadêmicas contínuas, a descoberta de novas espécies de bactérias e metabólitos inseticidas serão de grande utilidade no futuro (LACEY et al., 2001; GLARE et al., 2012).

Em trabalhos anteriores, foi descoberto que a bactéria *Chromobacterium sp.* Panamá (*Csp\_P*), que é uma bactéria isolada a partir dos intestinos médio do mosquito *Ae. aegypti* (RAMIREZ et al., 2012), tem uma atividade larvicida contra *Anopheles gambiae* e *Ae. aegypti* (RAMIREZ et al., 2014) (Figura 8). Outras espécies de *Chromobacterium* também apresentam propriedades inseticidas, incluindo *Chromobacterium vaccinii*, que provoca uma mortalidade nas larvas de *Ae. aegypti* e traças de diamante (MARTIN; SOBY, 2016) e *Chromobacterium subtsugae* que induz a mortalidade em múltiplas espécies de insetos, mas não contra larvas de *Culex pipiens*, além de ser principal ingrediente do biopesticida Grandevo® (Marrone BioInnovations) (MARTIN et al., 2007). A espécie mais estudada é a *Chromobacterium violaceum*, pois essa bactéria produz diversos metabólitos que possuem aplicações medicinais e industriais, incluindo violacina, a qual tem atividades antimicrobiana e antiparasitária, além do cianeto de hidrogênio (HCN), que pode ser usado para biolixiviação de ouro de lixo eletrônico e minério (LIU et al., 2016; BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003; LOPES et al., 2009; SHIN et al., 2013).

Mais recentemente, Short et al. (2018), descobriram que a atividade larvicida é mantida após a remoção da bactéria *Chromobacterium sp.* (*Csp\_P*) da água que as larvas se reproduzem, indicando que as bactérias produzem fatores que podem atuar independentemente de as bactérias estarem vivas. Esta atividade é derivada principalmente da bactéria *Chromobacterium sp.* (*C.sp\_P*) e não das carcaças das larvas. Os resultados do trabalho indicaram que a mortalidade larval é pelo menos em parte resultado do acúmulo de cianeto de hidrogênio (HCN) na água que as larvas se reproduzem, eventualmente atingindo níveis ambientais que são tóxicos para as larvas e gradualmente evaporando com o tempo. Os resultados do estudo

mostraram que o cianeto de hidrogênio (HCN) é a única fonte de atividade larvicida produzido por *Chromobacterium sp.* (*C.sp\_P*), porém outros fatores podem também estar envolvidos.



**Figura 8:** Os efeitos de *Csp\_P* na mortalidade larval também foram testados, colocando larvas de *An. gambiae* (G) e larvas de *Ae. aegypti* (H) de 2 a 4 dias de idade em água contendo *Csp\_P*. Os efeitos de *Csp\_P* na mortalidade larval também foram testados, colocando larvas de *An. gambiae* (G) e larvas de *Ae. aegypti* (H) de 2 a 4 dias de idade em água contendo *Csp\_P*.

Fonte: Ramirez et al., 2014

O estudo das interações entre mosquito-microbioma e a investigação contínua de bactérias associadas a mosquitos, tem elevado o interesse e o potencial de produzir novos agentes para controle biológico.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade larvicida das bactérias intestinais dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados nas cidades de Avaré e Botucatu/SP.

### 2.2 Objetivos específicos

Isolar bactérias intestinais cultiváveis de mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados nas cidades de Avaré e Botucatu/SP;

Identificar as bactérias intestinais cultiváveis pelo método de coloração Gram e por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA;

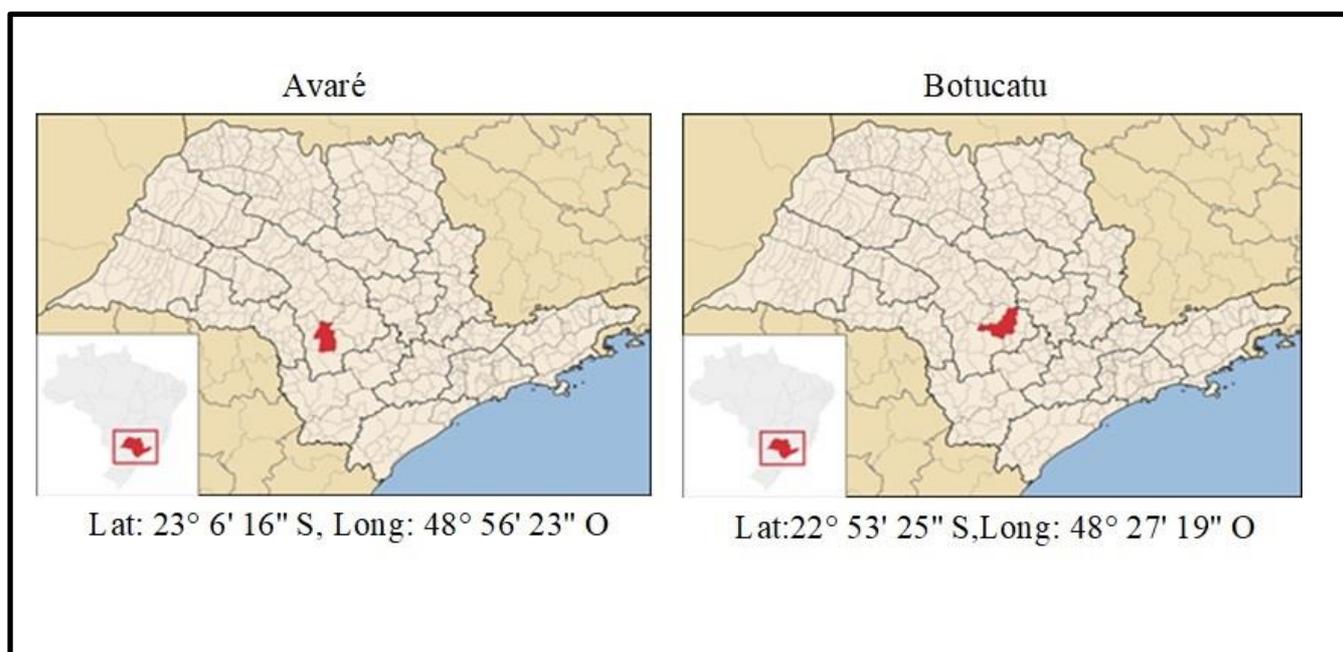
Testar o efeito larvicida das bactérias intestinais identificadas contra larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Determinar a dose letal (DL<sub>50</sub>) de cada tratamento bacteriano com efeito larvicida por meio de bioensaios, em larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Local, Coleta e Manutenção de mosquitos adultos de campo de Avaré e Botucatu/SP

Dezesseis mosquitos adultos de campo *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram coletados em Avaré (Latitude: 23° 6' 16" Sul, Longitude: 48° 56' 23" Oeste) e Botucatu (Latitude: 22° 53' 25" Sul, Longitude: 48° 27' 19" Oeste), que ficam localizados na região centro sul do estado de São Paulo em 2014 (Figura 9), pela Dra.Letícia Tsieme Gushi, com auxílio da SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias, órgão do governo responsável pelo controle de endemias no estado de São Paulo, juntamente com a Secretária da Saúde de Botucatu (Figura 10).



**Figura 9:** Localização dos locais de coleta, Municípios de Avaré e Botucatu no Estado de São Paulo.

Fonte: Wikipedia

A região do entorno de Botucatu foi escolhida, pois nesta área são reportados mosquitos de população relevante pela SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias, através do Índice de Breteau (IB). Pontos estratégicos foram escolhidos, de acordo com as Normas e Diretrizes Técnicas para Vigilância e Controle do *Ae. aegypti* no estado de São Paulo, ou seja, propriedades que ofereçam grande quantidade de contêineres capazes de se tornar criadouros artificiais. Nestes pontos, o SUCEN frequentemente reporta a presença de *Ae. aegypti*, assim quando encontrado mosquito adulto, um sugador à vácuo manual foi utilizado para coletar os insetos e colocá-los dentro de potes plásticos de 380 mL, com a abertura na tampa, posteriormente foram levados vivos para o insetário do laboratório Vectomics do Instituto de Biotecnologia da UNESP (IBTEC/UNESP) (Figura 10), onde foram colocados em gaiolas higienizadas com água sanitária e álcool 70% e mantidos em condições padrões de insetário a 28°C, umidade relativa de 85±5%, fotoperíodo de 12h e providos com solução estéril de sacarose 10% (m/v), até o momento da dissecação dos intestinos.



**Figura 10:** Agentes de saúde da SUCEN coletando mosquitos manualmente.

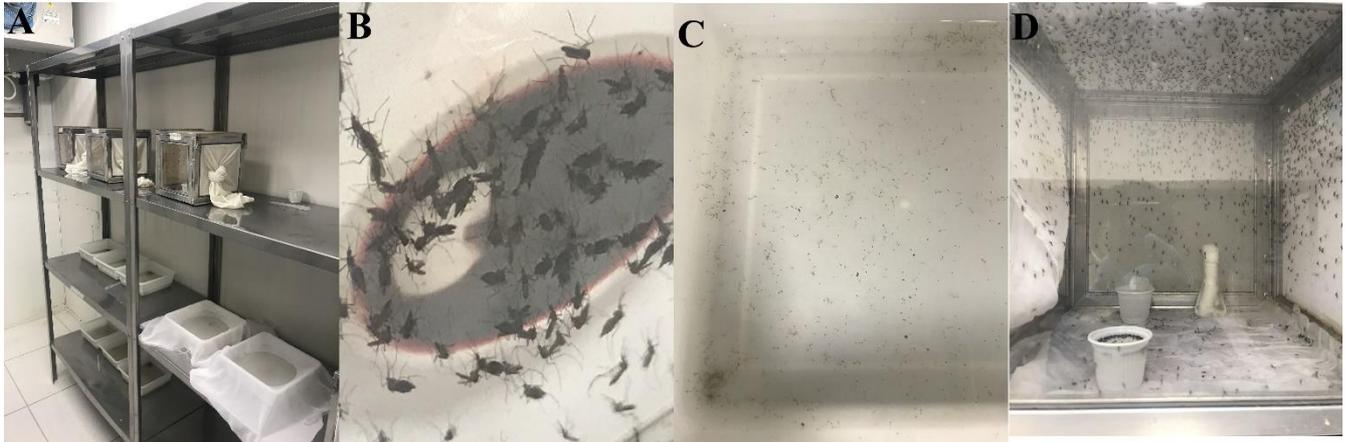
Fonte: Acervo Vectomics

### 3.2 Criação de mosquitos da linhagem Rockfeller

Os adultos do mosquito *Ae. aegypti* (Linhagem Rockfeller) foram criados no insetário do laboratório Vectomics (UNESP/BOTUCATU).

Para a criação, mosquitos machos e fêmeas são mantidos em gaiolas higienizadas com água sanitária e álcool 70% e em condições padrões de insetário a 28°C, umidade relativa de 85±5%, fotoperíodo de 12h e providos com solução estéril de sacarose 10% (m/v) (Figura 11 A).

Após o acasalamento dos mosquitos, as fêmeas adultas receberam alimentação sanguínea, por meio de um sistema com alimentador artificial com sangue de carneiro desfibrinado (Newprov) para maturação dos ovos e ovoposição (Figura 11 B). Após o repasto sanguíneo, foram colocados recipientes (copo plástico de 100 ml) na gaiola contendo água e uma tira de papel filtro em sua parede interna para a desova. Em seguida, os papéis filtros foram colocados para eclosão em bacias esmaltadas contendo 500 ml de água. Após a eclosão, as larvas receberam alimento, sendo este distribuído nas bacias com água (Figura 11 C). O alimento consistiu na mistura de 50 gramas de ração de peixe (Tetramin) com 10 ml de água. Duas vezes na semana eram realizadas a limpeza dos recipientes nos quais as larvas eram mantidas, com remoção de 1/3 da água, para evitar a formação de película na superfície, resultado da proliferação de microrganismos. Ao atingir o 2º estágio, as larvas foram selecionadas para os bioensaios, sendo as demais deixadas nas bacias esmaltadas até atingirem o estágio de pupa, sendo então transferidas para gaiolas, teladas, para emergência dos alados (Figura 11 D).

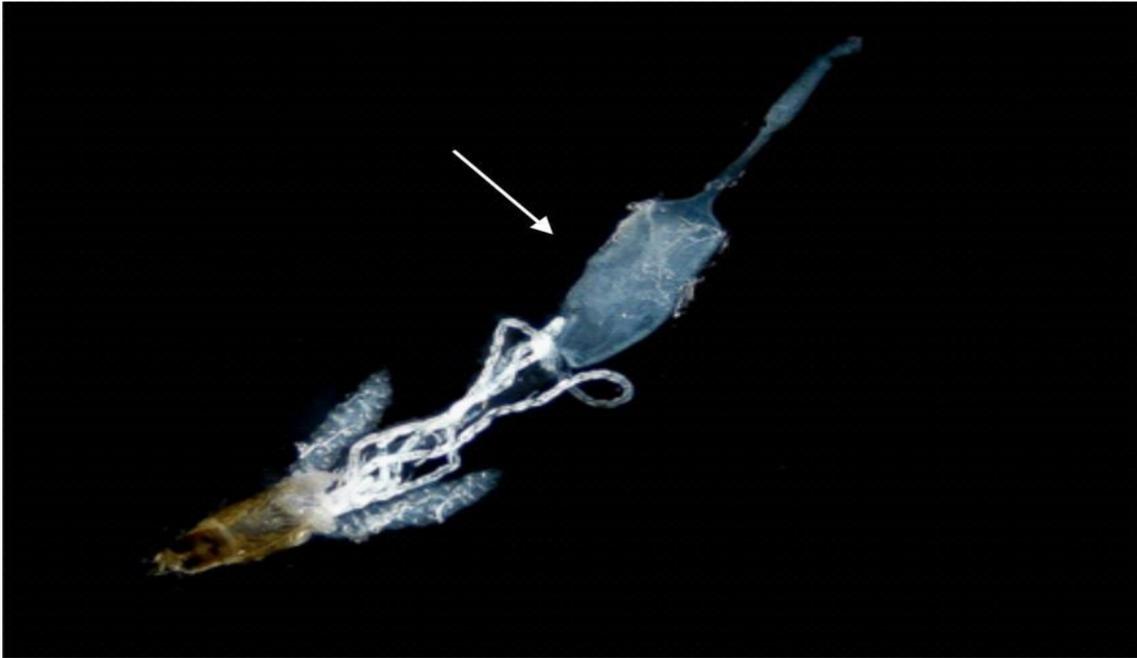


**Figura 11:** A: Manutenção de mosquitos no insetário. B: Alimentação sanguínea das fêmeas adultas. C: Larvas em bacias com água. D: Gaiolas teladas com mosquitos.

Fonte: Acervo autor

### 3.3 Dissecção dos intestinos-médios de mosquito adulto

A dissecção dos mosquitos para a obtenção do intestino-médio, independentemente da finalidade do experimento, é conduzida através de um protocolo padrão (COLEMAN et al., 2007). Antes da dissecção, todo o material utilizado foi autoclavado e ficou por ~20 min exposto a luz U.V. Foram dissecados dezesseis intestinos de mosquitos de campo e sete intestinos de mosquitos de laboratório. Brevemente, os mosquitos são mergulhados por 1 min em etanol 70% (v/v) para assepsia da sua superfície externa e enxaguados duas vezes com tampão fosfato-salino estéril PBS 1X por 2 min. Em seguida, os intestinos são coletados em PBS 1X com o auxílio de um microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss) (Figura 12). Neste caso, a homogeneização dos intestinos foi realizada com o auxílio de um pistilo e individualmente. Posteriormente, os intestinos-médios foram transferidos para microtubos de polipropileno (1 intestino por tubo) com 500  $\mu$ l de PBS e homogeneizados por 30 segundos com o auxílio de um pistilo. Os tubos foram armazenados à  $-20^{\circ}\text{C}$  e preservados para posterior plaqueamento dos mesmos.



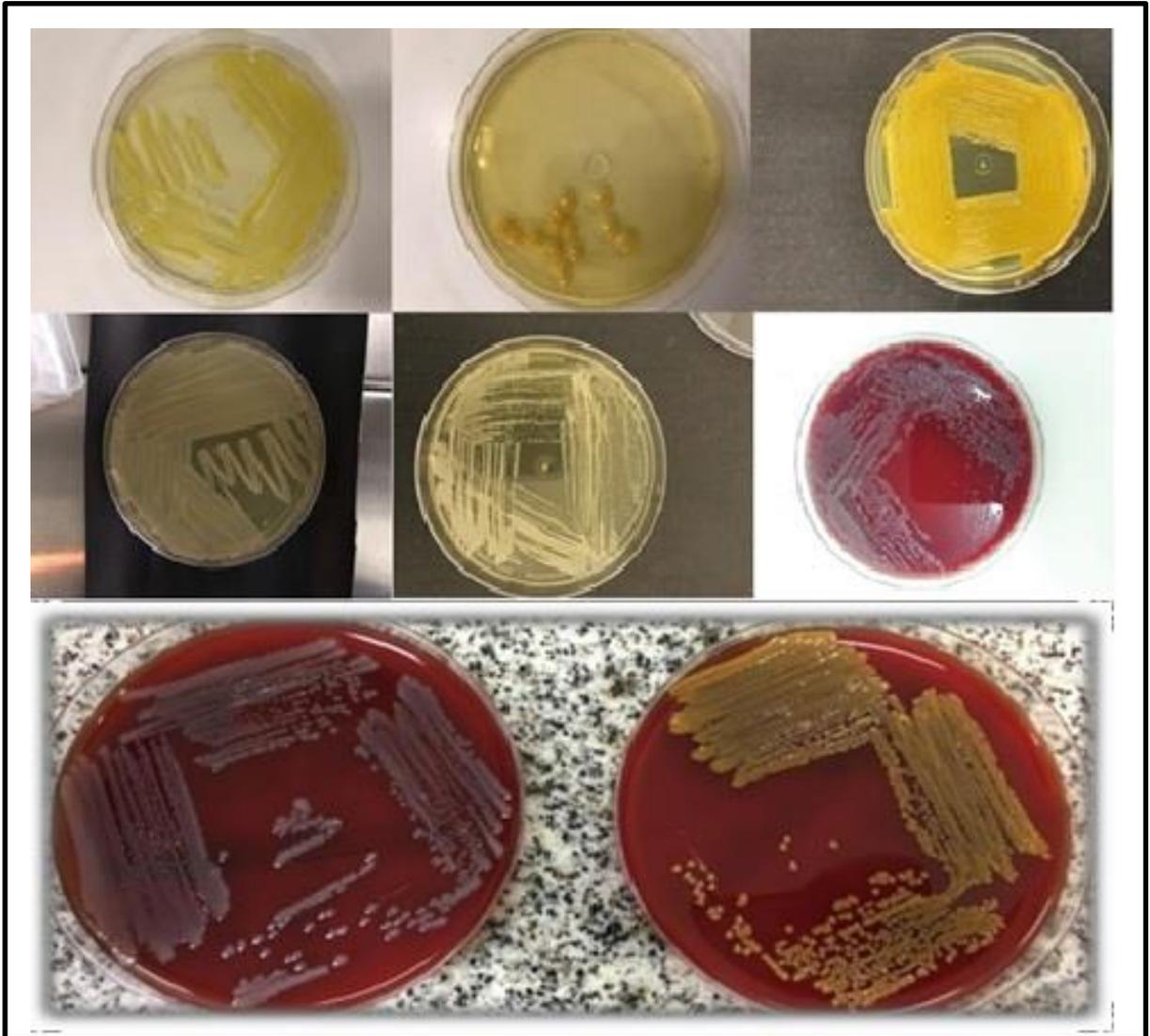
**Figura 12:** Dissecção do Ovários, túbulos de Malpighi e intestinos médio e posterior do mosquito *Ae. aegypti*. A seta branca indica o intestino médio do mosquito.

Fonte: Acervo Vectomics

### 3.4 Cultivo e Isolamento bacteriano

Em todos os isolamentos bacterianos foram realizados em placa de Petri de 9 cm de diâmetro (90mmx15mm) com os seguintes meios de cultivo para bactéria: Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI), Ágar Sangue de carneiro (AS) (Tripcase Soja + 5% de sangue de carneiro) e Lúria bertani (LB), todos da fabricante KASVI. Para impedir o crescimento de fungos, nestes meios de cultivo foram adicionados Anfotericina B a 2,5 µg/mL fluconazol. Os meios de cultivo foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Todos os meios de cultivo, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave à temperatura de 127°C por 15 min. As bactérias cultiváveis isoladas foram semeadas colocando 10µl de solução homogeneizada (500µl PBS 1X + 1 intestino médio) nos meios de cultura citados acima e mantidas em uma incubadora (Shel Lab) a 28°C durante 72 horas. Em seguida, as colônias puras e mais representativas foram colhidas e isoladas com o auxílio de uma alça de platina, por meio da técnica do esgotamento por estrias cruzadas, assim foram obtidas colônias puras cultivadas nas mesmas condições mencionadas acima (Figura 13). Colônias isoladas foram selecionadas e cultivadas em caldo BHI sem Anfotericina mantido por 200 rpm a 28°C entre 24 e 72h. Para o estoque das amostras foram confeccionadas alíquotas de 1ml com

150µl de glicerol estéril e mantidas a -80°.



**Figura 13:** Isolamento bacteriano por esgotamento de estrias cruzadas em Ágar BHI, Ágar LB e Ágar Sangue.

Fonte: Acervo autor

### **3.5 Identificação bacteriana pelo método Gram**

Inicialmente, os isolados bacterianos foram submetidos ao método de coloração de Gram, conforme descrito no Anexo 1. O método de coloração de Gram é uma etapa fundamental na caracterização e classificação inicial das bactérias, pois essa técnica é utilizada para corar bactérias com base na composição química e integridade da sua parede celular (GRAM, 1884). As bactérias coram-se de roxo ou de rosa e respectivamente são classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas. Uma gota de água deionizada (10 µL), foi colocada sobre uma lâmina de vidro e com auxílio de uma alça bacteriológica foi retirada uma colônia bacteriana de culturas crescidas em placa de Petri e, em seguida, cada colônia foi friccionada para homogeneização sobre uma lâmina com água. Posteriormente, a amostra foi passada em chama 3 vezes até a fixação. Cobriu-se então a lâmina com cristal violeta por 1 minuto e lavou-se imediatamente em água corrente. Em seguida, cobriu-se a lâmina com lugol por 2 minutos, lavou-se novamente com água corrente, assim, a lâmina descorou-se rapidamente com álcool-acetona (1:1); novamente, lavou-se a lâmina; cobriu-se a lâmina com safranina por 30 segundos e, por último, lavou-se a lâmina com água, secou-a e avaliou-se no microscópio óptico (YANO et al., 1991). A coloração de Gram abrange um conjunto de metodologias antes de se chegar à etapa final de leitura da lâmina preparada: envolve a confecção do esfregaço, sua fixação e posteriormente passa pela coloração. Nesta etapa, o corante Cristal Violeta adsorve-se nas células, forma um complexo com o iodo (Lugol) e após a etapa diferencial, com álcool-acetona, as células são coradas com Fucsina de Gram (FREITAS; PICOLI, 2007).

### 3.6 Caracterização molecular

#### 3.6.1 Extração do DNA genômico de bactérias

O DNA genômico das bactérias foi extraído conforme protocolo padrão. Resumidamente, cada uma das bactérias foi inoculada em 5ml de caldo BHI e cultivada sob agitação durante a noite. No dia seguinte, 20 microlitros de cultura bacteriana foram coletadas e plaqueadas em Placa de Petri contendo ágar BHI e deixada na estufa por 24 horas para o crescimento das colônias bacterianas.

Posteriormente cada uma das colônias foram inoculadas em microtubos de 1,5 ml. Coloca-se 200 microlitros de água autoclavada em cada um dos eppendorfs e inocula uma alça contendo a colônia. A mistura foi homogeneizada. E posteriormente foi aquecida a 95°C por 10 minutos e logo em seguida ao gelo por 10 minutos para haver choque térmico. Deve-se manter as amostras em -20°C. Utiliza-se dois microlitros para a reação de PCR.

#### 3.6.2 Amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA bacteriano

As reações de PCR (25 µL) foram realizadas de acordo com a tabela 1, com iniciadores universais para bactérias descritos por Hayashi et al. (2005) como na tabela 2.

**Tabela 1:** Reação de PCR utilizando DNA extraído de culturas pura.

MIX	1X
Gotaq colorless	12,5 µL
Primer 27F	1,0 µL
Primer 1492R	1,0 µL
Água	8,5 µL
DNA	2,5 µL
<b>Total</b>	<b>25 µL</b>

**Tabela 2:** Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação da região 16S rDNA das estirpes bacterianas isoladas do intestino do mosquito *Ae. aegypti*.

Iniciador	Sequência
27F	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
1492R	5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'

### **3.6.3 Purificação dos produtos da PCR do gene 16S rRNA bacteriano**

As bibliotecas geradas foram purificadas com o sistema de partículas magnéticas, ou *beads* magnéticas (AMPure Agencourt) e um suporte magnético (Magnetic Stand – Life Technologies). A partícula magnética é formada por uma região que se liga ao DNA amplificado e outra que é atraída por magnetismo. Ao homogeneizar as partículas com o material amplificado, todo o DNA é ligado a elas. Em seguida, a placa contendo o homogeneizado é posicionada sobre o suporte magnético de modo que as partículas se agrupam na parede do recipiente formando um *pellet*. Nesta etapa, todo o sobrenadante é descartado e duas lavagens com 200 µl álcool 70% foram realizadas. Para a dissociação do DNA das partículas magnéticas foi adicionado 40 µl de água *nuclease free* (Invitrogen) ao *pellet*.

### **3.6.4 Quantificação dos produtos de PCR do gene 16S rRNA bacteriano e Sequenciamento Sanger**

As análises quantitativas foram feitas por densidade ótica e espectrofotômetro (NanoDrop MD-1000 UV-Vis). Os fragmentos amplificados foram sequenciados por sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 – Applied Biosystems), no Instituto de Biotecnologia (IBTEC/UNESP) em Botucatu e comparados com as sequências depositadas no GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências de DNA selecionadas para análise foram alinhadas no programa Mega 7 pelo MUSCLE. Disponível no site [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net) para download. O alinhamento foi corrigido manualmente. Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o método de máxima parcimônia (MP) e para medir o grau de confiabilidade da árvore filogenética gerada foi utilizado o teste de Bootstrap com mil repetições.

## **3.7 Bioensaios**

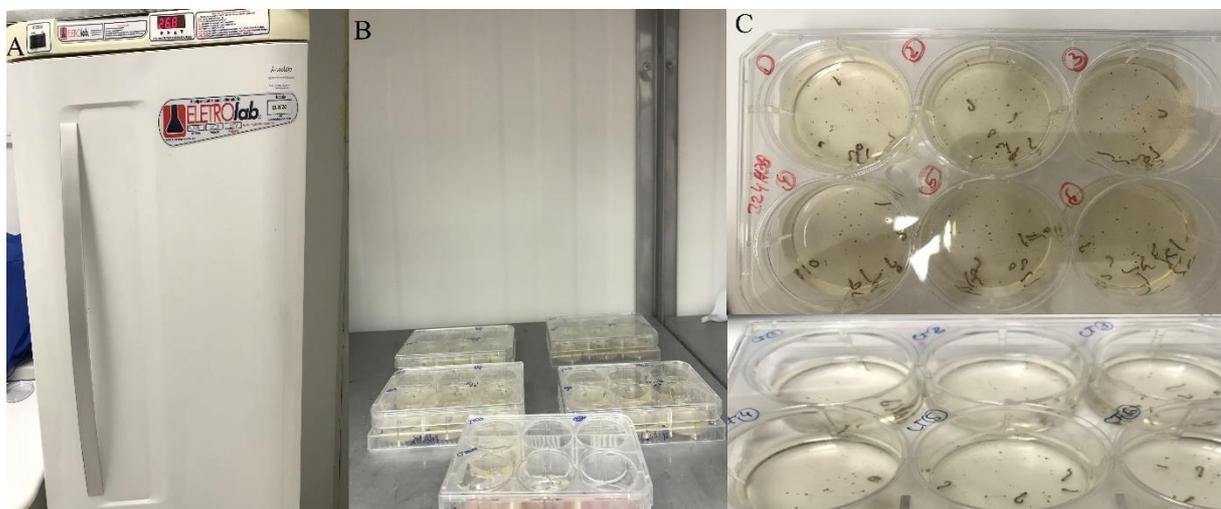
### **3.7.1 Bioensaios seletivos para larvas de *Aedes aegypti***

Foram utilizados 26 isolados bacterianos, cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion), no qual 50 µL de células bacterianas foi colocada em 6 ml do respectivo meio e incubadas em estufa agitadora à 200 rpm, a 30° C durante 48 horas. Em seguida, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min em 25° C, sedimentadas e lavadas duas

vezes com PBS 1X. Os peletes foram suspensos em 6 ml de PBS 1X, utilizou-se 1 ml da suspensão para leitura de DO e posteriormente as suspensões bacterianas foram ajustadas para  $DO_{600} = 1.0$ .

Os bioensaios seletivos foram conduzidos no laboratório VECTOMICS, sob condições controladas de temperatura ( $T = 28^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $UR = 85 \pm 5\%$ ) e fotoperíodo de 12 h, em uma incubadora modelo EL202/3 ELETROlab® (Figura 14 A). Para cada bactéria, o bioensaio foi realizado em triplicata e em três períodos diferentes, para isso utilizou-se placas de cultura celular de poliestireno estéreis com diâmetro de 34,5 mm, 5 ml de cultura bacteriana resuspendida em PBS 1X, 10 larvas de segundo estágio e 50  $\mu\text{L}$  de alimento líquido autoclavado (10 ml de água + 0,5 g de comida de peixe Tetramin®) e o controle negativo contendo 5ml de PBS 1X, sem inoculação de bactérias (Figura 14 B e C). O controle foi testado nas mesmas condições que o tratamento. Após a aplicação da bactéria, foram realizadas leituras de mortalidade das larvas em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas. As larvas foram consideradas mortas quando houve a ausência total de movimento.

Os isolados que tiveram o percentual de mortalidade igual ou superior a 50% foram selecionadas para a realização do bioensaio de dose.



**Figura 14:** A: Incubadora do bioensaio Eletrolab. B: Placas contendo o bioensaio para ser armazenado. C: Placas contendo bioensaio com bactérias e controle negativo.

Fonte: Acervo autor

### **3.7.2 Bioensaio de dose letal (DL<sub>50</sub>) contra larvas de *Ae. aegypti* (Rockefeller)**

Para determinação da DL<sub>50</sub>, para cada bactéria selecionada no bioensaio seletivo, foram testadas três concentrações de DO<sub>600</sub> (0,5; 1,0; 2,0). Cada concentração foi testada em triplicata e em três momentos diferentes. Para isso utilizou-se placas de cultura celular de poliestireno estéreis com diâmetro de 34,5mm, 5 ml de cultura bacteriana resuspendida em PBS 1X, 10 larvas de segundo estágio e 50 µL de alimento líquido autoclavado (10 ml de água + 0,5 g de comida de peixe Tetramin®) e o controle negativo contendo 5ml de PBS 1X, sem inoculação de bactérias. O controle foi testado nas mesmas condições que o tratamento. Após a aplicação da bactéria, foram realizadas leituras de mortalidade das larvas em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas, e determinou-se a DL<sub>50</sub> (dose letal necessária a matar 50% das larvas testadas). As larvas foram consideradas mortas quando houve a ausência total de movimento.

### **3.8 Análise de dados**

Os resultados foram analisados pelo teste de Student (t) pareado, considerando o intervalo de confiança  $p < 0,05$ , para a análise da significância estatística entre o grupo teste e o grupo controle. Já o desvio padrão foi calculado através da média dos experimentos. O programa GraphPad Prism, versão 9.0, foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos.

O cálculo da dose letal para matar 50% da população larval de cada análise (DL<sub>50</sub>), foi realizada com a utilização do programa Excel. Não houve a necessidade da correção dos dados pela fórmula de Abbott (1925).

## **4 Resultados**

### **4.1 Isolamentos bacterianos obtidos dos intestinos dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados em Avaré e Botucatu/SP.**

Neste estudo, dezesseis mosquitos adultos foram coletados com sucesso em pontos estratégicos nas cidades de Avaré e Botucatu/SP, e dissecados ainda vivos. Sendo 87,5% dos coletados, da espécie *Ae. aegypti* e 12,5% da espécie *Ae. albopictus*. Sete fêmeas adultas do laboratório também foram dissecadas após o tratamento com antibióticos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Dados da coleta de amostra de campo e laboratório.

Número da amostra	Data	Código da amostra	Cidade	Espécies de mosquito	Localização
1	24/02/2014	1 A	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Tire Repair - Joaquim Lyra Brandão # 794
2	24/02/2014	1 B	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Tire Repair - Joaquim Lyra Brandão # 794
3	24/02/2014	1 C	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Tire Repair - Joaquim Lyra Brandão # 794
4	24/02/2014	2 A	Botucatu	<i>Aedes albopictus</i> female	Departamento de Estradas e Rodagens (DER) - Rodovia Marechal Rodon, km 248
5	24/02/2014	2 B	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Departamento de Estradas e Rodagens (DER) - Rodovia Marechal Rodon, km 248
6	24/02/2014	2 C	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> male	Departamento de Estradas e Rodagens (DER) - Rodovia Marechal Rodon, km 248
7	24/02/2014	3 A	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Recycling point – Avenida Paula Vieira # 601
8	24/02/2014	4 A	Botucatu	<i>Aedes albopictus</i> female	Used municipal tire storage shed - Benjamin Constant # 228
9	28/05/2014	5 B	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Recycling point – Avenida Paula Vieira # 255
10	28/05/2014	5 D	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Recycling point – Avenida Paula Vieira # 255
11	28/05/2014	5 F	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Recycling point – Avenida Paula Vieira # 255
12	28/05/2014	7 A	Botucatu	<i>Aedes aegypti</i> female	Tire Repair - Dr. Jaguaribe # 690
13	28/05/2014	AV 1	Avaré	<i>Aedes aegypti</i> male	Tire Repair - Joselyr Moura Bastos # 52
14	28/05/2014	AV 2	Avaré	<i>Aedes aegypti</i> female	Tire Repair – Dr. Antônio Silva Cunha Bueno #101
15	28/05/2014	AV 3	Avaré	<i>Aedes aegypti</i> female	Tire Repair – Itaberá # 97

16	28/05/2014	AV 6	Avaré	<i>Aedes aegypti</i> male	Tire Repair – Milão # 300
17	Jun/2014	1 -F Réplica 2 - 7dias AB -1	PAE Laboratory Strain	<i>Aedes aegypti</i> female	----- -----
18	Jun/2014	2 -F Réplica 2 - 7 dias AB -1 - 2	PAE Laboratory Strain	<i>Aedes aegypti</i> female	----- -----
19	Jun/2014	5 -F Réplica 2 24h - AB - 3 - B	PAE Laboratory Strain	<i>Aedes aegypti</i> female	----- -----
20	Jun/2014	6 -F Réplica 2 24h - AB	PAE Laboratory Strain	<i>Aedes aegypti</i> female	----- -----
21	Jun/2014	7 -F Pool 4 dias AB	PAE Laboratory Strain	<i>Aedes aegypti</i> female	----- -----
22	Jun/2014	R2-1 -F	PAE Laboratory Strain	<i>Aedes aegypti</i> female	----- -----
23	Jun/2014	R4-1 -F	PAE Laboratory Strain	<i>Aedes aegypti</i> female	----- -----

Foram isoladas, um total de 26 colônias bacterianas cultiváveis, de todas as amostras deste estudo, no ano de 2014. Em relação aos diferentes meios de cultivo, utilizados em nosso trabalho, não foram observadas preferências quanto ao crescimento das bactérias por um meio específico. Por esse motivo, tanto os meios Ágar Sangue (AS), Ágar BHI e Ágar LB, foram utilizados em todos os procedimentos depois do isolamento bacteriano.

#### 4.2 Teste de coloração GRAM

Dos mosquitos coletados, foram isoladas 26 diferentes colônias bacterianas cultiváveis, sendo utilizado um dos métodos fenotípicos para serem identificadas, a coloração de gram. As colônias bacterianas foram observadas através da coloração da sua parede celular. Obteve-se como resultado, 12 amostras Gram-negativas, correspondendo a 46,15% dos isolados e 14 amostras Gram-positivas, correspondendo a 53,85% dos isolados (Tabela 4).

**Tabela 4:** Identificação pelo método Gram das bactérias intestinais isoladas.

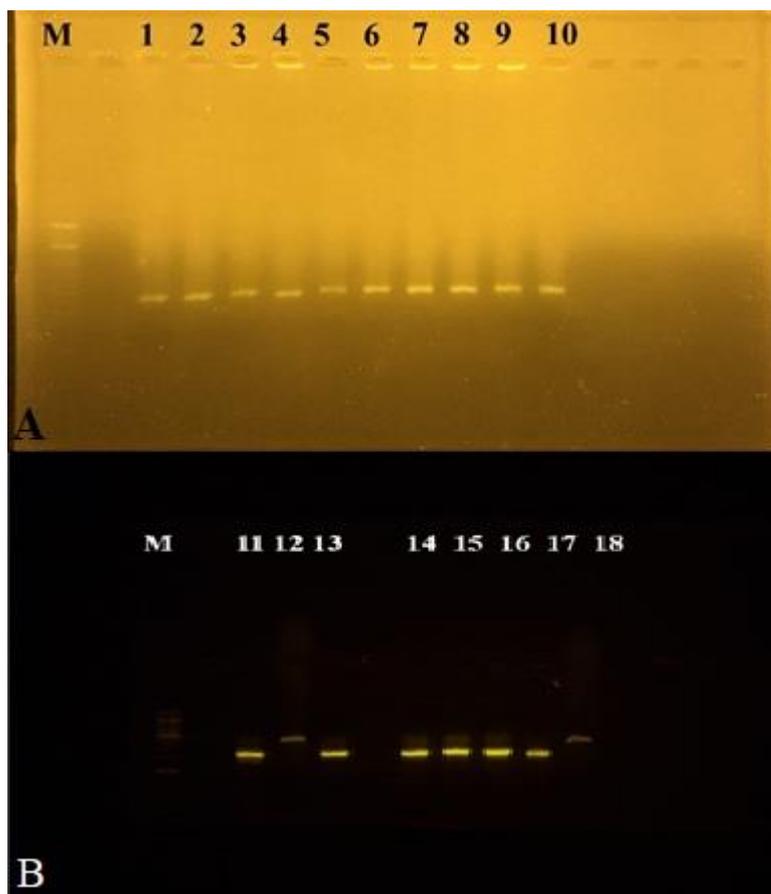
<b>Amostra</b>	<b>Gram</b>	<b>Amostra</b>	<b>Gram</b>
1	-	14	+
2	+	15	-
3	+	16	-
4	+	17	+
5	+	18	-
6	+	19	-
7	+	20	-
8	+	21	-
9	+	22	-
10	+	23	-
11	+	24	-
12	+	25	-
13	+	26	-

A identificação de espécies microbianas por métodos fenotípicos pode ser incerta, complicada e demorada, e a utilização de métodos moleculares revolucionou a sua identificação, melhorando a rapidez, a qualidade e a eficácia desta identificação (DELLAGLIO et al., 1991).

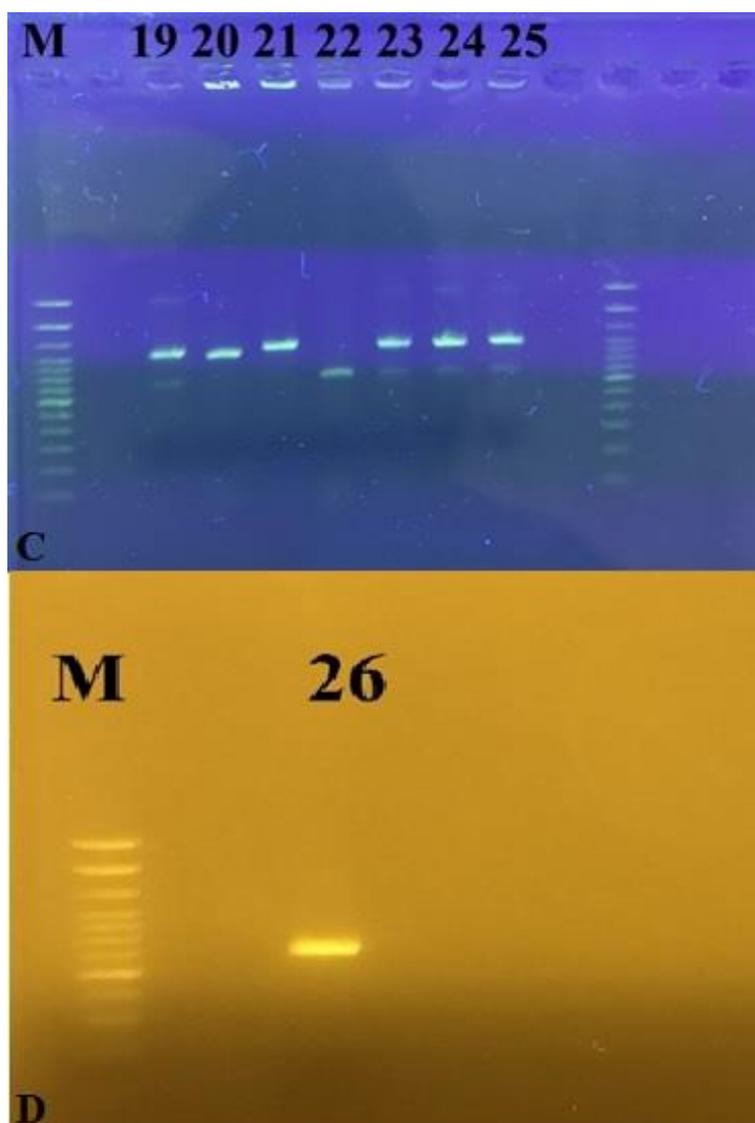
### 4.3 Amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA bacteriano

Após o teste de coloração gram dos isolados bacterianos foi procedida a caracterização molecular dos mesmos através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. A extração de DNA das amostras bacterianas foram quantificadas e ajustadas para a reação de PCR descrito no item 3.5.4.

O DNA genômico dos isolados foi extraído e avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose. O aparecimento de uma única banda íntegra indica que o processo de extração do DNA foi bem-sucedido e o mesmo não se encontra degradado como mostrado nas Figuras 15 e 16. Posteriormente, uma alíquota do DNA genômico foi utilizado para amplificar a região 16S rRNA (~1.5 kb), o fragmento molecular de 1500 (pares de bases) foi comparado com o marcador molecular de peso molecular Ladder 1Kb (Invitrogen). Após essa etapa, as amostras foram purificadas e utilizadas na reação de sequenciamento. Neste trabalho, os 26 isolados bacterianos foram amplificados e identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rDNA.



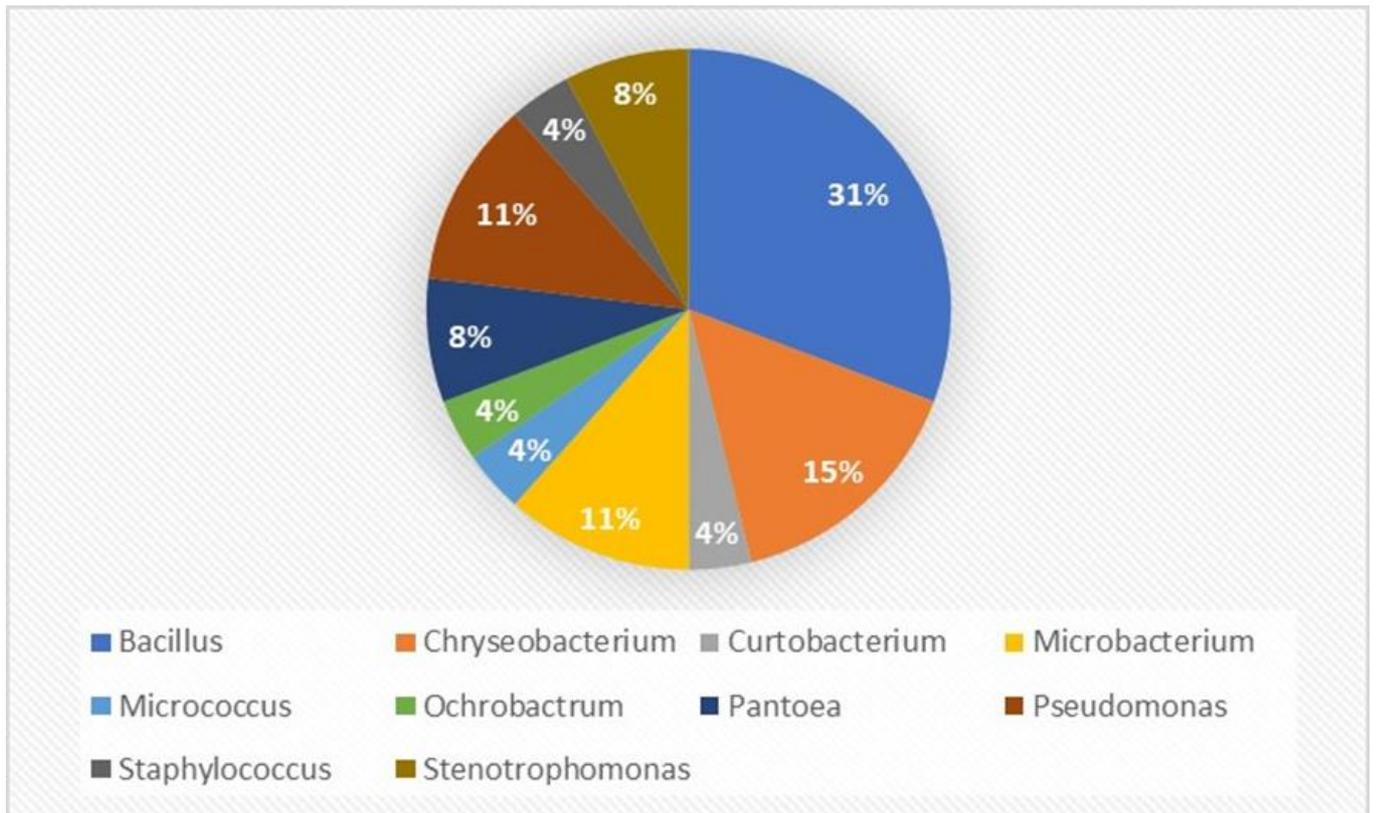
**Figura 15:** Gel de agarose (A e B) 1,0% para confirmação da extração do DNA genômico com amplificação do fragmento de 1500 pb do 16 S rRNA. M: marcador de peso molecular; 1: 1: A3-1; 2: 1A 4-2; 3: 1A 5-1; 4: 1B1-1; 5: 1B1-2; 6: 1B1-3; 7: 1B2-2; 8: 1C1-1; 9: 1C-3;10: 5F3; 11: 4A 1; 12: 5B1; 13: 5D1; 14: 5D2; 15: 7A 1; 16: AV1; 17: AV2; 18: AV3.



**Figura 16:** Gel de agarose (C e D) 1,0% para confirmação da extração do DNA genômico com amplificação do fragmento de 1500 pb do 16S rRNA. M: marcador de peso molecular; 19: AV6; 20: 27D1 ; 21: 27D1-2; 22: 224H3B; 23: 224H; 24: POOL 4D; 25: R2-1; 26: R4-1

#### 4.4 Identificação molecular das bactérias pelo sequenciamento Sanger

Na identificação molecular foi possível caracterizar 10 gêneros distintos como: *Bacillus* sp., *Chryseobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Ochrobactrum* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp. (Figura 17). Sendo predominante o gênero *Bacillus*, correspondendo a 31% dos isolados bacterianos e em seguida o gênero *Chryseobacterium* correspondendo a 15% dos isolados.

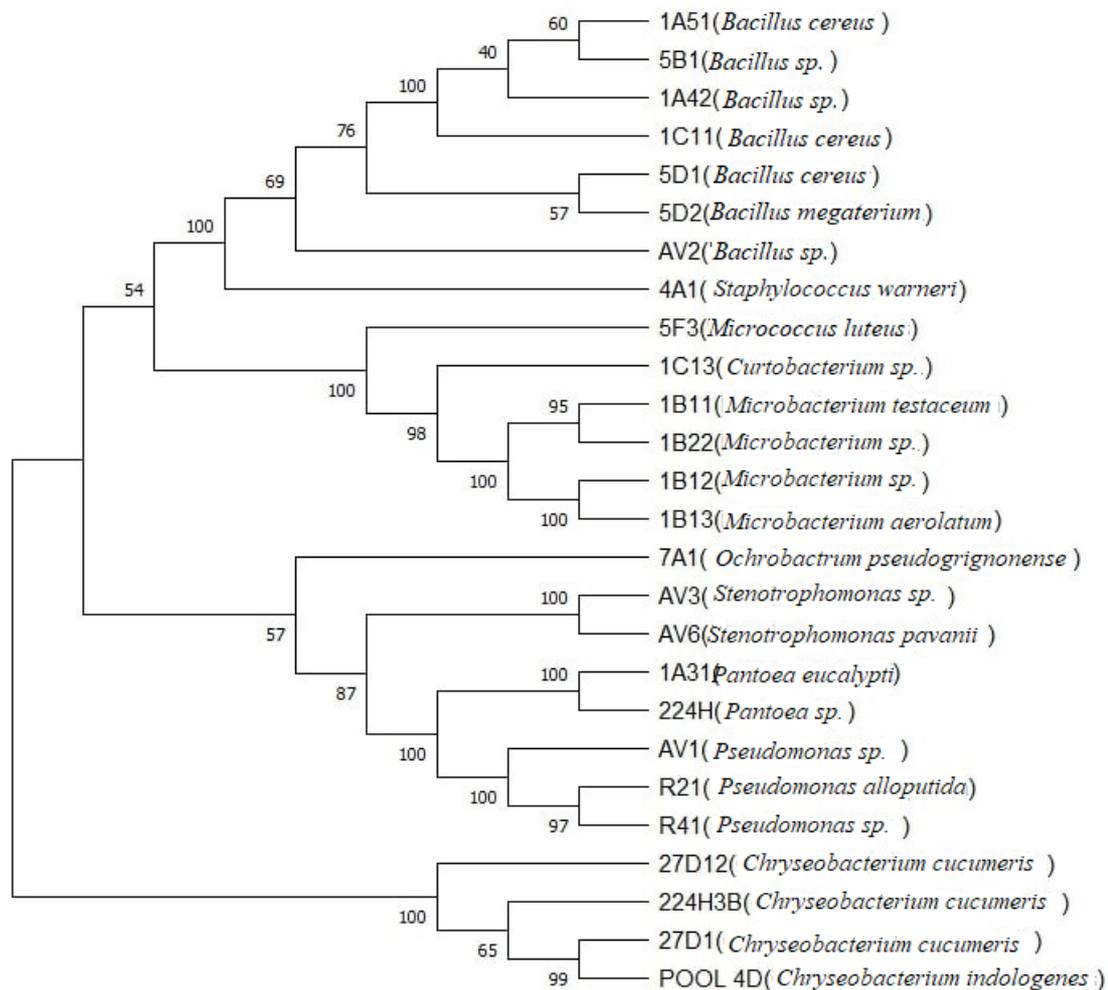


**Figura 17:** Representação dos gêneros com base na identificação bacteriana.

O sequenciamento do gene 16S rDNA é frequentemente utilizado como método alternativo para definir o nível de espécies em bactérias (YAMADA, 1977; WOESE, 1978). Para a identificação dos isolados bacterianos, com base na sequência do 16S rRNA obtida após o sequenciamento, realizou-se uma pesquisa no NCBI utilizando o programa BLAST, cuja comparação ocorreu entre os dados obtidos neste trabalho com os já existentes no banco de dados, assumindo-se o percentual de confiança para identidade bacteriana (ID) a partir de 93% a 100%. Com base nas buscas por similaridade de sequências através do banco de dados, os isolados foram identificados como *Bacillus cereus* (3 isolados), *Bacillus megaterium* (1 isolado), *Bacillus sp.* (3 isolados), *Chryseobacterium cucumeris* (3 isolados), *Chryseobacterium indologenes* (1 isolado), *Curtobacterium sp.* (1 isolado), *Microbacterium aerolatum* (1 isolado), *Microbacterium sp.* (2 isolados), *Microbacterium testaceum* (1 isolado), *Micrococcus luteus* (1 isolado), *Ochrobactrum pseudogrignonense* (1 isolado), *Pantoea eucalypti* (1 isolado), *Pantoea sp.* (1 isolado), *Pseudomonas alloputida* (1 isolado), *Pseudomonas sp.* (2 isolados), *Staphylococcus warneri* (1 isolado), *Stenotrophomonas pavanii* (1 isolado), *Stenotrophomonas sp.* (1 isolado) (Tabela 5). A análise filogenética de 16S rRNA dos genes também mostram essa identificação, além da similaridade bacteriana (Figura 18).

**Tabela 5:** Identificação molecular dos isolados bacterianos, obtidos pelo sequenciamento Sanger da região 16S rDNA.

<b>Amostra</b>	<b>Identificação</b>	<b>Espécie de mosquito</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
1A 3-1	<i>Pantoea eucalypti</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	98%	95,87%
1A 4-2	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	98%	100%
1A 5-1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	96%	99,85%
1B1-1	<i>Microbacterium testaceum</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	96%	99,70%
1B1-2	<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	99,7%
1B1-3	<i>Microbacterium aerolatum</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	96%	99,56%
1B2-2	<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	99,55%
1C1-1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	100%
1C1-3	<i>Curtobacterium sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	96%	99,85%
5F3	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	98%	99,56%
4A 1	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Ae.albopictus</i> fêmea	97%	100%
5B1	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	99,57%
5D1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	99,57%
5D2	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	96%	100%
7A 1	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	99,70%
AV1	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> macho	95%	99,71%
AV2	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	95%	100%
AV3	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	95%	95,01%
AV6	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	93%	96,57%
27D1	<i>Chryseobacterium cucumeris</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	98%	100%
27D1-2	<i>Chryseobacterium cucumeris</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	97,0%
224H3B	<i>Chryseobacterium cucumeris</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	95%	100%
224H	<i>Pantoea sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	91,91%
POOL 4D	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	98%	100%
R2-1	<i>Pseudomonas alloputida</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	97%	99,42%
R4-1	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Ae.aegypti</i> fêmea	96%	99,85%



**Figura 18:** Análise filogenética do sequenciamento da região do gene 16S rRNA do isolado bacteriano de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. A linha horizontal refere-se à distância genética. Os números dos nós referem-se aos valores estimados de apoio com 1000 réplicas de bootstrap.

#### 4.5 Bioensaio seletivo larvicida com as bactérias intestinais identificadas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Examinamos o efeito das bactérias intestinais dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em relação a mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti*, expondo-as aos 26 isolados identificados. Os resultados dos bioensaios seletivos com os isolados bacterianos sobre larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller estão representados nas figuras 19, onde os gráficos representados não obtiveram mortalidade de larvas acima de 50% e figura 20, onde os gráficos tiveram atividade larvicida acima de 50%..

Dos 26 isolados bacterianos testados para identificar a ação larvicida, três isolados bacterianos (*Bacillus cereus*, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium indologenes*), mostraram potente atividade larvicida sob as larvas de *Ae. aegypti* (Rockefeller), pois apresentaram atividade larvicida acima de 50%. Foi observado que nas primeiras 24 horas, apenas os isolados *Bacillus cereus* (1C1-1) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), apresentaram mortalidade acima de 50%.

Na leitura de 48 horas, os três isolados bacterianos, *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D12) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), já apresentaram mortalidade acima de 50%, sendo os valores aproximadamente de 70%, 50% e 90% respectivamente. Com isso, foi observado a morte das larvas, principalmente nas 72 horas de exposição das larvas ao conteúdo bacteriano.

Os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre o controle e os isolados bacterianos: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterim*, *Bacillus sp.*, *Microbacterium sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pantoea eucalypti*, *Pseudomonas alloputida*, *Pseudomonas sp.* e *Stenotrophomonas sp.* (Figura 19) durante os quatro dias observados. Já para os isolados *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D12) e *Cryseobacterium indologenes* (POOL 4D), a mortalidade observada foi estatisticamente significativa como mostrado nos gráficos da Figura 20. Os demais isolados bacterianos apesar de apresentar diferença significativa em relação ao controle, não apresentaram mortalidade acima de 50% não sendo selecionados para o bioensaio de dose letal (DL<sub>50</sub>).

Analisando os gráficos da Figura 20, podemos verificar que o isolado bacteriano *Bacillus cereus* (1C1-1), causou mortalidade de aproximadamente 70% nas larvas, desde o segundo dia do bioensaio, comparado com o controle tratado apenas com PBS, houve diferença significativa entre o tratamento e o controle. De modo similar, o isolado bacteriano *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) promoveu mortalidade de aproximadamente 90% nas larvas desde o primeiro dia de ensaio, eliminando quase que completamente as larvas até o quarto dia de ensaio, houve diferença significativa nos quatro dias de análise entre o tratamento com o isolado bacteriano e o grupo controle. Já o isolado *Chryseobacterium cucumeris* (27D12), promoveu mortalidade acima de 50% a partir do segundo dia de bioensaio, chegando a obter 80% de mortalidade no último de análise, como mostrado na Figura 20, também apresentando diferença significativa durante os quatro dias de análise quando se comparou o tratamento bacteriano com o grupo controle.

As larvas inoculadas com os isolados bacterianos *Bacillus cereus* (1C1-1) e *Chryseobacterium cucumeris* (27D12), após 24 horas de infecção passaram a se movimentar

um pouco mais devagar, porém continuavam se alimentando; com 48 horas de infecção, as larvas já não se locomoviam naturalmente, só com estímulo do toque com a pinça. Mesmo assim os movimentos eram muito lentos; neste período de infecção as larvas que se mantiveram vivas quase não buscavam mais se alimentar, principalmente. Com 72 horas de infecção as larvas não respondem mais ao toque, e pararam de se alimentar. Após 96 horas de infecção, as larvas estavam mortas em sua grande maioria. Além disso, foi observado ao longo do experimento, canibalismos das larvas mortas quando expostas aos isolados bacterianos. Como resultado do canibalismo, encontramos uma diminuição geral do número de larvas expostas à bactéria nos poços. O número de larvas nos controles, expostos ao PBS, permaneceu constante, e nenhuma redução significativa de larvas foi observada durante os quatro dias de avaliação.

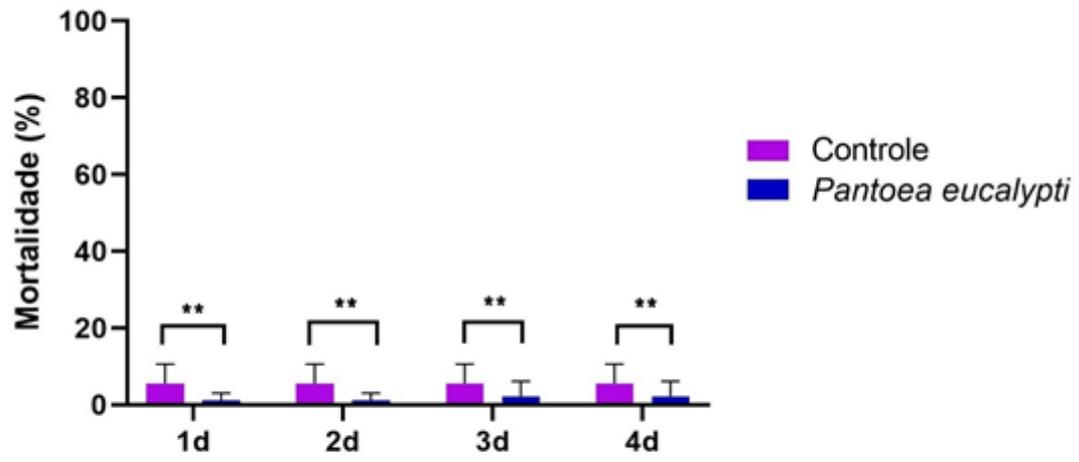
O mesmo não ocorre nos experimentos utilizando os demais isolados bacterianos (Figura 19), nos quais a taxa de mortalidade de todos os isolados não ultrapassa 40%, comparando com o controle tratado apenas com PBS, durante os quatro dias de avaliação. De acordo com a Figura 19, os isolados bacterianos *Bacillus cereus* (1A5-1), *Bacillus megaterium* (5D2), *Bacillus sp.* (1A4-2), *Microbacterium sp.* (1B1-2), e *Microbacterium testeceum* (1B1-1), apresentaram a menor atividade larvicida, matando, em média, uma larva, o que corresponde a até 10% de mortalidade, sendo bactérias que apresentaram pouco potencial larvicida.

Em relação a alguns isolados semelhantes aos que apresentaram mortalidade como, por exemplo, *Bacillus cereus* (1A5-1 e 5D1), *Bacillus megaterium* (5D2), *Bacillus sp.* (1A4-2, 5B1 e AV2) e *Chryseobacterium cucumeris* (27D1 e 224H3B), nos mostra a possibilidade de que as linhagens talvez precisem de mais tempo, aumento da concentração bacteriana e influência de alguns fatores ambientais para demonstrarem sua efetividade.

Os isolados para os quais o índice de mortalidade foi igual ou superior a 50% em 96 horas, foram selecionados para a realização de bioensaios de dose letal ( $DL_{50}$ ).

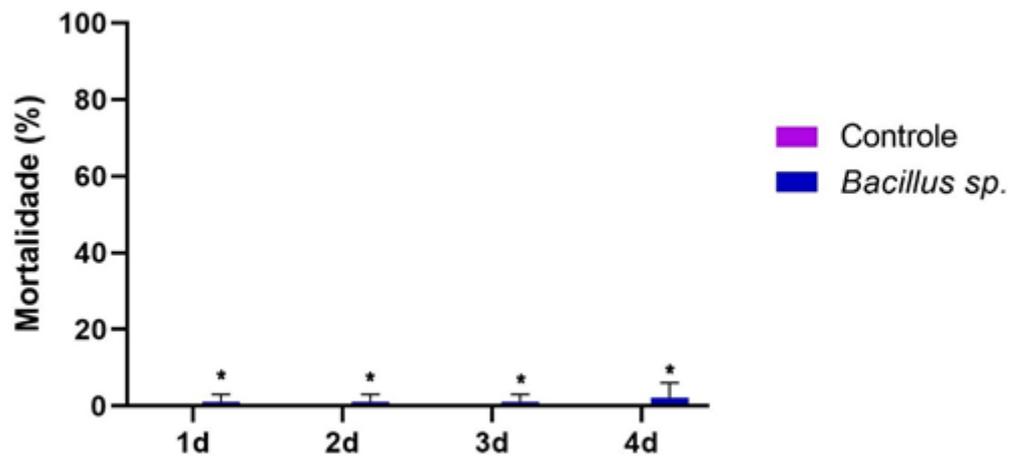
**A**

***Pantoea eucalypti* (1A3-1)**



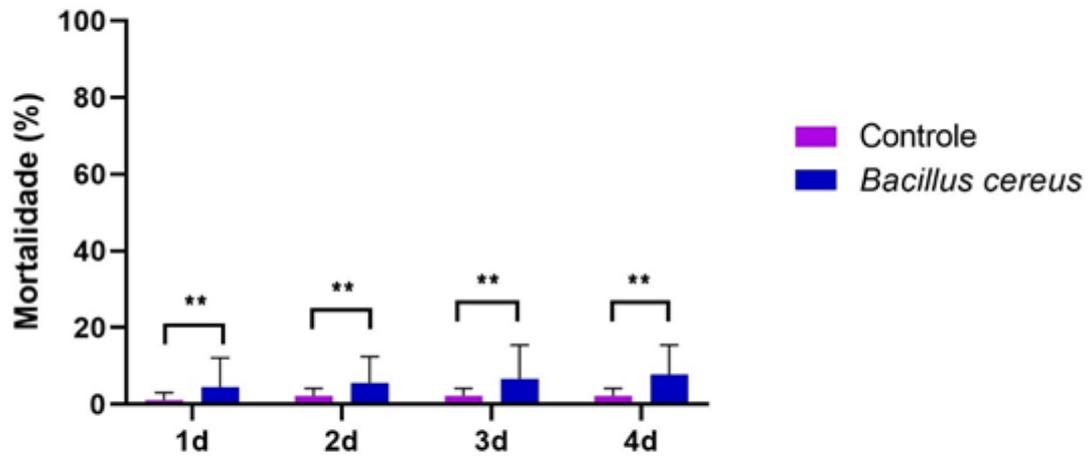
**B**

***Bacillus sp.* (1A4-2)**



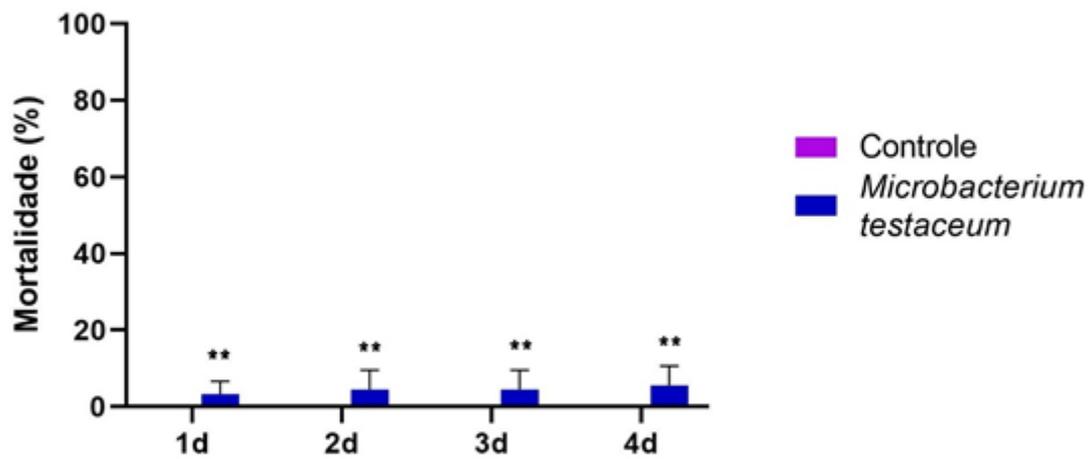
C

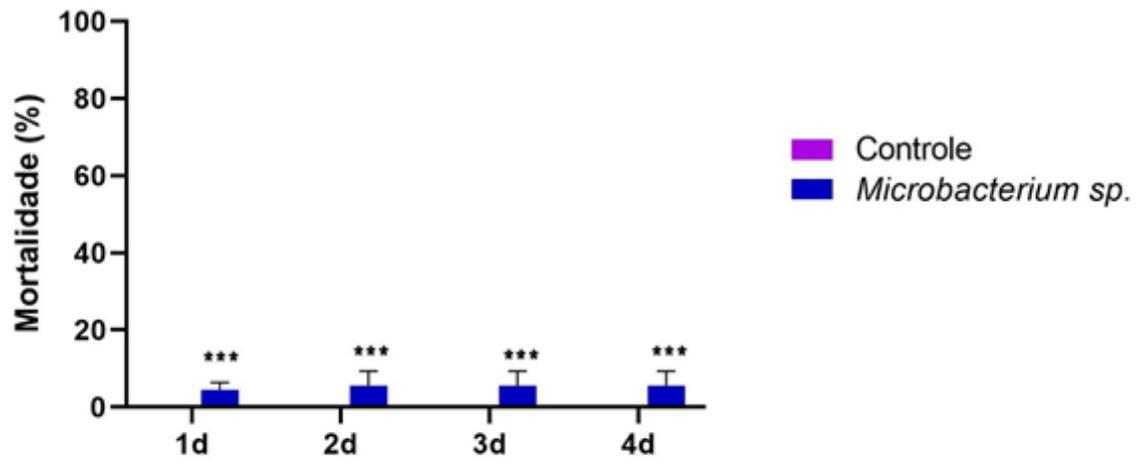
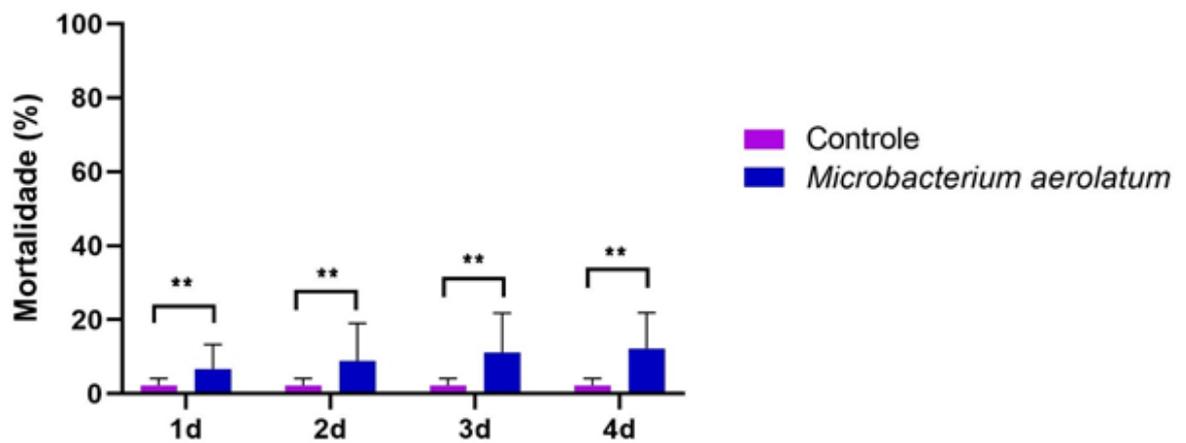
*Bacillus cereus* (1A5-1)

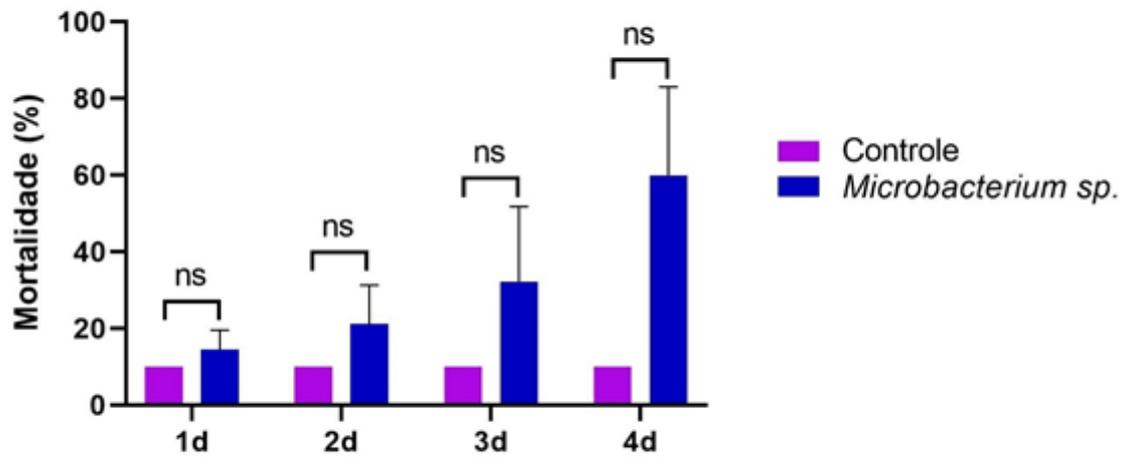
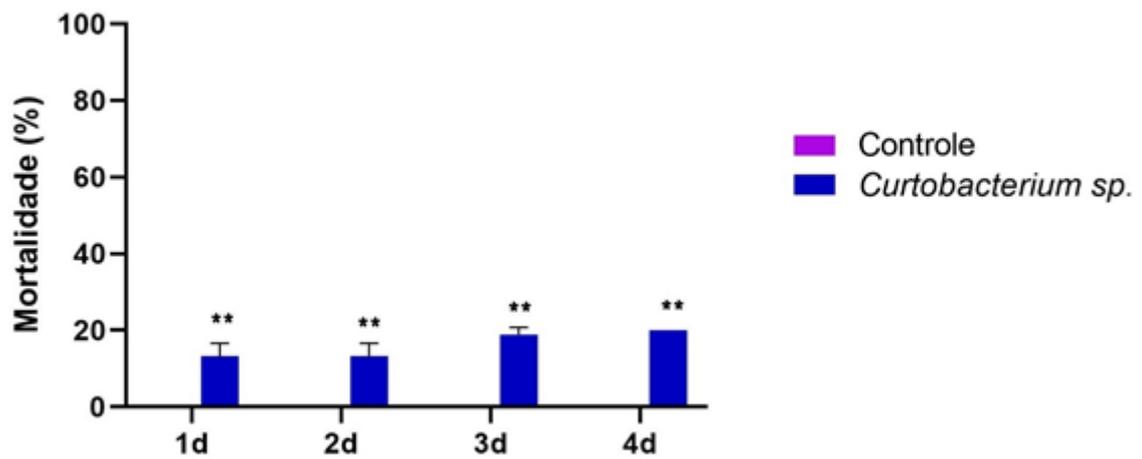


D

*Microbacterium testaceum* (1B1-1)

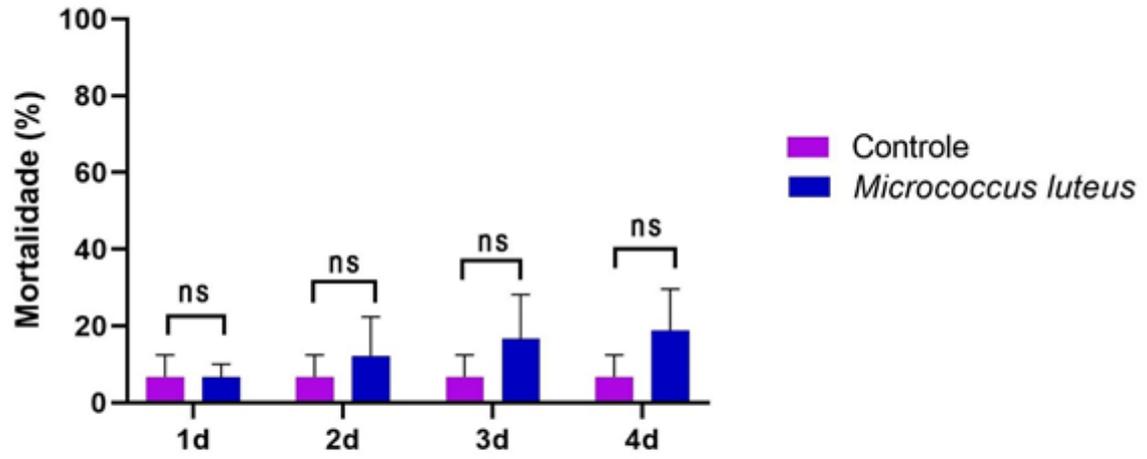


**E*****Microbacterium sp. (1B1-2)*****F*****Microbacterium aerolatum (1B1-3)***

**G*****Microbacterium sp. (1B2-2)*****H*****Curtobacterium sp. (1C1-3)***

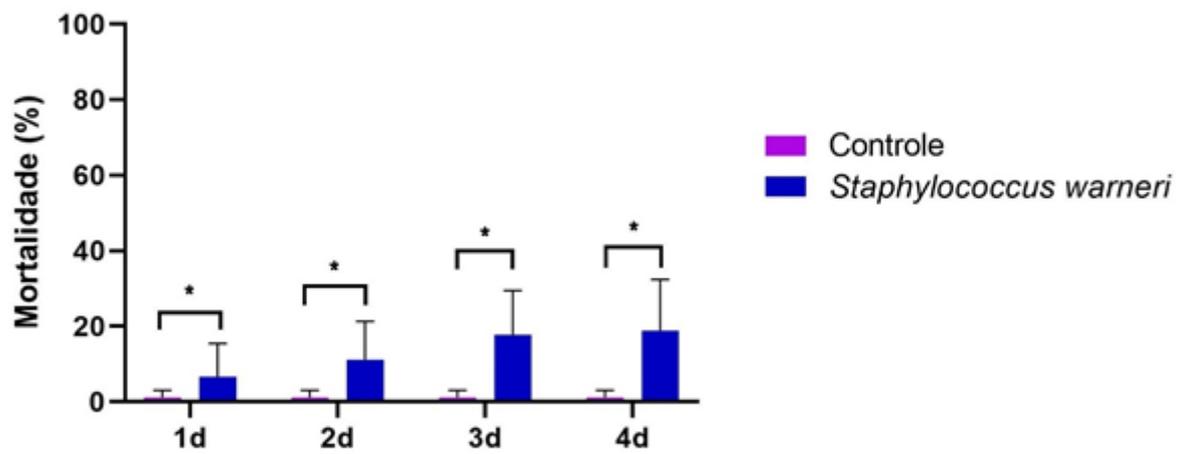
I

### *Micrococcus luteus* (5F3)



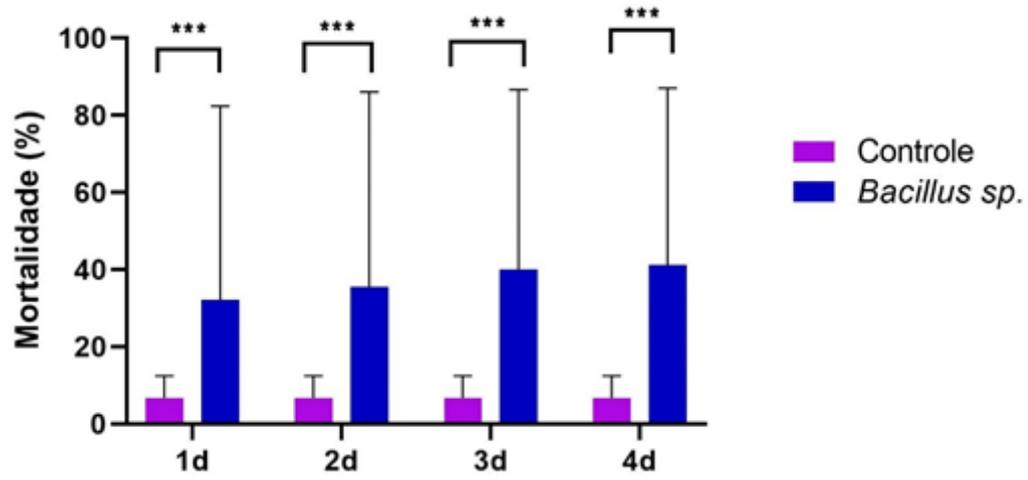
J

### *Staphylococcus warneri* (4A1)



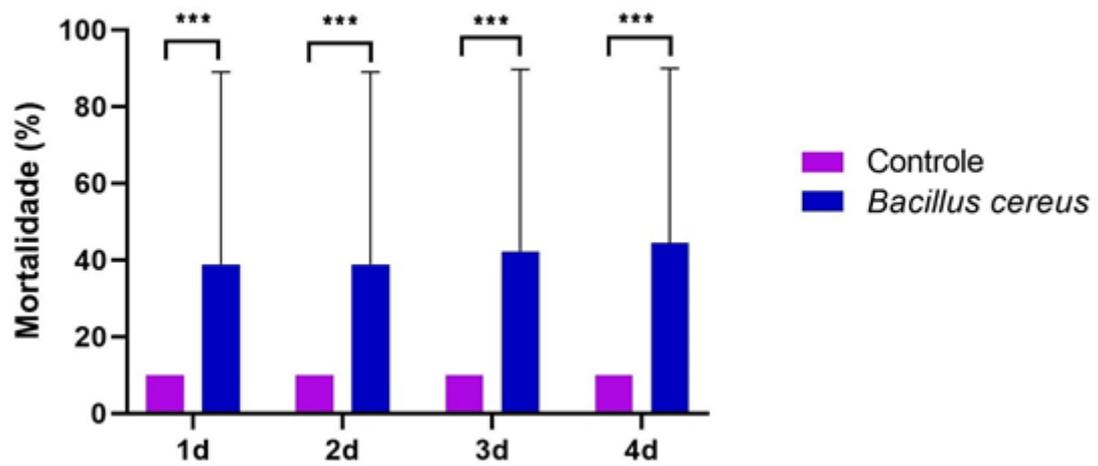
K

*Bacillus sp. (5B1)*



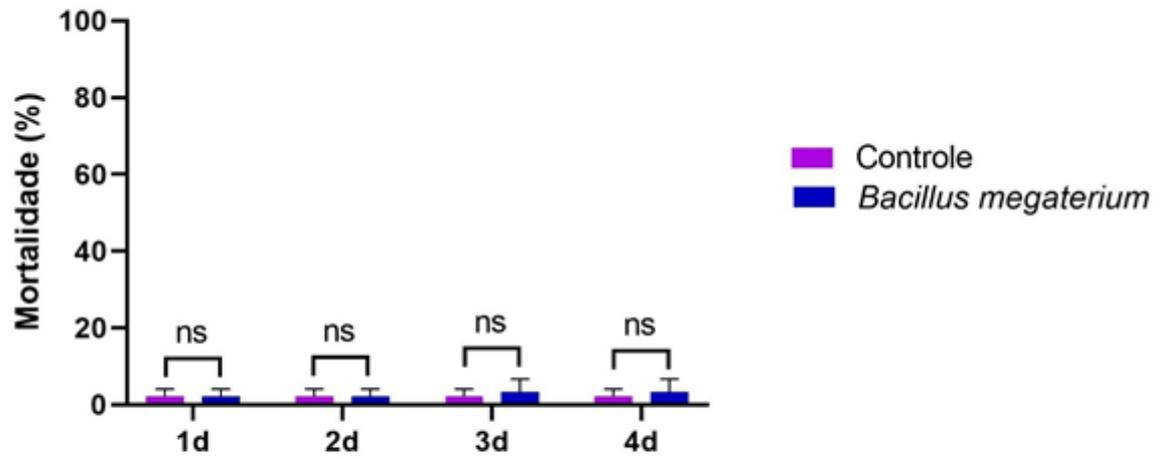
L

*Bacillus cereus (5D1)*



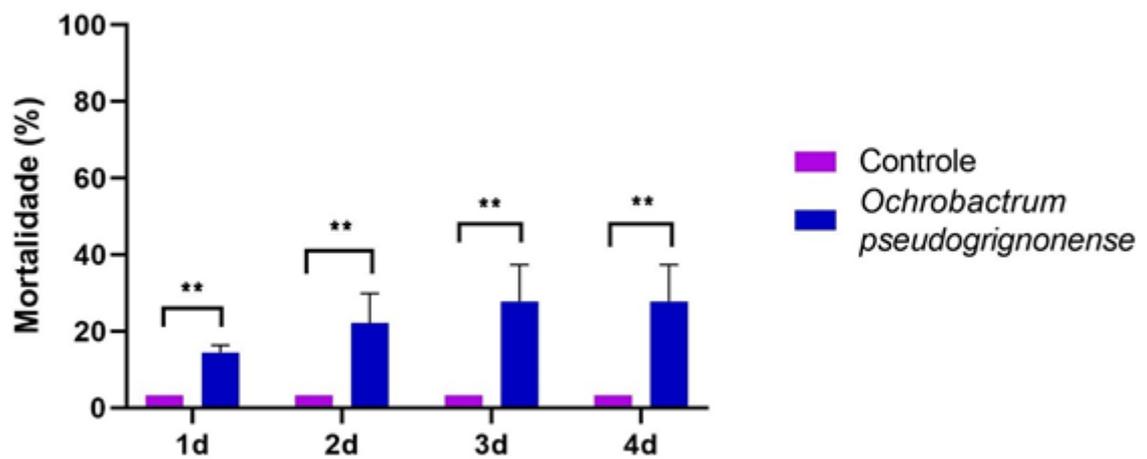
M

***Bacillus megaterium* (5D2)**



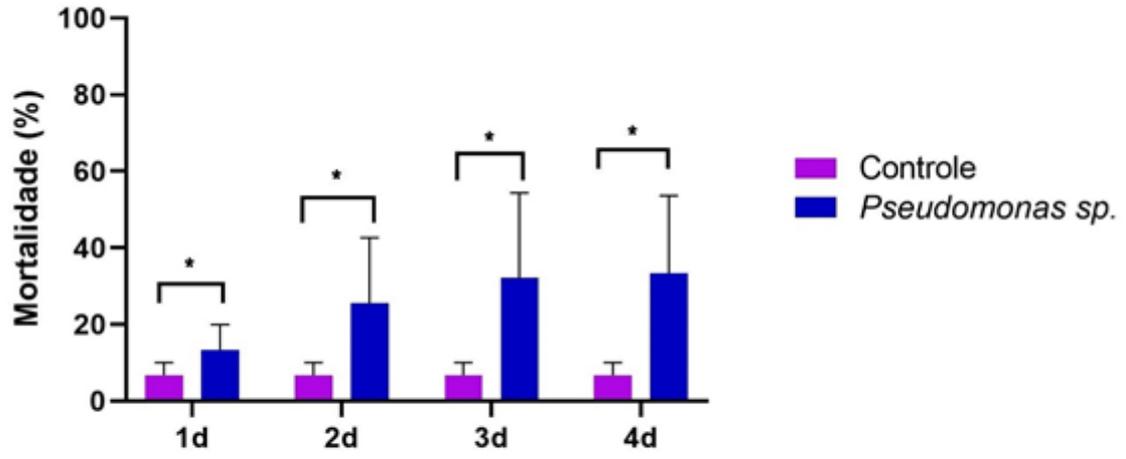
N

***Ochrobactrum pseudogrignonense* (7A1)**



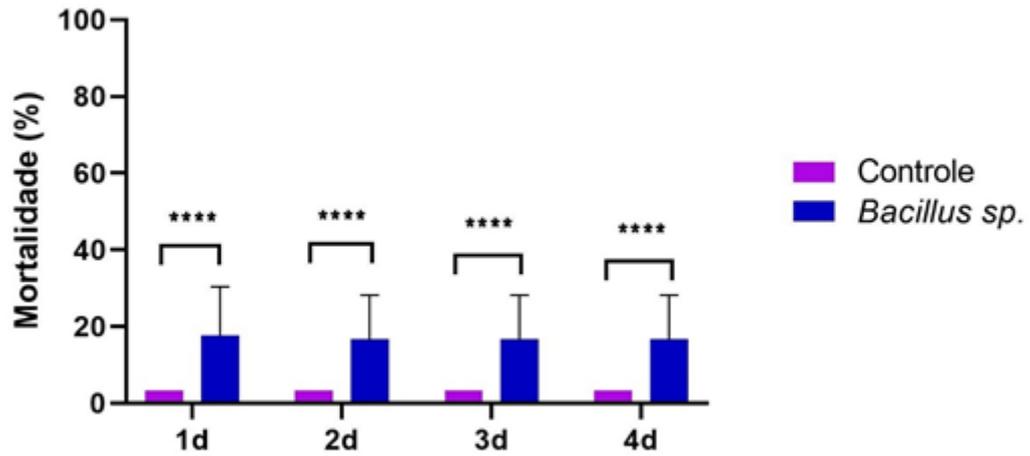
O

*Pseudomonas sp. (AV1)*



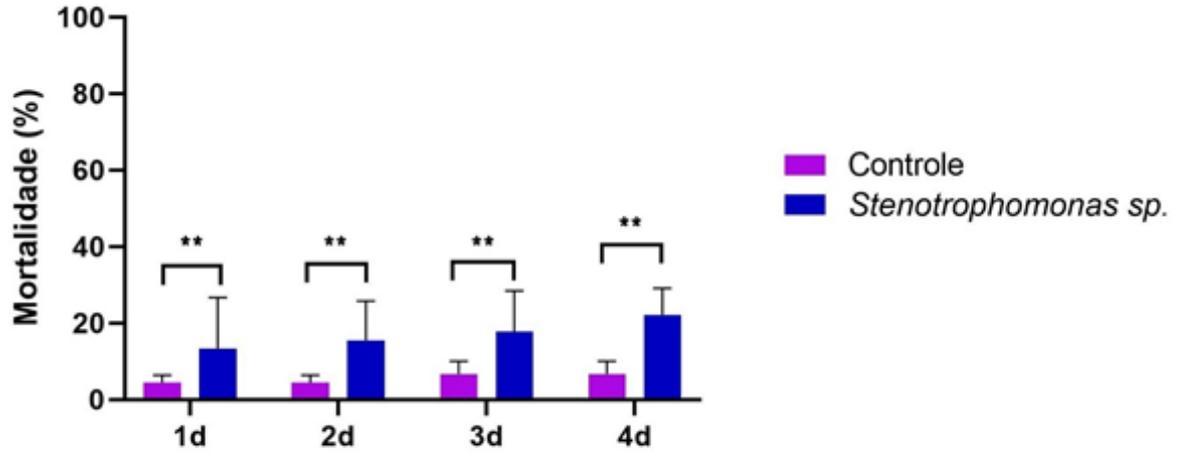
P

*Bacillus sp. (AV2)*



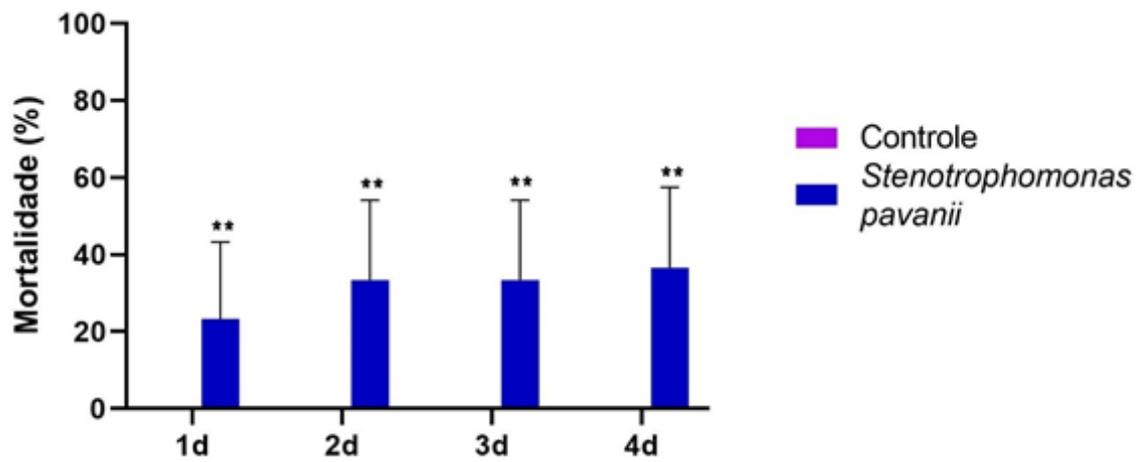
Q

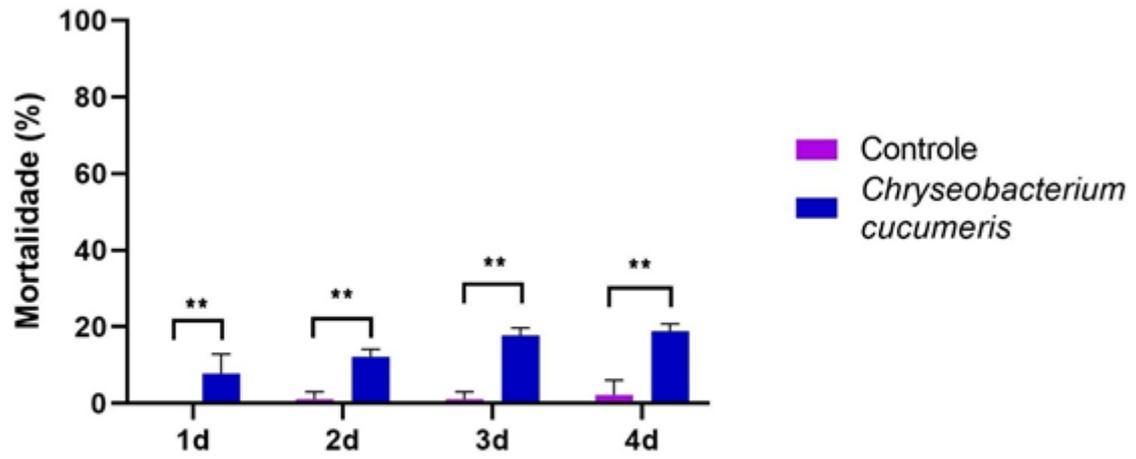
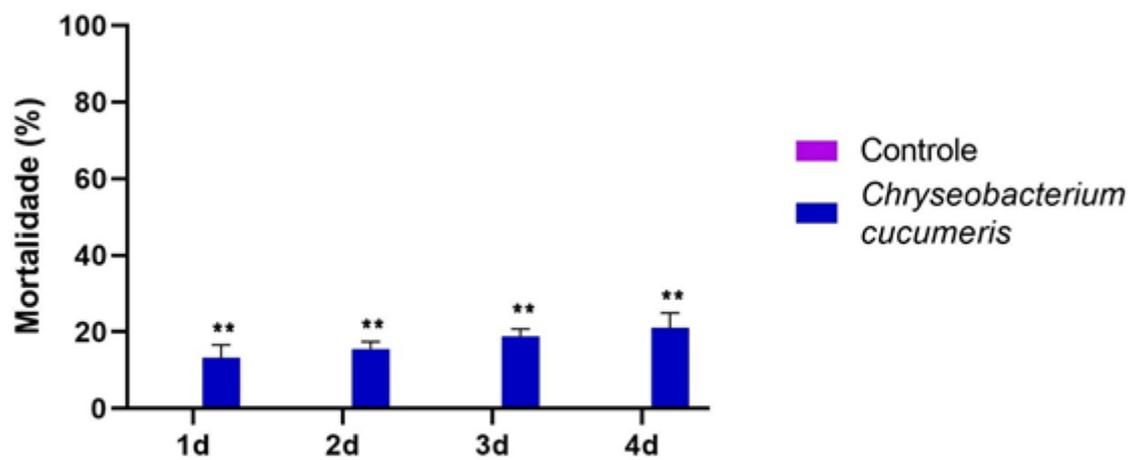
***Stenotrophomonas sp. (AV3)***



R

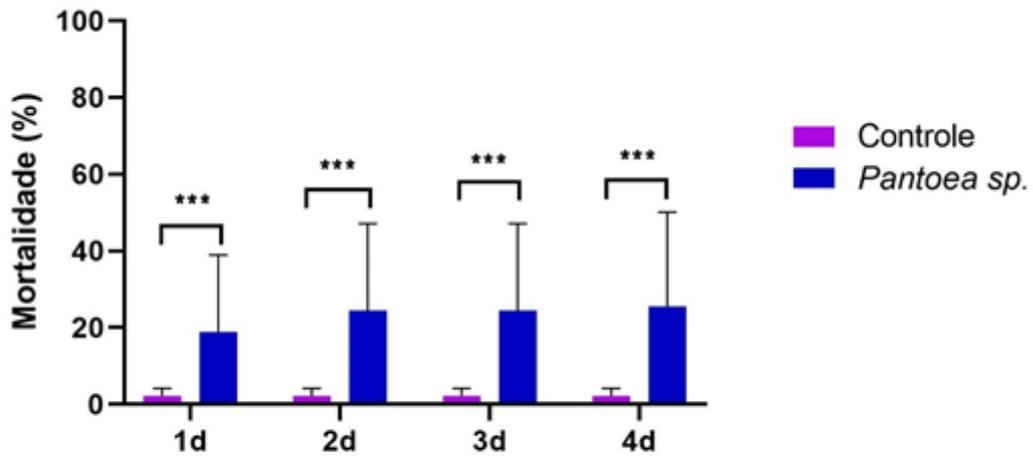
***Stenotrophomonas pavanii (AV6)***



**S*****Chryseobacterium cucumeris* (27D1)****T*****Chryseobacterium cucumeris* (224H3B)**

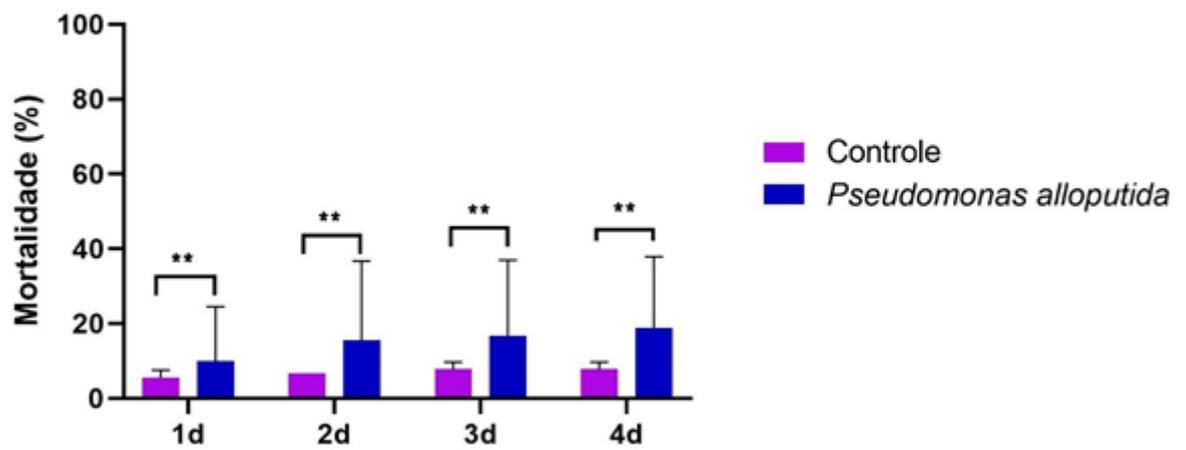
U

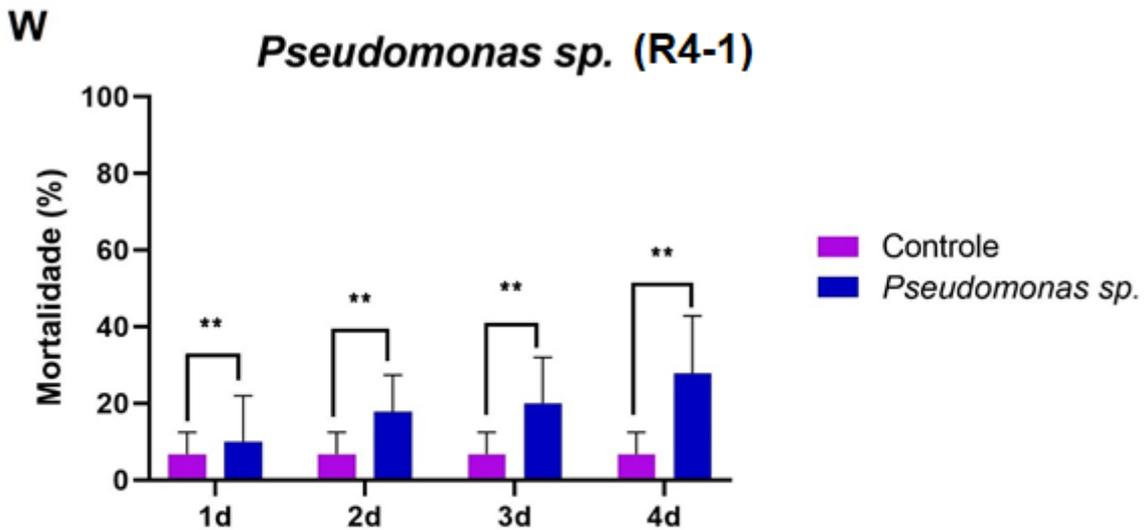
*Pantoea sp.* (224H)



V

*Pseudomonas alloputida* (R2-1)

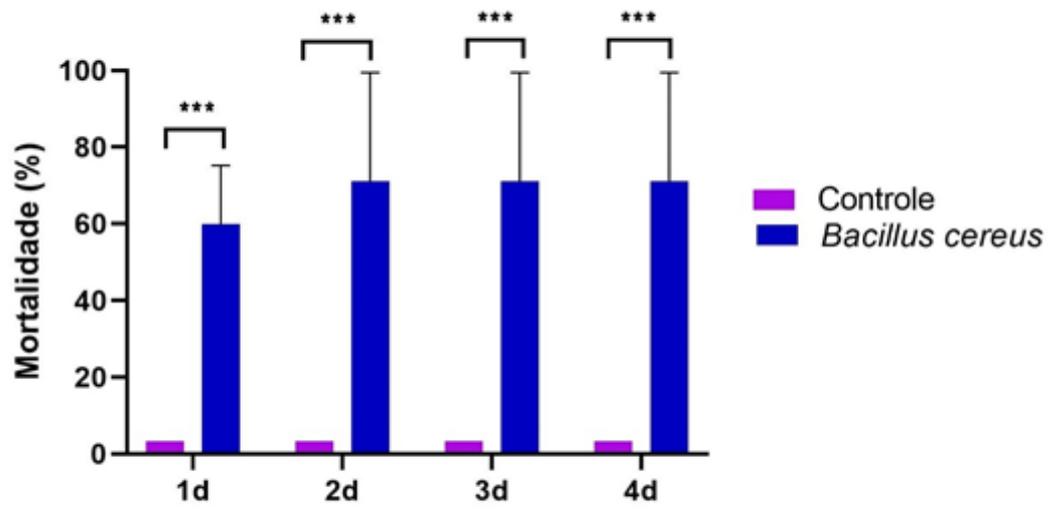




**Figura 19:** Gráfico de barras dos bioensaios dos diferentes isolados bacterianos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V,W) contra larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti* durante quatro dias de incubação mostrando as médias e desvio padrão da taxa de mortalidade dos diferentes isolados bacterianos. A suspensão de PBS foi usada como controle negativo. ns: Não houve diferença significativa na mortalidade larval entre o isolado bacteriano e o controle. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre as mortalidades do grupo teste e do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

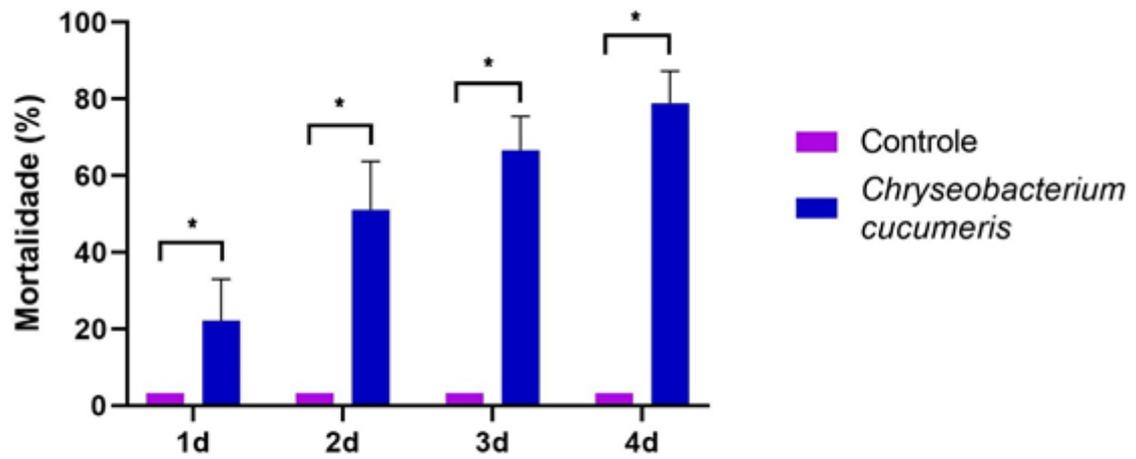
**A**

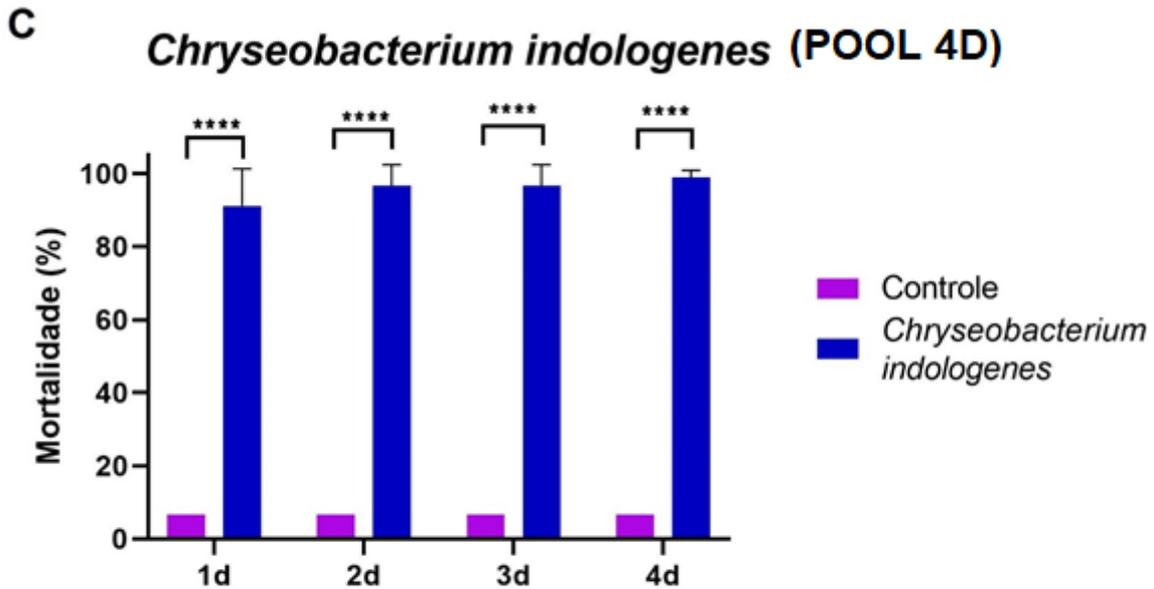
***Bacillus cereus* (1C1-1)**



**B**

***Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2)**





**Figura 20:** Gráficos de barras dos bioensaios dos diferentes isolados bacterianos (A, B e C) contra larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti* durante quatro dias de incubação mostrando as médias e desvio padrão da taxa de mortalidade dos diferentes isolados bacterianos. Suspensão de PBS foi usada como controle negativo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre as mortalidades do grupo teste e do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 Bioensaio de dose letal ( $DL_{50}$ ) das bactérias intestinais selecionadas no bioensaio com larvas.

Os bioensaios de dose letal foram realizados com os três isolados bacterianos, *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterim indologenes* (POOL 4D), que apresentaram mortalidade maior que 50% após a leitura de 96 horas do bioensaio larvicida. Considerando os valores de  $DL_{50}$  nas três concentrações, e nos quatro dias de observação, verificou-se que o isolado bacteriano com maior mortalidade foi *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), para quais foram obtidos os menores valores de  $DL_{50}$  em três dos quatro intervalos de observação (0,485557; 0,2777501; 0,00342258) (Tabela 6). Houve diferença significativa entre esse isolado e o controle durante os quatro intervalos (Teste t,  $p < 0,05$ ).

Na avaliação de 24 horas, os isolados *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) apresentaram resultados muito semelhantes, com valores de  $DL_{50}$  de 1,04466 e 1,67095, respectivamente (Tabela 6).

Analisando os valores da leitura de 48 horas, verificou-se que os isolados *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) foram os

mais tóxicos, pois obteve-se o menor valor de DL<sub>50</sub> (0,894476 e 0,485557 respectivamente) (Tabela 6).

Após 72 horas, os isolados *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), continuam sendo os isolados mais tóxicos apresentando DL<sub>50</sub> (0,851731 e 0,277750, respectivamente), sendo *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) a mais efetiva pois apresentou DL<sub>50</sub> três vezes menor que *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2).

Em 96 horas, os valores das leituras mostraram que o isolado *Chryseobacterium indologenes*, teve uma toxicidade elevada em relação aos outros dois isolados, com DL<sub>50</sub> (0,00342258) (Tabela 6).

Por outro lado, *Bacillus cereus* (1C1-1) foi o isolado com menor toxicidade, para os quais foram registrados os maiores valores de DL<sub>50</sub>, nos quatro dias de observação (Tabela 6). Com relação ao último dia de análise, DL<sub>50</sub> de *Bacillus cereus* (1C1-1) se mostrou muito pouco efetiva em relação à *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), apresentando uma DL<sub>50</sub> superior. A diferença dos valores absolutos da DL<sub>50</sub> de *Bacillus cereus* (1C1-1) chegaram a ser 600 vezes superior da obtida por *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) (Tabela 6).

Todos os tratamentos obtiveram diferença significativa quando comparado ao controle (Teste t, p<0,05) (Tabela 6). Para o controle negativo, o índice de mortalidade foi menor que 10% nos quatro dias avaliados.

Enfim, os três isolados que apresentaram atividade larvicida no bioensaio seletivo *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2), *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), foram testados contra larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti* (Rockfeller) no bioensaio quantitativo (Figura 21).

O isolado *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), apresentou mortalidade larval acima de 70%, no terceiro e quarto dia, nas concentrações de OD=1,0 e OD=2,0 (p <0,05) (Figura 21).

Os isolados *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), mostraram taxas de mortalidade estatisticamente semelhantes nas três concentrações testadas, OD=0,5, OD=1,0 e OD=2,0, nos quatro dias de análises (p<0,05) (Figura 21).

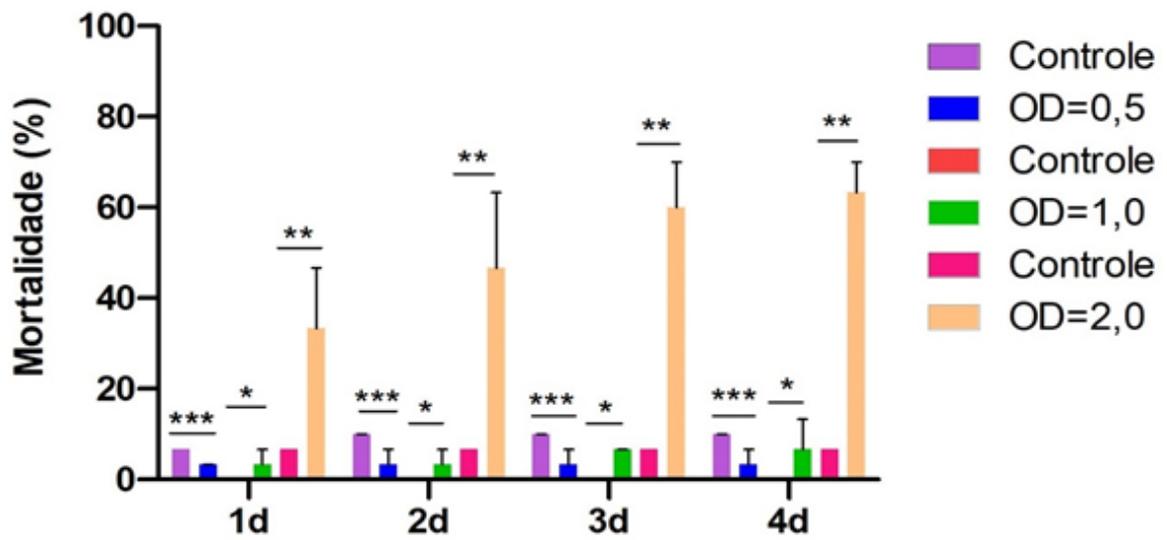
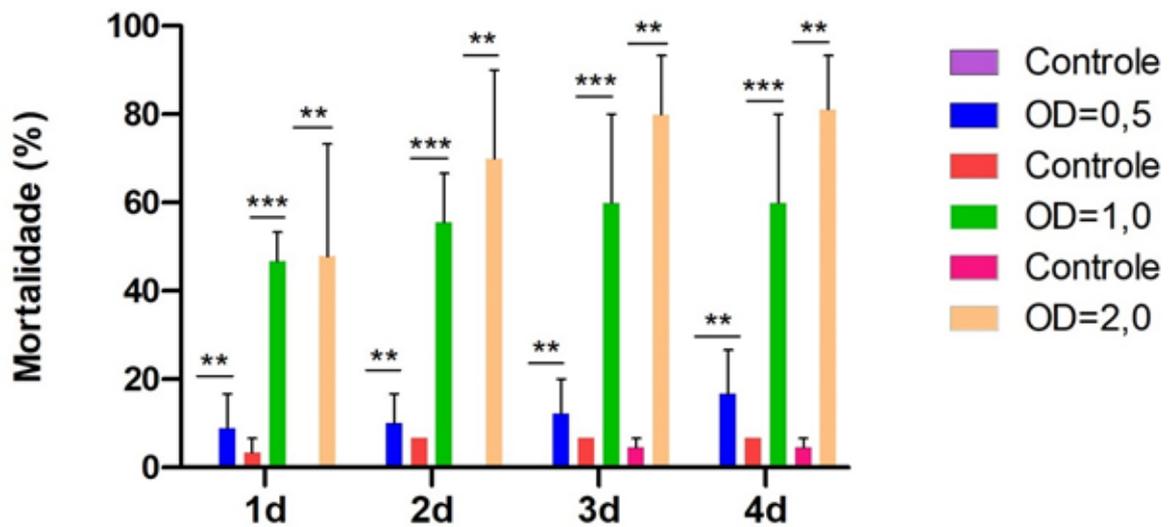
No entanto, o isolado *Bacillus cereus* (1C1-1) estatisticamente causou mortalidade baixa nas três concentrações testadas OD=0,5, OD=1,0 e OD=2,0 em todos os quatro dias analisados (p<0,05) (Figura 21).

**Tabela 6:** Mortalidade média e desvio padrão nos intervalos 24, 48, 72 e 96 horas para os isolados *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) em três concentrações (DO<sub>600</sub>=0,5; DO<sub>600</sub>=1,0 e DO<sub>600</sub>=2,0).

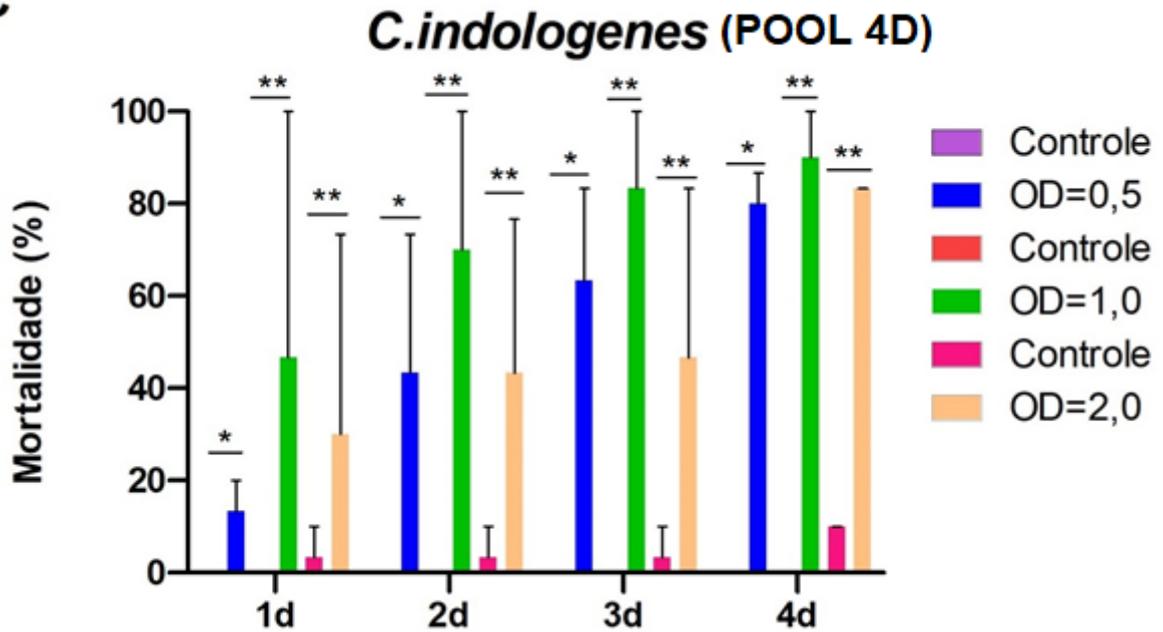
Bactéria	DO <sub>600</sub>	Número de larvas	Dia	Mortal. Média (%)	Desvio Padrão		
<i>C. indologenes</i>	0,5	360	90	1°	13,3	±0,19	
			90	2°	51,1	±0,26	
			90	3°	65,6	±0,22	
			90	4°	74,4	±0,21	
	1	1080	360	90	1°	60,0	±0,32
				90	2°	76,7	±0,23
				90	3°	84,4	±0,21
				90	4°	88,9	±0,15
	2	360	360	90	1°	43,3	±0,37
				90	2°	52,2	±0,35
				90	3°	55,6	±0,36
				90	4°	82,2	±0,16
<i>C. cucumeris</i>	0,5	360	90	1°	8,9	±0,09	
			90	2°	10,0	±0,09	
			90	3°	11,1	±0,09	
			90	4°	16,7	±0,11	
	1	1080	360	90	1°	47,8	±0,19
				90	2°	57,8	±0,20
				90	3°	62,2	±0,20
				90	4°	62,2	±0,20
	2	360	360	90	1°	48,9	±0,20
				90	2°	70,0	±0,22
				90	3°	80,0	±0,14
				90	4°	81,1	±0,14
<i>Bacillus cereus</i>	0,5	360	90	1°	2,2	±0,04	
			90	2°	3,3	±0,05	
			90	3°	3,3	±0,05	
			90	4°	3,3	±0,05	
	1	1080	360	90	1°	4,4	±0,07
				90	2°	4,4	±0,07
				90	3°	5,6	±0,09
				90	4°	8,9	±0,09
	2	360	360	90	1°	30,0	±0,20
				90	2°	43,3	±0,28
				90	3°	53,3	±0,24
				90	4°	55,6	±0,23

**Tabela 7:** DL<sub>50</sub> nos intervalos 24, 48, 72 e 96 horas para os isolados *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) em três concentrações (DO<sub>600</sub>=0,5; DO<sub>600</sub>=1,0 e DO<sub>600</sub>=2,0

Bactéria	Dia	Número de larvas	DO <sub>600</sub>	Mortal. Média (%)	DL <sub>50</sub>		
<i>C. indologenes</i>	1°	1080	90	0,5	13,3	1,67096	
			270	90	1		60,0
			90	2	43,3		
	2°		90	0,5	51,1	0,485557	
			270	90	1		76,7
			90	2	52,2		
	3°		90	0,5	65,6	0,2777501	
			270	90	1		84,4
			90	2	55,6		
	4°	90	0,5	74,4	0,00342258		
		270	90	1		88,9	
		90	2	82,2			
<i>C. cucumeris</i>	1°	1080	90	0,5	8,9	1,04466	
			270	90	1		47,8
			90	2	48,9		
	2°		90	0,5	10,0	0,894476	
			270	90	1		57,8
			90	2	70,0		
	3°		90	0,5	11,1	0,851731	
			270	90	1		62,2
			90	2	80,0		
	4°	90	0,5	16,7	0,836821		
		270	90	1		62,2	
		90	2	81,1			
<i>Bacillus cereus</i>	1°	1080	90	0,5	2,2	2,43745	
			270	90	1		4,4
			90	2	30,0		
	2°		90	0,5	3,3	2,10152	
			270	90	1		4,4
			90	2	43,3		
	3°		90	0,5	3,3	1,9557	
			270	90	1		5,6
			90	2	53,3		
	4°	90	0,5	3,3	1,9189		
		270	90	1		8,9	
		90	2	55,6			

**A*****Bacillus cereus* (1C1-1)****B*****C.cucumeris* (27D1-2)**

C



**Figura 21:** Representações gráficas em barras (A, B e C) dos valores de DL<sub>50</sub> das bactérias *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) nas DO<sub>600</sub> (0,5; 1,0; 2,0) contra larvas de 2º estágio de *Ae. aegypti*, nas leituras de 24, 48, 72 e 96 horas. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre as mortalidades do grupo teste e do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## 5 Discussão

Foi publicado em 2001, o primeiro artigo que mostrou sobre a microbiota de *Ae. aegypti* (LUXANANIL et al., 2001). Os autores neste estudo, utilizaram uma técnica dependente da cultura, que abrangeu o isolamento de intestinos de larvas de *Ae. aegypti*, os quais foram coletados de criadouros naturais na Tailândia, e posteriormente foi realizado o plaqueamento dessas culturas em placas de ágar Luria-Bertani (LB) para que posteriormente fosse feitas as análises das colônias resultantes. Para diferenciação das colônias, foram utilizadas as técnicas de análise morfológica, técnica de coloração Gram, além dos ensaios bioquímicos padrões (KONEMAN et al., 1992). Na primeira parte do estudo, duas cepas de *Bacillus cereus* em grande quantidade foram identificadas e, devido a associação dessas bactérias com o mosquito *Ae. aegypti*, foi proposto então pelos autores a utilização destas como potenciais larvicidas no controle destes mosquitos (LUXANANIL et al., 2001). Em um trabalho posterior, foi utilizado uma técnica, evidenciando a caracterização das bactérias simbiotes de *Ae. aegypti* (GUSMÃO et al., 2007). Para caracterizá-las, os autores fizeram a identificação morfológica e bioquímica de bactérias, além da extração do DNA e o sequenciamento Sanger do gene 16S rRNA. Diversas bactérias foram identificadas nesse estudo, como *Serratia sp.*, além de *Bacillus sp.* e *Bacillus subtilis*.

Geralmente, o lúmen do intestino do insetos, é densamente colonizado por diversos microrganismos comensais e simbióticos, que compreendem diversos táxons de acordo com a análise das sequência de rRNA 16S (DOUGLAS, 2011). Yun *et al.* descreveram que a microbiota de vários insetos era composta principalmente por *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* e outras não classificadas. Assim, o lúmen do intestino dos insetos é um habitat natural e complexo, onde vivem diversos microrganismos, e também onde há interações múltiplas e complexas entre eles que lhes permite sobreviver.

Muitas bactérias são formadoras de esporos, e produzem diversas moléculas importantes, como por exemplo: solventes, antibióticos, enzimas e inseticidas. Enquanto outras, apresentam problemas nas indústrias de alimentos, porque produzem toxinas e também podem apresentar esporos altamente resistentes a diversos métodos de higienização (FOSTER 1994; LIU, 1994).

As bactérias que são formadoras de esporos pertencem a família Bacillaceae, que são representadas por cinco gêneros: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Sporosarcina*. O gênero com a maioria dos representantes é *Bacillus*, seguido pelo gênero *Clostridium* (LIU, 1994). Essas bactérias também são formadoras de esporos que são utilizadas para o controle biológico, por possuírem as mesmas características do que lhes conferem

resistência a condições ambientais e de processos industriais.

Devido a grande expansão da agricultura e a ampliação das fronteiras agrícolas, houve um aumento no número de insetos que começaram a atacar as plantações, com isso foi necessário o uso em massa de pesticidas químicos. Dessa forma, fez-se necessário o uso indiscriminado de tais produtos químicos, ocasionando diversos problemas devido sua alta toxicidade e dos resíduos que ficavam nas plantações. Isso fez com que os problemas em relação à resistência de insetos aos pesticidas químicos fossem estudados. Assim, surgiram alternativas para o controle de insetos, como uso de feromônios e entomopatógenos, que incluem bactérias, fungos e vírus.

Os inseticidas feitos de entomopatógenos são em sua maioria específicos e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade aos vertebrados e insetos benéficos, ocorrendo de forma natural nos ambientes cultivados. A aplicação de patógenos como inseticidas requer grandes quantidades de agente ativo. Sua produção requer que o microorganismo entomopatogênico se desenvolva ou não em meio artificial.

Alguns agentes bacterianos que são usados no controle biológico se dividem em três grupos: *Bacillus popilliae*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. Esses grupos, possuem grandes promissores agentes de controle microbiano (ALVES, 1986). Essas espécies de bactérias possuem diversas vantagens e também desvantagens no controle biológico de insetos. Uma das vantagens é a produção de esporos por algumas dessas bactérias, que são bastante resistentes a diversos fatores ambientais, também podem ser mantidas no formato de pó ou emulsão, e também podem ser utilizadas em equipamentos projetados para aplicação de inseticidas químicos, que não são prejudiciais ao ser humano, animais e a flora.

Dentre as desvantagens, podemos citar o fato das bactérias agirem de forma oral, não tendo nenhuma ação por contato. Sua ação geralmente se restringe a um específico estágio de desenvolvimento do inseto, e por isso a aplicação do produto deve ser mais exata e controlada em comparação aos produtos químicos.

No presente trabalho, objetivamos identificar e caracterizar a atividade larvicida de algumas bactérias intestinais cultiváveis isoladas do intestino médio de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados nas cidades de Avaré e Botucatu/SP, para futuramente determinar os potenciais pelo qual essas bactérias podem causar a mortalidade larval em bioensaios. Há raríssimos estudos de seleção de isolados da microbiota intestinal de mosquitos com ação para mosquitos do gênero *Aedes*.

*Bacillus* foi o gênero mais frequente, correspondendo a 31% dos isolados. Muitos estudos ressaltam a forte presença desse gênero habitando nos mais diversos ambientes e

utilizam-no como uma alternativa de controle biológico, uma vez que muitas espécies de *Bacillus* produzem cristais que são entomopatogênicos (STRAIF et al., 1998). O segundo gênero mais abundante foi o *Chryseobacterium*, correspondendo a 15% dos isolados, seguido por proporções menores de outros gêneros como *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Staphylococcus*. Alguns desses gêneros são frequentemente observados em outros estudos que caracterizam a microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, mesmo quando as populações são provenientes de diferentes locais (ALVES et al., 2010). A bactéria *Chryseobacterium indologenes* já foi isolada de vários insetos (YABUUCHI et al., 1983; BURESOVA et al., 2006). Com o âmbito de buscar produtos de origem bacteriana com efeito larvicida, foram realizados bioensaios com vinte e seis isolados bacterianos visando avaliar a atividade larvicida destes contra larvas de *Ae. aegypti* (Rockfeller).

Dentre os 26 isolados bacterianos e identificados da microbiota cultivável de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, utilizados para o bioensaio, podemos observar que os isolados *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), foram os mais efetivos na mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* (Rockfeller) (Figura 20). Como demonstrado na Figura 20, ambos os tratamentos foram letais para as larvas de *Ae. aegypti* durante os quatro dias de análise.

Em nosso estudo, *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) causou uma taxa de mortalidade significativa alta em larvas de *Ae. aegypti* desde o primeiro dia do bioensaio, até o quarto dia, causando a mortalidade de aproximadamente 90% das larvas, como mostrado na Figura 20. Assim como outra bactéria do mesmo gênero, *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2), também ocasionou alta mortalidade nas larvas, aproximadamente 70%, durante a avaliação do seu efeito sob as larvas no quarto dia de análise. Esse efeito larvicida pode estar relacionado com a formação de biofilme ou infecção sistêmica por disseminação na hemolinfa pela bactéria, também observados em alguns estudos sobre o efeito da colonização por *Pseudomonas aeruginosa* no intestino de *Drosophila melanogaster*, que demonstraram a formação de biofilme por essa bactéria, a qual pode afetar drasticamente a disseminação na hemolinfa e a mortalidade da mosca (MULCAHY et al., 2011).

Na pesquisa realizada por Eski et al., 2015, mostrou que a bactéria *Chryseobacterium indologenes* ocasionou 45% de mortalidade em larvas de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera, Noctuidae). Já no estudo realizado por Pridgeon et al., 2013, *C. indologenes* ocasionou uma mortalidade de 10 a 20% no peixe perca amarela (*Perca flavescens*), sendo considerada uma bactéria patogênica, já que os outros isolados do estudo não ocasionaram mortalidade.

Silva et al. (2019) estudando o efeito de bactérias sobre larvas de *Aedes aegypti*, observaram que os isolados bacterianos *Chryseobacterium vietnamense* e *Chryseobacterium oncorhynchi* apresentaram alta taxa de mortalidade sob as larvas. Esses dados corroboram com os obtidos em nosso estudo, evidenciando a eficácia desse gênero bacteriano na busca de alternativas para o controle de mosquitos.

Um estudo semelhante realizado por Ramirez et al. (2014) analisaram a ação de uma bactéria do gênero *Chromobacterium* (*Csp\_P*), também isolada do intestino médio de *Aedes aegypti*, e observaram a atividade larvicida com 100% de eficiência contra larvas de *Aedes aegypti* da cepa Rockefeller e *Anopheles gambiae*.

O gênero *Chryseobacterium* possui seis espécies que foram anteriormente classificadas como pertencente ao gênero *Flavobacterium*. Estes indivíduos são bacilos aeróbicos gram-negativos, não fermentadores, oxidase-positivos (HSUEH et al., 1997). Várias bactérias formalmente classificadas no gênero *Flavobacterium* foram reclassificados dentro do gênero *Chryseobacterium* (VANDAMME et al., 1994). O gênero tem uma grande disseminação, incluindo solo, plantas, água fresca, ambiente marinho, águas residuais e fontes e alimento como leite e frango, e isolados associados a animais doentes e ambientes hospitalares (VANDAMME et al., 1994). Possui atividade queratinolítica e metaloproteases isoladas desta bactéria tem relevância no tratamento do couro e outras aplicações agrícolas e industriais (WANG et al., 2008). Além dessa bactéria ter a capacidade de formar um biofilme e produz uma protease importante na sua patogenicidade (HSUEH et al., 1996). Estudos recentes usando técnicas de pirosequenciamento mostraram que as flavobactérias *Elizabethkingia* e *Chryseobacterium* estavam associadas a mosquitos em vários estágios de desenvolvimento como seus simbioses (NGWA et al., 2013; WANG et al., 2011). Extratos de *Elizabethkingia* revelaram atividades antibacteriana, antifúngica e também antiparasitária, indicando que algumas flavobactérias podem ter um impacto significativo na saúde do mosquito (NGWA et al., 2013).

O isolado bacteriano *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) foi o mais efetivo contra larvas de *Ae. aegypti* (Rockefeller) e apresentou DL<sub>50</sub> duas vezes menor quando comparada a DL<sub>50</sub> do isolado do mesmo gênero *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2), a partir do segundo dia de análise. Chegando a obter uma diferença dos valores absolutos da DL<sub>50</sub> de *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) chegou a ser 200 vezes inferior em relação à *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) no último dia de análise (Tabela 6).

A alta taxa de mortalidade nos bioensaios com os isolados *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) pode ser atribuída a atuação direta das

bactérias sobre as larvas, bem como evidencia a possível secreção de toxinas com potencial inseticida pelas mesmas. A presença desses componentes no sobrenadante da cultura bacteriana, pode ser a explicação dos melhores resultados obtidos quando comparadas aos demais isolados bacterianos. Como demonstrado na Figura 20, os isolados *Chryseobacterium cucumeris* (27D1-2) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), apesar de serem do mesmo gênero, apresentam diferenças significativas na sequência correspondente ao gene 16S rRNA, tratando-se claramente de dois isolados diferentes. Este fato foi reforçado pelos resultados obtidos nos bioensaios, onde *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), sempre se mostrou mais eficaz e com maior mortalidade das larvas.

Quanto a ação de *Cryseobacterium* para *Aedes* e outros vetores, até o presente momento não existem na literatura estudos que relatem a presença de isolados nativos da microbiota intestinal com ação larvicida para esse gênero, o que torna esses dados inéditos.

O isolado bacteriano identificado pelo sequenciamento 16S rRNA como *Bacillus cereus* causou mortalidade acima de 50% nas larvas de *Ae. aegypti* (Rockefeller) desde o primeiro dia de análise por meio de bioensaios seletivos, evidenciando o potencial dos isolados obtidos do intestino dos mosquitos coletados para o controle desse mosquito. É importante ressaltar que o isolado apresentou 70% de mortalidade em 96 horas, mostrando uma atividade patogênica para a espécie de *Ae. aegypti*, podendo ser um potencial para o controle desses mosquitos.

*Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*, são membros do grupo *Bacillus cereus*, e possuem quatro espécies complementares, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weisteophanensis*, *Bacillus mycoides* e *Bacillus pseudomycoides*, abrangem um grupo que representa as bactérias formadoras de endosporos facultativamente anaeróbicas do gênero *Bacillus* (PRIEST, 1993).

Tanto *Bacillus cereus* como *Bacillus thuringiensis* são bactérias produtoras de enterotoxinas (PESSOA E ASTOLFI-FILHO, 2014). Porém, a única diferença estabelecida entre essas bactérias, é a presença dos genes cry, presentes em *Bacillus thuringiensis*, esses genes codificam as proteínas tóxicas que são liberadas por essas bactérias. Sem a presença desses genes, as duas espécies bacterianas não podem ser diferenciadas entre si (BATTISTI et al., 1985).

Estudos realizados por Haynes et al., 2011, *Bacillus cereus*, mostraram efeito tóxico em mosquitos através das proteínas de revestimentos que são mais utilizadas para o método de exibição na superfície de esporos. Apesar da ausência de genes Cry em *B. cereus*, algumas cepas desta espécie mostraram secretar uma exotoxina inseticida estável ao calor (PERCHAT et al., 2005). Essa exotoxina possui uma atividade proteolítica (OULED-HADDAR et al. 2010; SALEEM et al. 2012).

Mani et al., 2015, mostraram que *B. cereus* parece ser muito promissor para uso futuro como agente de controle biológico e sua eficácia no campo precisam ser examinado. O efeito tóxico de *B. cereus*, se deve a sua capacidade de ser um agente mosquitocida, pois essa bactéria afeta um alvo específico e não exibe nenhum efeito sobre organismos não visados no ambiente ao qual foi aplicado. Este estudo corrobora com outros que utilizam cepas de mosquitocidas como Bti e também *B. sphaericus* (MULLA et al. 1982; WIPFLI AND MERRITT, 1994). Podemos concluir que este estudo, confirma a eficiência de *B. cereus* como agente larvicida e de controle biológico, corroborando com nossos resultados.

Em nossos ensaios, contudo, os outros isolados do gênero *Bacillus* não apresentaram atividade larvicida, o que sugere que não se tratam de estirpes entomopatogênicas para dípteros (CHANK et al., 1994).

Tomando como base os valores da DL<sub>50</sub> durante os quatro dias de bioensaio, o isolado *Bacillus cereus* (1C1-1), se mostrou o menos efetivo, uma vez que apresentou os valores absolutos da DL<sub>50</sub>, 500 vezes inferior da obtida no isolado de maior toxicidade *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D) no quarto dia (Tabela 6).

Segundo a interpretação a respeito do controle biológico de insetos vetores, a especificidade do inseto alvo e o estreito espectro de ação das cepas bacterianas larvicidas, utilizadas em nosso estudo, são muito importantes. Pois, apesar de *Bacillus cereus* ter apresentado atividade larvicida alta no presente estudo, exibiu uma toxicidade baixa contra larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti* (Rockefeller).

O canibalismo foi observado nos bioensaios com os isolados bacterianos que obtiveram elevada mortalidade como *Bacillus cereus* (1C1-1), *Chryseobacterium cucumeris* (27D12) e *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), quando em contato com as larvas de *Ae. aegypti* (Rockefeller). Koenraadt e Taken (2003), mostraram em seu estudo que vários fatores bióticos, como por exemplo parasitas e patógenos, além dos fatores abióticos, como temperatura e alcalinidade, podem afetar as condições das larvas de mosquitos em habitats aquáticos. Essas condições podem causar estresse e competição extrema entre larvas que estão ocupando o mesmo local. Os resultados dos nossos bioensaios sugerem fortemente que essas bactérias pode causar canibalismo entre as larvas.

Ainda que esse estudo tenha evidenciado isolados bacterianos promissores no controle biológico de larvas do mosquito *Ae. aegypti*, serão realizados estudos complementares para a avaliação do seu real potencial de uso para esse fim, como: identificação dos mecanismos de ação, avaliação da viabilidade em um espectro maior de concentrações, avaliação de atividades sinérgicas com outros controles, inferir a eficiência sob diferentes fatores abióticos, dentre

outros. Alguns estudos realizados por Dua et al., 2002 e Scott et al., 2008, demonstraram que a microbiota intestinal de linhagens bacterianas resistentes a inseticidas é um recurso rico para o isolamento de bactérias que são capazes de degradar inseticidas e uma ferramenta promissora para a exploração biotecnológica em programas de biorremediação.

Diversas pesquisas brasileiras vêm desenvolvendo trabalhos utilizando metabolômica, os quais visam analisar qualitativamente e quantitativamente o conjunto metabólitos que podem ser produzidos ou modificados por um determinado organismo. Uma vez que se identifica parcial ou completamente os metabólitos primários e secundários de um organismo, é possível identificar biomarcadores de um determinado fenótipo de interesse. (HALL, 2008; SAITO; DIXON; WILLMITZER, 2016). A metabolômica tem sido empregada em diversas áreas como medicina, nutrição, farmácia, e principalmente nas áreas de química, biologia e na agricultura.

Levando em consideração a carência de bibliografia pertinente sobre controle biológico de mosquitos utilizando bactérias, temos uma lacuna a ser preenchida e um ótimo potencial a ser explorado. Para isso, são necessários diversos estudos de prospecção de novos produtos capazes de abranger mais alternativas no controle de vetores.

## 6 Conclusão

O alto interesse em identificar bactérias cultiváveis que são associadas à mosquitos vetores de doenças, estão sendo cada vez mais estudados devido a esses microorganismos possuírem uma alta capacidade de bloquear o desenvolvimento desses insetos, os quais podem transmitir diversas doenças.

As análises fenotípicas proporcionaram a caracterização de 26 isolados bacterianos, sendo representados por 53,85% gram positivos e 46,15% gram negativos;

As análises moleculares desse trabalho, permitiram a caracterização de 26 linhagens bacterianas, sendo identificados dez gêneros bacterianos: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*. Contudo, das 26 linhagens houve muitas similaridades entre as sequências, dificultando a identificação em nível de espécies de algumas bactérias.

Dois isolados do gênero *Chryseobacterium*, apresentaram atividade larvicida acima de 50% contra larvas de *Ae. aegypti* (Rockfeller), sendo bastante promissores para futuramente serem utilizado como controle vetorial. Entretanto, outros dois isolados também identificados como sendo do gênero *Bacillus* e *Chryseobacterium*, não apresentaram atividade larvicida

acima de 50%, sugerindo investigações mais detalhadas.

Um isolado do gênero *Bacillus*, sendo identificado como *Bacillus cereus* (1C1-1), apresentou atividade larvicida acima de 50 %.

O isolado bacteriano *Chryseobacterium indologenes* (POOL 4D), apresentou maior letalidade frente às larvas de *Ae. aegypti* (Rockfeller) com DL<sub>50</sub> (1,67096; 0,485557; 0,2777501; 0,00342258), após 24, 48, 72, 96 horas de exposição respectivamente, demonstrando ser o mais promissor para ser utilizado no controle do mosquito *Aedes aegypti*.

Os isolados que apresentaram atividade larvicida deste trabalho possuem alto potencial para o desenvolvimento de alternativas de biocontrole do mosquito *Ae. aegypti* e outros vetores de doenças.

## 7 Referências Bibliográficas

ABBOTT, Walter S. et al. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. econ. Entomol**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ALENCAR, Carlos Henrique Morais et al. Potencialidades do < em> *Aedes albopictus*< em> como vetor de arboviroses no Brasil: Um desafio para a atenção primária. **Revista de APS**, v. 11, n. 4, 2008.

ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. 1986.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. **Controle Microbiano de Insetos. 2.ed. Piracicaba: Fealq.**, p. 289-381, 1998.

ALVES, W. C. L. et al. Bactérias isoladas de culicídeos (Diptera: Nematocera) hematófagos em Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 131-142, 2010.

ALI, Arshad; NAYAR, Jai K. Invasion, spread, and vector potential of *Aedes albopictus* in the USA and its control possibilities. **Medical entomology and zoology**, v. 48, n. 1, p. 1-9, 1997.

ARANTES, O. M. N.; VILAS BOAS, L. A.; VILAS BOAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria. EDUCS**, v. 2, p. 269-293, 2002.

BANDO, H. et al. Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. **Scientific reports**, v. 3, p. 1641, 2013.

BARRETO, Maurício L.; TEIXEIRA, Maria Glória. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BATTISTI, Laurie; GREEN, BRIAN D.; THORNE, CURTIS B. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 2, p. 543-550, 1985.

BENNETT, K. E. et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 1, p. 85-92, 2002.

BENNETT, K. L. et al. Historical environmental change in Africa drives divergence and admixture of *Aedes aegypti* mosquitoes: a precursor to successful worldwide colonization?. **Molecular ecology**, v. 25, n. 17, p. 4337-4354, 2016.

BENTES, A. A. et al. Neurological manifestations of pediatric arboviral infections in the Americas. **Journal of Clinical Virology**, 2019.

BESERRA, Eduardo B. et al. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 1016-1023, 2010.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 13, p. 20751, 2014.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504, 2013.

BORGES, S. M. A. A. Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2001.

BOYCE, R. et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 5, p. 564- 577, 2013.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 36, 2015.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilancia em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 38, 2020. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. (Acesso em: 10 out. 2020).

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11660–5, 2003.

BRAVO, A. et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.64, p.4965-4972, 1998.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 4, p. 605, 1998.

BROWN, A. W. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of**

**the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 1986.

BÜCKER, A. et al. Controle biológico de larvas de *Aedes aegypti* por substâncias de *Trichoderma koningii*, um fungo endofítico da Amazônia. X Simpósio de Controle Biológico–SICONBIOL, Brasília-DF, 2007a.

BUREŠOVÁ, Veronika; FRANTA, Zdeněk; KOPÁČEK, Petr. A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 93, n. 2, p. 96-104, 2006.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885, 2015.

CARVALHO, M.P; ABRAHAM, W.R; MACEDO, A.J. Microrganismos em favor da saúde humana. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, p. 77-81, 2008.

CHAVASSE, D. C. et al. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. **Geneva: World Health Organization**, 1997.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti*: The yellow fever mosquito. **CUP Archive**, 1960.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J. Clin. Virol.**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

CIRIMOTICH, C. M. et al. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 332, n. 6031, p. 855-858, 2011.

COON, K. L. et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. **Molecular ecology**, v. 23, n. 11, p. 2727-2739, 2014.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 225, 1994.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

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

CHRISTOFFERSON, R. C.; MORES, C. N. A role for vector control in dengue vaccine programs. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7069-7074, 2015.

DELLAGLIO, F. et al. Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei subsp. casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989): request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 340-342, 1991.

DE LOURDES MACORIS, M. et al. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006390, 2018.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet**, v. 37, p. 409–433, 2003.

DIAMOND, M. S.; LEDGERWOOD, J. E.; PIERSON, T. C. Zika virus vaccine development: Progress in the face of new challenges. **Annual review of medicine**, v. 70, p. 121-135, 2019.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 71-92, 2004.

DONALISIO, M.R.C. O enfrentamento de epidemias: as estratégias e perspectivas do controle do dengue. **Tese de Doutorado**. Campinas: UNICAMP, 1995.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saúde pública**, v. 51, p. 30, 2017.

DUA, M. et al. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p. 143-152, 2002.

DURHAM, D. P. et al. Avaliação de estratégias de vacinação para o vírus Zika nas Américas. **Anais de medicina interna**, v. 168, n. 9, pág. 621-630, 2018.

DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **An. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 1-19, 1992.

ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control. 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly> (Acesso em 20 de outubro de 2020).

EICKMANN, S. H. et al. Zika virus congenital syndrome. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 7, 2016.

ESKI, Ardahan et al. Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae). **Turkish Journal of Biology**, v. 39, n. 1, p. 31-48, 2015.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **FEMS Microbiol Review**. v. 37, p. 699-735, 2013.

ERITJA, Roger et al. Direct evidence of adult *Aedes albopictus* dispersal by car. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

ESCOSTEGUY, C. C.. Tópicos metodológicos e estatísticos em ensaios clínicos controlados randomizados. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 72, n. 2, p. 139-43, 1999.

ESKI, Ardahan et al. Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae). **Turkish Journal of Biology**, v. 39, n. 1, p. 31-48, 2015.

ESTOFOLETE, C. F. et al. Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: A case series. **Journal of Clinical Virology**, 2016.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Dengue worldwide overview**, 2020.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20 th century. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. The brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v.2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.

FINNEY, D. Probit analysis. **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 50-80, 1971.

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz. O pernilongo ('*Culex quinquefasciatus*') pode transmitir a zika? . 2016. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/o-pernilongo-culex-quinquefasciatus-pode-transmitir-zika> (Acesso em 01/08/2019).

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz. Dengue vírus e vetor: Curiosidades sobre o *Ae. aegypti*, de 30 de setembro de 2015. Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html> (Acesso em: 27/06/2019).

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz. Vetor da dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos. 2008. Disponível: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=576&sid=32> (Acesso em: 15/10/2020).

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (stegomyia) Albopictus (skuse)* no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 244-245, 1986.

FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia. **Edusp**, v.2, 1994.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia. **In: Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**, v. 2, p. 860-860, 2002.

FOSTER, S. J. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 25S-

39S, 1994.

FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 880-2, 2011.

FRANÇA, G. V. A. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, 2016.

FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab**, v. 82, p. 124-128, 2007.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor. **Manual de normas técnicas**. 3 ed. Brasília, DF, 2001.

GARG, H.; MEHMETOGLU-GURBUZ, T.; JOSHI, A.. Recent advances in Zika virus vaccines. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 631, 2018.

GERMANI, J. C. Produção de *Bacillus sphaericus* S2 com Materias-Primas Regionais e Avaliação de sua Atividade Larvicida. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

GLARE, T. et al. Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnol**, v. 30, p. 250–258, 2012.

GOINDIN, D. et al. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 38, 2017.

GOMES, Almério de Castro et al. Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 206-210, 2005.

GRAM, C. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. **Fortschritte der Medicin**, v.2, p. 185-189, 1884.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and veterinary entomology**, v. 18, n. 3, p. 215-227, 2004.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010.

GUSMÃO, D. S. et al. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 919-924, 2007.

HABIB, M. E. M. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 31-34, 1989.

HALL, R. D.; BROUWER, I. D.; FITZGERALD, M. A. Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. **Physiologia plantarum**, v. 132, n. 2, p. 162- 175, 2008.

HALSTEAD, S.B. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. **Emerg Infect Dis**, v. 21, p. 557–561, 2015.

HAYASHI, H. et al. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. **Journal of medical microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1093-1101, 2005.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 7, p. 653-665, 2004.

HSUEH, Po-Ren et al. Clinical and microbiological characteristics of *Flavobacterium indologenes* infections associated with indwelling devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 1908-1913, 1996.

HSUEH, P. R. et al. Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 568-574, 1997.

ISSG- Invasive Species Specialist Group. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species, 2020 [Available from: <http://www.iucngisd.org/gisd/>]. (Acesso em 20 de outubro de 2020).

KARABATSOS, N. International catalog of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. San Antonio, Texas, USA, 1985.

KNUDSEN, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. **Parasitologia**, v. 37, n. 2-3, p. 91-97, 1995.

KOENRAADT, C. J. M.; TAKKEN, Willem. Cannibalism and predation among larvae of the *Anopheles gambiae* complex. **Medical and veterinary entomology**, v. 17, n. 1, p. 61-66, 2003.

KONEMAN, E. et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. **In: Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**, 2012.

KOVENDAN, K. et al. Larvicidal activity of *Morinda citrifolia* L. (*Noni*) (Family: Rubiaceae) leaf extract against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. **Parasitology research**, v. 111, n.4, p. 1481-1490, 2012.

KRAEMER, Moritz UG et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, v. 4, p. e08347, 2015.

LACEY, L.A; FRUTOS, R; KAYA, H.K; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? **Biol. Control**, v.21, p. 230–248, 2001.

LACON, G. et al. Shifting patterns of *Aedes aegypti* fine scale spatial clustering in Iquitos, Peru. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3038, 2014.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. **Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. John Wiley & Sons, New York, p. 37-69, 1993.

LIU, R.; LI, J.; GE, Z. Review on *Chromobacterium violaceum* for gold bioleaching from e-waste. **Procedia Environmental Sciences**, v. 31, p. 947-953, 2016.

LIU, Wei-Ming; BAJPAI, Rakesh; BIHARI, Vinod. High-density cultivation of sporeformers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 721, p. 310-325, 1994.

LONDONO-RENTERIA, B.; TROUPIN, A.; COLPITTS, T. M. Arbovirosis and potential transmission blocking vaccines. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016.

LOPES, S. C. P. et al. Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth in vitro and in vivo. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2149-2152, 2009.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes albopictus* from Brazil and southern United States: genetic variation and vector competence for dengue and yellow fever viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 1, p. 105-114, 2003.

LUXANANIL, P. et al. Isolation of bacterial strains colonizable in mosquito larval guts as novel host cells for mosquito control. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 342-345, 2001.

MACIEL, I. J. et al. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 2, p. 111-130, 2008.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 6, p. 1112-1120, 2006.

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia: Fundamentos. Edições Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, Rio de Janeiro. **Appl. Environ. Microbiol**, 2006.

MANI, Chinnasamy et al. Identification and characterization of a novel marine *Bacillus cereus* VCRC-B540 for mosquito control. **BioControl**, v. 60, n. 1, p. 71-79, 2015.

MARCONDES, C. B. Doenças transmitidas e causadas por artrópodes. **In: Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**, 2009.

MARTIN, P. A. W. et al. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n.5, p. 993-999, 2007.

MARTIN, P. A.; SOBY, S. Insecticidal strains of *Chromobacterium vaccinii* sp. nov. for control of insects. **U.S. Patent** n. 9,339,039, 17 maio 2016.

MASSONNET-BRUNEEL, B. et al. Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62711, 2013.

MEBRAHTU, Y. et al. Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 56, n. 4, p. 456-465, 1997.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. **Controle biológico**, v. 1, p. 17-30, 1998.

MINARD, G. et al. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. **Parasit Vectors.**, v. 146, p. 1-12, 2013.

MIZUNO, Y. et al. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 7, p. 738-739, 2007.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 84, 2007.

MOORE, Chester G.; MITCHELL, Carl J. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. **Emerging infectious diseases**, v. 3, n. 3, p. 329, 1997.

MULCAHY, H., et al. *Drosophila melanogaster* como um modelo animal para o estudo de infecções de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. **PLoS Pathog**, 7: e1002299, 2011.

MULLA, Mir S.; FEDERICI, Brian A.; DARWAZEH, Husam A. Larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against stagnant-water mosquitoes and its effects on nontarget organisms. **Environmental Entomology**, v. 11, n. 4, p. 788-795, 1982.

MUSSO, D. et al. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595-O596, 2014.

NASCI, Roger S. Movement of chikungunya virus into the Western hemisphere.

**Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 8, p. 1394, 2014.

NEVES, D. P. Culicidae. In: **Parasitologia Dinâmica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu. cap. 52, p. 485-486, 2009.

NGWA, C. J. et al. 16S rRNA gene-based identification of *Elizabethkingia meningoseptica* (Flavobacteriales: Flavobacteriaceae) as a dominant midgut bacterium of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) with antimicrobial activities. **Journal of medical entomology**, v. 50, n. 2, p. 404-414, 2013.

NICOLAS, L. Potentialités de *Bacillus sphaericus* dans la lutte antivectorielle en Afrique tropicale. Cah. °R.S.T.°M., sér. **Ent. Méd. et Parasitol.**, v. 24, n.4, p 265-273, 1986.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUILL, P. L. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. supl III, p. 59-66, 1994.

NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts, 2013.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**, v. 19, n.9, p. 20720, 2014.

OKOYE, P.N. et al. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2008.

OULED-HADDAR, H.; ZAGHLOUL, Taha I.; SAEED, Hesham M. Expression of alkaline proteinase gene in two recombinant *Bacillus cereus* feather-degrading strains. **Folia microbiologica**, v. 55, n. 1, p. 23-27, 2010.

PERCHAT, Stéphane et al. *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. **Journal of invertebrate pathology**, v. 90, n. 2, p. 131-133, 2005.

PESSOA, M. C. F.; ASTOLFI-FILHO, S. PREVALÊNCIA DE ENTEROTOXINAS EM LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* E MÉTODOS PARA SUA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA: REVISÃO1.

PIERSON, T.C. ; DIAMOND, M. S. Flaviviruses. **Fields virology**, v. 1, n.6, p. 746-794, 2014.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. **Revista de saúde pública**, v. 37, n. 6, p.813- 816, 2003.

POLONI, T. R. et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. **Virology journal**, v.7, n. 1, p. 1, 2010.

POWERS, A.M. Vacina e opções terapêuticas para controle do vírus chikungunya. **Revisões de microbiologia clínica**, v. 31, n. 1, 2018.

POWERS, A. M. Licensed chikungunya virus vaccine: a possibility?. **Lancet (London, England)**, v. 392, n. 10165, p. 2660, 2019.

PRECIOSO, A. R. et al. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7121-7125, 2015.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H.; GARCIA, J. C. Identification and virulence of *C. indologenes* isolated from diseased yellow perch (*Perca flavescens*). **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 636-643, 2013.

PRIEST, Fergus G. Systematics and ecology of *Bacillus*. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics, p. 1-16, 1993.

RAGAVENDRAN, C.; MARIAPPAN, T.; NATARAJAN, D. Larvicidal, histopathological efficacy of *Penicillium daleae* against larvae of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* plus biotoxicity on *Artemia nauplii* a non-target aquatic organism. **Frontiers in pharmacology**, v.8, p. 773, 2017.

RAMIREZ, J. L. et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 3, p. e1561, 2012.

RAMIREZ, J. L. et al. *Chromobacterium Csp\_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004398, 2014.

RANI, A; SHARMA, A; RAJAGOPAL, R; ADAK, T; BHATNAGAR, R.K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 96. PMID: 19450290, 2009.

REISINGER, E. C. et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. **The Lancet**, v. 392, n. 10165, p. 2718-2727, 2018.

RUEDA, L. M. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. In: **Freshwater animal diversity assessment**. Springer, Dordrecht, p. 477-487, 2007.

RUST, Robert S. Human arboviral encephalitis. In: **Seminars in pediatric neurology**. **WB Saunders**, 2012. p. 130-151.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect molecular biology**, v. 16, n. 6, p. 785-798, 2007.

SAITO, K.; DIXON, R. A.; WILLMITZER, L. (Ed.). Plant metabolomics. **Springer Science & Business Media**, 2006.

SALEEM, Mahjabeen et al. Biochemical analysis and investigation on the prospective applications of alkaline protease from a *Bacillus cereus* strain. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 6, p. 6399-6408, 2012.

SCOTT, T. W. et al. 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, 1993.

SCOTT, C. et al. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 65, 2008.

SHIN, D. et al. Evaluation of bioleaching factors on gold recovery from ore by cyanide-producing bacteria. **Minerals Engineering**, v. 48, p. 20-24, 2013.

SHORT, S. M. et al. Hydrogen cyanide produced by the soil bacterium *Chromobacterium sp.* Panama contributes to mortality in *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **Scientific reports**, v.8, n. 1, p. 8358, 2018.

SHROYER, D. A. *Aedes albopictus* e arbovírus: Uma revisão concisa da literaturai. **Journal of the American Mosquito Control Association** , 1986.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 4, p. 349-55, 1999.

SILVA, Dulcilene Pissango da et al. Atividade larvicida de bactérias isoladas de ambientes amazônicos contra *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762. **In: MEDTROP-55o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Volume Único. Brasil, 2019.

SOPER, F. L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 14, n. 6, p. 887-891, 1965.

STRAIF, Susanne C. et al. Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 3, p. 222-226, 1998.

TADEI, W. P.; RODRIGUES, I. B. O controle biológico para anofelinos na Amazônia. **In: Anais do XIX Congresso Brasileiro de Entomologia (CD-ROM)**. Manaus. 2002.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S99-S102, 2001.

THOMPSON, G. D. Spinosyns: an overview of new natural insect management systems. **In: Proc. Beltwide Cotton Production Conference**, San Antonio, TX, 1995. 1995. p. 1039-1043.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 2004.

TURMEL, J. M. et al. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. **The Lancet**, 2016.

VANDAMME, Peter et al. New Perspectives in the Classification of the Flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 827-831, 1994.

VAN RIE, J.; McGaughey, W. H.; Johnson, D.E.; Barnett, B. D.; Van Mellaert, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**. v. 247, p. 72-74. 1990.

VAZQUEZ-PROKOPEC, G. M. et al. Quantifying the spatial dimension of dengue virus epidemic spread within a tropical urban environment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. e920, 2010.

VEGA-RÚA, A. et al. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **Journal of virology**, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, 2014.

VILCINSKAS, A. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. **Virulence** 1, p. 206–214, 2010.

WANG, San-Lang et al. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3700-3707, 2008.

WANG, Ying et al. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24767, 2011.

WANG, S. et al. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12734-12739, 2012.

WATSON, G. B. Actions of insecticidal spinosyns on  $\gamma$ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 1, p. 20-28, 2001.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WHO, World Health Organization. 2008. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>) Acesso em 01/08/2019

WHO, World Health Organization. 2015. Dengue and severe dengue. Fact sheet N°117. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>) Acesso em 13/02/2019.

WIPFLI, Mark S.; MERRITT, Richard W. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on nontarget benthic insects through direct and indirect exposure. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 13, n. 2, p. 190-205, 1994.

WOESE, Carl R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.

YABUUCHI, EIKO et al. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-nonfermenting gram-negative rods in CDC groups I1K-2 and I1b. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 580-598, 1983.

YADAV, K. K. et al. Diversity of cultivable midgut microbiota at different stages of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0167409, 2016.

YAKOB, L. et al. *Aedes aegypti* control: the concomitant role of competition, space and transgenic technologies. **Journal of applied Ecology**, v. 45, n. 4, p. 1258-1265, 2008.

YAMADA, Yuzo; HOSHINO, Ken-ichiro; ISHIKAWA, Tetsuya. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.

YANO, D. M. Y. et al. Técnicas de microbiologia em controle de qualidade. **Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello**, 1991.

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

## **8 Anexo 1:**

Técnica de Coloração de Gram.

Preparação do esfregaço:

1. Depositar uma gota do crescimento bacteriano em Caldo Nutriente (Difco) sobre uma lâmina limpa e seca;
  2. Espalhar o material sobre a lâmina, procurando obter um esfregaço fino;
- Deixar a lâmina secar à temperatura ambiente;
- Passar a lâmina de 2 a 3 vezes pela chama do bico de Bunsen para fixar o esfregaço;
- Deixar a lâmina esfriar à temperatura ambiente.

Coloração das Células Bacterianas:

1. Cobrir o esfregaço com a solução Violeta de Genciana (Anexo 1) e aguardar durante 1 minuto;
  2. Adicionada a solução de Lugol (Anexo 1) e esperar por mais 1 minuto;
- Escorrer as duas soluções da lâmina por inclinação;
- Gotejar 10 mL de álcool sobre o esfregaço;
5. Lavar a lâmina rapidamente com água;
  6. Cobrir o esfregaço com Fucsina (Anexo 1) e aguardar durante 30 segundos;
  7. Lavar a lâmina novamente com água e secar com papel de filtro.

Bacterioscopia:

Observar o esfregaço contido na lâmina ao microscópio óptico, utilizando a lente objetiva de imersão (100 X) e uma gota de óleo de cedro (Merck). Como resultado, as bactérias Gram-positivas são visualizadas coradas em roxo e as bactérias Gram-negativas coradas em vermelho.