



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE  
BIONORTE



**ENCAPSULAMENTO DE LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* DO  
MARANHÃO PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* EM CONDIÇÃO  
SIMULADA DE CAMPO**

**JULIETE LIMA VIANA**

**Manaus - AM**

**2024**

**JULIETE LIMA VIANA**

**ENCAPSULAMENTO DE LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* DO  
MARANHÃO PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* EM CONDIÇÃO  
SIMULADA DE CAMPO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso  
de Doutorado do Programa de Pós-  
Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia - Rede BIONORTE, na  
Universidade do Estado do Amazonas,  
como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Doutor em Biodiversidade e  
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary  
Aparecida Roque

Coorientadora: Profa. Dra. Valéria  
Cristina Soares Pinheiro

**Manaus – AM**

**Fevereiro/2024**

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

---

V614e Viana, Juliete

Encapsulamento de linhagens de *Bacillus thuringiensis* do maranhão para o controle de *Aedes aegypti* em condição simulada de campo / Juliete Lima Viana; orientadora. Rosemary Aparecida Roque; coorientadora Valéria Cristina Soares Pinheiro. - Manaus: [s.l.], 2024.

1,41 MB

91p. : il. color.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bionorte) -  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2024.

1. Arboviroses. 2. Controle biológico. 3. Bactéria entomopatogênica. I.  
Roque, Rosemary Aparecida. II. Pinheiro, Valéria Cristina Soares. III. Título

CDD 579.262

---

**JULIETE LIMA VIANA**

**ENCAPSULAMENTO DE LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* DO  
MARANHÃO PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* EM CONDIÇÃO  
SIMULADA DE CAMPO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso  
de Doutorado do Programa de Pós-  
Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia - Rede BIONORTE, na  
Universidade do Estado do Amazonas,  
como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Doutor em Biodiversidade e  
Biotecnologia.

Aprovada em 29/ 02/2024

**Banca examinadora**



Documento assinado digitalmente  
**ROSEMARY APARECIDA ROQUE**  
Data: 01/03/2024 12:48:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Rosemary Aparecida Roque (Orientadora)**  
**INPA**



Documento assinado digitalmente  
**SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO**  
Data: 04/04/2024 10:13:52-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Sally Cristina Moutinho Monteiro (Membro Titular)]**  
**UFMA**



Documento assinado digitalmente  
**IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE**  
Data: 19/03/2024 10:30:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte (Membro Titular)**  
**UFSCar**



Documento assinado digitalmente  
**LETICIA DIAS LIMA JEDLICKA**  
Data: 21/03/2024 19:12:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Letícia Dias Lima Jedlicka (Membro Titular)**  
**UNIFESSPA**



Documento assinado digitalmente  
**ANTONIO ALVES DE MELO FILHO**  
Data: 05/04/2024 11:21:00-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof. Dr. Antonio Alves de Melo Filho (Membro Titular)**  
**UFRR**

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Juliete Lima Viana, não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “Encapsulamento de linhagens de *Bacillus thuringiensis* do maranhão para o controle de *Aedes aegypti* em condição simulada de campo” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora, em virtude do pedido de depósito de patente (“Processo de produção de micropartículas utilizando polímero natural em suspensão inversa, em sistema aberto para o encapsulamento de *B. thuringiensis* no controle do *A. aegypti*”), no qual está em fase de finalização.

Local/Data: Manaus- AM, 31 de março de 2024



Documento assinado digitalmente

JULIETE LIMA VIANA

Data: 31/03/2024 14:26:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Juliete Lima Viana

CPF: 048.447.163-52

RG: 033762332007-0

**A Deus todo poderoso e a minha família, em especial, a minha mãe Maria de Jesus e ao meu pai Francisco, verdadeiros tesouros da minha vida, honestidade, trabalho, que com muito amor e carinho, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. A minha irmã Juliélma, a minha avó Lucila (*in memoriam*), minha sobrinha linda Izabelly Sophia e meu cunhado Milton pelo amor, incentivo e carinho. Amo vocês!!!**

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado dons e tudo mais para que eu pudesse chegar a este estágio;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, e ao corpo docente pela contribuição na minha formação profissional;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa;

À minha professora orientadora Dra. Rosemary Aparecida Roque pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

À Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro pela coorientação, confiança, oportunidade e pela relevante contribuição para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei (*in memoriam*) pela contribuição para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Joelma Soares da Silva pela colaboração, confiança, ensinamentos e apoio;

Ao Dr. José Carlos Costa da Silva Pinto, Dra. Martina Costa Cerqueira Pinto, Ma. Thamiris Franckini Paiva, Luciana Dutra, Larissa Almeida e Gabriela Matos pela excelente contribuição para a realização deste trabalho;

A toda equipe do Laboratório de Entomologia Médica-LABEM pelo companheirismo durante todos esses anos de parceria;

Ao grupo de pesquisa de Controle Biológico de Insetos vetores da UFMA-Codó;

Ao Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processos (LMSCP) e ao Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela realiação das etapas do experimento;

A toda equipe do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA pelo acolhimento;

Aos meus pais Francisco Mota Viana e Maria de Jesus Pereira Lima pelo apoio e incentivo que serviram de alicerce para as minhas realizações;

À minha querida e amada avó Lucila Pereira de Melo (*in memoriam*) pelo amor que sempre me dedicou, por ter acreditado em mim e me proporcionado à chance de realizar os meus sonhos;

À minha amada irmã Julielma Lima Viana, a minha fonte de forças nesta longa trajetória de vida, permanecendo sempre presente na partilha de minhas conquistas e frustrações;

A minha sobrinha linda Izabelly Sophia. Te amo infinita vezes infinito;

Aos meus familiares que amo muito (tia Edite e tio Oliveira, aos meus primos: Elenilda, Edilene, Elenice, Antônio, Thiago e Eduardo e meus sobrinhos);

As minhas amigas e companheiras do doutorado Katiane, Aylane e Histelle que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre com o espírito colaborativo;

As minhas amigas Maria dos Remédios, Maxcilene, Rosinha e Maria de Jesus pela amizade que fizeram parte da minha formação e que irão continuar presentes em minha vida com certeza;

A Hellen, Hudson, Helena, Henrique, Marta, Glayson e Ana pelo carinho, apoio e hospedagem na cidade de Manaus;

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.



**“Um herói pode ser qualquer um, até mesmo um homem fazendo algo tão simples e reconfortante quanto colocar um casaco nos ombros de um menino para que ele saiba que o mundo não acabou”.**

**Batman**

## RESUMO

VIANA, Juliete Lima. **Encapsulamento de linhagens de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão para o controle de *Aedes aegypti* em condição simulada de campo**. 2024. 91 f. Tese. (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024.

Os inseticidas biológicos estão sendo utilizados como alternativas no controle de mosquitos vetores de doenças, incluindo o *Bacillus thuringiensis*, um entomopatógeno, capaz de sintetizar cristais proteicos tóxicos durante o processo de esporulação, chamados de proteína Cry e Cyt. Atualmente, os biopolímeros são bastante utilizados para o encapsulamento de bioinseticidas, o qual é uma alternativa no sentido de melhorar a persistência dos produtos em campo. No presente trabalho, foi investigada a microencapsulação de duas linhagens da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (BtMA-750 e BtMA-1114), que atuam como bioinseticidas de alta toxicidade para o mosquito vetor *Aedes aegypti*. Para isso, foi avaliado o encapsulamento de diferentes concentrações de microrganismos em micropartículas de amido utilizando a técnica de polimerização em suspensão inversa. Foi possível observar que maiores quantidades de bactérias ocasionaram uma leve diminuição no diâmetro das partículas, garantindo que mesmo a bactéria encapsulada ainda apresente um diâmetro médio adequado para ser consumido pelas larvas do *A. aegypti*. Além disso, notou-se que a presença de ambas as linhagens de *B. thuringiensis* não afetou a estabilidade térmica das partículas. As linhagens bacterianas microencapsuladas demonstraram elevado número de esporos viáveis e preservaram a expressão de proteínas com massas moleculares correspondentes às toxinas inseticidas Cry e Cyt, reforçando que o processo de encapsulamento foi realizado de forma controlada. Finalmente, as linhagens encapsuladas foram testadas em laboratório contra larvas de *A. aegypti* e manteve 100% de mortalidade das larvas durante 35 dias. O encapsulado de BtMA-1114 apresentou  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  com  $0.0075 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0.0872 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Já a linhagem BtMA-750 apresentou maiores valores de  $CL_{50}$  com  $0.137 \text{ mg/L}$  e  $CL_{90}$  com  $10.08 \text{ mg.L}^{-1}$ . Em condição simulado de campo, observou-se mortalidade larval nos recipientes expostos a luz solar durante 23 dias de experimento aplicando a  $CL_{50}$  do encapsulado BtMA-750, já o encapsulado BtMA-1114 observou-se alta mortalidade larval até a terceira semana de exposição bacteriana. Portanto, foi demonstrado que a microencapsulação de *B. thuringiensis* com amido utilizando a técnica de polimerização em suspensão inversa não só garante a atividade bacteriana, mas também prolonga a ação do bioinseticida. Tais descobertas destacam o grande potencial dos novos biopesticidas, que podem ajudar a reduzir os índices populacionais do mosquito vetor *A. aegypti* de forma sustentável e sem agressão ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** Arboviroses; Controle biológico; Bactéria entomopatogênica; Micropartícula polimérica.

## ABSTRACT

VIANA, Juliete Lima. **Encapsulation of *Bacillus thuringiensis* strains from Maranhão to control *Aedes aegypti* in simulated field conditions**. 2024. 91 f. Thesis. (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – State University of Amazonas, Manaus, 2024.

Biological insecticides are being used as alternatives to control disease vector mosquitoes, including the *Bacillus thuringiensis*, an entomopathogen, capable of synthesizing toxic protein crystals during the sporulation process, called Cry and Cyt proteins. Currently, biopolymers are widely used for the encapsulation of bioinsecticides, which is an alternative to improving the persistence of products in the field. In the present work, the microencapsulation of two strains of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (BtMA-750 and BtMA-1114) was investigated, which act as highly toxic bioinsecticides for the mosquito vector *Aedes aegypti*. To this end, the encapsulation of different concentrations of microorganisms in starch microparticles was evaluated using the inverse suspension polymerization technique. It was possible to observe that greater quantities of bacteria caused a slight decrease in the diameter of the particles, ensuring that even the encapsulated bacteria still has an average diameter suitable for consumption by *A. aegypti* larvae. Furthermore, it was noted that the presence of both strains of *B. thuringiensis* did not affect the thermal stability of the particles. The microencapsulated bacterial strains demonstrated a high number of viable spores and preserved the expression of proteins with molecular masses corresponding to the insecticidal toxins Cry and Cyt, reinforcing that the encapsulation process was carried out in a controlled manner. Finally, the encapsulated strains were tested in the laboratory against *A. aegypti* larvae and maintained 100% larval mortality for 35 days. The BtMA-1114 encapsulate presented LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> with 0.0075 mg.L<sup>-1</sup> and 0.0872 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. The BtMA-750 lineage presented higher values of LC<sub>50</sub> with 0.137 mg/L and LC<sub>90</sub> with 10.08 mg.L<sup>-1</sup>. In simulated field conditions, larval mortality was observed in containers exposed to sunlight during 23 days of experiment applying the LC<sub>50</sub> of the encapsulated BtMA-750, whereas in the encapsulated BtMA-1114 high larval mortality was observed until the third week of bacterial exposure. Therefore, it was demonstrated that microencapsulation of *B. thuringiensis* with starch using the inverse suspension polymerization technique not only guarantees bacterial activity, but also prolongs the action of the bioinsecticide. Such discoveries highlight the great potential of new bioinsecticides, which can help reduce population rates of the mosquito vector *A. aegypti* in a sustainable way and without harming the environment.

**Key-words:** Arboviruses; Biological control; Entomopathogenic bacteria; Polymer microparticle.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* em larvas de mosquito vetor de doenças. **19**
- Figura 2** - Fases de vida do mosquito *Aedes aegypti*: (A) ovos; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto. **21**
- Figura 3** - Fluxograma simplificado da metodologia de encapsulamento de linhagens de *Bacillus thuringiensis* com ação inseticida para larvas de *Aedes aegypti*. **30**
- Figura 4** - Realização dos experimentos com as linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas com amido em condição simulada. **36**
- Figura 5** - Espectros infravermelhos das micropartículas analisadas. A) Linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 encapsuladas com 250 mg e 200 mg de bactéria, respectivamente e B) Linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 encapsuladas com 1700 mg de bactéria. **38**
- Figura 6** - Curvas termogravimétricas do amido reticulado e das linhagens encapsuladas, no qual mostram os termogramas (TGA) das amostras e sua respectiva derivada de decomposição térmica (DTG). A) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 250 mg de bactéria; B) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 200 mg de bactéria; C) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 1700 mg de bactéria; D) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 1700 mg de bactéria. **39**
- Figura 7** - Crescimento bacteriano proveniente das micropartículas de amido. (A) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 250 mg de bactéria; (B) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 200 mg de bactéria; (C) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 1.700 mg de bactéria; (D) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 1.700 mg de bactéria. **40**
- Figura 8** - Perfil proteico das linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas com amido com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. MM: marcador molecular (Broad Range Protein Molecular 225 a 10 kDa); Bti 1 - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* T14 001 e Bti 2 formulado VectoBac. **41**
- Figura 9** - Atividade larvicida de linhagens bacterianas encapsuladas estimadas em bioensaios. **42**
- Figura 10** - Percentual de mortalidade larval de *Aedes aegypti* utilizadas nos bioensaios em condição simulada de campo com linhagens encapsuladas com amido BtMA-750 e BtMA-1114. **44**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Relação das linhagens de *Bacillus thuringiensis* utilizadas no encapsulamento com amido, conforme a origem do substrato de isolamento. **29**
- Tabela 2** - Diâmetro médio das linhagens bacterianas encapsuladas com amido. **37**
- Tabela 3** - Concentração de esporos viáveis das linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas com amido. **40**
- Tabela 4** - Estimativa das Concentrações Letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em mg.L<sup>-1</sup> para as linhagens encapsuladas de *Bacillus thuringiensis* com toxicidade para larvas de *Aedes aegypti*. **43**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 OBJETIVOS .....	16
1.1.1 Geral .....	16
1.1.2 Específicos .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	18
2.2 <i>Aedes aegypti</i> E AS DOENÇAS DENGUE, FEBRE AMARELA URBANA, VÍRUS ZIKA E CHIKUNGUNYA .....	20
2.3 CONTROLE VETORIAL DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....	22
2.4 ENCAPSULAMENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
2.5 POLÍMEROS .....	25
2.6 TÉCNICAS DE POLIMERIZAÇÃO .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	29
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O ENCAPSULAMENTO .....	30
3.3 PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS À BASE DE POLÍMERO NATURAL .....	31
3.4 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DTP .....	31
3.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) .....	31
3.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) .....	32
3.7 INCORPORAÇÃO DO BIOPRODUTO A MATRIZ POLIMÉRICA .....	32
3.8 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NAS LINHAGENS ENCAPSULADAS .....	32
3.9 CRIAÇÃO DE <i>Aedes aegypti</i> EM LABORATÓRIO PARA A REALIZAÇÃO DOS BIOENSAIOS .....	33
3.10 ATIVIDADE LARVICIDA DAS LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> ENCAPSULADAS EM LABORATÓRIO.....	34
3.11 BIOENSAIOS QUANTITATIVOS.....	34
3.12 EFETIVIDADE DAS LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> ENCAPSULADAS EM CONDIÇÃO SIMULADO DE CAMPO .....	35
3.13 ANÁLISE DOS DADOS .....	36
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 ANÁLISES MORFOLÓGICAS .....	37

4.2 ESPECTROSCOPIA FT-IR .....	37
4.3 ANÁLISES TÉRMICAS .....	39
4.4 CRESCIMENTO BACTERIANO .....	39
4.5 PERFIL PROTEICO DAS LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> ENCAPSULADA.....	40
4.6 EFETIVIDADE BACTERIANA.....	41
4.7 BIOENSAIOS QUANTITATIVOS.....	42
4.8 BIOENSAIOS EM CONDIÇÃO SIMULADA DE CAMPO .....	43
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A região da Amazônia brasileira possui condições climáticas com temperaturas elevadas e altos níveis de insolação, que contribuem para a proliferação de mosquitos vetores dos agentes etiológicos da malária, dengue, zika e chikungunya, os quais são de importância médica e sanitária no Brasil (BRASIL, 2022). O controle biológico desses vetores é uma alternativa eficiente quando comparado ao controle químico. Produtos de origem biológica, são ambientalmente viáveis, pois são biodegradáveis e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade ao ambiente. Entre os mais variados produtos biológicos usados no controle de vetores ou pragas agrícolas, destaca-se a bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) (BRAVO *et al.*, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009; BEN-DOV, 2014; VARGAS *et al.*, 2022). Essa linhagem apresenta elevada toxicidade contra mosquitos vetores devido à produção de proteínas Cry e Cyt, as quais possuem ação larvicida (CRICKMORE *et al.*, 1998; CRICKMORE *et al.*, 2023).

Na fase de esporulação a bactéria produz essas toxinas, que possuem atividade inseticida, que quando acumuladas formam os cristais proteicos. As proteínas Cry são tóxicas para as ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera, já as Cyt apresentam toxicidade para insetos da ordem Diptera. As proteínas Cry se ligam aos receptores específicos presentes na membrana do intestino médio dos insetos, provocando septicemia e morte da larva, diferentemente as toxinas Cyt não se ligam aos receptores, mas se inserem diretamente na membrana celular, potencializando a ação inseticidas das Cry (HÖFTE e WHITELEY, 1989; BRAVO *et al.*, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009; BEN-DOV, 2014).

No entanto, alguns fatores ambientais como a exposição direta aos raios ultravioleta (UV) e insolação podem inativar a ação dessas toxinas, interferindo assim na sua efetividade e inviabilizando a persistência em campo dos produtos à base de *B. thuringiensis* Berliner, 1911. Estudos realizados por Batra *et al.* (2000) e Viana *et al.* (2021a) demonstraram que a eficácia e persistência dos formulados de Bti é reduzida quando expostos a essas condições ambientais em campo, a duração do larvicida fica entre duas a três semanas.

Uma alternativa viável, é o encapsulamento do *B. thuringiensis* utilizando uma matriz polimérica natural, que possibilita ampliar o espectro de ação deste bacilo, sendo capaz de diminuir a influência de fatores ambientais na persistência da bactéria e, levando maior tempo para degradar no ambiente e, consequentemente aumentando o poder residual do produto.

Atualmente, as matrizes poliméricas são muito utilizadas para o encapsulamento de diversos produtos por representar uma das classes de materiais mais versáteis, disponíveis para



aplicações em diversas áreas tecnológicas, além de representarem uma medida ecologicamente viável e segura.

Nesse sentido, o presente trabalho realizou o encapsulamento de linhagens de *B. thuringiensis* (BtMA-750 e BtMA-1114) pertencentes ao Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA) com ação inseticida comprovada para larvas de *Aedes aegypti* (L. 1762), *Aedes albopictus* (Skuse), *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 e *Anopheles darlingi* (Root, 1926) (BARBOSA *et al.*, 2017; SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021).

O encapsulamento de linhagens com biopolímero possibilitará o desenvolvimento de bioprodutos extraídos de recursos naturais e o desenvolvimento de materiais sustentáveis, o que é uma ótima alternativa para a segurança ambiental. Além disso, a utilização de *B. thuringiensis*, que hoje representa o melhor princípio ativo utilizado mundialmente para o controle biológico de insetos, é de extrema importância para estes procedimentos, pois diante da preocupação quanto à utilização racional dos recursos naturais e a sustentabilidade, esta estratégia de encapsulamento de linhagens de *B. thuringiensis* com o biopolímero amido se enquadra na proposta de produção de produtos ecologicamente sustentáveis. As atividades de controle, contribuem para a redução da poluição gerada quanto à aplicação de inseticidas químicos aos ecossistemas, sendo o meio ambiente beneficiado nas condições a serem desenvolvidas nesse trabalho (DUNKLE e SHASHA, 1988; RAMÍREZ-SUERO *et al.*, 2005; WEIMANN, 2014; HE *et al.*, 2017; KHORRAMVATAN *et al.*, 2017; ESKI *et al.*, 2019).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

- Avaliar a eficiência do encapsulamento de isolados de *B. thuringiensis* do Maranhão com biopolímero amido para o controle de larvas de *A. aegypti*.

### 1.2.2 Específicos

- Encapsular as linhagens de *B. thuringiensis* utilizando o biopolímero amido;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas dos encapsulados;
- Caracterizar o conteúdo proteico das linhagens encapsuladas de *B. thuringiensis* com ação tóxica para larvas de *A. aegypti*;
- Determinar o potencial larvicida dos bioprodutos em condições de laboratório;

- Determinar a Concentração Letal Mediana e o potencial de persistência dos bioprodutos em condição simulada de campo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Bacillus thuringiensis*

O *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 (Eubacteriales: Bacillaceae) é uma bactéria ubíqua, gram-positiva, e com alta toxicidade contra determinadas ordem de insetos, como Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera (ALVES, 1998; CRICKMORE *et al.*, 1998; BEN-DOV, 2014; SAUKA e BENINTENDE, 2017; VILLARREAL-DELGADO *et al.*, 2018; CRICKMORE *et al.*, 2023). Foi descoberta no início do século XX, no Japão, pelo biólogo Shigetane Ishiwata a partir de larvas mortas de bicho-da-seda. Em 1911 na província de Thuringia na Alemanha foi isolada larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) por Berliner (HABIB e ANDRADE, 1998; GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

Essa bactéria possui forma de bastonete de aproximadamente 1 a 1,2 µm largura por 3 a 5 µm de comprimento, geralmente com motilidade. São formadoras de esporos entre elípticos e cilíndricos, em posição central, com esporângio não nitidamente estendido, aeróbia, podendo também crescer facultativamente em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 45 °C (HABIB e ANDRADE, 1998).

Várias toxinas, com atividade inseticida podem ser produzidas por *B. thuringiensis* como:  $\alpha$ -exotoxinas,  $\beta$ -exotoxinas, quitinases, proteínas inseticidas vegetativas (VIP – do inglês “vegetative insecticidal proteins”) e dois tipos de  $\delta$ -endotoxinas sintetizadas durante o processo de esporulação: Cry e Cyt (CRICKMORE *et al.*, 1998; HÖFTE e WHITELEY, 1989; SCHNEPF *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007; DJENANE *et al.*, 2017; RICOLDI *et al.*, 2018).

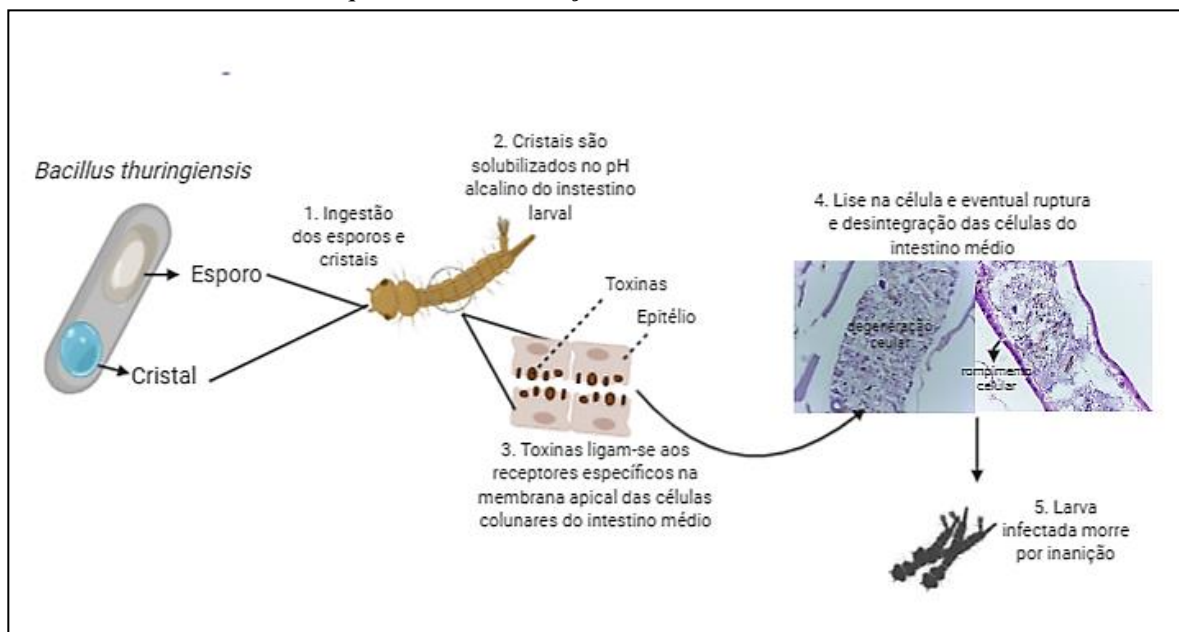
As toxinas Cry possuem massa molecular entre 40 e 140 kDa, sintetizadas sob condições restritas de crescimento e codificadas por diferentes genes denominados gene *cry*, mais de 750 genes *cry*, que codificam as proteínas Cry, já foram sequenciados e estão classificadas em 74 grupos organizados em diferentes subgrupos (AGAISSE e LERECLUS, 1995; BRAVO *et al.*, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009; da COSTA *et al.*, 2010; CRICKMORE *et al.*, 2023).

A toxicidade de um isolado está relacionada aos diferentes tipos de genes *cry* funcionais codificadores das proteínas Cry que o mesmo possui. A presença dos genes serve como parâmetro para inferir na efetividade de uma cepa bacteriana contra um determinado grupo de insetos (PINTO *et al.*, 2003; SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021).

As proteínas Cry tornam-se tóxicas aos insetos alvo quando são ingeridas pelas larvas. As toxinas ligam-se a receptores específicos no intestino médio das larvas, após o reconhecimento do receptor começa a formação de poros na membrana celular do epitélio intestinal, provocando desequilíbrio iônico, aumentando a absorção de água, ruptura e desintegração das células do intestino médio, levando o inseto à paralisia e à morte (HÖFTE e

WHITELEY, 1989; GLARE e O'CALLAGHAM, 2000; SOBERÓN *et al.*, 2018; VIANA *et al.*, 2021b) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* em larvas de mosquito vetor de doenças.



Fonte: Esquema realizado por Vieira-Neta no Created in BioRender e figuras do epitélio intestinal de Viana *et al.* (2021b).

As toxinas Cyt são  $\delta$ -endotoxinas com massa molecular de 27–30 kDa, que são codificadas pelos genes *cyt*, sintetizadas principalmente por isolados de *B. thuringiensis* ativos contra dípteros. As proteínas Cyt possuem atividade citolítica e são constituídas pelos grupos Cyt1, Cyt2 e Cyt3, com mais de 30 genes *cyt* sequenciados (KONI e ELLAR, 1993; CRICKMORE *et al.*, 1998; SCHNEPF *et al.*, 1998; ELLEUCH *et al.*, 2015; CRICKMORE *et al.*, 2023). Essas toxinas podem agir sinergicamente com toxinas Cry mosquitocida, funcionando como um receptor para a ligação de toxinas Cry em membranas das células do intestino de insetos alvo, desempenhando assim um papel crucial na atividade tóxica das linhagens bacterianas (CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995; VIANA *et al.*, 2021b).

*B. thuringiensis* apresenta boa efetividade no controle biológico de insetos, pois apresenta persistência no ambiente, em locais protegidos de raios UV; possui também a capacidade de esporular em larvas mortas, favorecendo sua manutenção no ambiente; bem como, menor probabilidade de causar resistência, devido à diversidade de toxinas. Além disso, o bacilo é inócuo aos humanos, mamíferos, aves, répteis, anfíbios ou peixes, pois não causam danos, possibilitando a aplicação em área onde essas espécies habitam (BETZ *et al.*, 2000; RAMÍREZ-LEPE e RAMÍREZ-SUERO, 2012; LOBO *et al.*, 2018).

## 2.2 *Aedes aegypti* e as doenças dengue, febre amarela urbana, Zika vírus e chikungunya

O *Aedes aegypti* (L. 1762) é hoje um dos principais problemas em saúde pública no mundo, devido ao seu papel como transmissor de agentes patogênicos ao homem que causam doenças como a dengue, febre amarela urbana, Zika vírus e chikungunya, entre outros (FORATTINI, 2002; NATAL, 2002; HONÓRIO *et al.*, 2015; VASCONCELOS, 2015; BRASIL, 2022). Esse vetor pertence ao filo Artropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia* (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; MONTEIRO, 2014).

Esse mosquito foi introduzido na América durante a colonização e o tráfico negreiro. Foi descrito originalmente no Egito, o que lhe conferiu o nome específico (*aegypti*) (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; EIRAS, 2000; FORATTINI, 2002; BRAGA e VALLE, 2007; FERREIRA-DE-BRITO *et al.*, 2016). *A. aegypti* possui ampla distribuição geográfica, predominando nas áreas tropicais e subtropicais situadas entre os paralelos de latitudes 45° Norte e 40° Sul, e nas zonas isotermas intermediadas a 20 °C (GADELHA, 1985; FORATTINI, 2002).

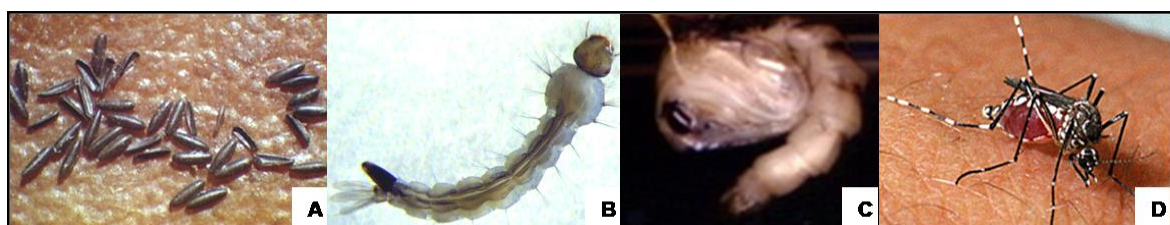
O *A. aegypti* é um vetor que possui hábito diurno e alimenta-se preferencialmente de sangue humano, podendo também utilizar sangue de outros animais (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Esse vetor possui elevada preferência por ambiente domiciliar e, realiza hematofagia na maior parte das vezes no intradomicílio (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1999; FORATTINI, 2002). Esse mosquito é característico por apresentar escamas brancas, escudo recoberto por escamas escuras e um desenho em forma de lira composto por escamas brancas prateadas (FORATTINI, 2002; REY *et al.*, 2006).

Em relação ao desenvolvimento desse vetor, são holometábolos compreendendo quatro fases durante o seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adultos (CONSOLI e LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; HIGGS e BEATY, 2005). As fêmeas realizam a oviposição em diferentes recipientes artificiais, fator que contribui para sua proliferação. Os ovos possuem como característica alta resistência às adversidades do meio, uma vez completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano, aumentando seu potencial de dispersão e sobrevivência. (FORATTINI, 2002; KRAEMER *et al.*, 2015; SOARES-PINHEIRO *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2019).

A fase larval compreende quatro estádios L1, L2, L3 e L4, que duram até cinco dias dependendo da temperatura, densidade larval e disponibilidade de alimento e, passam a maior

parte do tempo alimentando-se de matéria orgânica presente no fundo e nas paredes dos criadouros. Posteriormente as larvas entram na fase de pupa, estas desenvolvem-se aproximadamente em dois a três dias, nesta fase não se alimentam, sendo assim, raramente são afetadas pela ação de larvicidas (FUNASA, 2001; FORATTINI, 2002; BENEDICT *et al.*, 2007; POWELL e TABACHNICK, 2013; KRAEMER *et al.*, 2015). Após a fase de pupa o inseto adulto emerge, e dentro de 24 horas já pode acasalar, sobrevivendo em média entre 30 a 35 dias. Os mosquitos alimentam-se de seiva elaborada, composta principalmente por aminoácidos e açúcares. Entretanto, as fêmeas são hematófagas, pois necessitam de sangue para a maturação dos ovos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002) (Figura 2).

Figura 2. Fases de vida do mosquito *Aedes aegypti*: (A) ovos; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto.



Fonte: Imagem esquematizada por Viera-Neta, 2014, Bernhard Nocht (ovos); Richard C. Russel (larva); Stich A (pupa); Vieira G. J (adulto).

Durante o processo de hematofagia podem transmitir diferentes arbovírus que causam infecções ao homem (FORATTINI, 2002; VALLE *et al.*, 2016), como Dengue (DENV; gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), Febre amarela urbana (MONATH, 2001; TAVEIRA *et al.*, 2001; MASCHERETTI *et al.*, 2013; SOO *et al.*, 2016), Zika vírus (ZIKV; gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) (DIALLO *et al.*, 2014; GANGULI *et al.*, 2017) e vírus Chikungunya (CHIKV; gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*) (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014, WEAVER, 2014; KANTOR, 2016). Os vírus ZIKV e CHIKV foram introduzidos no Brasil provavelmente no período da Copa do Mundo em 2014 (VASCONCELOS, 2015).

A dengue é uma doença febril aguda causada por quatro sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (MARZOCHI, 1994; SOO *et al.*, 2016). Após um período de 10 a 14 dias do processo de hematofagia em indivíduo infectado que se encontra na fase virêmica, o mosquito é capaz de transmitir o vírus por toda sua vida por meio da picada. No homem, o período de incubação do vírus Dengue pode durar de três a 15 dias (FUNASA, 2001; BRASIL, 2002).

A febre amarela é uma infecção viral aguda, também transmitida ao homem por meio da picada de mosquitos infectados com vírus do gênero *Flavivirus*, essa doença possui dois ciclos de transmissão, o ciclo silvestre tendo como principais vetores, os mosquitos do gênero

*Haemagogus* Williston, 1896., 1827 e *Sabethes* Robineau-Desvoidy e o ciclo urbano, onde o vetor do vírus é o *A. aegypti* e o *Aedes albopictus* (Skuse 1894) (TAVEIRA *et al.*, 2001; MASCHERETTI *et al.*, 2013; SOO *et al.*, 2016).

O vírus CHIKV desencadeia quadros de febre, intensa dor nas articulações e cefaleia (BURT *et al.*, 2014; DONALISIO e FREITAS, 2015; KANTOR, 2016). O vírus ZIKV causa doença febril, podendo provocar cefaleia, mal-estar, edema, dor nas articulações e em casos mais graves comprometimento do sistema nervoso central, ocasiona microcefalia e distúrbios neurológicos em recém-nascidos, além disso o vírus pode estar associado a síndrome de Guillain-Barré (SALLENT *et al.*, 2016; MORA-CÁRDENAS e MARCELLO, 2017; WHO e UNICEF, 2017).

Fatores como mudanças climáticas e sociais, como a urbanização desordenada sem a devida estrutura de saneamento, abastecimento de água e globalização da economia favorece a dispersão do mosquito *A. aegypti*, e conseqüentemente a disseminação das arboviroses (TAUIL, 2002).

### **2.3 Controle vetorial do mosquito *Aedes aegypti***

O controle de mosquitos vetores consiste em eliminar ou reduzir a população desses insetos que transmitem patógenos causadores de doenças ao homem. O controle vetorial pode ser dividido em mecânico ou ambiental, químico e biológico (BRAGA e VALLE, 2007; ZARA *et al.*, 2016; BASSANI *et al.*, 2019).

O controle mecânico ou ambiental utiliza metodologias que eliminam ou reduzem água estagnada em criadouros artificiais como pneus velhos, latas, caixas d'água, vasos de plantas, frascos e outros (BRASIL, 2009; BASSANI *et al.*, 2019).

O controle químico utiliza diversas substâncias químicas de origem orgânica ou inorgânica (BRAGA e VALLE, 2007; LIMA *et al.*, 2009; BASSANI *et al.*, 2019). Os inseticidas químicos como organoclorados (DDT), organofosforados (malathion e Temephos) e carbamatos (carbofurano) e os piretroides (cipermetrina) atuam no sistema nervoso central do inseto (BRAGA e VALLE, 2007). Os principais problemas do uso destes inseticidas é a seleção de populações de *A. aegypti* resistentes, além dos impactos ambientais como contaminação do solo e dos recursos hídricos; além do risco à saúde humana provocados por seu uso intensivo (POLANCZYK *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2004; ZARA *et al.*, 2016; MOYES *et al.*, 2017; VARGAS *et al.*, 2022).

Outro larvicida utilizado é o pyriproxyfen pertencente ao grupo químico éter piridiloxipropílico, um análogo de hormônio juvenil ou juvenóide, que atua inibindo o desenvolvimento das características adultas do inseto, ou seja, mantendo-o com aspecto imaturo

e causando esterilidade (DIVE/SUV/SES/SC, 2014; BASTOS *et al.*, 2016). Esse larvicida começou a ser introduzido nos estados brasileiros em 2014, em substituição ao temephos, que não é mais utilizado devido a problemática de resistência (BRAGA e VALLE, 2007; DIVE/SUV/SES/SC, 2014). Apesar do pyriproxyfen apresentar resultados satisfatórios no controle dos vetores, já foi verificada resistência cruzada em populações de *A. aegypti* resistentes a temefós (ANDRIGHETTI *et al.*, 2008; Oo *et al.*, 2018).

Os inseticidas biológicos também vêm sendo utilizados como alternativas no controle dos mosquitos vetores (POLANCZYK *et al.*, 2003; BRAGA e VALLE, 2007; VIANA *et al.*, 2021c). O *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* é o agente mais efetivo utilizado na fabricação de inseticidas biológicos (SCHNEPF *et al.*, 1998; BEN-DOV, 2014). No entanto, o elevado custo dos bioinseticidas derivados dessa bactéria, ocasiona aumento do preço final do produto para o consumidor e a diminuição da competição destes produtos em relação ao mercado dos inseticidas químicos (ANGELO *et al.*, 2010).

Desta forma, a busca por novas linhagens de *B. thuringiensis* é realizada em diferentes laboratórios do mundo, com intuito de obter isolados que estejam adaptados às condições ambientais de cada região, além de contribuir para uma maior variabilidade genética das diferentes linhagens do *B. thuringiensis* para fabricação de novos produtos (SALEKJALALI *et al.*, 2012; BEN-DOV, 2014; LOBO *et al.*, 2018; TISSERA *et al.*, 2018; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021). Encontrar linhagens brasileiras que possuam atividade inseticida mais adaptadas para a nossa região, além do uso da tecnologia de encapsulamento com polímeros naturais é importante para reduzir o preço final e aumentar o poder residual de um novo produto. A persistência no ambiente é um importante fator na efetividade do produto, porque é mediante esse processo que as bactérias se mantêm por maior tempo nos criadouros realizando o controle das larvas.

## 2.4 Encapsulamento de *Bacillus thuringiensis*

Atualmente, no mercado estão disponíveis diferentes formulados como VectoBac® WG, VectoBac® CG, VectoBac® 12AS, entre outros, à base de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), sendo que a maioria desses formulados constitui-se de formas líquidas e granuladas, contendo os cristais com atividade inseticida e os esporos viáveis, estes últimos auxiliam o processo de reciclagem da bactéria (BECKER, 2000; COUCH, 2000; SOARES-DASILVA, 2009; VIANA *et al.*, 2021a). A viabilidade dos esporos é um importante fator, pois sabe-se que para uma maior duração da atividade larvicida é necessária a manutenção de esporos viáveis, que em condições favoráveis, podem levar à reciclagem destas bactérias no



cadáver larval, o que aumenta o tempo de ação da bactéria em campo (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2021a).

Devido à importância dos mosquitos vetores em transmitir diferentes agentes patogênicos ao homem, que acometem uma boa parcela da população e, considerando ainda, a boa efetividade da bactéria *B. thuringiensis* no controle desses insetos, as alternativas são produzir novos produtos, que possam ter um poder residual maior em campo e garantir produção de baixo custo. Desta forma, esses biolarvicidas tornam-se competitivos aos produtos químicos e possibilitam a utilização de inseticidas ecologicamente seguros (ARAÚJO, 2006; VIANA *et al.*, 2021a).

As formulações devem manter as características dos microrganismos entomopatogênicos necessárias para a sua atuação como bioinseticidas. Devem ser de fácil aplicação, ter tamanhos de partículas de acordo com o tamanho do inseto alvo, possibilitando assim, a ingestão pelas larvas e, ainda, ser possível o armazenamento, por um maior tempo possível. Nesse caso, em condições ambientais que não afetem as propriedades do larvicida, protegendo o princípio ativo das condições adversas, como fotossensibilidade, altas temperaturas, baixa umidade, entre outras.

Dentre as estratégias para reduzir a fotossensibilidade, a microencapsulação com polímeros, a fim de torná-los mais resistentes às condições ambientais e com maior período de validade é uma alternativa viável (CANEVAROLO, 2006; ANGELO *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ-SUÁREZ *et al.*, 2011). O encapsulamento é definido como uma técnica capaz de revestir ou empacotar substâncias sólidas, líquidas ou gasosas, utilizando um revestimento polimérico, no qual o seu conteúdo é liberado de forma controlada e sob condições específicas (SUAVE *et al.*, 2006; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008; WAY *et al.*, 2018).

Vários estudos buscam encapsular diferentes linhagens de *B. thuringiensis* com uma ampla variedade de polímeros na tentativa de melhorar o poder residual dos produtos, os quais são influenciados pelas condições ambientais, como exposição direta à luz solar que ocasiona inativação da toxina pela radiação ultravioleta e evaporação da água. Geralmente o encapsulamento de microrganismos é realizado com polímeros biodegradáveis, pois estes protegem e estabilizam os agentes ativos, e permitem manter o caráter tóxico e seletivo do bioinseticida, protegendo-o do meio ambiente, além de auxiliar na cinética de liberação do agente (DUNKLE e SHASHA, 1988; RAMÍREZ-SUERO *et al.*, 2005; WEIMANN, 2014; HE *et al.*, 2017; KHORRAMVATAN *et al.* 2017; ESKI *et al.*, 2019). Isso pode levar a ampliação do tempo de prateleira do produto, aumentando o seu potencial de aproveitamento econômico. Além disso, pode manter sua atividade metabólica durante longos períodos de tempo, não só

durante o armazenamento, mas também depois da aplicação (CANEVAROLO, 2006; VEMMER e PATEL, 2013).

Torna-se relevante também o desenvolvimento de materiais sustentáveis, como os biopolímeros, que podem ser definidos como polímeros naturais biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos. Por este motivo, os biopolímeros apresentam alto potencial para o encapsulamento de compostos (VAUTHIER e BOUCHEMA, 2009; FANGUEIRO *et al.*, 2010; FOGLIO *et al.*, 2013; WAY *et al.*, 2018).

O encapsulamento de isolados tóxicos às larvas de *A. aegypti*, do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA) é de extrema importância, pois poderão ser utilizados para a fabricação de larvicidas e adulticidas biológicos para mosquitos vetores, os quais poderão resultar em produtos biotecnológicos de baixo custo e eficientes para o controle biológico dos mosquitos vetores.

## 2.5 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas de elevada massa molar, compostas por unidades que se repetem denominadas meros, ligadas por ligação covalente, apresentam matéria prima para a produção que é o monômero, ou seja, uma molécula com um (mono) unidade de repetição, formados por meio de reações denominada polimerização. A palavra polímero origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição) (MANO e MENDES, 2004; CANEVAROLO, 2006).

Os polímeros podem ser classificados no ponto de vista estrutural, em homopolímeros e copolímeros, ou seja, de acordo com o tipo de monômeros que formam a estrutura ou cadeia polimérica (CANEVAROLO, 2006). Os homopolímeros são macromoléculas provenientes da polimerização de um só tipo de monômero (SCICOLONE, 2002; CANEVAROLO, 2006), enquanto os copolímeros são resultantes da polimerização de mais de um monômero (CANEVAROLO, 2006; STUART, 2007). Podem ainda ser divididos conforme o tipo de estrutura que apresentam, de cadeia linear, ou não linear (ramificados e reticulados) (UBIETA, 2011; CALLISTER e RETHWISCH, 2012).

Podem ainda ser classificados quanto ao comportamento mecânico em termoplásticos (plásticos), elastômeros e fibras. Os plásticos apresentam grande variedade de combinações e aplicações, e se dividem em termoplásticos e termofixos (termorrígidos). Os termoplásticos são polímeros que podem ser fundidos e solidificados repetidas vezes, com pouca ou nenhuma variação em suas propriedades básicas, enquanto os termofixos são polímeros que, após sofrerem o processo de ligações cruzadas, não podem ser fundidos ou dissolvidos sem a ocorrência da degradação de sua estrutura química. Os elastômeros possuem elasticidade,

deformações maiores que voltam a sua forma inicial. As fibras são utilizadas em compósitos e na indústria têxtil, e podem ser estirados em longos filamentos com uma razão entre o comprimento e o diâmetro de 100:1 (MANRICH, 2005; CANEVAROLO, 2006).

Os polímeros também podem ser divididos em sintéticos obtidos por síntese a partir do petróleo, e naturais ou biopolímeros naturais que ocorrem normalmente na natureza (MANO e MENDES, 2004; CANEVAROLO, 2006; SHRIVASTAVA, 2018).

Os polímeros sintéticos são bastante utilizados nas indústrias, são constituídos por monômeros com carbono e obtidos por meio de reações de polimerização. O problema da utilização desses polímeros ao meio ambiente são: a poluição dos mares, rios, lagos, igarapés e a liberação de gases tóxicos, resultando em alternativa de reciclagem, biodegradação e uso de polímeros biodegradáveis na tentativa de minimizar os efeitos negativos desses polímeros sintéticos (SCICOLONE, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2018).

Os polímeros naturais ou biopolímeros são polímeros ou copolímeros obtidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis como a soja, milho, cana-de-açúcar, celulose, dentre outros. Esses biopolímeros possuem um ciclo de vida mais curto, se renovam de forma rápida, e são mais sustentáveis (MOHANTY *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2011; SHRIVASTAVA, 2018; BILAL e IQBAL, 2019).

Os biopolímeros podem ser biodegradáveis ou não, já que os polímeros biodegradáveis são resultantes da ação de microrganismos, como bactérias, fungos e algas, podendo ser degradados em semanas ou meses. Esses polímeros biodegradáveis podem ser sintetizados de fontes naturais renováveis (biopolímeros), produzidos por bactérias, derivados de fonte animal, fontes fósseis ou da mistura entre biomassa e petróleo (RAY e BOUSMINA, 2005; PIRES *et al.*, 2015; BILAL e IQBAL, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2021).

Dentre os biopolímeros utilizados, tem-se o amido formado por moléculas de glicose unidas entre si por meio de ligações glicosídicas com elevado peso molecular. O amido é o principal polissacarídeo de reserva de carboidratos do reino vegetal, pode ser encontrado abundantemente na natureza, apresenta baixo custo, pode ser adicionado a diferentes polímeros sintéticos, pode também ser utilizado como carga para a diminuição do custo do produto final, além de ser totalmente biodegradável (ABDILLAH *et al.*, 2013; AZEVÊDO *et al.*, 2018).

Esses biopolímeros são promissores na substituição aos materiais não biodegradáveis, principalmente quando se considera a preocupação ambiental com o desenvolvimento de novas tecnologias para o desenvolvimento de bioprodutos no controle biológico de mosquitos vetores.

Polímeros naturais, a exemplo do amido, são uma excelente estratégia para o desenvolvimento de produtos ecologicamente sustentáveis, pois são produzidos com matéria-

prima renovável de baixo custo, podendo ser uma alternativa para fabricação de bioprodutos com maior duração no ambiente, especialmente para o controle de mosquitos vetores. Além disso, do ponto de vista da saúde, esses produtos poderão reduzir o uso dos inseticidas químicos, os quais quando utilizado continuamente seleciona populações de mosquitos resistentes.

## 2.6 Técnicas de polimerização

O encapsulamento é um método de acondicionamento de materiais líquidos, sólidos ou gasosos em cápsulas pequenas, podendo liberar o conteúdo sob condições específicas e de forma controlada (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008; XING *et al.*, 2014; BARRETO *et al.*, 2015). O processo de produção das microcápsulas teve origem na década de 1930, em que o pesquisador Barret K. Green descobriu e desenvolveu o sistema de formação dessas microcápsulas mediante o processo de coacervação (BLENFORD, 1986).

Existem várias técnicas que são utilizadas para a produção das microcápsulas, no entanto, é importante selecionar a técnica de acordo com a interação entre o material de núcleo e de parede, se as etapas de processamento são adequadas aos materiais utilizados, se a taxa de liberação é premeditada, deve-se observar o tamanho das partículas formadas, como também a futura aplicação da mesma (DE SOUZA SIMÕES *et al.*, 2017).

As técnicas utilizadas para o encapsulamento podem ser divididas em físicos (*spray drying*, liofilização, evaporação de solventes, precipitação de fluídos supercríticos, etc.), químicos (complexação de inclusão molecular, polimerização *in situ*, etc.) e os físico-químicos (lipossomas, gelificação iônica, emulsificação, coacervação, etc.) (MILIÁN *et al.*, 2017; OZKAN *et al.*, 2019; SAIFULLAH *et al.*, 2019).

Dentre as técnicas de polimerização, destaca-se a polimerização em suspensão, esse sistema de polimerização pode ser classificado em homogêneos e heterogêneos. O sistema homogêneo são polimerização em massa e a polimerização em solução. Já as técnicas em sistemas heterogêneos são polimerização em lama, polimerização em emulsão, polimerização em suspensão, polimerização interfacial e polimerização em fase gasosa (MANO e MENDES, 2004; ODIAN, 2004; CANEVAROLO, 2006).

A técnica em suspensão utiliza água como meio de transferência de calor, em substituição à utilização de outros solventes. No sistema de polimerização em suspensão clássico, emulsão inversa ou óleo-em-água (O/W), tem-se a fase aquosa contínua e a fase orgânica apresentando monômeros e o iniciador. A solução aquosa é dispersa em uma fase contínua oleosa e essa emulsão é chamada de emulsão inversa. Na preparação da solução é utilizado um surfactante como agente estabilizante da suspensão (CANEVAROLO, 2006; MACHADO *et al.*, 2007; DE SOUZA E CASTRO *et al.*, 2020). Nesse tipo de técnica, a reação

se passa em meio heterogêneo. É importante também para a estabilidade do sistema e controle do tamanho das partículas a agitação desse sistema (ODIAN, 2004; RUDIN e CHOI, 2013; DE SOUZA E CASTRO *et al.*, 2020).

A técnica de suspensão permite melhor controle da temperatura, pois apresenta facilidade de dissipação de calor na reação, e mais baixa viscosidade do sistema ao longo da reação. Essa técnica resulta em baixos níveis de impureza no produto e, consequentemente, menor custo de separação, quando comparada com técnicas em emulsão. É importante ressaltar que a técnica de suspensão inversa nunca foi reportada para preparação de partículas a partir de polímeros naturais para o encapsulamento de *B. thuringiensis*.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o encapsulamento de duas linhagens de *B. thuringiensis* em micropartículas de amido, com diferentes combinações de toxinas Cry e Cyt, tóxicas ao *A. aegypti*. Ademais, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações das linhagens no encapsulamento e as respectivas atividades larvicidas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis*

As linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas neste trabalho foram selecionadas do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA) do Laboratório de Entomologia Médica-LABEM da UEMA, *Campus Caxias*, Maranhão, Brasil. Atualmente na coleção há 1.448 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes dos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, e do ecossistema Mangue e Restinga do estado do Maranhão e Caatinga do Piauí, as amostras foram isoladas do solo, água e insetos mortos.

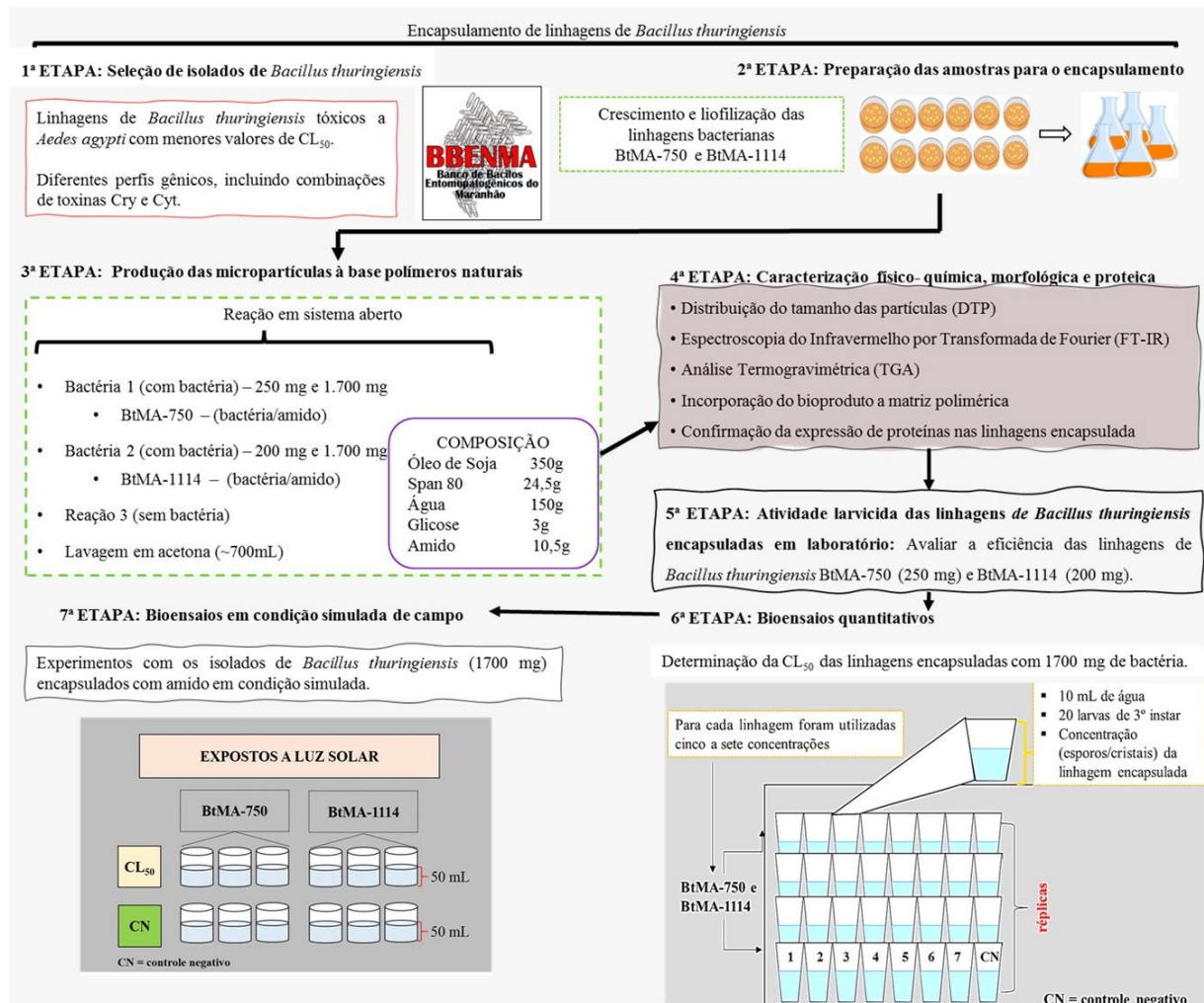
Foram selecionadas duas linhagens do Banco de Bacilos BtMA-750 e BtMA-1114 (Tabela 1). Essas linhagens apresentaram maior toxicidade em larvas de *A. aegypti* e foi constatado diferentes perfis gênicos, incluindo combinações de toxinas Cry e Cyt, as quais apresentaram elevada especificidade para mosquitos (SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2017; VIEIRA-NETA *et al.*, 2021). O trabalho foi desenvolvido conforme o fluxograma simplificado abaixo: (Figura 3)

Tabela 1. Relação das linhagens de *Bacillus thuringiensis* utilizadas no encapsulamento com amido, conforme a origem do substrato de isolamento.

<b>Linhagem</b>	<b>Substrato</b>	<b>Ecossistema</b>	<b>Municípios</b>	<b>Georreferenciamento</b>
<b>BtMA-750</b>	solo	Restinga	São José de Ribamar-MA	02°27'56.5"S 044°11'43.2"W
<b>BtMA-1114</b>	inseto	Cerrado	Mirador-MA	*

\* sem localização

Figura 3. Fluxograma simplificado da metodologia de encapsulamento de linhagens de *Bacillus thuringiensis* com ação inseticida para larvas de *Aedes aegypti*.



Fonte: Autor

### 3.2 Preparação das amostras para o encapsulamento

Os isolados BtMA-750 e BtMA-1114 foram cultivados em 20 placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná) e incubado em estufa bacteriológica (FANEM<sup>®</sup>, Guarulhos, São Paulo) a 28 °C por 24 h. Posteriormente, foram transferidas para *Erlenmeyer* e cultivado em 600 mL do meio caldo nutriente (Kasvi) à 28 °C e 180 rpm, por cinco dias em agitador rotativo (*shaker*) (*Thermo Scientific*, Massachusetts, Estados Unidos), para a completa esporulação das bactérias e liberação dos cristais de proteínas. A cultura obtida foi liofilizada, baseando-se na metodologia de Santos *et al.* (2012), sendo centrifugada a 9.000 xg por 30 min a 4 °C, lavada com água destilada autoclavada, em seguida, congelada por 14 h e liofilizada por aproximadamente 6 h em liofilizador *Enterprise I* (Terroni, São Carlos, São Paulo) no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

### 3.3 Produção das micropartículas à base de polímero natural

Todas as etapas desta técnica e de caracterização morfológica e físico-química foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os isolados liofilizados foram encapsulados em micropartículas de amido por meio da técnica de polimerização em suspensão inversa. Para isso, a fase contínua oleosa foi composta por 350 g de óleo de soja (meio contínuo) e 24,5 g de Span 80 (surfactante, agente tensoativo) (Hexágono Química, Rio de Janeiro, Brasil), e a fase dispersa aquosa foi constituída por 150 g de água ultrapura, 3 g de glicose D (+) anidra P.A. acs-dextrose (agente reticulante) (Hexágono Química, Rio de Janeiro, Brasil), 10,5 g de Amido solúvel P.A (polímero natural) (Hexágono Química, Rio de Janeiro, Brasil) e pelas amostras de bactéria liofilizada estudadas BtMA-750 (250 mg e 1700 mg) e BtMA-1114 (200 mg e 1700 mg). Foram produzidas também partículas de amido reticulado sem a presença das linhagens das bactérias para serem usadas como referência.

Primeiramente, foi preparada a fase aquosa: a glicose foi solubilizada em água à 80 °C, em seguida, o amido foi adicionado até a completa solubilização e, por fim, foram acrescentadas as bactérias. O meio foi mantido sob agitação vigorosa para dispersão das bactérias. Em seguida, a solução aquosa foi vertida sobre a fase oleosa (óleo de soja e Span 80), sendo essa mistura mantida em reator por 2 horas a 80 °C, sob agitação constante de 900 rpm. Ao final da reação, o sistema foi resfriado até atingir 10 °C, com auxílio de um banho de gelo sob agitação constante, para que houvesse a gelificação do polímero, obtendo-se uma suspensão das micropartículas. Após a etapa de resfriamento, as micropartículas de amido foram lavadas com acetona, separadas por filtração e secas em estufa de recirculação, de maneira a remover a umidade residual.

### 3.4 Distribuição do tamanho das partículas (DTP)

A determinação do diâmetro médio e a distribuição de tamanhos médios das partículas encapsuladas foi determinada por meio da técnica de espalhamento da luz provocada pela presença das partículas poliméricas, com auxílio do equipamento *Mastersizer Instruments*, modelo *Mastersizer 2000* (Malvern, Reino Unido). As amostras foram dispersas em água e analisadas em temperatura ambiente.

### 3.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de FT-IR foi realizada para avaliar os grupos químicos da matriz (amido) e bactérias encapsuladas (BtMA-750 e BtMA-1114). Os espectros foram registrados na região



do infravermelho médio ( $4000\text{ cm}^{-1}$  -  $500\text{ cm}^{-1}$ ), com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  usando um espectrofotômetro modelo Cary 360 - *Agilent Technologies* (Califórnia, EUA) equipado com detector DTGS KBr (Brometo de Potássio) e refletância total atenuada (RTA) e cristal de diamante. O espectro médio de cada amostra foi obtido após 16 varreduras.

### 3.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas com o equipamento TA Instruments, modelo *Discovery TGA 55* (*Delaware*, EUA), para avaliar a estabilidade térmica das amostras. Essas análises foram realizadas em atmosfera inerte, com fluxo de nitrogênio constante a  $20\text{ mL/min}$ , taxa de aquecimento igual a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}^{-1}$ , com temperaturas inicial e final de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $850\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

### 3.7 Incorporação do bioproduto a matriz polimérica

Para verificar a incorporação e liberação das linhagens bacterianas encapsuladas foi realizado ensaio de plaqueamento com as amostras BtMA-750 e BtMA-1114, baseando-se na metodologia de Rabinovitch e De Oliveira (2015). Para isso, foi adicionado  $0,5\text{ g}$  do encapsulado de *B. thuringiensis* em  $2\text{ mL}$  de NaCl a  $0,85\%$  (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). Posteriormente, as suspensões preparadas foram previamente homogeneizadas em *Vortex Mixer* (*Vision Scientific*, Westland, Michigan) e realizadas diluições seriadas. Em seguida, alíquotas de  $100\text{ }\mu\text{L}$  das suspensões  $10$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram semeadas com o auxílio da alça de *Drigalski* em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubadas em estufa bacteriológica a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 h. Após esse período, foi realizada a contagem de Unidade Formadora de Colônia ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) baseada no modelo de contagem em placa (ALVES, 1998). Para as amostras liofilizadas, foi considerado o fator de ajuste multiplicando-se o resultado por 2 para que se obtenha o valor mais aproximado do número de células existentes no microtubo.

### 3.8 Confirmação da expressão de proteínas nas linhagens encapsuladas

Foi realizada análise proteica a partir das linhagens encapsuladas para verificar se as proteínas inseticidas Cry e Cyt estavam sendo expressas genes *cry* e *cyt*. A técnica foi realizada segundo Laemmli (1970) por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando o surfactante iônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a  $12\%$ , em condições desnaturantes.

A extração das proteínas foi realizada seguindo o protocolo de Lecadet *et al.* (1991). As linhagens encapsuladas foram crescidas em Ágar Nutriente (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), após, uma colônia de cada linhagem foi transferida para *Erlenmeyer* contendo

12 mL de caldo nutriente e incubadas em agitador rotativo (*shaker*) (Nova Técnica, Piracicaba, São Paulo, Brasil), por 28 °C por 52 a 200 rpm.

Posteriormente, foi retirada de cada amostra uma alíquota de 1,5 µL contendo o complexo esporo/cristal e centrifugada a 12000 xg durante 15 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuspenso em 1,5 mL de 0,5 M NaCl em agitador Vortex Mixer (*Vision Scientific, Westland, Michigan*) e centrifugado novamente, posteriormente o *pellet* foi ressuspenso em 1,5 mL da solução para inibição da atividade proteásica (2 mL de 100 mM PMSF + 4 mL do EDTA a 0,5 M avolumado para 200 mL de água destilada), homogeneizada em Vortex Mixer e centrifugada novamente a 12000 xg por 15 minutos a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes e, as amostras foram estocadas em solução de inibição de atividade proteica a -20 °C até o momento de uso.

Foram preparadas 50 µL das amostras (25 µL da solução contendo as proteínas de *B. thuringiensis* e 25 µL de tampão de amostra (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 25% de Glicerol, 1,0% de Azul de bromofenol, 10% de SDS e β-mercaptoetanol a 1%), e fervidas por 10 minutos a 100 °C. Posteriormente, foi retirada 40 µL de cada amostra e aplicada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE na concentração de 12%, e como padrão de massa molecular de proteína foi adicionado 5 µL do marcador *Broad Range Protein Molecular* 225 a 10 kDa (*Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos*), como referência para identificação das proteínas (LAEMMLI, 1970).

O gel foi colocado em cuba de eletroforese vertical (Kasvi) preenchida com tampão de corrida 1X (25 mM Tris-BASE, 35 mM SDS e 1,92 mM Glicina) e submetido a um campo elétrico de 150 V por 2h30min. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de *Comassie Brillante Blue* (metanol 50%, Ácido acético 10% e 0,1% de *Comassie Brillante Blue R-250*) por 1 h em temperatura ambiente, em seguida foi descorado em solução de metanol e ácido acético na proporção de 4:1 por 24 h, até a visualização das bandas de proteínas. O gel foi digitalizado e analisado quanto à presença das proteínas de ação inseticida.

### 3.9 Criação de *Aedes aegypti* em laboratório para a realização dos bioensaios

Na realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* que foram obtidas da colônia mantida no insetário no Laboratório de Biologia da Universidade Federal do Maranhão, *Campus VII*, a criação foi realizada conforme o protocolo descrito por por Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) adaptado por Pinheiro e Tadei (2002). As larvas foram criadas sob condições controladas, temperatura média de  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa a 80-90% e fotofase de 12 h. Após a eclosão, as larvas receberam alimento padronizado (ração para peixes) três vezes por semana e foi realizada a limpeza das bacias, com a troca de 1/3 da

água, para evitar a formação de película e a proliferação de microrganismo micrrganismos. As larvas foram mantidas nas bacias até chegar ao 3º estágio, momento no qual foram utilizadas nos experimentos.

Na manutenção dos mosquitos adultos, fêmeas e machos foram alimentados com solução de sacarose á 10%, umedecida em algodão. Para as fêmeas foi oferecido o repasto sanguíneo utilizando-se um hamster (*Mesocricetus auratus*). As fêmeas ingurgitadas foram postas para desovar em copos revestidos de papel-filtro, contendo água, objetivando evitar dessecação dos ovos. Após o período de oviposição, em média de três a cinco dias, as desovas foram guardadas em caixas de isopor. Para a realização dos bioensaios, as desovas de *A. aegypti* foram transferidas para bacias de plástico, contendo água potável e alimento, seguindo o mesmo ciclo de atividades, mencionado anteriormente.

### **3.10 Atividade larvícida das linhagens encapsuladas de *Bacillus thuringiensis* em laboratório**

Na realização dos bioensaios para avaliar a eficiência das linhagens de *B. thuringiensis* BtMA-750 (250 mg) e BtMA-1114 (200 mg) foi seguida a metodologia descrita por *World Health Organization-WHO* (2005).

Foi preparada réplicas de três copos plásticos de 50 mL contendo 10 mL de água, 10 larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* e 0,5 g.mL<sup>-1</sup> do produto. Em cada bioensaio, foi preparado uma réplica sem inoculação bacilar, contendo 1 mL de água tritonada 0,01% (Triton<sup>TM</sup> X-100, Sigma-Aldrich) e 9 mL de água do sistema osmose reversa (QUIMIS®, Diadema, SP), servindo assim como controle negativo. Semanalmente foram introduzidas dez larvas de terceiro estágio (totalizando 60 larvas) e o volume de água foi ajustado em cada recipiente para compensar a evaporação e adicionado alimento (ração para gato triturada) para as larvas (WHO, 2005). Os bioensaios foram realizados sob condições controladas de temperatura 26 ± 2 °C e umidade relativa em torno de 80% no Laboratório de Entomologia Médica (LABEM) do CESC-UEMA, Campus Caxias.

A eficácia inicial do larvícida foi estimada pela mortalidade larval, nas primeiras 48 h após a aplicação do produto. A persistência, definida como o período em dias durante o qual a mortalidade é ≥ 80%, foi estimada pelo número de pupas vivas, recuperadas após a reposição semanal das larvas de terceiro estágio nos recipientes.

### **3.11 Bioensaios quantitativos**

Os bioensaios quantitativos foram realizados para calcular os valores de CL<sub>50</sub> (concentração capaz de matar 50% das larvas expostas ao isolado) e CL<sub>90</sub> (concentração capaz

de matar 90% das larvas expostas ao isolado), seguindo o protocolo da WHO (2005), no qual foi preparado uma solução a partir do isolado encapsulado na concentração de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir desta solução foram preparadas de cinco a sete concentrações (0.009, 0.008, 0.006, 0.005, 0.004, 0.002 e 0.001 mg.mL<sup>-1</sup>.) das linhagens de *B. thuringiensis*. Para cada concentração foram utilizadas cinco réplicas de copos plásticos em volume final de 10 mL de água e 20 larvas de *A. aegypti* de terceiro estágio, sendo que cada bioensaio repetido três vezes.

Para comparação da toxicidade das linhagens encapsuladas de *B. thuringiensis* no Maranhão para larvas de *A. aegypti* foram utilizados dados de Soares-da-Silva *et al.* (2017) e Vieira-Neta *et al.* (2021) de testes realizados com a estirpe padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* - Bti T14 001 (Instituto Pasteur, França), fornecida pelo Laboratório de Genética Bacteriana e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV/UNESP Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Como controle negativo, em cada bioensaio preparou-se uma réplica sem inoculação bacilar. Após a aplicação do bacilo foi realizada as leituras de sobrevivência das larvas em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h. Os valores obtidos de CL<sub>50</sub> das linhagens encapsuladas com 1700 mg de bactéria foram utilizados nos bioensaios em condição simulada de campo.

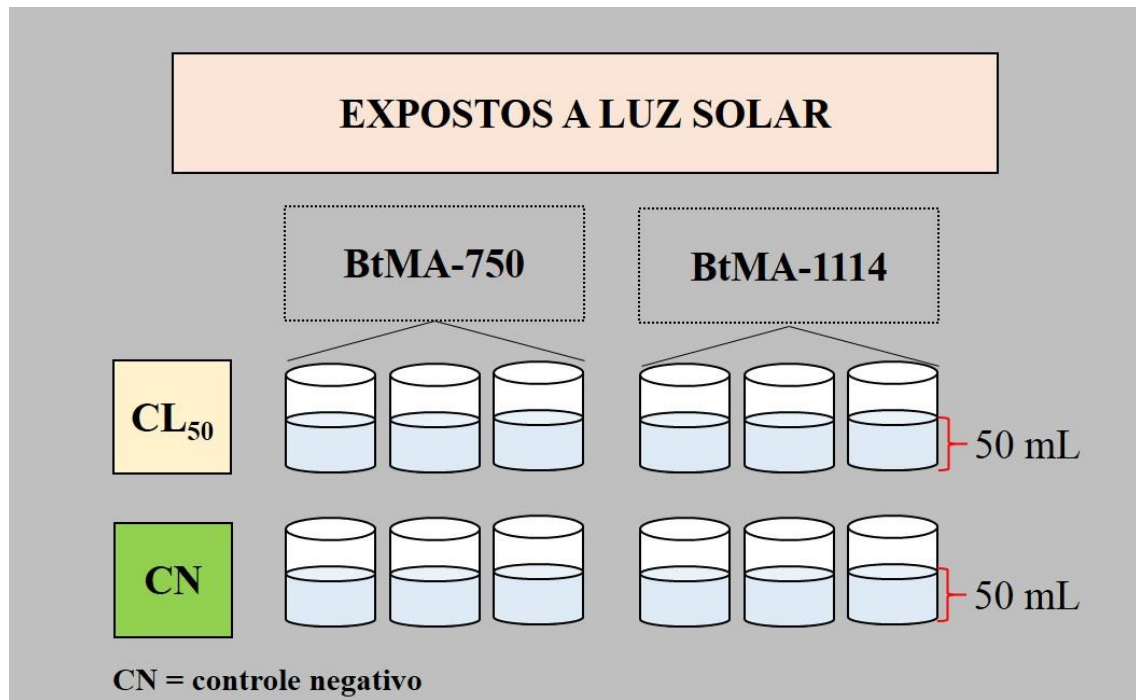
### **3.12 Efetividade das linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas em condição simulado de campo**

Na realização dos bioensaios para avaliar a eficiência dos isolados BtMA-750 (1700 mg) e BtMA-1114 (1700 mg) encapsulado com polímero natural (amido), foi seguida a metodologia descrita por WHO (2005) e Araújo (2006).

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia da Universidade Federal do Maranhão, *Campus VII*, Codó-MA, utilizando-se recipientes plásticos com capacidade de 50 mL de água. Os recipientes foram expostos à luz solar, permitindo assim a completa penetração dos raios solares através da coluna de água. Foram testadas as concentrações (CL<sub>50</sub>) obtidas a partir de cada linhagem encapsulada nos bioensaios quantitativos (BtMA-750 e BtMA-1114). Para cada um dos grupos, os recipientes foram preenchidos com água da torneira (50 mL), e os tratamentos foram feitos em três repetições para cada uma das concentrações, com três recipientes não tratados (controle). Semanalmente, foram introduzidas 20 larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* e em cada recipiente foi ajustado o volume de água, para compensar a evaporação, e adicionado alimento para as larvas (ração para gato triturada) (Figura 4).

A eficácia inicial do larvicida foi estimada pela mortalidade larval, nas primeiras 48 h após a aplicação do produto. A persistência, definida como o período em dias durante o qual a mortalidade é  $\geq 80\%$ , foi estimada pelo número de pupas vivas, recuperadas após a reposição semanal das larvas de terceiro estágio nos recipientes.

Figura 4. Realização dos experimentos com as linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas com amido em condição simulada de campo.



Fonte: Autor

### 3.13 Análise dos dados

Os dados obtidos nos testes de toxicidade foram submetidos à análise de Probit a  $P < 0,05$  (FINNEY, 1971) por meio do programa POLO-PLUS (LeOra Software 2003) para determinação da  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ . Os dados de mortalidade dos testes em condições simulada de campo foram digitados em planilhas do Programa Microsoft Office Excel 2013 para montagem do banco de dados e construção de gráficos e tabelas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análises morfológicas

A Tabela 2 mostra o tamanho médio das partículas das linhagens de bactérias encapsuladas (BtMA-750 e BtMA-1114) e das partículas de amido reticulado, que foram utilizadas como referência. Primeiramente, o encapsulamento de quantidades menores de bactérias (250 mg de BtMA-750 e 200 mg de BtMA-1114) aparentemente não afetou significativamente o diâmetro médio das partículas. Por outro lado, conforme observado na Tabela 2, o encapsulamento de maiores quantidades de BtMA-750 e BtMA-1114 (1700 mg) ocasionou uma diminuição no diâmetro médio das partículas, provavelmente devido a uma maior estabilização das partículas de polímero. No entanto, é importante ressaltar que todas as reações resultaram em tamanhos de partículas adequados para serem ingeridos pelas larvas do mosquito.

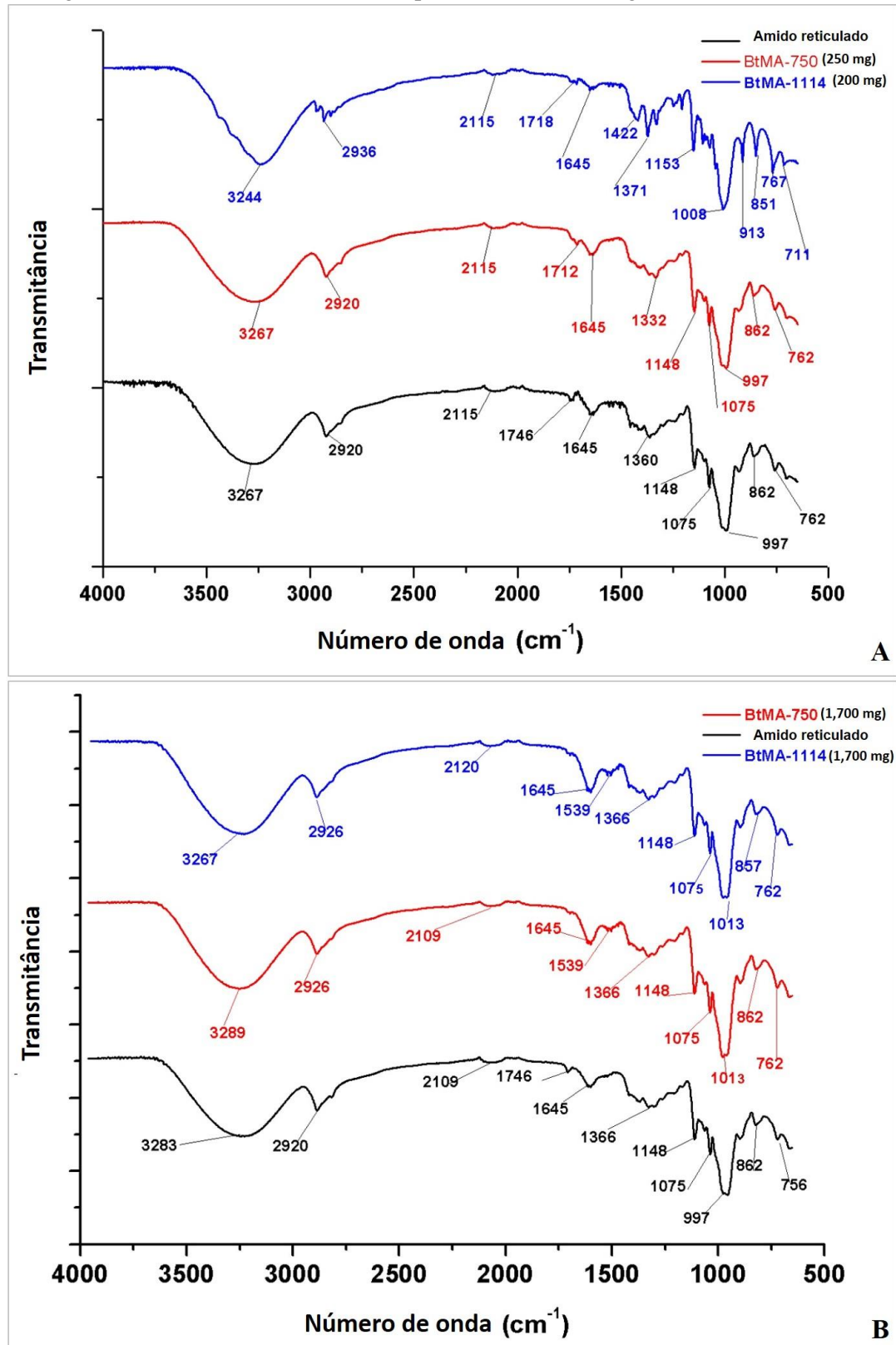
Tabela 2. Diâmetro médio das linhagens bacterianas encapsuladas com amido.

Quantidade de bactérias encapsuladas	Diâmetro Médio das Partículas	
	BtMA-750	BtMA-1114
0 mg	176,61 $\mu\text{m}$	176,61 $\mu\text{m}$
200 mg	272,76 $\mu\text{m}$	-
250 mg	-	233,72 $\mu\text{m}$
1700 mg	20,46 $\mu\text{m}$	16,40 $\mu\text{m}$

### 4.2 Espectroscopia FT-IR

A partir da técnica de FT-IR foram avaliados os grupos funcionais presentes nas partículas reticuladas de amido sem a presença das bactérias, utilizadas como referência, e nas linhagens encapsuladas. Observou-se que não houve mudança na intensidade dos picos 2115  $\text{cm}^{-1}$  e 1645  $\text{cm}^{-1}$  após a incorporação de ambas as bactérias nas matrizes poliméricas (Figura 5A). Outras regiões, referentes aos picos 1148  $\text{cm}^{-1}$ , 1075  $\text{cm}^{-1}$ , 862  $\text{cm}^{-1}$ , 762  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas ao alongamento C-O e C-C, e o pico 997  $\text{cm}^{-1}$ , atribuído a deformações C-OH e CH<sub>2</sub> (Figura 5A). Resultados semelhantes foram obtidos quando maiores concentrações de bactérias encapsuladas foram observadas (Figura 5B), indicando que as principais funções químicas observadas estão relacionadas à matriz do amido, provavelmente devido à baixa quantidade de bactérias e também devido à baixa concentração de bactérias nas superfícies das partículas de amido, o que implica que as mesmas podem estar localizadas principalmente na região das partículas internas.

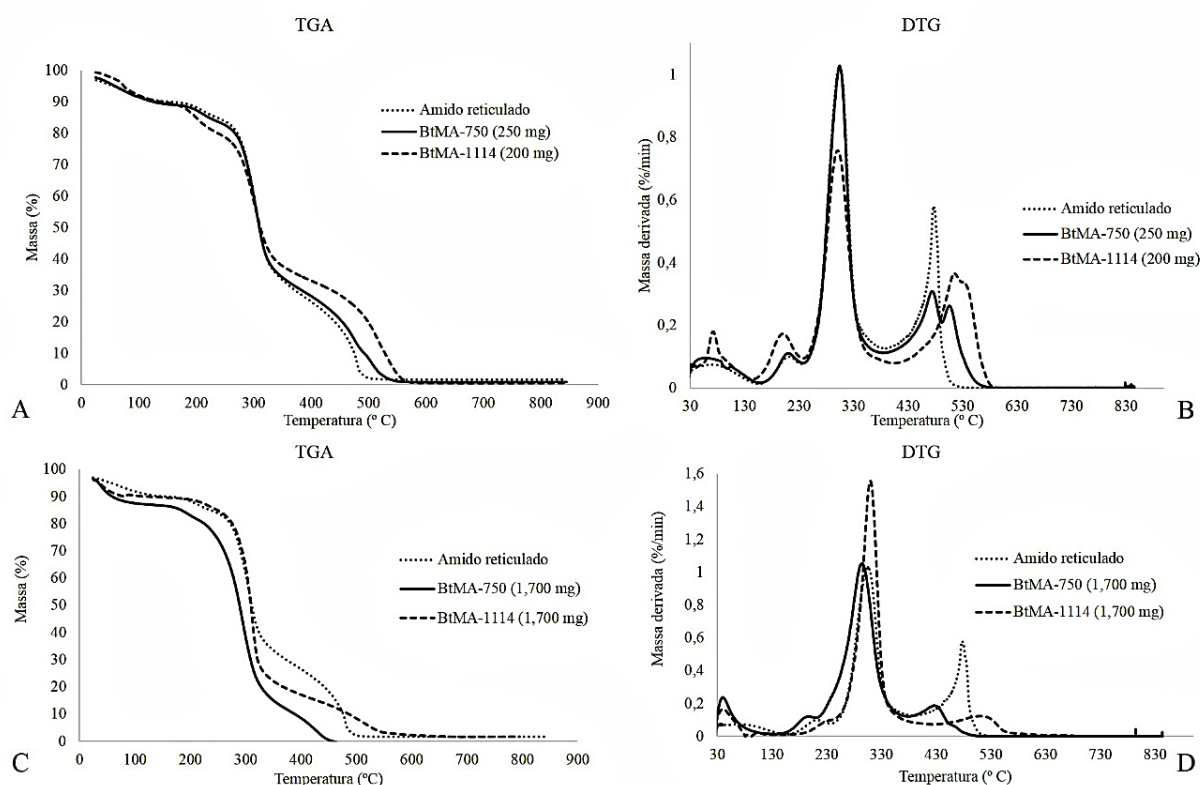
Figura 5. Espectros infravermelhos das micropartículas analisadas. A) Linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 encapsuladas com 250 mg e 200 mg de bactéria, respectivamente e B) Linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 encapsuladas com 1700 mg de bactéria.



### 4.3 Análises térmicas

As curvas termogravimétricas das partículas produzidas estão representadas na Figura 6, e mostram os valores de temperatura inicial ( $T_{\text{onset}}$ ), a temperatura de degradação máxima ( $T_{\text{máx}}$ ) e a variação de massa em função da temperatura (% perda de massa) térmica muito semelhantes. Em geral, todas as amostras apresentaram um primeiro estágio de perda de massa menos de 100%, referente a eliminação de água absorvida pelo amido. Foi observado que o  $T_{\text{máx}}$  oscilou entre 295 °C e 310 °C (Figura 6A e 6C). Sobre a máxima derivada, as amostras apresentaram quatro picos característicos de perdas de massa (Figura 6B e 6D). Assim, comparando-se os resultados da TGA para as linhagens encapsuladas e as partículas de amido simples, é possível observar que a presença de *B. thuringiensis* não influenciou na estabilidade térmica das amostras observadas pela técnica de encapsulamento.

Figura 6. Curvas termogravimétricas do amido reticulado e das linhagens encapsuladas, no qual mostram os termogramas (TGA) das amostras e sua respectiva derivada de decomposição térmica (DTG). A) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 250 mg de bactéria; B) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 200 mg de bactéria; C) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 1700 mg de bactéria; D) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 1700 mg de bactéria.



### 4.4 Crescimento bacteriano

Para verificar se a bactéria foi incorporada à matriz polimérica, foi realizada a técnica de contagem de colônia em placa de Petri (UFC.mL<sup>-1</sup>). O crescimento bacteriano das linhagens



BtMA-750 e BtMA-1114 nas placas, mostraram que essas bactérias se mantiveram ativas e foram devidamente encapsuladas na matriz de amido (Figura 7).

Na Tabela 3 observa-se a concentração de esporos viáveis, demonstrando que o processo de encapsulamento não interferiu na viabilidade microbiológica da bactéria. No qual, verificou-se também maiores taxas de esporos viáveis quando utilizado maior quantidade de bactéria para o encapsulamento.

Figura 7. Crescimento bacteriano proveniente das micropartículas de amido. (A) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 250 mg de bactéria; (B) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 200 mg de bactéria; (C) Linhagem BtMA-750 encapsulada com 1.700 mg de bactéria; (D) Linhagem BtMA-1114 encapsulada com 1.700 mg de bactéria.

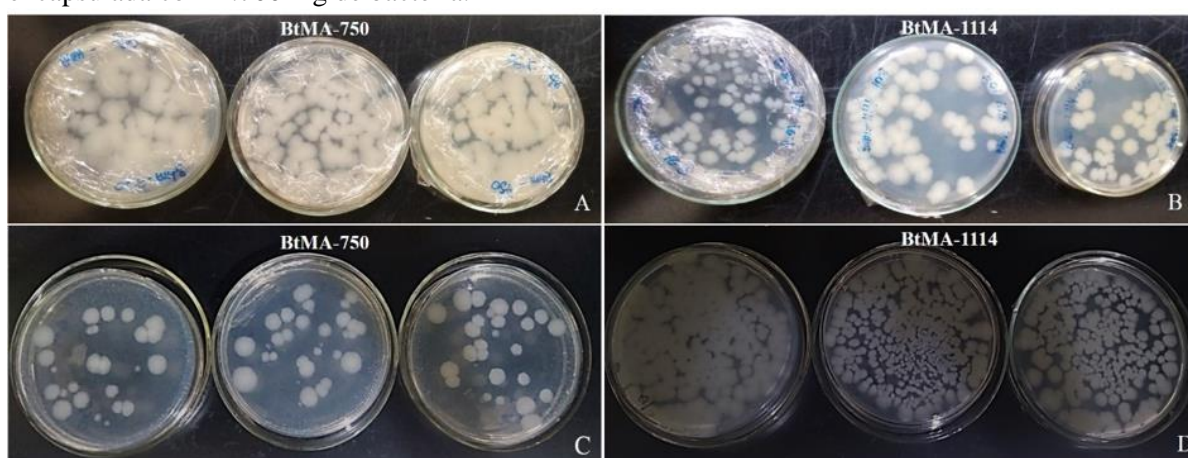


Tabela 3. Concentração de esporos viáveis das linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas com amido.

Quantidade de bactérias encapsuladas	Viabilidade Microbiológica (UFC.mL <sup>-1</sup> )	
	BtMA-750	BtMA-1114
200 mg	-	1,5 x 10 <sup>4</sup>
250 mg	1,98 x 10 <sup>4</sup>	-
1.700 mg	1,52 x 10 <sup>5</sup>	4,48 x 10 <sup>5</sup>

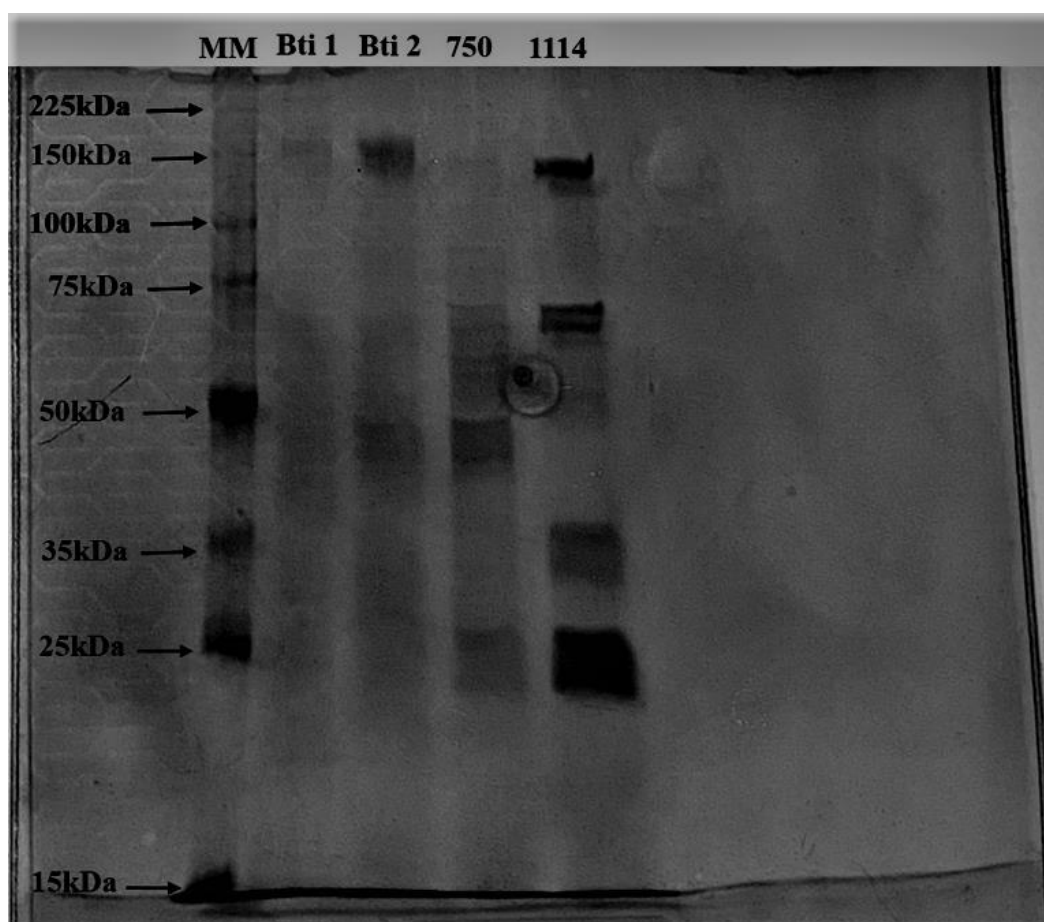
UFC=Unidade Formadora de Colônias.

#### 4.5 Perfil proteico das linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas

Por meio da caracterização proteica das linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 após o encapsulamento, mediante a técnica de SDS-PAGE 12%, demonstrou que as duas bactérias continuaram expressando as proteínas com massas moleculares correspondentes as toxinas inseticidas Cry e Cyt, confirmando que o processo de encapsulamento não afetou a produção de toxinas (Figura 8).

As linhagens apresentaram conteúdo proteico com aproximadamente 65 a 150 kDa, que corresponde as proteínas Cry. Em relação a toxina Cyt, as linhagens apresentaram perfil proteico menor que 50kDa semelhante ao das toxinas Cyt1 e Cyt2 (Figura 8) (CRICKMORE *et al.*, 1998; 2023).

Figura 8. Perfil proteico das linhagens de *Bacillus thuringiensis* encapsuladas com amido com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. MM: marcador molecular (*Broad Range Protein Molecular* 225 a 10 kDa); Bti 1 - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* T14 001 e Bti 2 formulado VectoBac.



#### 4.6 Efetividade bacteriana

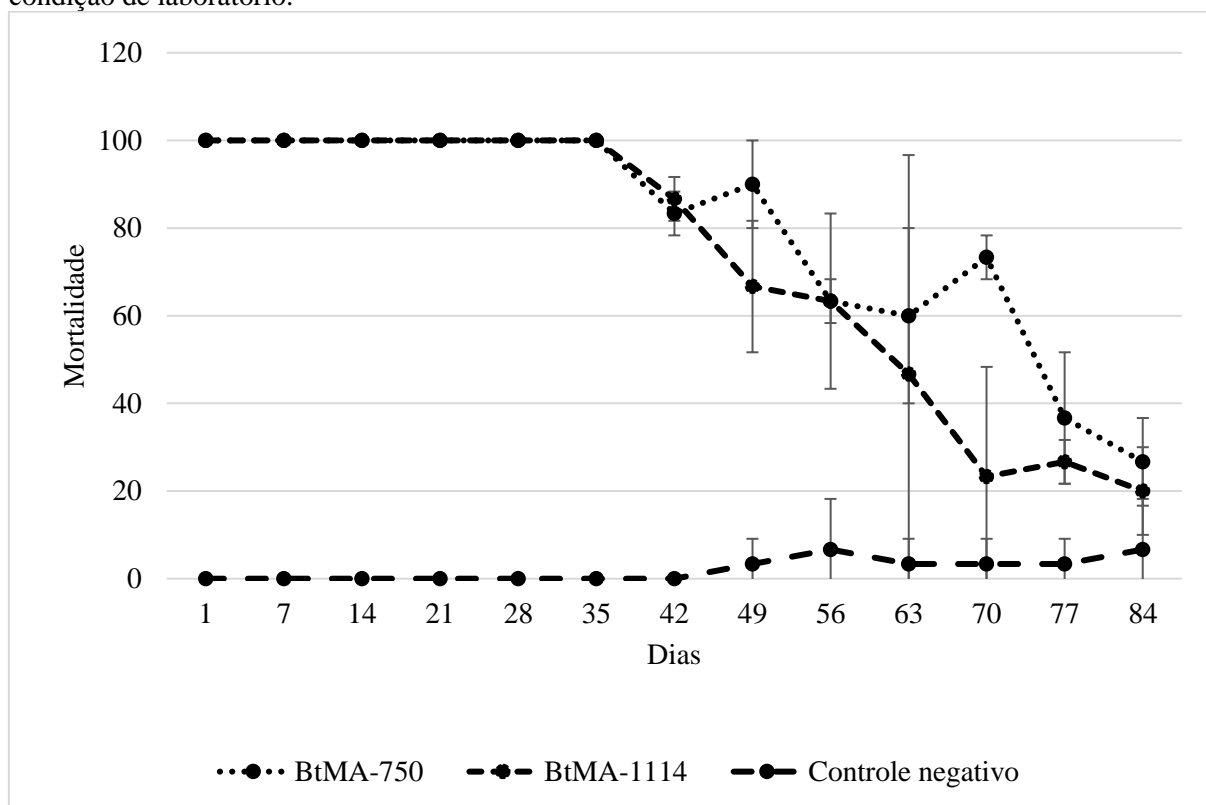
Verificou-se que as linhagens bacterianas encapsuladas BtMA-750 (250 mg) e BtMA-1114 (200 mg) apresentaram alta mortalidade das larvas de *A. aegypti* quando comparadas ao controle negativo.

Os testes com as linhagens bacterianas BtMA-750 e BtMA-1114 mantiveram 100% de mortalidade larval por 35 dias de experimento. Para a bactéria BtMA-750 verificou-se mortalidade larval de 73,33% em 70 dias de experimento, enquanto a linhagem BtMA-1114 apresentou mortalidade de 63,33% em 56 dias de experimento (Figura 9).

A mortalidade das larvas persistiu até cerca de setenta dias após o tratamento, quando a taxa de mortalidade das linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 foi inferior a 26,7% e 20%, respectivamente (Figura 9). O controle negativo, que não foi exposto ao tratamento experimental, apresentou mortalidade inferior a 6% durante 84 dias (Figura 9).

Os resultados experimentais obtidos foram muito precisos e a flutuação média da mortalidade foi igual a 0% quando o tempo de lote foi menor que 42 dias e igual a  $\pm 10\%$  quando o tempo de lote foi menor que 84 dias. Consequentemente, a flutuação média da mortalidade média relatada foi igual a  $\pm 0\%$  quando o tempo do lote foi menor que 42 dias e igual a  $\pm 5\%$  quando o tempo do lote foi menor que 84 dias.

Figura 9. Atividade larvívora de linhagens bacterianas encapsuladas estimadas em bioensaios em condição de laboratório.



#### 4.7 Bioensaios quantitativos

Comparando os valores obtidos de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  e respectivos intervalos de confiança das linhagens encapsuladas, observou-se que a linhagem mais tóxica, com menor valor de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , foi BtMA-1114 com  $0,0075 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,0872 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Já a linhagem BtMA-750 apresentou maiores valores de  $CL_{50}$  com  $0,137 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $CL_{90}$  com  $10,08 \text{ mg.L}^{-1}$  (Tabela 4).

Observa-se que as linhagens encapsuladas BtMA-750 e BtMA-1114 apresentaram maiores valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  em comparação com o *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativa das Concentrações Letais  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  em  $mg.L^{-1}$  para as linhagens encapsuladas de *Bacillus thuringiensis* com toxicidade para larvas de *Aedes aegypti*.

Linhagens	$CL_{50}$ (IC 95%)	$CL_{90}$ (IC 95%)	$\chi^2$ (GL)	Slope $\pm$ SE
Bti T14 001 <sup>1</sup>	0.0028 (0.0021-0.0037)	0.012 (0.0092-0.0180)	6.68(3)	NC
Bti T14 001 <sup>2</sup>	0.003 (0.0021 -0.0033)	0.011 (0.009-0.015)	3.8	2.055 (0.093)
BtMA-750	0.137 (0.0301-448.031)	10.08 (0.6885-0.0485E+10)	3.8777 (3)	0.687 (0.131)
BtMA-1114	0.0075 (0.0052-0.021)	0.0872 (0.027-45.805)	9.9252 (3)	1.206 (0.144)

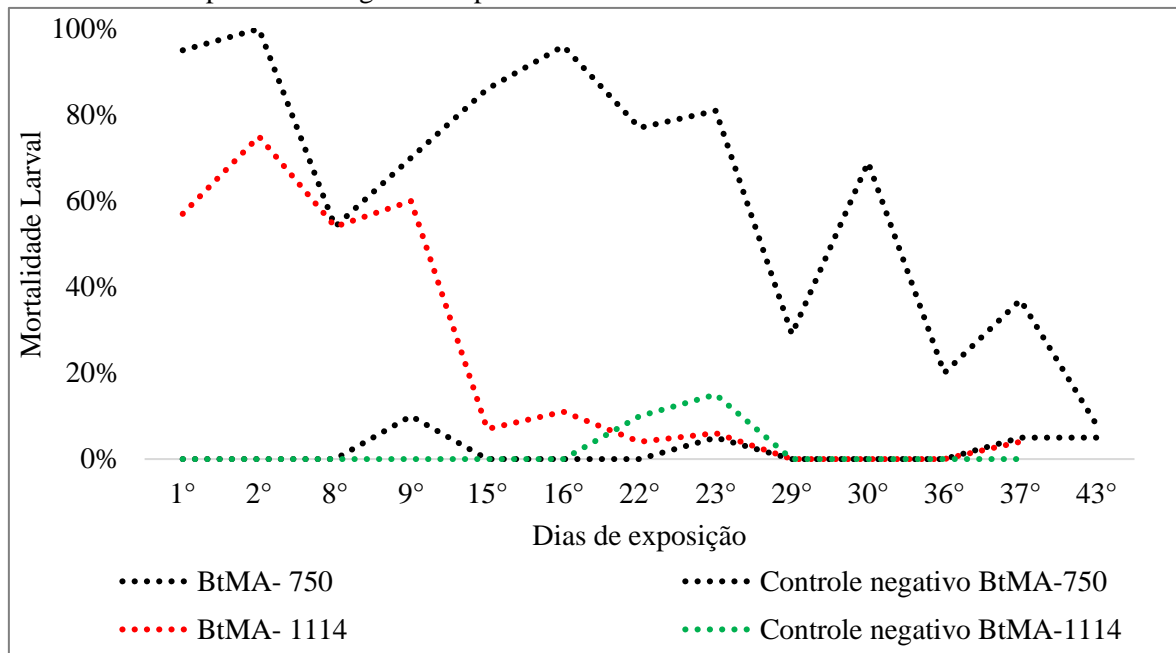
$CL_{50}$  e  $CL_{90}$ = Concentração Letal; IC= Intervalo de confiança; GL= Graus de Liberdade;  $\chi^2$ = Qui-quadrado; SE= Erro padrão; NC= Não calculado e Bti= *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* T14 001. Fonte: <sup>1</sup>VIEIRA-NETA *et al.* (2021) e <sup>2</sup>SOARES-DA-SILVA *et al.* (2017).

#### 4.8 Bioensaios em condição simulada de campo

Durante a realização do experimento aplicando-se a Concentração Letal Mediana ( $CL_{50}$ ) do encapsulado BtMA-750, verificou-se mortalidade larval média de 54% durante 23 dias de experimento. Vinte nove dias após o tratamento a taxa de mortalidade foi inferior a 29%, verificando um aumento de 69% no 30º dia. Ao final do experimento no 43º dia, a mortalidade nos recipientes foi inferior a 8% (Figura 10).

Em relação ao encapsulado BtMA-1114 observou-se no nono dia de exposição das larvas, mortalidade de 60%, reduzindo para menos de 4% no 37º dia. Os recipientes utilizados como controle negativo, expostos às condições climáticas, apresentaram mortalidade inferior a 20% durante todo o experimento (Figura 10).

Figura 10. Percentual de mortalidade larval de *Aedes aegypti* utilizadas nos bioensaios em condição simulada de campo com linhagens encapsuladas com amido BtMA-750 e BtMA-1114.



## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo a microencapsulação foi utilizada como um método para aumentar a persistência de linhagens de *B. thuringiensis* tóxicas ao *A. aegypti*. O processo de encapsulamento permite o controle da liberação do ativo, além de garantir maior proteção do ativo ao ambiente externo. Nesse contexto, a utilização da técnica de polimerização em suspensão inversa é bastante vantajosa, pois permite o encapsulamento *in situ* do ativo, apresenta menores níveis de impurezas e maior facilidade para recuperação do produto (MACHADO *et al.*, 2007; WAY *et al.*, 2018; DE SOUZA E CASTRO *et al.*, 2020).

Outra vantagem da utilização da polimerização em suspensão inversa é a obtenção de diâmetros de partículas em escala micrométrica de tamanhos regulares como observado no presente estudo. Bianco (2016) relata que a viscosidade da solução polimérica influencia diretamente na produção uniforme de microesferas. Assim, uma das vantagens da utilização da técnica de encapsulamento por suspensão inversa é a facilidade em controlar a distribuição de tamanhos das partículas hidrofílicas por meio da manipulação da agitação e da quantidade de agente de suspensão (KIPARISSIDES, 1996; MACHADO *et al.*, 2007).

Pesquisas realizadas por Rokhade *et al.* (2006) com polímeros naturais, gelatina e carboximetilcelulose de sódio (NaCMC), para a liberação controlada do fármaco cetorolaco de trometamina, também obtiveram em seus estudos microesferas com diâmetros médios entre 247 a 535  $\mu\text{m}$ . Rokhade *et al.* (2006) também observaram que com o incremento da quantidade de polímero na reação, o tamanho da partícula também foi aumentado.

No presente estudo, quando aumentada a concentração de bactérias nas micropartículas, houve diferença no diâmetro médio e na distribuição do tamanho dessas partículas, no entanto, tais diferenças não afetaram a alimentação das larvas de *A. aegypti*, o que indica a importância da análise do tamanho das partículas das microesferas para a utilização de novas técnicas e novas formulações para o controle de mosquitos vetores. Conforme discutido na literatura, as larvas de *A. aegypti* possuem um sistema de filtros formado por escovas localizadas ao redor da cavidade oral que se movimentam criando um fluxo que transporta as partículas de alimentos até o orifício oral. Nesse sentido, a alimentação das larvas é orientada principalmente pelo tamanho/dimensões das partículas presentes no meio, essas partículas são classificadas como grandes (partículas com diâmetros maiores que 1 mm), finas (partículas com diâmetros menores que 1 mm e maiores que 50  $\mu\text{m}$ ) e ultrafinas (partículas com diâmetros menores que 50  $\mu\text{m}$  e maiores que 0,5  $\mu\text{m}$ ) (CLEMENTS *et al.*, 1992).

Os resultados referentes à espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) não mostraram mudanças significativas na intensidade dos picos, em comparação aos espectros de

amido reticulado. Muitos trabalhos também relatam as principais absorções características da estrutura do amido reticulado. Assim, aparentemente, as principais funções químicas observadas nos espectros de FT-IR estão relacionadas à matriz do amido, provavelmente devido à baixa quantidade de bactérias e também devido à baixa concentração de bactérias na superfície das partículas de amido, indicando que elas podem estar localizadas principalmente na região interna das partículas (THYGESEN *et al.*, 2003; FANG *et al.*, 2004; MUSCAT *et al.*, 2012; FAZELI *et al.*, 2019; AHMAD *et al.*, 2020).

Nos estudos realizados por De Souza e Castro *et al.* (2020), os quais analisaram o encapsulamento de ativos hidrofílicos em micropartículas de amido também foi verificado perda de massa inicial em torno de 100 °C como observado no presente estudo, o que pode ser em função da água adsorvida nas partículas. Já os picos de perda de massa em torno de 200, 300 e 400 °C são correspondentes a degradação térmica do amido e da glicose, como observado no presente estudo picos de perda de massa em torno de 294,75 a 309,8 °C. Navarro-Mtz *et al.* (2019) analisaram o tratamento de moagem de alta energia de grãos de soja para meios de cultura de *B. thuringiensis* e também demonstraram perda de massa em torno de 100 °C associada à perda de água.

A microencapsulação mediante a técnica de polimerização em suspensão inversa, utilizando o biopolímero amido foi promissora para o encapsulamento de *B. thuringiensis*, mantendo a atividade biológica dessa bactéria, o qual foi observado nas linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 que foram devidamente incorporadas a matriz polimérica do amido, apresentando um número elevado de colônias bacterianas nas concentrações avaliadas.

Eski *et al.* (2019) utilizaram amido como material de parede para o encapsulamento de *B. thuringiensis*, no qual mediante os testes de contagem de esporos, também apresentaram elevado número de esporos viáveis de  $3.4 \times 10^{11}$ ,  $4.1 \times 10^{11}$  e  $5.1 \times 10^{11}$  UFC/g<sup>-1</sup>. Rodríguez *et al.* (2015) empregaram a técnica *spray drying* e, como material de parede utilizaram amido de amaranto para encapsular *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1 (*Bt*- HD1) e relataram que o material utilizado na microencapsulação e as secagens dessas matrizes pode influenciar a viabilidade dos esporos e a eficiência do inseticida.

Verificou-se ainda que as linhagens encapsuladas continuaram expressando as proteínas inseticidas Cry e Cyt, o que evidencia que o encapsulamento não afetou a expressão dessas toxinas, as quais são importantes para a ação entomopatogênica. O presente estudo, mediante a análise do conteúdo proteico, demonstrou que a bactéria encapsulada expressou proteínas com massas moleculares correspondentes as proteínas Cry e Cyt. Álvarez López *et al.* (2011) analisaram a toxicidade de microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1

contra *Manduca sexta* (Linnaeus) e verificaram as proteínas por eletroforese (SDS-PAGE), no qual os genes *cry* codificaram aproximadamente 133 kDa. He *et al.* (2017) desenvolveram microcápsulas de *B. thuringiensis* no controle de Lepidoptera e verificaram que mediante os resultados obtidos por SDS-PAGE, essas microcápsulas produzidas forneceram uma proteção considerável aos cristais encapsulados contra estresse ambiental analisados durante a pesquisa.

Foi confirmado por meio da técnica de SDS-PAGE a continuação da expressão das proteínas inseticidas das duas linhagens encapsuladas BtMA-750 e BtMA-1114. Essas linhagens apresentam diferentes perfis gênicos, incluindo combinações de toxinas Cry (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba*) e Cyt (*cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*) com toxicidade para *A. aegypti*, como constatado nas pesquisas realizadas por Soares-da-Silva *et al.* (2017) e Vieira-Neta *et al.* (2021).

*B. thuringiensis* se destaca pela presença dessas  $\delta$ -endotoxinas Cry e Cyt, sintetizadas como protoxinas e produzidas em grandes quantidades durante a esporulação. A ingestão das inclusões por larvas de insetos leva à solubilização dessas protoxinas e conversão em toxinas, e, conseqüentemente, alterações ultraestruturais e morte celular (VIANA *et al.*, 2021b). As proteínas Cry são codificadas por um ou várias cópias de um mesmo gene, ou diferentes genes *cry*, no qual se tem linhagens contendo diferentes combinações e distintos perfis de toxicidade, como observado na análise proteica deste estudo. Já as proteínas Cyt têm sido relatadas agindo sinergicamente com as toxinas Cry, mostrando-se importantes para aumentar a eficiência de um isolado no controle biológico de mosquitos vetores (CRICKMORE *et al.*, 1998; JOUZANI *et al.*, 2008; BEN-DOV, 2014).

No presente estudo, observou-se 100% de mortalidade até 35 dias de exposição às linhagens bacterianas encapsuladas. Nos resultados apresentados por Nasser *et al.* (2021), envolvendo hidrogéis à base de k-carragena, apresentaram que as amostras produzidas foram eficazes na liberação gradual e na persistência de *B. thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *A. aegypti* durante 11 semanas de bioensaio em laboratório, com uma taxa de mortalidade em torno de 100%. He *et al.* (2017) realizaram a microencapsulação de proteínas de cristais (Cry1Ac) produzidas por *B. thuringiensis* HD73 (Bt-HD73) e também verificaram em seus estudos que as microcápsulas podem aumentar a eficácia da bactéria.

As linhagens encapsuladas BtMA-750 e BtMA-1114 avaliadas no presente estudo apresentaram eficácia no controle de imaturos do *A. aegypti* em laboratório. No trabalho realizado por Elçin *et al.* (1995) no qual encapsularam *B. thuringiensis* var. *israelensis* em microcápsulas de alginato contra larvas de *Culex sp.*, após 24 horas de exposição bacteriana



verificaram 30 a 50% de mortalidade, demonstrando que o processo de encapsulamento não interferiu na ação larvicida da bactéria, o que pode ser observado no presente estudo.

Notavelmente, as duas linhagens encapsuladas apresentaram toxicidade às larvas de *A. aegypti*, com destaque para a linhagem BtMA-1114 que apresentou menores valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ . Essa diferença na toxicidade pode estar relacionada com a interação das proteínas Cry aos receptores específicos presentes no epitélio intestinal dos insetos, no qual pode haver variação quanto ao número desses receptores, o que define a especificidade e os espectro de ação de cada proteína inseticida (BRAVO *et al.*, 2007; PIGOTT e ELLAR, 2007; CHEN *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2017).

Diferentes estudos evidenciaram encapsulados com toxicidade para o controle do *A. aegypti* quando comparado com os valores obtidos de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , obtidas no presente trabalho. Como na pesquisa realizada por Aguilar-Meza *et al.* (2010) estudando um complexo microencapsulado de esporos-toxina Bti (MeBti) contra larvas de *A. aegypti*, no qual também realizaram bioensaios quantitativos, e verificaram valores de  $CL_{50}$  com 0,0612 mg.L<sup>-1</sup> e  $CL_{90}$  com 0,1448 mg.L<sup>-1</sup> também utilizados nos bioensaios de semi campo. Maldonado *et al.* (2002) encapsularam *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* utilizando gelatina, goma acácia, alginato de sódio e parafina, e observaram valores de  $CL_{50}$  de 0,016 mg.L<sup>-1</sup> e  $CL_{90}$  de 0,051 mg.L<sup>-1</sup> nos testes realizados com larvas de *A. aegypti*. Ramírez-Lepe *et al.* (2003) estudando um complexo de esporotoxina de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, encapsulado em carboximetilcelulose de alumínio (CMC) sem fotoprotetor contra larvas de *A. aegypti*, obtiveram  $CL_{50}$  de 0,6155 mg.L<sup>-1</sup> e  $CL_{90}$  1,3872 mg.L<sup>-1</sup>. Cavalcante *et al.* (2018) estudando a atividade larvicida do *Bacillus thuringiensis israelensis* microencapsulado com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* com toxicidade para larvas de *A. aegypti*, observaram que a  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  obtida do pó seco foram, respectivamente, 0,12 mg.L<sup>-1</sup> e 0,21 mg.L<sup>-1</sup>, após 4 meses de armazenamento.

As linhagens encapsuladas com amido apresentaram eficácia no controle de imaturos do *A. aegypti* nos recipientes expostos às condições climáticas, no qual verificou-se ação inseticida das linhagens de *B. thuringiensis* nas primeiras semanas de tratamento, esses dados também foram constatados em estudos realizados no México utilizando complexo microencapsulado de esporos-toxina Bti (MeBti) contra larvas de *A. aegypti* expostos ao sol (AGUILAR-MEZA *et al.*, 2010). Nos estudos realizados por Viana *et al.* (2021a) observou-se que bactérias do gênero *Bacillus* apresentam elevada capacidade de reciclagem, demonstrando que a persistência de *B. thuringiensis* é um importante fator para determinar o sucesso dessa bactéria no controle de mosquitos vetores.

Bashir *et al.* (2016) estudaram a eficiência do encapsulamento de *B. thuringiensis* para a liberação controlada dessa bactéria em campo, no qual utilizaram encapsularam *B. thuringiensis* em microcápsulas coloidossomas para o controle de lepidópteros e verificaram que após 12 dias, o número médio de larvas foi significativamente menor nas formulações microencapsuladas do que nas formulações comerciais de *B. thuringiensis*. Nos estudos realizados por Sabbour e Singer (2016) em condições de campo, os resultados mostraram o efeito de dois isolados encapsulados de *B. thuringiensis*, após 21 dias de aplicação, onde as infestações de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) diminuíram significativamente.

Apesar das adversidades das condições climáticas observadas no Maranhão com clima tropical com temperaturas médias anuais superiores a 26 °C (NuGeo UEMA, 2023), a linhagem encapsulada BtMA-750 conseguiu persistir no ambiente por um longo período. Estudos demonstram que a eficácia e persistência dos formulados pode ser afetada pelas condições ambientais (BATRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2005, MELO-SANTO *et al.*, 2009, SETHA *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2021a). Esses estudos têm demonstrado que a eficácia do bacilo pode ser afetada pelas condições ambientais independentes do tipo de reservatório. Desta forma, observa-se a importância do encapsulamento de linhagens de *B. thuringiensis* para o controle de mosquitos vetores.

O encapsulamento de *B. thuringiensis* utilizando a técnica de polimerização em suspensão inversa e amido como material de parede mostrou ser uma excelente estratégia para o desenvolvimento de novos larvicidas para o controle de mosquitos. É importante mencionar que alguns ensaios adicionais podem ser realizados para avaliar possíveis efeitos fora do alvo do produto encapsulado.

## 6 CONCLUSÃO

- A técnica de polimerização em suspensão inversa se mostrou eficiente para o encapsulamento de *B. thuringiensis*, observadas nas análises de caracterização físico-química e morfológicas do material encapsulado, no qual mostraram que as bactérias foram devidamente incorporadas nas estruturas das microcápsulas de amido;
- Observou-se que maiores quantidades de bactérias ocasionaram uma leve diminuição no diâmetro das partículas, garantindo que mesmo a bactéria encapsulada ainda apresente um diâmetro médio adequado para ser consumido pelas larvas do *A. aegypti*;
- Os grupos funcionais do amido reticulado foram mantidos, apesar do aumento na quantidade de bactéria encapsulada;
- As análises de TGA indicaram que as análises térmicas das micropartículas não influenciaram a estabilidade térmica das amostras encapsuladas;
- As linhagens BtMA-750 e BtMA-1114 foram incorporadas as microcápsulas de amido e se mantiveram ativas, conforme os resultados de contagem de esporos viáveis;
- A análise SDS-PAGE evidenciou que as linhagens encapsuladas continuaram produzindo as proteínas inseticidas Cry e Cyt;
- As linhagens bacterianas encapsuladas testadas em laboratório contra larvas de *A. aegypti*, apresentaram 100% de mortalidade larval durante 35 dias de experimento;
- O encapsulado BtMA-750 e BtMA-1114 apresentou elevada toxicidade as larvas de *A. aegypti* mediante os bioensaio quantitativos;
- As linhagens encapsuladas BtMA-750 e BtMA-1114 apresentaram efetividade mesmo expostos aos fatores ambientais;
- A produção de formulações de bioinseticidas a partir de linhagens que estejam adaptadas às condições da região em estudo proporcionará um produto altamente eficiente e de baixo custo, além disso, é uma alternativa viável para reduzir o uso de inseticidas químicos que são nocivos ao homem e ao ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ABDILLAHI, H.; CHABRAT, E.; ROUILLY, A.; RIGAL, L. Influence of citric acid on thermoplastic wheat flour/poly (lactic acid) blends. II. Barrier properties and water vapor sorption isotherms. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 104-111, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.028>
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, 1995. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.177.21.6027-6032.1995>
- AGUILAR-MEZA, O.; RAMÍREZ-SUERO, M.; BERNAL, J. S.; RAMÍREZ-LEPE, M. Field evaluation against *Aedes aegypti* larvae of aluminum-carboxymethylcellulose-encapsulated spore-toxin complex formulation of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 3, p. 570-576, 2010. <https://doi.org/10.1603/ec09372>
- AHMAD, M.; GANI, A.; HASSAN, I.; HUANG, Q.; SHABBIR, H. Production and characterization of starch nanoparticles by mild alkali hydrolysis and ultra-sonication process. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60380-0>
- ÁLVAREZ LÓPEZ, D. I. G. **Toxicidad de microencapsulados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre larvas en primer instar de *Manduca sexta* (Linneo)**. (Doctorado Ingeniera Agrónoma Fitotecnista) - Universidad Autónoma De San Luis Potosí, San Luis Potosí, México 2011.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. p. 97-170.
- ALY, C. Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.45, n.1, p.1-8, 1985.
- ANDRADE, A. T. S.; BEZERRA, J. M. T.; PINHEIRO, V. C. S. Characterization of the proliferation sites of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the artificial breeding sites of Caxias, Maranhão, Brazil. In: **Life cycle and development of Diptera**. IntechOpen, 2019.
- ANDRIGHETTI, M. T. M.; CERONE, F.; RIGUETI, M.; GALVANI, K. C.; MACORIS, M. D. L. D. G. **Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos**. 2008.
- ANGELO, E.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- ARAÚJO, A.P. **Avaliação de um biolarvicida à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, desenvolvido no Brasil, para o controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2006.
- ARAÚJO, B. A.; DE FREITAS, L. S.; SARMENTO, K. K. F.; BEZERRA, V. R.; DE LIMA, C. A. P.; DE MEDEIROS, K. M. A aplicação de polímeros biodegradáveis como uma alternativa sustentável. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e49010918248-e49010918248, 2021. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18248>

AZEVEDO, A. R.; ALMEIDA, V. M.; SANTOS, S. A. S. Síntese de bioplásticos feitos com polímeros naturais: uma alternativa para a gestão ambiental. **Conhecimento & Diversidade**, v. 9, n. 19, p. 59-70, 2018. <http://dx.doi.org/10.18316/rcd.v9i19.3278>

AZEVÊDO, L. C.; DE SÁ, A. S. C.; ROVANI, S.; FUNGARO, D. A. Propriedades do amido e suas aplicações em biopolímeros. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, p. 351, 2018. <https://doi.org/10.9771/cp.v11i2.23173>

BARBOSA, J.K.B., 2017. **Seleção e caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 com potencial inseticida em larvas de *Aedes albopictus* SKUSE 1894 (Diptera: Culicidae)**. (Mestrado em Entomologia) - Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia, Manaus, A, 2017.

BARRETO, A. R.; MÉRIDA, L. G. R.; ETCHEPARE, M. A.; LOPES, E. J.; MENEZES, C. R. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 164-174, 2015. <https://10.5902/2179-460X19747>

BASSANI, A. T.; TRAMONTINA, A. C.; TRAMONTINA, F. F. Educação Ambiental, Vigilância em Saúde e o Controle do Vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) Educación Ambiental, Vigilancia en Salud y el Control del Vector *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae) Environmental Education, Health Surveillance and the Control of the Vector *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae). **REMEA-Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 36, n. 1, p. 339-356, 2019. <https://doi.org/10.14295/remea.v36i1.87721>

BASHIR, O.; CLAVERIE, J. P.; LEMOYNE, P.; VINCENT, C. Controlled-release of *Bacillus thuringiensis* formulations encapsulated in light-resistant colloidosomal microcapsules for the management of lepidopteran pests of *Brassica* crops. **PeerJ**, v. 4, p. e2524, 2016.

BASTOS, C. M.; D'AVILA, O. P.; UMPIERRE, R. N.; GONÇALVES, M. R.; FACCINI, L. S.; HARZHEIM, E. O uso de larvicidas em água potável é seguro?. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v.11, n.38, p.1-5, 2016. [https://doi.org/10.5712/rbmfc11\(38\)1300](https://doi.org/10.5712/rbmfc11(38)1300)

BATRA, C. P.; MITTAL, P. K.; ADAK, T. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 16, n. 4, p. 321-323, 2000.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Springer, Dordrecht, 2000. p. 383-398. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7_21)

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*, v. 6, n. 4, p. 1222-1243, 2014. <https://doi.org/10.3390/toxins6041222>

BENEDICT, M. Q.; LEVINE, R. S.; HAWLEY, W. A.; LOUNIBOS, L. P. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. **Vector-borne and zoonotic Diseases**, v. 7, n. 1, p. 76-85, 2007. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>

BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 156-173, 2000. <https://doi.org/10.1006/rtp.2000.1426>

BLENFORD, D. Food, flavourings, ingredients, processing. **Packaging**, v. 8, n. 7, p. 43, 1986.

BIANCO, L.R. **Produção de 1,3-propanodiol em biorreator por *Clostridium butyricum* imobilizado em microesferas**. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

BILAL, M.; IQBAL, H. MN. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International journal of biological macromolecules**, v. 130, p. 462-482, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, p. 279-293, 2007. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF, 2002.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 51 de 2022**. Brasília-DF, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF, 2009.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista eletrônica de materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

BURT, F.; CHEN, W.; MAHALINGAM, S. Chikungunya virus and arthritic disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 14, n. 9, p. 789-790, 2014. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70869-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70869-2)

CALLISTER, W. D. Jr.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 8º ed. Rio de Janeiro, LTC, 2012. p. 817.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos Polímeros**, 2ª. ed. Artliber, São Carlos, 2006.

CAVALCANTE, S. S. C. **Atividade larvicida frente à *Aedes aegypti* de *Bacillus thuringiensis israelensis* e óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* microencapsulado**.

2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão Ambiental) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Recife, PE, 2018.

CHEN, J.; AIMANOVA, K.; GILL, S.S. Functional characterization of *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 involved in the toxicity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *jegathesan*. **Peptides**, v. 98, p. 78-85, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.05.011>

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction. Universidade de Michigan: Chapman & Hall, 1992.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994. p. 228.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Eds), **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. cap.5.2, p.297-316.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D.; *et al.* Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, n. 3, p. 807–813, 1998.

CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, n. 3, p. 249-254, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07784.x>

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info>, Acesso em: 09/05/2023.

da COSTA, J. R.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. D. C.; VOLPE, H. X.; FERRAUDO, A. S.; *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. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000500015>

DE SOUZA E CASTRO, N. L.; NELE, M.; PINTO, J. C. Production of Crosslinked Starch Microparticles through Inverse Suspension Polymerization using Statistical Experimental Design. In: **Macromolecular Symposia**. 2020. p. 2000125.

DE SOUZA SIMÕES, L.; MADALENA, D. A.; PINHEIRO, A. C.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A.; RAMOS, Ó. L. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 23-45, 2017. <https://10.1016/j.cis.2017.02.010>

DIALLO, D.; SALL, A. A.; DIAGNE, C. T.; FAYE, O.; FAYE, O.; BA Y.; *et al.* Zika Virus Emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, v.9, n. 10, p. 1-8, 2014.

DIVE/SUV/SES/SC. Diretoria de Vigilância Epidemiológica/Superintendência de Vigilância em Saúde/Secretaria de Estado da Saúde/Governo de Santa Catarina. **ORIENTAÇÃO**



**TÉCNICA: Orientações para uso do larvívica Pyriproxyfen 0,5G no Programa de Controle da Dengue em Santa Catarina.** Florianópolis, 2014.

DJENANE, Z.; NATECHE, F.; AMZIANE, M.; GOMIS - CEBOLLA, J.; EL- AICHAR, F.; KHORF, H.; *et al.* Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 139, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9040139>

DONALISIO, M. R., FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 283-285, 2015. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201500010022>

DUNKLE, R. L.; SHASHA, B. S. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. **Environmental Entomology**, v. 17, n. 1, p. 120-126, 1988.

EIRAS, A. E. Culicidae. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo, Atheneu, 2000.

ELÇIN, Y. Murat. Control of mosquito larvae by encapsulated pathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of microencapsulation**, v. 12, n. 5, p. 515-523, 1995. <https://doi.org/10.3109/02652049509006782>

ELLEUCH, J.; TOUNSI, S.; HASSEN, N.B.B.; LACOIX, M.N.; CHANDRE, F.; JAOUA, S.; *et al.* Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of invertebrate pathology**, v. 124, p. 90-97, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.11.005>

ESKI, A.; DEMIRBAĞ, Z.; DEMİR, İ. Microencapsulation of an indigenous isolate of *Bacillus thuringiensis* by spray drying. **Journal of microencapsulation**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1572238>

FANG, J. M.; FOWLER, P. A.; SAYERS, C.; WILLIAMS, P. A. The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction condition. **Carbohydrate Polymers**, v. 55 n. 3, p. 283-289, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.10.003>

FANGUEIRO, J.; GONÇALVES, A. S.; SOUTO, E. B. Proteínas e polissacarídeos utilizados na preparação de sistemas de transporte de substâncias activas. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, p. 158-167, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C.S., PINHO, S.C., ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FAZELI, M.; FLOREZ, J. P.; SIMÃO, R. A. Improvement in adhesion of cellulose fibers to the thermoplastic starch matrix by plasma treatment modification. **Composites Part B: Engineering**, v. 163, p. 207-216, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.11.048>

FERNANDEZ, C.; ROJAS; C. C.; NILSSON, L. Size, structure and scaling relationships in glycogen from various sources investigated with asymmetrical flow field-flow fractionation and 1H NMR. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 458-465, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.05.016>



FERREIRA-DE-BRITO, A.; RIBEIRO, I. P.; MIRANDA, R. M.; FERNANDES, R. S.; CAMPOS, S.S., SILVA, K.A.B.; *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 655-658, 2016. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160332>

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. London, Cambridge University, 1971. 333p.

FOGLIO, M. A; SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F. Microencapsulação: uma Alternativa Promissora para Preservação de Produtos Naturais. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 5, n. 02, p. 52-57, 2013.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 2 ed. São Paulo, EDUSP, 2002.

FUENTES, C.; CASTAÑEDA, R.; RENGEL, F.; PEÑARRIETA, J. M.; NILSSON, L. Characterization of molecular properties of wheat starch from three different types of breads using asymmetric flow field-flow fractionation (AF4). **Food chemistry**, v. 298, p. 125090, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125090>

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. Brasília-DF, 2001.

GADELHA, D. T. A. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37: p. 29-36, 1985.

GANGULI, A.; ORNOB, A.; YU, H.; DAMHORST, G. L.; CHEN, W.; SUN, F.; *et al.* Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomedical microdevices**, v. 19, n. 4, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10544-017-0209-9>

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

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, São Paulo: FEALQ, 1998. cap. 12, p.383-446.

HE, X.; SUN, Z.; HE, K.; GUO, S. Biopolymer microencapsulations of *Bacillus thuringiensis* crystal preparations for increased stability and resistance to environmental stress. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2779-2789, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8070-y>

HERNÁNDEZ-SUÁREZ, M.; HERNÁNDEZ-CASTILLO, F. D.; GALLEGOS-MORALES, G. R.; LÍRA-SALDÍVAR, H.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n.2, p. 189-195, 2011. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.189.195>

HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: MARQUARDT, W.C. (Ed.). **Biology of disease vectors**. Waltham, Elsevier Academic, 2005. p. 167-185

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989. <https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989>

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, p. 906-908, 2015. <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020515>

JOUZANI, G. S.; ABAD, A. P.; SEIFINEJADE, A.; MARZBAN, R.; KARIMAN, K.; MALEKI, B. Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 83-94, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0269-6>

KANTOR, I. N. Dengue, Zika y Chikungunya. **Medicina**, (B. Aires), Ciudad Autonoma de Buenos Aires, v. 76, n.2, p.93-97, 2016.

KHAWALED, K.; BARAK, Z.; ZARITSKY, A. Feeding behavior of *Aedes aegypti* larvae and toxicity of dispersed and of naturally encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, n.3, p. 419-426, 1988.

KHORRAMVATAN, S.; MARZBAN, R.; ARDJMAND, M.; SAFEKORDI, A.; ASKARY, H. Optimising microencapsulated formulation stability of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bt-KD2) against ultraviolet condition using response surface methodology. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 50, n. 5-6, p. 275-285, 2017. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1302147>

KIPARISSIDES, C. Polymerization reactor modeling: a review of recent developments and future directions. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 10, p. 1637-1659, 1996. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(96\)00024-3](https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)00024-3)

KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 229, n.2, p.319-327, 1993.

KRAEMER, M. U. G.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A.; SHEARER, F. M.; BRADY, O. J.; *et al.* The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Scientific data**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2015. <http://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LECADET, M. M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J. E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, 1991. <https://doi.org/10.1128/aem.58.3.840-849.1992>

LEPARC-GOFFART, I.; NOUGAIREDE, A.; CASSADOU, S.; PRAT, C.; LAMBALLERIE, X. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60185-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60185-9)

LIMA, J. B. P.; MELO, N. V. D.; VALLE, D. Persistência de Vectobac WDG e Metoprag S-2g contra larvas de *Aedes aegypti* em ensaio simulado de campo no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 1, p. 7-12, 2005.

LIMA, W. P.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; MACORIS, M. L. G.; ZUCCARI, D. A. P. C.; DIBO, M. R. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 638-641, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000600005>

LOBO, K. D. S.; SOARES-DA-SILVA, J.; SILVA, M. C. D.; TADEI, W. P.; POLANCZYK, R. A.; PINHEIRO, V. C. S. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 1, p. 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.004>

LOPES, I. A.; PAIXAO, L. C.; DA SILVA, L. J. S.; ROCHA, A. A.; BARROS FILHO, A. K. D.; SANTANA, A. A. Elaboration and characterization of biopolymer films with alginate and babassu coconut mesocarp. **Carbohydrate polymers**, v. 234, p. 115747, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115747>

LUNA, J. E. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 842-843, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000600013>

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282007000200016>

MALDONADO, B. M. G.; GALAN, W. L. J.; RODRIGUEZ, P. C.; QUIROZ, M. H. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 18, p. 352-358, 2002.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. rev. e aum. São Paulo: Edgard Blücher, 2004.

MANRICH, S. Processamento de Termoplásticos: rosca única, extrusão e matrizes, injeção e molde, 1. ed. - São Paulo: Artiliber Editora, 2005.

MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brazil – Situation, Transmission and Control – A Proposal for Ecological Control. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 2, p. 235-245. 1994. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000200023>

MASCHERETTI, M.; TENGAN, C.H.; SATO, H.K.; SUZUKI, A.; SOUZA, R.P.; MAEDA, M.; *et al.* Febre amarela silvestre: reemergência de transmissão no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 5, p.881-889, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004341>

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

MILIÁN, Y.E.; GUTIERREZ, A.; GRAGEDA, M.; USHAK, S. A review on encapsulation techniques for inorganic phase change materials and the influence on their thermophysical properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 7, pp. 983–999, 2017.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.; SELKE, S. E.; HARTE, B. R.; HINRICHSSEN, G. (Ed.). **Natural fibers, biopolymers, and biocomposites**. CRC press, 2005. <https://doi.org/10.1201/9780203508206>

MONATH, T. P. Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases**, v.1. p. 11-20, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0).

MONTEIRO, F. J. C. **Monitoramento da dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e da dengue no município de Macapá, Amapá, Brasil**. 2014. Dissertação (Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP, 2014.

MORA-CÁRDENAS, E.; MARCELLO, A. Switch-on the LAMP to spot Zika. *Annals of translational medicine*, v. 5, n. 24, 2017. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2017.10.19>

MOYES, C.L.; VONTAS, J.; MARTINS, A.J.; NG, L.C.; KOOU, S.Y.; DUSFOUR, I.; *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005625, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>

MUSCAT, D.; ADHIKARI, B.; ADHIKARI, R.; CHAUDHARY, D. S. Comparative study of film forming behaviour of low and high amylose starches using glycerol and xylitol as plasticizers. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 2, p. 189–201, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.019>

NASSER, S.; DA COSTA, M. P. M.; DE MELLO FERREIRA, I. L.; LIMA, J. B. P. k-Carrageenan-*Bacillus thuringiensis israelensis* hydrogels: a promising material to combat larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100125, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100125>

NAVARRO-MTZ, A. K.; MARTIN-GARCIA, R.; URZUA-VALENZUELA, M.; ROLDAN-SABINO, C.; KAKAZEY, M.; JUAREZ-ARELLANO, E. A. High-energy ball milling treatment of soybean for *Bacillus thuringiensis* culture media. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 128, n. 3, p. 296-301, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.02.010>

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002.

NuGeo, Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Meteorologia. Disponível: [http://www.nugeo.uema.br/?page\\_id](http://www.nugeo.uema.br/?page_id), Acesso em: 26/07/2023.

ODIAN, G. **Principles of polymerization**. 4 ed. New York: Wiley-Interscience, 2004.

OO, S. Z. M.; THAUNG, S.; MAUNG, Y. N. M.; AYE, K. M.; AUNG, Z. Z.; THU, H. M.; MINAKAWA, N. Effectiveness of a novel long-lasting pyriproxyfen larvicide (SumiLarv® 2MR) against *Aedes* mosquitoes in schools in Yangon, Myanmar. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 16, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2603-9>

OZKAN, G.; FRANCO, P.; MARCO, I. DE; XIAO, J.; CAPANOGLU, E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, p. 494-506., 2019. <https://10.1016/j.foodchem.2018.07.205>

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255- 281, 2007. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1529-1536, Nov./Dec. 2002.

PINTO, L. M. N.; BERTIZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*. v. 38, p. 24-31, 2003.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, p. 957-971, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 813-816, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102003000600020>

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; Klier, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal of Invertebrate Pathology**, 66, n. 2, p. 131-135, 1995.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>

QIU, L.; CUI, S.; LIU, L.; ZHANG, B.; MA, W.; WANG, X.; *et al.* Aminopeptidase N1 is involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45007, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep45007>

RABINOVITCH, L.; DE OLIVEIRA, E. J. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. **CEP**, v. 21040, p. 900, 2015.

RAMÍREZ-LEPE, M.; AGUILAR, O.; RAMÍREZ-SUERO, M.; ESCUDERO, B. Protection of the spore-toxin complex of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* from ultraviolet irradiation with aluminum-CMC encapsulation and photoprotector. **Southwestern Entomologist**, v. 28, n. 2, p. 137-143, 2003.



RAMÍREZ-LEPE, M.; RAMÍREZ-SUERO, M. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelenses*. In: PERVEEN, F. (Ed.). **Insecticides - Pest Engineering**. InTech. Croatia, 2012. p. 239-264.

RAMÍREZ-SUERO, M.; ROBLES-OLVERA, V.; RAMIREZ-LEPE, M. Spray-dried *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* formulations for control of *Aedes aegypti* larvae. **Journal of economic entomology**, v. 98, n. 5, p. 1494-1498, 2005. <https://doi.org/10.1093/jee/98.5.1494>

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, v. 50, n. 8, p. 962-1079, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2005.05.002>

REY, J. R.; NISHIMURA, N.; WAGNER, B.; BRAKS, M. A.; O'CONNELL, S. M.; LOUNIBOS, L. P. Habitat segregation of mosquito arbovirus vectors in south Florida. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 6, p. 1134-41, 2006. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[1134:hsomav\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[1134:hsomav]2.0.co;2)

RICOLDI, M. C.; FIGUEIREDO, C. S.; DESIDÉRIO, J. A. Toxicity of Cry2 proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain T01-328 against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000132018>

RODRÍGUEZ, A. P. G.; MARTÍNEZ, M. G.; BARRERA-CORTÉS, J.; IBARRA, J. E.; BUSTOS, F. M. Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: studies on the propagation “in vitro”. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 2, p. 329-339, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1273-7>

ROKHADE, A. P.; AGNIHOTRI, S. A.; PATIL, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; KULKARNI, P. V.; AMINABHAVI, T. M. Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. **Carbohydrate polymers**, v. 65, n. 3, p. 243-252, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.013>

RUDIN, A.; CHOI, P. **The Elements of Polymer Science and Engineering**. Elements of Polymer Science & Engineering. 3 ed. Cambridge, MA, Elsevier Inc, 2013.

SABBOUR, M. M.; SINGER, S. M. Observations of the effect of two isolated nano *Bacillus thuringiensis* on *Tuta absoluta* infestation under laboratory and field condition. **Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 1891-1897, 2016.

SAIFULLAH, M.; SHISHIR, M. R. I.; FERDOWSI, R.; RAHMAN, M. R. T.; VAN VUONG, Q. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 230-251, 2019. <https://10.1016/j.tifs.2019.02.030>

SALEKJALALI, M.; BARZEGARI, A.; JAFARI, B. Isolation, Pcr Detection and Diversity of Native *Bacillus thuringiensis* Strains Collection Isolated from Diverse Arasbaran Natural Ecosystems. **World Applied Sciences Journal**, v. 18, n. 8, p. 1133-1138, 2012. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.18.08.1456>

SALIENT, L. V.; DÍEZ, S. R.; RIVAS, G. F. Zika virus infection or the future of infectious diseases. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 147, n. 7, p. 300-305, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.10.022>

SANTOS, F. P.; LOPES, J.; VILAS-BÔAS, G. T.; ZEQUI, J. A. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 122, n.1, p. 64-70, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.11.018>

SAUKA, D. H.; BENINTENDE, G. B. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 3, 273-281, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.003>

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>

SCICOLONE, G. **Restauración de la Pintura Contemporánea. De las técnicas de intervención tradicionales a las nuevas metodologías**. Editorial Nerea, 2002.

SETHA, T., CHANTHA, N.; BENJAMIN, S.; SOCHEAT, D. Bacterial larvicide, *Bacillus thuringiensis israelensis* strain AM 65-52 water dispersible granule formulation impacts both dengue vector, *Aedes aegypti* (L.) population density and disease transmission in Cambodia. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 9, p. e0004973, 2016.

SHIRAI, M. A.; GROSSMANN, M. V. E.; MALI, S.; YAMASHITA, F.; GARCIA, P. S.; MÜLLER, C. M. O. Development of biodegradable flexible films of starch and poly (lactic acid) plasticized with adipate or citrate esters. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 19-22, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.038>

SHRIVASTAVA, A. Introduction to Plastics Engineering. **Introduction To Plastics Engineering**, p.1-16, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-39500-7.00001-0>

SOARES-DA-SILVA, J. **Avaliação Experimental de duas Formulações de Larvicida Biológico *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, no Controle de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), em Caxias, MA**. 2009. Monografia (Graduação em Ciências com Habilitação em Biologia) - Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, 2009.

SOARES-DA-SILVA, J.; QUEIRÓS, S. G.; AGUIAR, J. S.; VIANA, J. L.; NETA, M. D. R. A.V., SILVA, M. C.; *et al.* Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Acta Tropica**, v. 176, p. 197-205, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.006>

SOARES-PINHEIRO, V. C.; DASSO-PINHEIRO, W.; TRINDADE-BEZERRA, J. M.; TADEI, W. P. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under diferente environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 396-401, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.19815>

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of action of cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. In: P. GOPALAKRISHNAKONE, B. STILES, A. ALAPE-GIRÓN, J.D. DUBREUIL and M. MANDAL. (Eds), **Microbial toxins: toxinology**. Dordrecht: Springer, 2018. pp. 1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

SOO, K. M.; KHALID, S. M.; CHING, S. M.; CHEE, H. Y. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0154760, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154760>

STUART, B. H. **Analytical Techniques in Materials Conservation**. England: John Wiley & Sons, 2007.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em Diferentes Áreas. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v.7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 18, p. 867-871, 2002.

TAVEIRA, L. A. T.; FONTES, L. R.; NATAL, D. **Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti***. 1. ed. Ribeirão Preto, São Paulo, 2001. p. 108-108.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33. 1999. <http://dx.doi.org/10.5123/S0104-16731999000400002>

THYGESEN, L. G.; LØKKE, M. M.; MICKLANDER, E.; ENGELSEN, S. B. Vibration microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. **Trends in food Science & technology**, v. 14, n. 1-2, p. 50-57, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00243-1)

TISSERA, H. A.; SAMARAWEEERA, P. C.; JAYAMANNE, B. D. W.; JANAKI, M. D. S.; U CHULASIRI, M. P. P.; RODRIGO, C.; *et al.* Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* in integrated vector control of *Aedes sp.* in Sri Lanka: a prospective controlled effectiveness study. **Tropical Medicine & International Health**, v. 23, n. 2, 229-235, 2018. <https://doi.org/10.1111/tmi.13015>

UBIETA, M. Conservación y restauración de materiales contemporáneos y nuevas tecnologías. Madrid: Editorial Síntesis, 2011.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 419-422, 2016. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742016000200020>

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p.1-16, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>

VARGAS, L. D. L.; FERREIRA, S. M. B.; SOUZA, M. D.; DA SILVA, C. A. L.; SHIMOYA-BITTENCOURT, W. Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle: estado da arte do conhecimento. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 21, n. 1, p. 98-116, 2022. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v21i1.44458>



VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?. **Revista Pan-Amazônica Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232015000200001>

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>

VEMMER, M.; PATEL, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 380-389, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>

VIANA, J. L.; NETA, M. D. R. A. V.; DA SILVA, J. S.; DOS SANTOS ANDRADE, A. T.; BEZERRA, J. M. T.; *et al.* Larvicide activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in simulated field condition. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 43248-43264, 2021a. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-676>

VIANA, J. L.; SOARES-DA-SILVA, J.; VIEIRA-NETA, M. R. A.; TADEI, W. P.; OLIVEIRA, C. D.; ABDALLA, F. C.; *et al.* Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 1, p. 114-124, 2021b. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.223389>

VIANA, J. L.; DOS SANTOS LOBO, K.; NETA, M. D. R. A. V.; DUARTE, I. C. S.; DELFORNO, T. P.; DA SILVA, J. S.; *et al.* Técnicas de identificação e meios de cultivo para crescimento de *Bacillus thuringiensis* utilizados no controle de mosquitos vetores: Mini revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 7, p. e51510716916-e51510716916, 2021c. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16916>

VIEIRA-NETA, M. R. A. Isolamento e patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* do estado do Maranhão para larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). 2014. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, Maranhão, 2014.

VIEIRA-NETA, M. R. A.; SOARES-DA-SILVA, J.; VIANA, J. L.; SILVA, M. C.; TADEI, W. P.; PINHEIRO, V. C. S. Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 872-880, 2021. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228790>

VILLARREAL-DELGADO, M. F.; VILLA-RODRÍGUEZ, E. D.; CIRA-CHÁVEZ, L. A.; ESTRADA-ALVARADO, M. I.; PARRA-COTA, F. I.; SANTOS-VILLALOBOS, S. D. L. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95-130, 2018. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

WAY, D. V.; NELE, M.; PINTO, J. C. Production of doxycycline-loaded gelatin microspheres through thermal treatment in inverse suspensions. **Polymer Engineering and Science**, v. 58, n. 5, p. 802-809, 2018. <https://doi.org/10.1002/pen.24628>

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1-4, 2014.

WEIMANN, G. L. **Estudo dos efeitos de três técnicas de microencapsulação da bactéria *Bacillus thuringiensis* subespécie *israeliensis* (Bti) em matriz polimérica biodegradável poli(ácido láctico) e poli(ácido láctico-co-glicólico).** 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville, Univille, Joinville, 2014.

World Health Organization - WHO. Dept. of Communicable Disease Prevention, Control and Eradication & WHO Pesticide Evaluation Scheme. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.** Geneva. World Health Organization, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/69101>, Acesso em: 26/05/2018.

World Health Organization.; UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. **Global vector control response 2017-2030.** Geneva: World Health Organization, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259205>, Acesso em: 09/05/2021.

XING, Y.; XU, Q.; MA, Y.; CHE, Z.; CAI, Y.; JIANG, L. Effect of porous starch concentrations on the microbiological characteristics of microencapsulated *Lactobacillus Acidophilus*. **Food & function**, v. 5, n. 5, p. 972-983, 2014. <https://10.1039/c3fo60438a>

ZARA, A. L. D. S. A.; SANTOS, S. M. D.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000200017>

## **ANEXOS**

## **Técnicas de identificação e meios de cultivo para crescimento de *Bacillus thuringiensis* utilizados no controle de mosquitos vetores: Mini revisão**

Identification techniques and culture media for the growth of *Bacillus thuringiensis* used to control vector mosquitoes: Mini review

Técnicas de identificación y medios de cultivo para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* utilizados para el control de mosquitos vectores: Mini revisión

Recebido: 07/06/2021 | Revisado: 15/06/2021 | Aceito: 18/06/2021 | Publicado: 30/06/2021

**Juliete Lima Viana**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6008-3931>

Universidade do Estado do Amazonas, Brasil

E-mail: [julieteviana\\_2009@hotmail.com](mailto:julieteviana_2009@hotmail.com)

**Katiane dos Santos Lobo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-1905>

Universidade do Estado do Amazonas, Brasil

E-mail: [katianecx@hotmail.com](mailto:katianecx@hotmail.com)

**Maria dos Remédios Araújo Vieira Neta**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0788-1579>

Universidade Federal de São Carlos, Brasil

E-mail: [remediosneta@gmail.com](mailto:remediosneta@gmail.com)

**Iolanda Cristina Silveira Duarte**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9141-1010>

Universidade Federal de São Carlos, Brasil

E-mail: [iolanda.duarte@gmail.com](mailto:iolanda.duarte@gmail.com)

**Tiago Palladino Delforno**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1705-0763>

Universidade Federal de São Carlos, Brasil

E-mail: [tiago.palladino@gmail.com](mailto:tiago.palladino@gmail.com)

**Joelma Soares da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5558-7916>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: [joelmasoares12@gmail.com](mailto:joelmasoares12@gmail.com)

**Valéria Cristina Soares Pinheiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4652-4884>

Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

E-mail: [pinheirovcs@gmail.com](mailto:pinheirovcs@gmail.com)

**Rosemary Aparecida Roque**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8781-6170>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil

E-mail: [rosebio1996@yahoo.com.br](mailto:rosebio1996@yahoo.com.br)

**Wanderli Pedro Tadei**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0612-3285>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil

E-mail: [wptadeicurso@gmail.com](mailto:wptadeicurso@gmail.com)

### **Resumo**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria de interesse mundial, devido sua elevada toxicidade a uma ampla gama de insetos vetores de agentes patogênicos ao homem e pragas agrícolas. A ação inseticida de Bt é conferida pela presença de cristal proteico, que atuam como toxinas. Diversos estudos são realizados com intuito de selecionar linhagens de Bt de diferentes ecossistemas com ação mosquitocida para insetos vetores. Observa-se que o solo é o substrato mais utilizado para o isolamento de Bt, sendo amplamente encontrado na natureza, predominantemente, na forma de esporos. A busca de novas linhagens de Bt em diferentes regiões do mundo tem como objetivo obter novas toxinas com ação inseticida, e que possam ser utilizadas na produção de biopesticidas. Para o cultivo das linhagens, são utilizados os meios Ágar Nutriente ou NYSM. Os meios de cultura possuem grande variedade de nutrientes, sendo ricos em carbono, nitrogênio e sais minerais, que são utilizados para induzir o crescimento dos microrganismos. Portanto, diversos estudos buscam aprimorar esses meios para o crescimento de Bt, utilizando meios alternativos eficazes e econômicos, visando o controle de mosquitos vetores.

**Palavras-chave:** Entomopatogênico; Inseticida; Crescimento bacteriano; Controle biológico.

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is a bacterium of worldwide interest, due to its high toxicity to a wide range of insect vectors of pathogens to humans and agricultural pests. The insecticidal action of Bt is conferred by the presence of protein crystals, which act as toxins. Several studies are carried out in order to select Bt strains from different ecosystems with mosquitocidal action for vector insects. It is observed that the soil is the most used substrate for the isolation of Bt, being widely found in nature, predominantly in the form of spores. The search for new Bt strains in different regions of the world aims to obtain new toxins with insecticidal action, which can be used in the production of biopesticides. For the cultivation of the strains, Nutrient Agar or NYSM media are used. Culture media have a wide variety of nutrients, being rich in carbon, nitrogen and mineral salts, which are used to induce the growth of microorganisms. Therefore, several studies seek to improve these means for the growth of Bt, using alternative effective and economical means, the control of vector mosquitoes.

**Keywords:** Entomopathogenic; Insecticide; Bacterial growth; Biological control.

## Resumen

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria de interés mundial, debido a su alta toxicidad para una amplia gama de insectos vectores de patógenos para humanos y plagas agrícolas. La acción insecticida de Bt se confiere por la presencia de cristales de proteínas, que actúan como toxinas. Se realizan varios estudios para seleccionar cepas de Bt de diferentes ecosistemas con acción mosquitocida para insectos vectores. Se observa que el suelo es el sustrato más utilizado para el aislamiento de Bt, encontrándose ampliamente en la naturaleza, predominantemente en forma de esporas. La búsqueda de nuevas cepas de Bt en diferentes regiones del mundo tiene como objetivo la obtención de nuevas toxinas con acción insecticida, que puedan ser utilizadas en la producción de bioplaguicidas. Para el cultivo de las cepas se utilizan medios de agar nutritivo o NYSM. Los medios de cultivo tienen una amplia variedad de nutrientes, ricos en carbono, nitrógeno y sales minerales, que se utilizan para inducir el crecimiento de microorganismos. Por ello, varios estudios buscan mejorar estos medios para el crecimiento de Bt, utilizando medios alternativos eficaces y económicos, el control de mosquitos vectores.

**Palabras clave:** Entomopatógeno; Insecticida; Crecimiento bacterial; Control biológico.

## 1. Introdução

A espécie *Bacillus thuringiensis* Berliner é um entomopatógeno de maior sucesso, apresentando múltiplas vantagens, principalmente quando comparado ao controle químico, que ocasionam sérios problemas à saúde humana e a natureza (Alves, 1998; Polanczyk e Alves, 2003; Bravo et al., 2011; Soares-da-Silva et al., 2017). Além disso, é uma das bactérias mais utilizadas na fabricação de inseticidas biológicos e, para o controle de insetos em todo o mundo (Polanczyk e Alves, 2003; Galzer e Azevedo Filho, 2016; Liu et al., 2016).

O interesse das pesquisas voltadas para o *B. thuringiensis* é devido sua elevada patogenicidade e toxicidade a uma ampla gama de insetos transmissores de agentes patogênicos ao ser homem e pragas agrícolas (Alves, 1998; Marrone, 2019; Saraiva et al., 2019). Portanto, diversos estudos em diferentes partes do mundo são realizados com o objetivo de selecionar novas linhagens de *B. thuringiensis* com elevada toxicidade (El-Kersh et al., 2016; Soares-da-Silva et al., 2017; Lobo et al., 2018).

*B. thuringiensis* é naturalmente encontrado em diferentes locais como no solo, grãos estocados, plantas, insetos mortos e água (Guz, Bugla-Ploskonska e Doroszkiewicz, 2009; Konecka et al., 2012; Reyaz, Gunapriya e Arulselvi, 2017; Argôlo-Filho e Loguercio, 2018). Relacionado aos insetos, tem-se constatado que esses organismos são altamente infectados por microrganismos, podendo está presente externa e internamente, mantendo a relação complexa entre eles. Os insetos mortos são fontes de alimento para *B. thuringiensis* no ambiente, servindo como substrato e matriz natural dos esporos. A ampla gama de substrato para reprodução de *B. thuringiensis* pode gerar variabilidade genética dessa bactéria em condições naturais (Alves, 1998; Ben-Dov, 2014; Raymond, 2017; Viana et al., 2020).

A ação inseticida de *B. thuringiensis* é conferida pela presença de cristal de proteínas produzido durante a fase de esporulação, que atuam como toxinas (Alves, 1998; Polanczyk e Alves, 2003; Fernández-Chapa et al., 2019). Essas proteínas são conhecidas como  $\delta$ -endotoxinas, que são compostas de duas famílias multigênicas, as proteínas Cry (Crystal) e Cyt

(Citolíticas), as quais são tóxicas a insetos de diferentes ordens (Höfte e Whiteley, 1989; Bravo, Gill e Soberón, 2007; Van Frankenhuyzen, 2013; Badran et al., 2016; Zogo et al., 2019; Onofre et al., 2020).

Para a seleção de novas linhagens de *B. thuringiensis* com potencial de ação inseticida, um parâmetro importante é a adequação do crescimento bacteriano em laboratório, como verificação das exigências nutricionais, levando em consideração o próprio ambiente onde cada linhagem foi isolada. Nesse sentido, a escolha do meio de cultivo adequado é extremamente importante para o sucesso de produção da bactéria. Os meios de cultura para crescimento das bactérias, devem proporcionar a máxima produção com custo mínimo (Couch, 2000; Angelo, Vilas-Bôas e Castro-Gómez, 2010; Boniolo et al., 2012).

Os meios de cultivo utilizados para o crescimento de *B. thuringiensis* comumente possuem uma fonte de nitrogênio, carbono e sais minerais. A fonte de carbono fornece energia e matéria prima para muitas organelas celulares, o nitrogênio atua na síntese de proteínas e ácidos nucleicos e os sais minerais agem como cofatores no controle da osmolaridade celular (Angelo, Vilas-Bôas e Castro-Gómez, 2010; Boniolo et al., 2012). Nessa revisão foram identificados os meios de cultura mais comumente utilizados no crescimento de *B. thuringiensis*, as principais diferenças desses meios de cultivo e seus componentes nutricionais fundamentais. Além disso, também foi abordado as principais técnicas utilizadas na identificação dessa bactéria.

## 2. Metodologia

O presente estudo é uma síntese do conhecimento científico sobre a identificação de *B. thuringiensis* e os meios de cultura utilizados no crescimento da bactéria no controle de vetores. A escolha dos artigos foi realizada de modo atemporal, ou seja, independentemente do tempo.

A revisão foi produzida com base em livros científicos e artigos disponíveis nas bases de dados de indexação, como: Pubmed, Scielo, Wiley Online Library, cience Direct, Web of Science e Scopus. A busca de artigos nas diferentes bases de dados utilizou diferentes termos como: cultivos de *Bacillus thuringiensis*, seleção de *Bacillus thuringiensis*, identificação de *Bacillus thuringiensis*, Prospecção de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* no controle de mosquitos vetores, culture media in the growth of *Bacillus thuringiensis*, Prospecting for *Bacillus thuringiensis*, selection of *Bacillus thuringiensis* in vector control. Após a seleção dos artigos científicos, os mesmos foram lidos, analisados e interpretados as principais informações para a fundamentação teórica do estudo. A partir da fundamentação teórica foram confeccionadas tabelas com os dados de cada artigo científico referente ao isolamento e meios de cultura utilizados no crescimento de *B. thuringiensis*.

## 3. *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *B. thuringiensis* é um bastonete de 1 a 1,2 µm de largura por 3 a 5 µm de comprimento, comumente com motilidade. É gram-positiva, aeróbica, crescendo facultativamente em anaerobiose, na faixa de 10 a 45°C. Desenvolvem esporos, de elípticos a cilíndricos, na posição central, com esporângio não claramente estendido e produzem um cristal proteico (Alves, 1998; Capalbo, Vilas-Bôas e Suzuki, 2005; Deng et al., 2014).

Em 1901, esta bactéria foi inicialmente analisada por Ishiwata, ocasionando mortalidade em larvas de bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Linnaeus, 1758), sendo chamada de *Bacillus sotto*. Posteriormente, em 1911, a bactéria foi novamente isolada por Berliner, apresentando aspectos da sua atividade entomopatogênica e o nomeou de *B. thuringiensis* em homenagem a província da Thuringia na Alemanha, local onde foi primeiramente descoberto (Glare e O'Callaghan, 2000).

Embora o termo *B. thuringiensis* seja empregado para uma única espécie, levando em consideração aspectos taxonômicos, esta bactéria pertence a um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephensis*). Este complexo é denominado *B. cereus* (Polanczyk e Alves, 2003; Ehling-Schulz, Lereclus e Koehler, 2019).

O número de células de *B. thuringiensis* obtidas em isolamento varia entre  $10^2$  e  $10^4$  unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo, enquanto que em plantas este número possui uma taxa bem mais baixa (Damgaard, 2000).

Dentre as bactérias que possuem patogenicidade a insetos, o *B. thuringiensis* é o principal componente ativo utilizado comercialmente nos biolarvicidas (Liu et al., 2016). A espécie *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) é a linhagem que apresenta maior atividade tóxica para mosquitos e é utilizada como padrão, sendo indicada no controle de vetores em várias regiões do planeta. O grande sucesso desta bactéria como agente de controle biológico se dá devido à produção, durante a esporulação, de um cristal de proteínas, que contêm toxinas inseticidas, chamadas de  $\delta$ -endotoxinas (Damgaard, 2000; Delécluse, Juárez-Pérez e Berry, 2000; Saraswathy e Kumar, 2004; Sanchis, 2011; Deng et al., 2014; Onofre et al., 2020).

O *B. thuringiensis* oferece uma diversidade de vantagens, como segurança ambiental, pois atua somente na espécie alvo e suas toxinas não se acumulam no meio ambiente; ótima durabilidade no ambiente, apresentando eficácia no campo de até 90 dias, em locais protegidos dos raios solares; capacidade de reciclagem em larvas mortas, com isso os esporos podem germinar dentro do cadáver das larvas, mantendo-se assim no ambiente; além de apresentar uma diversidade de toxinas inseticidas, o que irá dificultar a seleção de mosquitos com resistência (Habib e Andrade, 1998; Polanczyk e Alves, 2003; Soares-da-Silva et al., 2017).

#### 4. Mecanismo de ação das toxinas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis*

A atividade larvicida da bactéria *B. thuringiensis* é conferida à produção de um cristal proteico, que irá conter as delta-endotoxinas, sendo as proteínas Cry (Cristal) as mais relevantes, e as Cyt (Citolíticas) atuando em sinergismo com as toxinas do cristal proteico. Estas proteínas são sintetizadas durante o processo de esporulação do *B. thuringiensis*, em condições limitadas de crescimento, e são codificadas por diferentes genes chamados genes *cry* e *cyt* (Agaisse e Lereclus, 1995; De Maagd et al., 2003; Saraswathy e Kumar, 2004; Pérez et al., 2005; Fernández-Chapa et al., 2019).

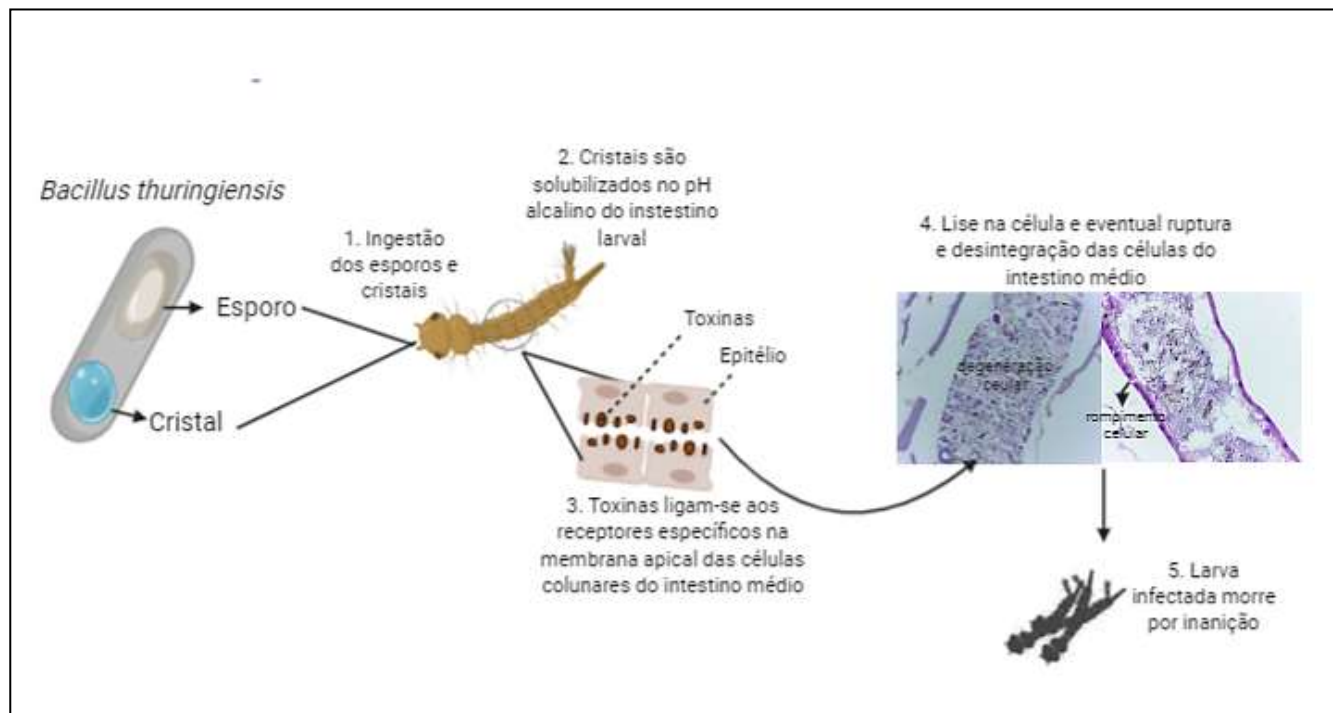
O cristal de proteínas dessa bactéria é considerado como uma pró-toxina, sendo uma forma inativa, que em contato com meio alcalino ou em solução de enzima proteolítica, ocorre a clivagem desta pró-toxina, resultando em moléculas de tamanhos variados, as comumente chamadas de Cry e Cyt (Kuo e Chak, 1996; Yamamoto e Dean, 2000; Bravo et al., 2005; Zhong et al., 2007). Os esporos também podem contribuir com a atividade patogênica por meio da ação sinérgica realizada com as delta-endotoxinas (Johnson e McGaughey, 1996).

As proteínas Cry apresentam atividade tóxica para os insetos, quando as larvas se alimentam desses cristais. Deste modo, após a ingestão, os cristais são solubilizados no pH alcalino, que em presença de enzimas digestivas, tornam-se tóxicos e são convertidas em quatro ou mais polipeptídios de delta-endotoxinas. As toxinas hidrolisadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se aos receptores específicos na membrana apical das células colunares do intestino médio, intervindo no gradiente iônico e no balanço osmótico das células da membrana, formando poros e, causando ruptura na célula e desintegração do intestino médio. Portanto, a larva sofre consequente morte por inanição, tornando-se incapaz de absorver os nutrientes necessários (Figura 1) (Höfte e Whiteley, 1989; Bravo, 1997; Copping e Menn, 2000; Bergman et al., 2007).

A atividade patogênica a insetos dessa bactéria está associada com a síntese dessas proteínas que possuem alta atividade tóxica e exclusivas para insetos de diversas ordens e alguns invertebrados (Höfte e Whiteley, 1989; Glare e O'Callaghan, 2000; Zogo et al., 2019).



**Figura 1.** Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* em larva de mosquito.



Fonte: Esquema realizado por Vieira-Neta no Created in BioRender e figuras do epitélio intestinal de Viana et al. (2021).

Diversas ordens de insetos são suscetíveis às linhagens de *B. thuringiensis*, dentre as mais estudadas estão, Lepidoptera, Coleoptera por serem importantes pragas agrícolas e Díptera, especialmente as espécies vetores de doenças. Além de insetos são citados na literatura os nematóides, ácaros, entre outros organismos (Kuo e Chak, 1996; Yamamoto e Dean, 2000; De Maagd et al., 2003; Van Frankenhuyzen, 2009, 2013).

As toxinas de *B. thuringiensis* são compostas por três domínios, o domínio I, relacionado à inserção e formação de poros na membrana; o II, responsável pelo reconhecimento do receptor e, pela ação específica da toxina para a espécie-alvo; e o domínio III, em que sua função ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se estar envolvida com as duas funções dos domínios anteriores, além de tornar a toxina estável (Saraswathy e Kumar, 2004).

Pesquisas sobre a toxina de *B. thuringiensis*, mostram a associação entre os três domínios para ocasionar a atividade larvicida de *B. thuringiensis*. Saraswathy e Kumar (2004) delinearam a engenharia das diferentes  $\delta$ -endotoxinas, levando à compreensão do seu modo molecular de atuação e constituição de novas toxinas com maior patogenicidade e ação específica. A atividade tóxica das proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto que o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal proteico (Li, Carroll e Ellar, 1991). A composição da inclusão cristalina e as estruturas das toxinas originam a formação do cristal, que pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou sem forma determinada (Habid e Andrade, 1998).

A maioria das linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de produzir mais de um tipo de cristal. Os cristais são formados por diferentes proteínas Cry e/ou Cyt, como ocorre na espécie *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), que possui cinco genes que codificam proteínas Cry e dois genes codificadores de Cyt, localizados no mesmo plasmídeo com massa molecular de 72 MDa (González e Carlton, 1984; Lereclus et al., 1989; Berry et al., 2002). Esses genes das proteínas do cristal de proteínas de *B. thuringiensis* estão presentes em plasmídeos conjugativos, facilitando a recombinação e troca destes



elementos, assim, fornece um importante mecanismo de geração de novas especificidades (Aronson, 1993; Berry et al., 2002; Espinasse et al., 2003).

A multiplicidade de proteínas Cry e Cyt são consequência de contínuos esforços na investigação por toxinas com características apropriadas para controlar biologicamente os insetos de importância agrícola e transmissores de doenças (Pigott e Ellar, 2007; Saraiva et al., 2019). Compreendendo mais de 400 genes *cry* e aproximadamente 37 genes *cyt* já identificados. As proteínas Cry estão classificadas em cerca de 74 grupos reunidos em diferentes subgrupos, além da existência de três grupos de toxinas Cyt (Crickmore et al., 2020). As toxinas Cry especificamente com ação para dípteros vetores de doenças abrangem cerca de 20, sendo que consecutivamente são descritos novos genes e, por conseguinte, novas toxinas (Van Frankenhuyzen, 2009, 2013).

Um dos exemplos de trabalhos de isolamento e avaliação da patogenicidade de novas linhagens de *B. thuringiensis*, foi realizado em 2009, na China, onde foi isolado do solo uma nova linhagem de *B. thuringiensis*, que demonstrou atividade entomopatogênica para larvas de *Aedes aegypti* vinculada à mesma descoberta, encontrou-se também uma nova toxina Cry diferente das atualmente conhecidas, com ação para o mesmo vetor (Tan et al., 2009).

Especialmente, devido à crescente utilização das proteínas Cry e Cyt, produzidas por essa bactéria no controle biológico de insetos de importância epidemiológica, há também a preocupação com a manipulação de resistências de insetos alvo às  $\delta$ -endotoxinas produzidas pelo *B. thuringiensis* já conhecidas. E como essas toxinas não oferecem risco à saúde humana e outras espécies benéficas à natureza, a sua utilização para controle de insetos vetores tornam-se conveniente (Carozzi et al., 2001; Silva, 2008).

Desse modo, a investigação de novas linhagens de *B. thuringiensis* com potencialidades diferentes das atualmente conhecidas, mostra-se como uma das prioridades de pesquisas em várias regiões do mundo, objetivando obter, isolar e caracterizar linhagens promissoras e com toxinas diferenciadas das que já existem, podendo ser utilizadas na produção de biolarvicidas (Schnepf e Whiteley, 1981; Barreto, 2005; Medeiros et al., 2006; El-Kersh et al., 2016; Soares-da-Silva et al., 2017; Lobo et al., 2018).

## 5. Isolamento, identificação e toxicidade de *Bacillus thuringiensis* para mosquitos vetores

Devido ao sucesso de *B. thuringiensis* no controle de vetores, diversos estudos são realizados para selecionar isolados com ação mosquitocida (Campanini et al., 2012; Soares-da-Silva et al., 2015; Tissera et al., 2018; Vieira-Neta et al., 2020). Geralmente, os trabalhos de seleção de linhagens de *B. thuringiensis* para mosquitos são iniciados com a busca pelo complexo de proteínas Cry e Cyt, toxinas encontradas na cepa padrão Bti (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cy2Ba*), pois os genes presentes nos isolados é uma forma de prever a atividade larvicida. No entanto, muitos trabalhos preferem selecionar linhagens selvagens, tendo em vista, que estas podem apresentar maior variabilidade genética (Van Frankenhuyzen, 2009; da Costa et al., 2010; Cantón et al., 2011; Crickmore et al., 2020).

O solo é o substrato comumente utilizado para a seleção de *B. thuringiensis* (Soares-da-Silva et al., 2017; Gobatto et al., 2010; Soares-da-Silva et al., 2015; Monnerat et al., 2005; Vieira-Neta et al., 2020), pois essa bactéria é amplamente encontrada na natureza predominantemente na forma de esporos, que podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo (de Maagd et al., 2003). De acordo com Wang et al. (2003) o *B. thuringiensis* é encontrado em todos os ambientes terrestres e também em insetos mortos plantas e detritos. *B. thuringiensis* possui capacidade de permanecer no solo em diversas condições ambientais, sendo facilmente transportada por animais, vento e chuvas. A presença de componentes químicos no solo como Ca, Cu, Fe e Zn são importantes para o desenvolvimento da bactéria no ambiente (Glare e O'Callaghan 2000; Polanczyk, 2004).

Diferentes hipóteses explicam sobre a permanência de *B. thuringiensis* no solo, Meadows (1993) relata que *B. thuringiensis* é depositado no solo por folhas e insetos, dificilmente desenvolve-se no solo. Essa bactéria também pode ser patógeno de insetos do solo que apresentem pouca importância econômica, com os quais poucos estudos foram realizados. Pressupõe também que *B. thuringiensis* pode desenvolver-se no solo quando existem nutrientes suficientes, obtidos de resíduos orgânicos em decomposição. E que a afinidade de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, com o qual *B. thuringiensis* pode trocar material genético, possibilitando sua permanência no ambiente. Outra proposição para a variação de *B. thuringiensis* nas regiões brasileiras podem estar relacionadas às atividades agrícolas, tipos de solo e método de isolamento desenvolvido (Gobatto et al., 2010).

A quantidade de isolados obtidos de diferentes regiões brasileiras varia bastante (Tabela 1), o que pode influenciar no percentual de *B. thuringiensis* em uma localidade é a dificuldade e a comparação entre estudos, referente ao método de isolamento empregado, pois estes não são padronizados, havendo uma grande diversidade entre os grupos de pesquisa (Carozzi et al., 1991; da Silva, Dias e Monnerat, 2002; Polanczyk, Zanúncio e Alves, 2009). No entanto, existe um método preconizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1985). Outros fatores que podem influenciar na quantidade de linhagens de *B. thuringiensis* são: a escolha do substrato, o método de coleta em campo e o processo de identificação da espécie.

Em estudo realizado por Soares-da-Silva et al. (2015) foi relatado que de 57 linhagens de *B. thuringiensis* obtidas de áreas florestais da Amazônia apenas 8,8% apresentaram atividade larvicida contra *Ae. aegypti* e somente uma (BtAM-27) expressou cinco genes (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba*), os quais são descritos na literatura como responsáveis pela toxicidade de dípteros, apesar dos cinco isolados apresentaram toxicidade, somente duas linhagens (IBt-07 e IBt-28) exibiram os menores valores de  $CL_{50}$  com 0,0011 e  $0,0014 \times 10^5$ , respectivamente.

Em outro estudo, Soares-da-Silva et al. (2017) relataram que de 553 linhagens de *B. thuringiensis* testadas contra *Ae. aegypti* apenas 37 apresentam patogenicidade, destes 12 proporcionaram mortalidade de 100% das larvas em 24 h e foram utilizadas em ensaios de toxicidade. Os autores mostraram que duas linhagens BtMA-690 e BtMA-1114 apresentaram toxicidade igual a cepa padrão Bti, e o mesmo valor de  $CL_{50}$  (0,003 mg/L) foi observado após 48 h de exposição. No estudo também foi verificado as toxinas Cry, Cyt e Chi importantes na toxicidade para mosquitos vetores.

Lobo et al. (2018) reportaram que de 300 linhagens analisadas quanto a patogenicidade contra as larvas de *Ae. aegypti*, 12 foram patogênicas, e apenas uma linhagem BtMA-401 apresentou  $CL_{50}$  de  $0,004 \times 10^7$  esporos/mL. Quando submetidos a análise molecular mediante PCR, 10 linhagens apresentaram um ou mais genes *cry* e *cyt* dípteros-específico. Campanini et al. (2012) caracterizaram por meio de técnicas moleculares, mediante RNA ribossomal 16S (ou 16S rRNA), 76 linhagens de Bt, e verificaram que oito isolados apresentavam os genes *cry4Aa*, *cry4Ba* ou *cry10Aa*, destes sete apresentaram mortalidade às larvas de *Ae. aegypti*. A presença de genes, por isso, não significa que a linhagem apresente toxicidade, pois para isso ocorrer é necessário que as proteínas sejam expressas.

Ootani et al. (2011) relataram a investigação de 101 linhagens de *B. thuringiensis* de diferentes localidades do estado do Tocantins, destas somente a linhagem A-392 apresentou excelente atividade larvicida contra *Ae. aegypti* e mediante análise proteica apresentaram proteínas de massa molecular de aproximadamente 80 kDa correspondente ao tamanho esperado para a estirpe padrão Bti. As proteínas Cry apresentam massa molecular entre 40 a 140 kDa e as toxinas Cyt apresentam proteínas de massa molecular de 27–30 kDa. Gobatto et al. (2010) selecionaram 231 isolados, destes 35 foram submetidos a bioensaios de patogenicidade e toxicidade, do qual 31% apresentaram atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* e um isolado apresentou valor de  $CL_{50}$  semelhante a Bti.

Vieira-Neta et al. (2020) estudando áreas de restinga e manguezais analisaram 232 linhagens de *B. thuringiensis*, e relataram que uma linhagem, BtMA-750, apresentou alta toxidade contra *Ae. aegypti* e exibiu produtos de amplificação para nove genes díptero-específico presente na cepa padrão Bti. No entanto, evidenciou-se que novos estudos devem ser realizados

com esta linhagem, a fim de elucidar se os genes estão expressando as proteínas com ação larvicida, pois a CL<sub>50</sub> foi de 0,004 mg / mL em comparação ao Bti que apresentou CL<sub>50</sub> de 0.003 mg/mL.

Na literatura, também é bastante relatado o estudo das linhagens que estão depositadas em diferentes coleções de entomopatógenos no Brasil (Praça et al., 2004; Monnerat et al., 2005; Soccol et al., 2009), nessas coleções estão depositadas linhagens obtidas de uma variedade de substratos provenientes de diferentes regiões brasileiras. Portanto, o estudo destas linhagens é de extrema importância, pois possibilita encontrar aquelas com variabilidade genética e elevada toxicidade contra insetos vetores.

Praça et al. (2004) analisaram 300 linhagens de *B. thuringiensis* proveniente do Banco de Germoplasma de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e relataram que a linhagem S234 e S997 apresentaram patogenicidade contra *Ae. aegypti* e *Cu. quinquefasciatus*. No entanto, apresentaram valor de CL<sub>50</sub> para *Ae. aegypti* e para *Cu. quinquefasciatus* superior ao do Bti (S234 de 4,9200 mg/mL e S997 de 4,4900 mg/mL para *Ae. aegypti* e S234 de 7,2600 mg/mL e S997 de 31,0300 mg/mL para *Cu. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* 0,0016 mg/mL e *Cu. quinquefasciatus* de 0,0096 para Bti) o que demonstram que comparado a estirpe padrão possui menos efetividade e amplificaram os genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* e *cry2*.

Monnerat et al. (2005) também realizaram estudos com 210 linhagens de *B. thuringiensis* isoladas da água e do solo provenientes da coleção de *Bacillus* spp. entomopatogênicos do Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Das seis linhagens de *B. thuringiensis* tóxicas a mosquitos vetores analisados nos bioensaio seletivos, quatro linhagens apresentaram atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, duas contra ambas as espécies *Ae. aegypti* e *Cu. quinquefasciatus*. As linhagens apresentaram valores de CL<sub>50</sub> semelhantes entre si (*Ae. aegypti* de 6.8 a 42 mg/mL e *Cu. quinquefasciatus* de 0.073 a 0.089 mg/mL) e maior que a estirpe padrão Bti (*Ae. aegypti* de 1.1 mg/mL e *Cu. quinquefasciatus* de 0.034) e nenhum dos isolados apresentaram tamanho esperado para os genes *cry4*, *cry11* e *cyt1A*.

Estudos visando a detecção de genes mosquitocidas no controle do *Ae. aegypti* foram realizados com 1073 linhagens de *B. thuringiensis* de diferentes regiões do Brasil provenientes da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, Unesp, Campus de Jaboticabal, no qual 45 isolados que apresentaram genes *cry* e *cyt* foram selecionados para os testes de patogenicidade e toxicidade, destes 13 apresentaram atividade larvicida para larvas de *Ae. aegypti* e também foi verificado linhagens com os menores valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (da Costa et al., 2010). Soccol et al. (2009) também analisaram 12 linhagens de *B. thuringiensis*, cepas estas, oriundas do Banco de Cepas da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia para a produção endotoxina no controle de *Ae. aegypti*.

É notório que o solo é o substrato mais utilizado para prospecção de *B. thuringiensis*, porém, apesar da quantidade elevada de linhagens obtidas dos mais variados substratos, são poucas que apresentam toxicidade superior a cepa padrão Bti, isso pode ocorrer devido o Bti expressar os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cy2Ba*, responsáveis pela produção de proteínas Cry e Cyt. Além disso, as linhagens selvagens apesar de apresentar os genes dípteros específicos, alguns não produzem as proteínas, portanto os estudos devem ser voltados para elucidar se esses genes estão sendo inibidos. Vale ressaltar também que algumas linhagens extremamente tóxicas, apresentam apenas poucos genes comparado ao Bti, e isso é uma desvantagem, pois quanto maior o número de genes melhor combinação entre eles, o que resulta em menor probabilidade dos insetos adquirirem resistência ao Bti.

**Tabela 1.** Amostragem de isolados de *Bacillus thuringiensis* utilizados no controle de vetores.

Local de Amostragem	Substrato	#Bt	Referência
Amazônia, Brasil	Solo	57	Soares-da-Silva et al. (2015)
Banco de Bacilos Entomopatôgenico do Maranhão-BBENMA	Solo	153	Soares-da-Silva et al. (2017)
	Solo	85	Soares-da-Silva et al. (2017)
	Insetos mortos	244	Soares-da-Silva et al. (2017)
Maranhão, Brasil	Solo	71	Soares-da-Silva et al. (2017)
	Solo	232	Vieira-Neta et al. (2020)
	Solo	383	Lobo et al. (2018)
São Paulo, Brasil	Solo	76	Campanini et al. (2012)
Tocantins, Brasil	Solo	101	Ootani et al. (2011)
Rio Grande do Sul, Brasil	Solo e insetos mortos	231	Gobatto et al. (2010)
*Banco de Germoplasma de Bactérias Entomopatogênicas	-	300	Praça et al. (2004)
	Solo e água	210	Monnerat et al. (2005)
*Coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada	-	1073	da Costa et al. (2010)
*Banco Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia	-	12	Soccol et al. (2009)

\*isolados obtidos de diferentes regiões brasileiras e depositados em diferentes coleções; #quantidade de isolados de *Bacillus thuringiensis*; - Não especificado. Fonte: Autores.

## 6. Meios de cultura utilizados no crescimento de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de mosquitos vetores

Observa-se que o ágar Nutriente (Extrato de Carne, Extrato de Levedura; Peptona, Cloreto de Sódio e Agar) ou o meio Nutrient Yeast Extract Salt Medium - NYSM (caldo nutriente, extrato de levedura,  $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ) são muito utilizados no isolamento e crescimento de *B. thuringiensis* utilizado no controle de vetores (Polanczyk et al., 2004; da Costa et al., 2010; Gobatto et al., 2010; Ootani et al., 2011; Campanini et al., 2012; Soares-da-Silva et al., 2015; Soares-da-Silva et al., 2017; Lobo et al., 2018). O ágar Nutriente é um meio simples, de fácil preparação e com várias finalidades em laboratório de microbiologia, usado também para observar esporulação de espécies de bacilos Gram positivos no caso de *B. thuringiensis*. A peptona e o extrato de carne fornecem fontes de nutrientes como nitrogênio, vitaminas, minerais e aminoácidos. O extrato de levedura é uma fonte de vitaminas essenciais para o crescimento de bactérias. O cloreto de sódio mantém o balanço osmótico e o ágar bacteriológico é o agente solidificante. O NYSM é um meio de cultura de baixo custo e disponível para a produção de bactérias com atividade larvicida. Os meios são utilizados com finalidade de cultura e isolamento de microrganismos, uma grande variedade de processo e de preparações de nutrientes é utilizada para induzir o crescimento e a reprodução de microrganismos, sendo a maioria meios convencionais. No entanto, alguns estudos analisaram meios de culturas alternativos com o objetivo de obter um aumento na produção de células de *B. thuringiensis*.

Diferentes estudos buscam aprimorar as condições de cultivo de *B. thuringiensis*, devido a produção das endotoxinas dependerem dos nutrientes presentes no meio de fermentação. Portanto, a produtividade das delta endotoxinas pode ser melhorada mediante manipulação dos parâmetros nutricionais, condições ambientais e melhoria na seleção de fontes de carbono e nitrogênio (Salama et al., 1983; Rossa et al., 1990). Liu e Tzeng et al. (1998) e Sarrafzadeh et al. (2012) realizaram

estudos sobre os efeitos das composições dos meios de cultivo no crescimento de *B. thuringiensis*, e demonstram com os resultados obtidos que para a comercialização bem-sucedida da produção de *B. thuringiensis* é necessário o desenvolvimento de uma fermentação ideal. A tabela 2 mostra a composição de diferentes meios alternativos para crescimento do Bti e a toxicidade contra diferentes mosquitos.

Poopathi e Abidha (2011) elaboraram um meio de cultura utilizando resíduos de casca de café para a produção de biopesticida, e relataram que as delta endotoxinas produzidas pelo Bti foram semelhantes as produzidas no meio convencional NYSM. Além disso, as toxinas mostraram excelente atividade larvica contra *Cu. quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Ae. aegypti*, e produção de delta endotoxinas. Em outro estudo Poopathi e Abidha (2012) analisaram a viabilidade de resíduos de sedimentos de manteiga clarificada como meio de cultura na produção de bactérias mosquitocidas. A densidade óptica (650 nm) do meio, no intervalo de 6h a 72h atingiu uma absorbância de 0,5 para 2,62 indicando que houve excelente crescimento celular, ao final da fermentação (72h) ocorreu rendimento de 9,7 g/L de biomassa e produção em torno de 2,5 g/L de toxinas (esporos/cristal) com atividade larvica contra mosquitos vetores. Este resultado foi semelhante ao obtido com meio NYSM.

Poopathi e Kumar (2003) analisaram três meios de cultura alternativos como extrato de batata, extrato de batata açucarado e extrato de batata combinado com grão-de-bico para o crescimento e produção de toxinas de Bti, que mostrou, nos bioensaios, toxicidade às larvas de *Cu. quinquefasciatus*, *An. stephensi* e *Ae. aegypti*, a toxicidade foi igualmente comparável com o meio de cultivo convencional Luria-Bertani- LB (Tryptona, Extrato de Levedura e Cloreto de Sódio: 1:0.5:1 wt:vol). Ernandes, Del Bianchi e Oliveira (2013) utilizando o processo de fermentação submersa visando obter um crescimento celular de Bti no controle de *Ae. aegypti*, além da produção de esporos verificou que a milhocina, subproduto agroindustrial proveniente do processamento do milho, possui melhor eficiência quando comparada com a triptose. O fato da milhocina ter apresentado melhor resultado pode estar relacionado com a composição química, pois a mesma é uma excelente fonte de carboidratos solúveis, aminoácidos e minerais, que são nutrientes importantes para o metabolismo dos microrganismos.

Devidas, Pandit e Vitthalrao (2014) avaliaram fonte de carbono convencional e não convencional e fontes de nitrogênio para a produção de biomassa e esporo/cristal e determinaram a eficácia do custo benefício de substratos potenciais na produção de *B. thuringiensis*, e observou um aumento significativo na produção de biomassa na utilização de glicose 6.30 (0.03)<sup>a</sup> g/L, banana 5.87 (0.08)<sup>b</sup> g/L e beterraba 5.10 (0.11)<sup>b</sup> g/L. Análises de custo-benefício revelaram que a produção de biopesticidas a partir de meios alternativos é altamente econômica, no qual mostraram resultados eficazes, e nos testes de toxicidade foi observado que o efeito tóxico foi aumentado duas vezes (CL<sub>50</sub> 1.57) em comparação ao meio LB (CL<sub>50</sub> 4.02), quando utilizaram feijão e soja (CL<sub>50</sub> 3.17) como meio de cultivo, obtiveram resultados próximos ao meio LB (CL<sub>50</sub> 4.02).

Prabakaran et al. (2008) desenvolveram um meio de cultivo à base de água de coco e verificaram um rendimento da massa célula de 3.1 g/L, esporulação de  $3.4 \times 10^{11}$  e atividade larvica contra as larvas de *Ae. aegypti* por meio do cultivo de Bti, verificando resultados similares aos obtidos com o meio convencional (NYSM). As fontes alternativas mingau e farinha de peixe, farinha de soja, farelo de trigo e pó de bolo de amendoim possuem excelentes resultados no cultivo de *B. thuringiensis* (Ghribi, Zouari e Jaoua, 2005; Prabakaran e Balaraman, 2006).

**Tabela 2.** Componentes dos meios de cultivo alternativos utilizados no crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

Meio de cultivo alternativo	Bti	Mosquito	Referência
Composição (m/v)	CL <sub>50</sub>		
Resíduo da casca de café (proteína 7,0%, carboidrato 57,8%, lipídio 0,3%, cinzas 5,4%)	0,0035 mg/L	<i>C. quinquefasciatus</i>	Poopathi e Abidha (2011)
	0,0056 mg/L	<i>An. Stephensi</i>	
	0,0073 mg/L	<i>Ae. Aegypti</i>	
Extrato do subproduto da manteiga clarificada (30 g/mL)	0,0036 mg/L*	<i>C. quinquefasciatus</i>	Poopathi e Abidha (2012)
	0,0058 mg/L*	<i>An. Stephensi</i>	
	0,0075 mg/L*	<i>Ae. Aegypti</i>	
Extrato de batata	1,58 µg/L	<i>C. quinquefasciatus</i>	Poopathi e Kumar (2003)
Extrato de Batata + 0,5% (m/v) sacarose	0,99 µg/L		
Extrato de batata + 0,5 % (m/v) de pó de grão de bico	1,18 µg/L		
Extrato de batata	1,35 µg/L	<i>An. Stephensi</i>	
Extrato de Batata + 0,5% (m/v) sacarose	1,97 µg/L		
Extrato de batata + 0,5 % (m/v) de pó de grão de bico	1,77 µg/L		
Extrato de batata	1,39 µg/L		
Extrato de Batata + 0,5% (m/v) sacarose	1,52 µg/L		
Extrato de batata + 0,5 % (m/v) de pó de grão de bico	1,63 µg/L		
NaCl (5,0 g/L), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,5 g/L) e milhocina (20 g/L)	5,2 µg/L	<i>Ae. Aegypti</i>	Ernandes, Del Bianchi e Oliveira (2013)
NaCl (2,5 mg/L), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1,0 mg/L), MgSO <sub>4</sub> (0,02 mg/L), MnCl <sub>2</sub> (0,005 mg/L), 0,5 g/L de feijão	1,57 µg/L		Devidas, Pandit e Vitthalrao (2014)
NaCl (2,5 mg/L), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1,0 mg/L), MgSO <sub>4</sub> (0,02 mg/L), MnCl <sub>2</sub> (0,005 mg/L), 0,5 g/L de soja	3,17 µg/L		<u>Prabakaran</u> et al. (2008)
MgCl <sub>2</sub> (20,3 g/L), CaCl <sub>2</sub> (10,2 g/L), MnCl <sub>2</sub> (1,0 g/L) e água de coco (100 mL)	15,03 ng/mL		
Mingau bruto e farinha de peixe em pó	-	-	Ghribi, Zouari e Jaoua (2005)
MgCl <sub>2</sub> (20,3 g/L), CaCl <sub>2</sub> (10,2 g/L), MnCl <sub>2</sub> (1,0 g/L) e 2,5% farinha de soja	8,89 ng/mL	<i>C. quinquefasciatus</i>	Prabakaran e Balamaran (2006)
MgCl <sub>2</sub> (20,3 g/L), CaCl <sub>2</sub> (10,2 g/L), MnCl <sub>2</sub> (1,0 g/L) e 2,5 % pó de bolo de amendoim	18,84 ng/mL		
MgCl <sub>2</sub> (20,3 g/L), CaCl <sub>2</sub> (10,2 g/L), MnCl <sub>2</sub> (1,0 g/L) e 5,0% Extrato de farelo de trigo	9,31 ng/mL		

- não determinado; Bti: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*; CL<sub>50</sub>: Concentração Letal Média



## 7. Considerações Finais

Baseado nos relatos acima, conclui-se que o solo é o melhor substrato para isolar linhagens de *B. thuringiensis* e que o meio Ágar Nutriente é o mais utilizado para o cultivo de bactérias entomopatogênicas em laboratório. No entanto, os meios alternativos são altamente econômicos e eficientes para produção de biolarvicidas a base de Bti, reduzindo os custos de produção dessa bactéria em laboratório, e que o Bti é um importante entomopatógeno que pode ser empregado em programas de controle de mosquitos, sendo o *Ae. aegypti* o vetor mais estudado, devido ser o principal transmissor de arboviroses no Brasil como: zika, chikungunya, dengue e febre amarela urbana. Diante do exposto, o estudo poderá subsidiar pesquisas futuras relacionadas a produção de meios de cultura alternativos a serem utilizados para o controle de mosquitos vetores. É necessário um estudo mais aprofundado das composições químicas do solo e a partir desses estudos desenvolver pesquisas para a fabricação de diferentes meios alternativos com a presença de nutrientes essenciais para o crescimento da bactéria.

## Agradecimentos

À FAPEAM-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela concessão das bolsas. Ao Laboratório de Entomologia Médica (LABEM) do Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão-CESC/UEMA.

## Referências

- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of bacteriology*, 177(21), 6027. <https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6027-6032.1995>
- Alves, S. B. (1998). *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba, FEALQ.
- Angelo, E. A., Vilas-Bôas, G. T., & Castro-Gómez, R. J. H. (2010). *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(4), 945-958.
- Argôlo-Filho, R. C., & Loguercio, L. L. (2014). *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects*, 5(1), 62-91. <https://doi.org/10.3390/insects5010062>
- Aronson, A. I. (1993). The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. *Molecular microbiology*, 7(4), 489-496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01139.x>
- Badran, A. H., Guzov, V. M., Huai, Q., Kemp, M. M., Vishwanath, P., Kain, W., ... & Liu, D. R. (2016). Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533(7601), 58-63. <https://doi.org/10.1038/nature17938>
- Barreto, M. R. (2005). Prospecção e Caracterização de Genes de *Bacillus thuringiensis* com Potencial Para o Controle de Insetos-praga da Cultura da Soja.
- Ben-Dov, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*, 6(4), 1222-1243. <https://doi.org/10.3390/toxins6041222>
- Bergman, N. H., Anderson, E. C., Swenson, E. E., Janes, B. K., Fisher, N., Niemeyer, M. M., ... & Hanna, P. C. (2007). Transcriptional profiling of *Bacillus anthracis* during infection of host macrophages. *Infection and immunity*, 75(7), 3434-3444. <https://doi.org/10.1128/IAI.01345-06>
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., ... & Parkhill, J. (2002). Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 5082-5095. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5082-5095.2002>
- Boniolo, F. S., Rodrigues, R. C., Prata, A. M. R., López, M. L., Jacinto, T., da Silveira, M. M., & Berbert-Molina, M. A. (2012). Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and  $\delta$ -endotoxin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(3), 625-636. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3746-9>
- Bravo, A. (1997). Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of bacteriology*, 179(9), 2793. <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.2793-2801.1997>
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

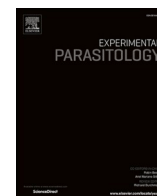
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. (2005). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 175-206). Elsevier BV, Amsterdam.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S & Soberón, M. (2003). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41 (7), 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Campanini, E. B., Davolos, C. C., Alves, E. C. C., & Lemos, M. V. F. (2012). Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Brazilian Journal of Biology*, 72(2), 243-247. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842012000200003>
- Cantón, P. E., Reyes, E. Z., De Escudero, I. R., Bravo, A., & Soberón, M. (2011). Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, 32(3), 595-600. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.005>
- Capalbo, D.M.F., Vilas-Bôas, G.T., Suzuki, M.T. (2005). *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 34 (24), 78-85.
- Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S., & Koziel, M. G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3057-3061. <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3057-3061.1991>
- Copping, L. G., & Menn, J. J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 56(8), 651-676. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U)
- Couch, T. L. (2000). Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In *Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application* (pp. 297-316). Springer, Dordrecht.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., & Dean, D.H. (2020). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available on <http://www.btmomenclature.info>.
- Costa, J. R., Rossi, J. R., Marucci, S. C., Alves, E. C. D. C., Volpe, H. X., Ferraudo, A. S., ... & Desidério, J. A. (2010). Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 39(5), 757-766. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000500015>
- Damgaard, P. H. (2000). Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* (pp. 23-40). Springer, Dordrecht.
- Delécluse, A., Juárez-Pérez, V., & Berry, C. (2000). Vector-active toxins: structure and diversity. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* (pp. 101-125). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7_6)
- Deng, C., Peng, Q., Song, F., & Lereclus, D. (2014). Regulation of cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*, 6(7), 2194-2209. <https://doi.org/10.3390/toxins6072194>
- Devidas, P. C., Pandit, B. H., & Vitthalrao, P. S. (2014). Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/273030>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Gram-Positive Pathogens*, 875-902. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
- El-Kersh, T. A., Ahmed, A. M., Al-Sheikh, Y. A., Tripet, F., Ibrahim, M. S., & Metwalli, A. A. (2016). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (sl). *Parasites & vectors*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1922-6>
- Ernandes, S., Del Bianchi, V.L., Oliveira, I.M. (2013). Evaluation of two different culture media for the development of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*. *Acta Scientiarum Technology*, 35(1), 11-18. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i1.13831>
- Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D., & Sanchis, V. (2003). Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Current microbiology*, 47(6), 501-507. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4097-2>
- Fernández-Chapa, D., Ramírez-Villalobos, J., & Galán-Wong, L. (2019). Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. *Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85756>
- Galzer, E. C. W., & Azevedo Filho, W. S. (2016). Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. *Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada*, 1(1), 13-16.
- Ghribi, D., Zouari, N., & Jaoua, S. (2005). Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. *Journal of applied microbiology*, 98(4), 823-831. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02490.x>
- Glare, T. R., & O'Callaghan, M. H. (2000). *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley&Sons. Inc., New York, NY.



- Gobatto, V., Giani, S. G., Camassola, M., Dillon, A. J. P., Specht, A., & Barros, N. M. (2010). *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1039-1046.6. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842010000500018>
- González Jr, J., & Carlton, B. C. (1984). A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid*, 11(1), 28-38. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(84\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0147-619x(84)90004-0)
- Guz, K., Bugla-Ploskonska, G., & Doroszkiewicz, W. (2009). The Occurrence, Biodiversity and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from the Insect Pest *Lymantria dispar*(Poland). *Polish journal of microbiology*, 58(2), 155-161.
- Habib, M.E.M., Andrade, C.F.S. (1996). Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B (Ed). *Controle Microbiano de Insetos* (pp. 383-446). FEALQ, Piracicaba
- Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(2), 242-255.
- Johnson, D. E., & McGaughey, W. H. (1996). Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Current microbiology*, 33(1), 54-59. <https://doi.org/10.1007/s002849900074>.
- Konecka, E., Baranek, J., Hrycak, A., & Kaznowski, A. (2012). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100 / 2012/710501>
- Kuo, W. S., & Chak, K. F. (1996). Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1369-1377.
- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., & Lecadet, M. M. (1989). Transformation and expression of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS microbiology letters*, 60(2), 211-217. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03448.x>
- Li, J., Carroll, J., & Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353(6347), 815-821. <https://doi.org/10.1038/353815a0>
- Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, 18(6), 413-418. <https://doi.org/10.1007/PL00008999>
- Liu, Q., Hallerman, E., Peng, Y., & Li, Y. (2016). Development of Bt rice and Bt maize in China and their efficacy in target pest control. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1561. <https://doi.org/10.3390/ijms17101561>
- Lobo, K. D. S., Soares-da-Silva, J., Silva, M. C. D., Tadei, W. P., Polanczyk, R. A., & Pinheiro, V. C. S. (2018). Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Revista Brasileira de Entomologia*, 62(1), 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.004>
- Marrone, P.G. (2019). Pesticidal natural products—status and future potential. *Pest Management Science*, 75 (9), 2325-2340. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>
- Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual review of genetics*, 37(1), 409-433. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143042>
- Meadows, M. P. (1993). *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. *Bacillus thuringiensis, An environmental biopesticide: Theory and Practice*, 193-220.
- Medeiros, P. T., Sone, E. H., Soares, C. M. S., Dias, J. M. C. D. S., & Monnerat, R. G. (2006). Evaluation of insecticides based on *Bacillus thuringiensis* in the control of the diamondback moth. *Horticultura Brasileira*, 24(2), 245-248. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362006000200026>
- Monnerat, R. G., Dias, D. G. S., Silva, S. F. D., Martins, E. S., Berry, C., Falcão, R., ... & Soares, C. M. S. (2005). Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(2), 103-106. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000200001>
- Onofre, J., Pacheco, S., Torres-Quintero, M. C., Gill, S. S., Soberon, M., & Bravo, A. (2020). The Cyt1Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* inserts into target membranes via different mechanisms in insects, red blood cells, and lipid liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 295(28), 9606-9617. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013869>
- Ootani, M. A., Ramos, A. C. C., de Azevedo, E. B., de Oliveira Garcia, B., dos Santos, S. F., & de Sousa Aguiar, R. W. (2011). Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linneus (Díptera: Culicidae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(2), 37-43. <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v2n2.ootani>
- Pérez, C., Fernandez, L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), 18303-18308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505494102>

- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(2), 255-281. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>
- Polanczyk, R. A. (2004). Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Polanczyk, R. A., Zanúncio, J. C., & Alves, S. B. (2009). Relationship between chemical properties of the soil and the occurrence of *Bacillus thuringiensis*. *Ciência Rural*, 39(1), 1-5. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000100001>
- Polanczyk, R.A. & Alves, S. (2003). *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. *Agrociencia Uruguay*, 7(2), 1-10.
- Silva, S. F., Dias, J. D. S., & Monnerat, R. (2002). Comparação entre três métodos de isolamento de bacilos entomopatogênicos. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Circular Técnica (INFOTEC-A-E)*.
- Poopathi, S., & Abidha, S. (2011). Coffee husk waste for fermentation production of mosquitocidal bacteria. *Journal of economic entomology*, 104(6), 1816-1823. <https://doi.org/10.1603/EC11125>
- Poopathi, S., & Abidha, S. (2012). The use of clarified butter sediment waste from dairy industries for the production of mosquitocidal bacteria. *International journal of dairy technology*, 65(1), 152-157. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00745.x>
- Poopathi, S., & Kumar, K. A. (2003). Novel fermentation media for production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of economic entomology*, 96(4), 1039-1044. <https://doi.org/10.1093/jee/96.4.1039>
- Prabakaran, G., & Balaraman, K. (2006). Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Biological Control*, 36(3), 288-292. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.018>
- Prabakaran, G., Hoti, S. L., Manonmani, A. M., & Balaraman, K. (2008). Coconut water as a cheap source for the production of  $\delta$  endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. *Acta tropica*, 105(1), 35-38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.09.002>
- Praça, L. B., Batista, A. C., Martins, É. S., Siqueira, C. B., Dias, D. G. D. S., Gomes, A. C. M. M., ... & Monnerat, R. G. (2004). Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(1), 11-16. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000100002>
- Raymond, B. (2017). The biology, ecology and taxonomy of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. In *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus* (pp. 19-39). Springer, Cham.
- Reyaz, A. L., Gunapriya, L., & Arulselvi, P. I. (2017). Molecular characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Kashmir valley. *3 Biotech*, 7(2), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0756-z>.
- Rossa, C. A., Yantorno, O. M., Arcas, J. A., & Ertola, R. J. (1990). Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(1), 27-31. <https://doi.org/10.1007/BF01225351>
- Salama, H. S., Foda, M. S., Dulmage, H. T., & El-Sharaby, A. (1983). Novel fermentation media for production of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41(1), 8-19. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90231-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90231-8)
- Sanchis, V. (2011). From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. *A review. Agronomy for sustainable development*, 31(1), 217-231. <https://doi.org/10.1051/agro/2010027>
- Saraiva, J.F., Maitra, A., Galardo, A.K.R & Scarpassa, V.M. (2019). First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the state of Amapá, northern Brazil. *Acta Amazonica*, 49 (1), 71-74. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201802771>
- Saraswathy, N., & Kumar, P. A. (2004). Protein engineering of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2), 178-188.
- Sarrafzadeh, M. H. (2012). Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by plackett-burman method. <https://doi.org/10.30492/IJCCE.2012.5936>
- Schnepf, H. E., & Whiteley, H. R. (1981). Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), 2893-2897. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.5.2893>
- Silva, N. D. (2008). Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae* L., 1763.
- Soares-da-Silva, J., Pinheiro, V. C. S., Litaiff-Abreu, E., Polanczyk, R. A., & Tadei, W. P. (2015). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 59(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.02.001>

- Soares-da-Silva, J., Queirós, S.G., Aguiar, J.S., Viana, J.L., Neta, M.D.R.A.V., Silva, M.C., Pinheiro, V.C.S., Polanczyk, R.A., Carvalho-Zilse, G.A & Tadei, W.P. (2017). Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. *Acta Tropica*, 176, 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.006>
- Soccol, C. R., Pollom, T. E., Fendrich, R. C., Prochmann, F. A., Mohan, R., Blaskowski, M. M. M., ... & Soccol, V. T. (2009). Development of a low cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* intended for biological control of *Aedes aegypti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(SPE), 121-130. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000700017>
- Tan, F., Zhu, J., Tang, J., Tang, X., Wang, S., Zheng, A., & Li, P. (2009). Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, cry54Aa1 and cry30Fa1, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28. *Current microbiology*, 58(6), 654-659. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9386-y>
- Tissera, H. A., Samaraweera, P. C., Jayamanne, B. D. W., Janaki, M. D. S., U Chulasiri, M. P. P., Rodrigo, C., & Fernando, S. D. (2018). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* in integrated vector control of *Aedes* sp. in Sri Lanka: a prospective controlled effectiveness study. *Tropical Medicine & International Health*, 23(2), 229-235. <https://doi.org/10.1111/tmi.13015>
- Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of invertebrate pathology*, 101(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>
- Van Frankenhuyzen, K. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(1), 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>
- Viana, J. L., Soares-da-Silva, J., Vieira-Neta, M. R. A., Tadei, W. P., Oliveira, C. D., Abdalla, F. C., ... & Pinheiro, V. C. S. (2021). Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*, 81(1), 114-124. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.223389>
- Vieira-Neta, M. R. A., Soares-da-Silva, J., Viana, J. L., Silva, M. C., Tadei, W. P., & Pinheiro, V. C. S. (2020). Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*, (AHEAD). <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228790>
- Wang, J., Boets, A., Van Rie, J., & Ren, G. (2003). Characterization of cry1, cry2, and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(1), 63-71. [https://doi.org/10.1016/s0022-2011\(02\)00202-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2011(02)00202-1)
- World Health Organization. (1985). Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide. Geneva: UNDP: World Bank: WHO, 24p. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)*.
- Yamamoto, T., & Dean, D. H. (2000). Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* (pp. 81-100). Springer, Dordrecht.
- Zhong, W., Shou, Y., Yoshida, T. M., & Marrone, B. L. (2007). Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3446-3449. <https://doi.org/10.1128/AEM.02478-06>
- Zogo, B., Tchiekoi, B. N. C., Koffi, A. A., Dahounto, A., Alou, L. P. A., Dabiré, R. K., ... & Pennetier, C. (2019). Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Malaria journal*, 18(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2687-0>



# Microencapsulation of *Bacillus thuringiensis* strains for the control of *Aedes aegypti*

Juliete L. Viana<sup>a,\*</sup>, Joelma S. da Silva<sup>b</sup>, Gabriela C. de Mattos<sup>c</sup>, Martina C.C. Pinto<sup>c</sup>,  
Luciana da S. Dutra<sup>c</sup>, Larissa L. de A. Carvalho<sup>c</sup>, José Carlos C. da S. Pinto<sup>c</sup>,  
Valéria Cristina S. Pinheiro<sup>d</sup>, Rosemary A. Roque<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE – PPG BIONORTE, Av. Carvalho Leal, 1777, Ed. Anexo, 4º andar, Cachoeirinha, Manaus, CEP 69065001, AM, Brazil

<sup>b</sup> Curso Ciências Naturais, Campus VII, Universidade Federal do Maranhão, Avenida Dr. José Anselmo, 2008, São Sebastião, Codó, CEP 65400-000, MA, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Engenharia Química/COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, CEP 21941-598, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão Campus Caxias, Praça Duque de Caxias, s/n, Morro do Alecrim, Caxias, CEP 65604-380, MA, Brazil

<sup>e</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue, Manaus, CEP 69060-001, AM, Brazil

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Arboviruses  
Biological control  
Entomopathogenic bacteria  
Encapsulation  
Polymer microparticle

## ABSTRACT

In this study, we investigated the microencapsulation of two strains of the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) (BtMA-750 and BtMA-1114), which are biopesticides of high toxicity for the mosquito vector *Aedes aegypti*. The encapsulation of different concentrations of microorganisms in starch microparticles was evaluated, and the inverse suspension polymerization technique was explored. It was possible to observe that the higher amounts of the biopesticide caused a slight decrease in the diameter of the particles; however, even when encapsulated, the biopesticide still presents an average diameter that is able to be consumed by the larvae of *Aedes aegypti*. Furthermore, it was noticed that the presence of both of the *B. thuringiensis* strains did not affect the thermal stability of the particles. The microencapsulated bacterial strains presented a high number of viable spores and preserved the expression of proteins with molecular masses corresponding to the insecticidal toxins Cry and Cyt, indicating that the encapsulation process was conducted satisfactorily. Finally, the encapsulated strains were tested against *Ae. aegypti* larvae and maintained 100% larval mortality even after 35 days. Therefore, microencapsulation of *B. thuringiensis* not only guarantees the bacterial activity, but also prolongs the action of the biopesticide. Collectively, such findings highlight the great potential of the new biopesticides, which may help to reduce the population indices of the mosquito vector *Ae. aegypti* via a sustainable and environment-friendly route.

## 1. Introduction

The Brazilian Amazon has high temperatures and high levels of insolation, climate conditions that contribute to the proliferation of the mosquito *Aedes aegypti* (L. 1762), which is the vector of the etiological agents of dengue, Zika, and chikungunya. These diseases constitute a group of arboviruses that presents a high risk to the health of many people who live mainly in tropical regions, such as in Brazil (Brasil Ministério da saúde, 2022).

In this context, the biological control of this vector is an efficient and

more sustainable alternative compared to chemical routes, and presents some environmental advantages, such as biodegradability and low or no toxicity to the environment. Among these larvicides, the bacterium *Bacillus thuringiensis* can be highlighted (Bravo et al., 2007; Van Frankenhuyzen, 2009; Ben-Dov, 2014; Vargas et al., 2022). This bacterium produces spores and Cry and Cyt proteins in the form of protoxins, which exhibit larvicidal action for certain orders of insects, including Diptera, to which *Aedes aegypti* belongs (Crickmore et al., 1998; Crickmore et al., 2023). Cry proteins act by binding to specific receptors that are present in the midgut membrane of insects, causing septicemia and larval death;

\* Corresponding author. Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE – PPG BIONORTE, Av. Carvalho Leal, 1777, Ed. Anexo, 4º andar, Cachoeirinha, Manaus, CEP 69065001, AM, Brazil.

E-mail address: [julieteviana\\_2009@hotmail.com](mailto:julieteviana_2009@hotmail.com) (J.L. Viana).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108654>

Received 24 July 2023; Received in revised form 7 November 2023; Accepted 8 November 2023

Available online 11 November 2023

0014-4894/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

in contrast, Cyt toxins do not bind to receptors, but insert themselves directly into the cell membrane, enhancing the insecticidal action of Cry (Bravo et al., 2007; Van Frankenhuyzen, 2009; Ben-Dov, 2014).

The long-term persistence of viable bacterial spores in the environment is important for greater duration of larvicidal activity in the field (Viana et al., 2021a). However, it is worth noting that direct exposure of the spores to ultraviolet (UV) rays and high levels of insolation can deactivate the action of these microorganisms, thus reducing their effectiveness and making it difficult to develop efficient formulations based on free *B. thuringiensis*. The studies conducted by Batra et al. (2000) and Viana et al. (2021a) demonstrated that, when the spores are exposed to such environmental conditions in the field, the duration of the larvicide action is only two to three weeks.

It is important to emphasize that insecticidal formulations based on *B. thuringiensis* should maintain the characteristics of the microorganisms that are necessary to guarantee their larvicide action, should present low cost and be of easy use. In this way, microencapsulation is a technique that may protect the structure of some active ingredients while also enabling their controlled release under specific conditions (Suave et al., 2006; Favaro-Trindade et al., 2008; Way et al., 2018; De Souza e Castro et al., 2020). Thus, this technique can be explored in order to prolong the activity of *B. thuringiensis* even under adverse environmental conditions in the field (Canevarolo, 2006; Angelo et al., 2010; Hernández-Suárez et al., 2011; De Souza e Castro et al., 2020). Among the polymers used in encapsulation processes, starch stands out as a promising biopolymer since it exhibits low cost and has good potential for the replacement of non-biodegradable materials (Abdillahi et al., 2013; Azevêdo et al., 2018). The use of starch as a matrix for the encapsulation of *B. thuringiensis* may be an excellent strategy for the development of ecologically sustainable products. Interestingly, in the literature, we did not find any studies that have explored the inverse suspension polymerization technique in the encapsulation of this larvicide in starch matrices (Azevêdo et al., 2018; Bilal and Iqbal, 2019; Araújo et al., 2021).

Thus, this study aims to encapsulate two strains of *B. thuringiensis* (BtMA-750 and BtMA-1114), which have different combinations of Cry and Cyt toxins, in starch microparticles. For this, we explored the inverse suspension polymerization technique and evaluated the effect of the concentration of spores on the encapsulation process and the larvicidal activity of the encapsulated bacteria.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Selection of *Bacillus thuringiensis* isolates

The strains of *B. thuringiensis* used in this study were selected from the Collection of Entomopathogenic Bacilli of Maranhão (BBENMA) at the Laboratory of Medical Entomology (LABEM of CESC-UEMA), Campus Caxias, Maranhão, Brazil. Currently, in the collection, there are 1448 isolates of *B. thuringiensis* from the Amazon, Cerrado and Caatinga biomes, including the Mangrove and Restinga ecosystems of the state of Maranhão, and the Caatinga of the state of Piauí, which were all isolated from soil, water, and dead insects.

Two strains were selected from the Bacillus Collection: BtMA-750, which was isolated from the soil of the Restinga ecosystem of São José de Ribamar, Maranhão state; and, BtMA-1114, which was isolated from dead insects from the Cerrado biome in the city of Mirador, Maranhão state. These strains showed higher toxicity in *Ae. aegypti* larvae because of the different gene profiles that were found, including different combinations of Cry and Cyt toxins, which exhibit high toxicity and specificity for mosquitoes (Soares-da-Silva et al., 2017; Vieira-Neta et al., 2021).

### 2.2. Preparation of bacteria for encapsulation

The isolates of BtMA-750 and BtMA-1114 were cultured in 20 Petri

dishes containing agar culture medium (Ágar Nutriente, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná), and incubated in a bacteriological oven (FANEM®, Guarulhos, São Paulo) at 28 °C for 24 h. Subsequently, they were transferred to Erlenmeyer flasks and cultured in 600 mL of a broth medium (Kasvi) at 28 °C and 180 rpm for five days in a rotary shaker (Thermo Scientific, MaxQ 6000, Massachusetts, USA), in order to achieve the complete sporulation of bacteria and the release of the protein crystals. The culture that was obtained was lyophilized based on the methodology of Santos et al. (2012) and was centrifuged at 9000×g for 30 min at 4 °C. Then, it was washed with autoclaved distilled water, frozen for 14 h, and lyophilized for approximately 6 h (Enterprise I, Terroni, São Carlos, São Paulo) at the Malaria and Dengue Laboratory of the National Institute for Amazonian Research (INPA).

### 2.3. Encapsulation of the spores in starch microparticles

The lyophilized isolates were encapsulated in starch microparticles via the inverse suspension polymerization technique. For this, the continuous oil phase was composed of 350 g of soybean oil (continuous medium) and 24.5 g of Span 80 (surfactant) (Hexágono Química, Rio de Janeiro, Brazil), and the aqueous dispersed phase consisted of 150 g of ultrapure water, 3 g of D-(+)-glucose anhydrous P.A. acs-dextrose (crosslinking agent) (Hexágono Química, Rio de Janeiro, Brazil), 10.5 g of soluble starch P.A. (natural polymer) (Hexágono Química, Rio de Janeiro, Brazil) and the lyophilized bacterial samples (BtMA-750, 250 mg, and 1700 mg; and, BtMA-1114, 200 mg, and 1700 mg). Crosslinked starch particles were also produced without the presence of bacterial strains in order to be used as a reference.

First, the aqueous phase was prepared as follows: glucose was solubilized in water at 80 °C, then starch was added until complete solubilization and, finally, the bacteria were added. The medium was subjected to vigorous agitation to disperse the bacteria. Then, the aqueous solution was poured over the oil phase (soybean oil and Span 80), and this mixture was kept in a reactor for 2 h at 80 °C, under constant stirring of 900 rpm. At the end of the reaction, under constant shaking, the system was cooled to 10 °C with the aid of an ice bath, so that the polymer gelled so as to mitigate the agglomeration of microparticles. After the cooling step, the starch microparticles were washed with acetone, separated by filtration, and dried in a recirculating oven.

### 2.4. Particle size distribution (PSD)

The determination of the average diameter and the distribution of average sizes of the encapsulated bacteria were determined using light scattering via a particle size analyzer (Mastersizer 2000 Mastersizer Instruments, Malvern, United Kingdom). The samples were dispersed in water and analyzed at room temperature.

### 2.5. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

The FT-IR technique was performed in order to evaluate the chemical groups of the matrix (starch) and encapsulated bacteria (BtMA-750 and BtMA-1114). The spectra were established in the mid-infrared region (4000 cm<sup>-1</sup> - 500 cm<sup>-1</sup>), with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup> using a spectrophotometer (Cary 360, Agilent Technologies, California, USA) equipped with a DTGS KBR (potassium bromide) detector, attenuated total reflectance (ATR) and a diamond crystal. The mean spectrum of each sample was obtained after 16 scans.

### 2.6. Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analyses were performed using TG equipment (Discovery TGA 55, TA Instruments, Delaware, USA) to evaluate the thermal stability of the samples. Such analyses were performed in an inert atmosphere with constant nitrogen flow at 20 mL/min, a heating ramp rate equal to 10 °C/min, with initial and final temperatures of



25 °C and 850 °C, respectively.

## 2.7. Incorporation of the bacteria into the polymer matrix

To verify the incorporation and release of the encapsulated bacterial strains, a plating assay was performed with the samples BtMA-750 and BtMA-1114, which was based on the methodology of [Rabinovitch and De Oliveira \(2015\)](#). For this, 0.5 g of encapsulated *B. thuringiensis* was added to 2 mL of 0.85% NaCl (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil). Subsequently, the prepared suspensions were homogenized in a vortex mixer (Vision Scientific, Westland, Michigan, USA) and serial dilutions were performed. Then, aliquots of 100 µL of suspensions  $10$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , and  $10^{-3}$  were seeded with the aid of a Drigalski's loop in Petri dishes containing a nutrient agar culture medium (Ágar Nutriente, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) and incubated in a bacteriological oven at 30 °C for 24–48 h. After this period, colony-forming unit (CFU/mL) counting was performed based on the plate-counting model ([Alves, 1998](#)). For the lyophilized samples, the adjustment factor was considered by multiplying the result by 2 to obtain the most approximate value of the number of cells in the microtube.

## 2.8. Protein expression in the encapsulated strains

Protein analysis was performed using the encapsulated strains to verify whether the insecticidal proteins Cry and Cyt were being expressed as cry and cyt genes. The technique was conducted according to [Laemmli \(1970\)](#) using polyacrylamide gel electrophoresis and the ionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) at 12%, under denaturing conditions. Protein extraction was performed following the protocol of [Lecadet et al. \(1991\)](#). The encapsulated strains were grown on nutrient agar (Ágar Nutriente, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil), then, a colony of each strain was transferred to Erlenmeyer flasks containing 12 mL of nutrient broth and were incubated in a rotary shaker (Nova Técnica, Piracicaba, São Paulo, Brazil) at 28 °C for 52 h at 200 rpm.

Subsequently, a 1.5 µL aliquot containing the spore/crystal complex was removed from each sample and centrifuged at  $12,000\times g$  for 15 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 1.5 mL of 0.5 M NaCl in a vortex mixer (Vision Scientific, Westland, Michigan, USA) and centrifuged again. Following this, the pellet was resuspended in 1.5 mL of the solution for inhibition of protease activity (2 mL of 100 mM PMSF + 4 mL of EDTA at 0.5 M bulk to 200 mL of distilled water), homogenized in a vortex mixer and centrifuged again at  $12,000\times g$  for 15 min at 4 °C, discarding the supernatant. This procedure was repeated twice, and the samples were stored in protein activity inhibition solution at –20 °C until the time of use.

Aliquots of 50 µL of bacteria (25 µL of the solution containing the *B. thuringiensis* proteins) and 25 µL of buffer solution (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 1.0% Bromophenol Blue, 10% SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol at 1%) were prepared and boiled for 10 min at 100 °C. Subsequently, 40 µL of each sample were withdrawn and applied to an SDS-PAGE polyacrylamide gel at a concentration of 12% and, as a protein molecular mass standard, 5 µL of Broad Range Protein molecular marker 225 at 10 kDa (Promega, Madison, Wisconsin, USA) was added as a reference for protein identification ([Laemmli, 1970](#)).

The gel was added to a vertical electrophoresis vessel (Kasvi) filled with 1x run buffer (25 mM Tris-BASE, 35 mM SDS, and 1.92 mM glycine) and subjected to an electric field of 150 V for 2.5 h. After the electrophoretic run, the gel was stained in Coomassie brilliant blue solution (50% methanol, 10% acetic acid, and 0.1% Coomassie brilliant blue R-250) for 1 h at room temperature. This was stained in a methanol and acetic acid solution at the ratio of 4:1 for 24 h until the visualization of the protein bands. The gel was subsequently scanned and analyzed for the evaluation of the presence of proteins with insecticidal action.

## 2.9. Larvicidal activity of the encapsulated *Bacillus thuringiensis* strains

Bioassays were also conducted to evaluate the larvicidal activity of the *B. thuringiensis* strains (BtMA-750, 250 mg; and, BtMA-1114, 200 mg), following the methodology described by [World Health Organization - WHO \(2005\)](#). Replicates of three 50 mL plastic cups containing 10 mL of water, 10 third-instar *Ae. aegypti* larvae and 0.5 g/mL of the product were prepared. In each bioassay, a replicate was prepared without bacterial inoculation, containing 1 mL of 0.01% tritonated water (Triton™ X-100, Sigma-Aldrich) and 9 mL of reverse osmosis system water (QUIMIS®, Diadema, SP), which served as a negative control. Ten third-instar larvae were introduced weekly (totaling 60 larvae per week). The volume of water was adjusted in each container to compensate for evaporation and food for the larvae (crushed cat food) was added weekly ([World Health Organization - WHO, 2005](#)). The bioassays were carried out on a shelf under controlled conditions of temperature  $26 \pm 2$  °C and relative humidity around 80% at the Laboratory of Medical Entomology (LABEM) at CESC-UEMA, Campus Caxias.

The initial efficacy of the larvicide was estimated by larval mortality in the first 48 h after application of the product. Persistence, defined as the period (in days) during which mortality is  $\geq 80\%$ , was estimated by the number of live pupae recovered after the weekly replacement of third-instar larvae in the containers.

## 3. Results

### 3.1. Morphological analysis

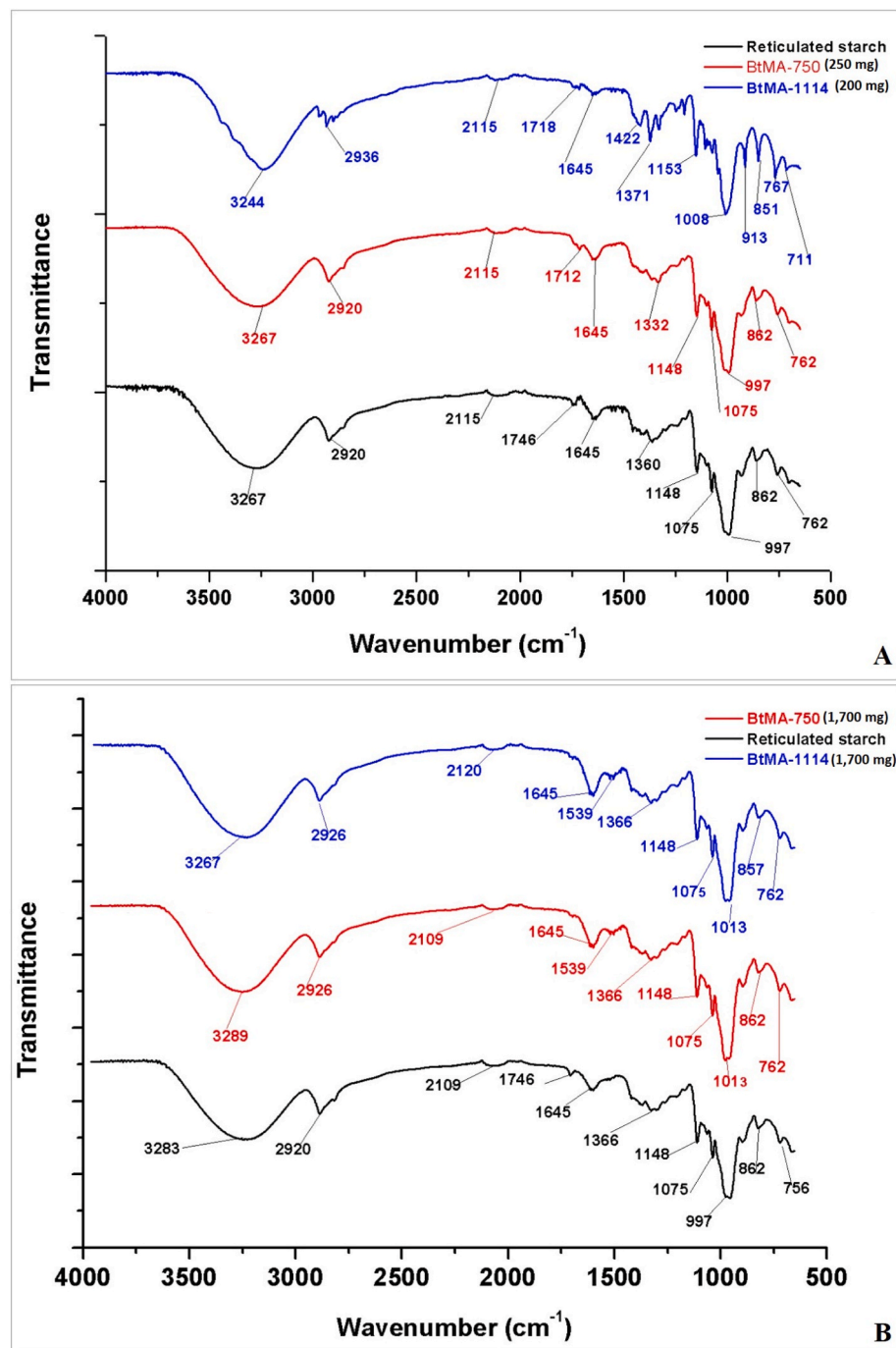
[Table 1](#) shows the average particle size of the encapsulated strains of bacteria (BtMA-750 and BtMA-1114) and of the crosslinked starch particles, which were used as references. Firstly, the encapsulation of lower amounts of bacteria (250 mg of BtMA-750 and 200 mg of BtMA-1114) apparently did not significantly affect the average particle diameter. On the other hand, as observed in [Table 1](#), the encapsulation of greater amounts of BtMA-750 and BtMA-1114 caused a decrease in the average particle diameter, probably because of a greater stabilization of the polymer particles. However, it is important to emphasize that all the reactions resulted in particle sizes that were adequate for ingestion by the mosquito larvae.

### 3.2. FT-IR spectroscopy

Using the FT-IR technique, we evaluated the functional groups present in the crosslinked starch particles without the presence of bacteria (used as the reference) and those in the encapsulated strains. It was observed that there was no significant change in the intensity of the peaks at  $2115\text{ cm}^{-1}$  and  $1645\text{ cm}^{-1}$  after the incorporation of either bacteria into the polymer matrices ([Fig. 1A](#)). Other regions, which refer to the peaks at  $1148\text{ cm}^{-1}$ ,  $1075\text{ cm}^{-1}$ ,  $862\text{ cm}^{-1}$  and  $762\text{ cm}^{-1}$ , are related to the C–O and C–C elongation, and the peak at  $997\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to C–OH and  $\text{CH}_2$  deformations ([Fig. 1A](#)) present in both the crosslinked starch and the encapsulated bacteria, which also did not suffer changes after encapsulation. Similar results were obtained when higher concentrations of encapsulated bacteria were analyzed ([Fig. 1B](#)). This indicates that the major chemical functions that are observed are related to the starch matrix, probably because of the low quantity of

**Table 1**  
Average particle diameter of the encapsulated biopesticides.

Amount of bacteria encapsulated	Average particle diameter	
	BtMA-750	BtMA-1114
0 mg	176.61 µm	176.61 µm
200 mg	272.76 µm	-
250 mg	-	233.72 µm
1700 mg	20.46 µm	16.40 µm



**Fig. 1.** Infrared spectra of the analyzed microparticles. (A) BtMA-750 and BtMA-1114 strains encapsulated with 250 mg and 200 mg of bacteria, respectively; (B) BtMA-750 and BtMA-1114 strains encapsulated with 1700 mg of bacteria.

bacteria and also because of a low concentration of bacteria on the surfaces of the starch particles, which implies that they may be located mainly in the inner region of the particles.

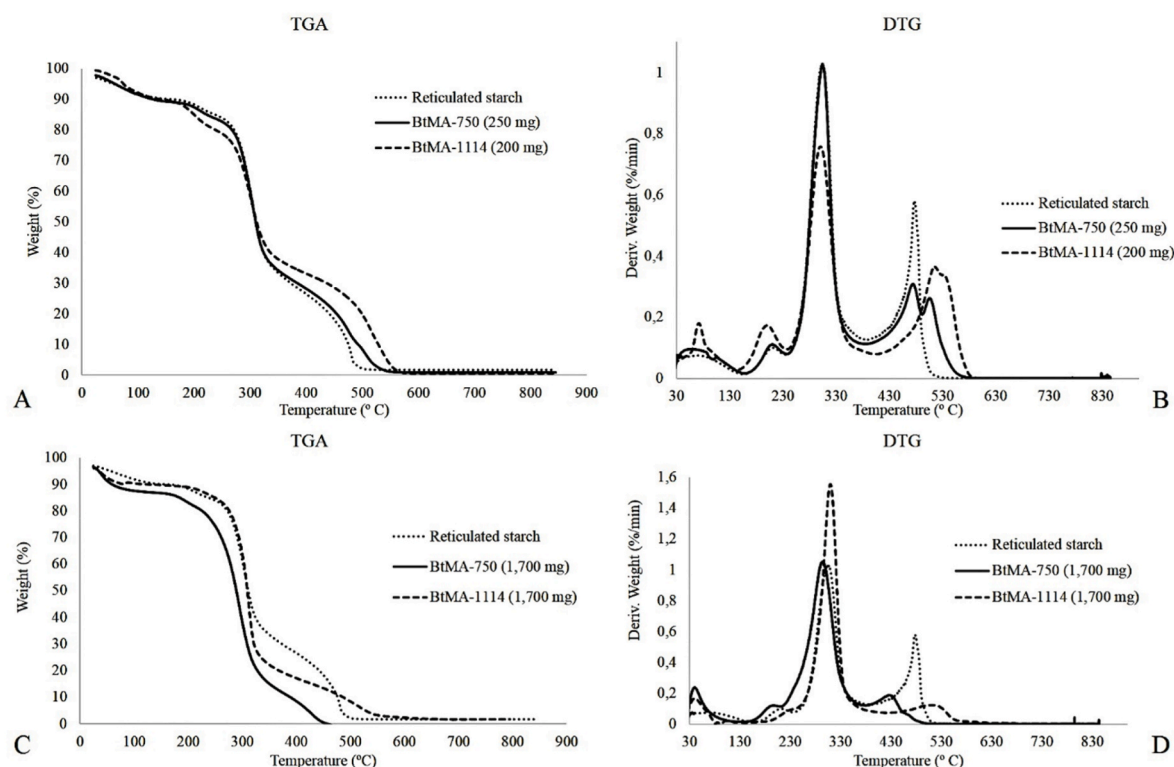
### 3.3. Thermal analysis

The thermogravimetric curves of the produced particles are presented in Fig. 2. The curves show very similar values of initial temperature ( $T_{\text{onset}}$ ), maximum degradation temperature ( $T_{\text{max}}$ ), and mass variation as a function of temperature (% mass loss). In general, all the samples presented a first stage of mass loss of less than 100%, which refers to the elimination of water absorbed by the starch. It was observed

that the  $T_{\text{max}}$  oscillated between 295 °C and 310 °C (Fig. 2A and C). Regarding the maximum derivative, the samples presented four characteristic peaks of mass loss (Fig. 2B and D). Thus, by comparing the results of TGA for the encapsulated strains and plain-starch particles, it is possible to observe that the presence of *B. thuringiensis* did not influence the thermal stability of the samples obtained via the encapsulation technique.

### 3.4. Bacterial growth

In order to verify whether the bacterium was incorporated into the polymer matrix, the colony counting technique (CFU/mL) was



**Fig. 2.** Thermogravimetric curves of crosslinked starch and encapsulated strains, showing the thermograms (TGA) of the samples and their respective thermal decomposition derivative (DTG). (A) BtMA-750 strain encapsulated with 250 mg of bacteria; (B) BtMA-1114 strain encapsulated with 200 mg of bacteria; (C) BtMA-750 strain encapsulated with 1700 mg of bacteria; (D) BtMA-1114 strain encapsulated with 1700 mg of bacteria.

performed in Petri dishes. The bacterial growth of the BtMA-750 and BtMA-1114 strains in the plates showed that these bacteria remained active and were properly encapsulated in the starch matrix (Fig. 3).

Table 2 shows the concentration of viable spores, and demonstrates that the encapsulation process did not interfere with the microbiological viability of the bacteria. Moreover, there were also higher rates of viable spores when bacteria were used in the encapsulated form.

### 3.5. Protein profile of encapsulated *Bacillus thuringiensis* strains

The protein characterization of BtMA-750 and BtMA-1114 strains after encapsulation, using the 12% SDS-PAGE technique, demonstrated that the two bacteria continued expressing proteins with molecular masses that corresponded to the insecticidal toxins Cry and Cyt, thus confirming that the encapsulation process did not affect the production of toxins (Fig. 4).

The strains presented a protein content of approximately 65–150

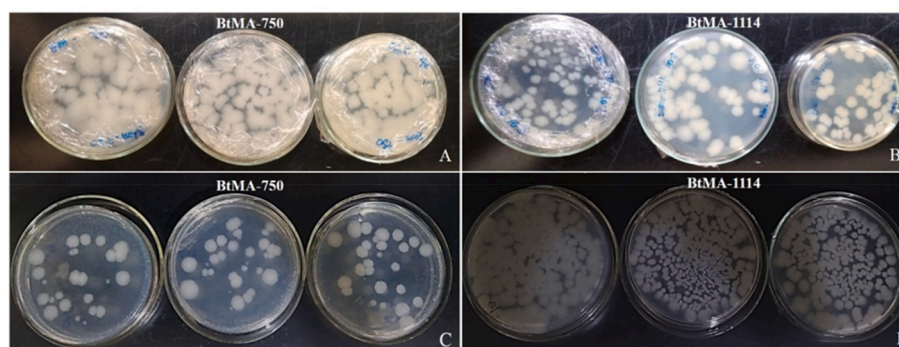
**Table 2**

Concentration of viable spores of *Bacillus thuringiensis* strains encapsulated using starch.

Amount of bacteria encapsulated	Microbiological viability (CFU/mL)	
	BtMA-750	BtMA-1114
200 mg	-	$1.5 \times 10^4$
250 mg	$1.98 \times 10^4$	-
1700 mg	$1.52 \times 10^5$	$4.48 \times 10^5$

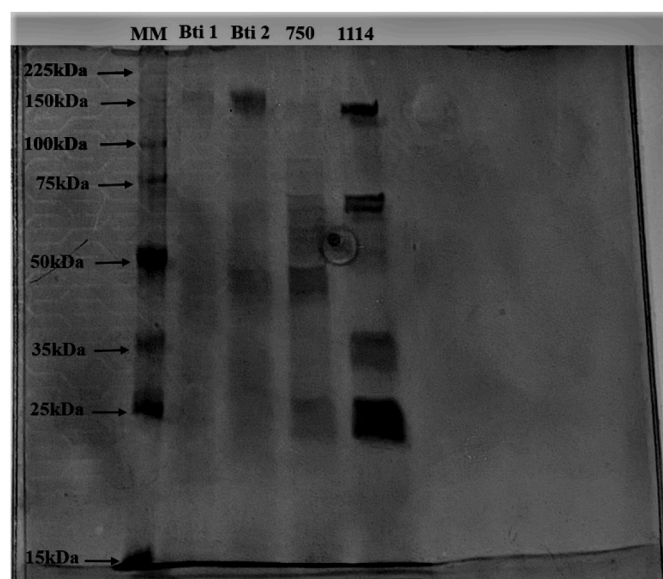
CFU = colony forming unit.

kDa, which corresponds to Cry proteins. In relation to the Cyt toxin, the strains showed a protein profile of lower than 50 kDa, which is similar to that of Cyt1 and Cyt2 toxins (Fig. 4) (Crickmore et al., 1998; Crickmore et al., 1998).



**Fig. 3.** Bacterial growth from starch microparticles. (A) BtMA-750 strain encapsulated with 250 mg of bacteria; (B) BtMA-1114 strain encapsulated with 200 mg of bacteria; (C) BtMA-750 strain encapsulated with 1700 mg of bacteria; (D) BtMA-1114 strain encapsulated with 1700 mg of bacteria.



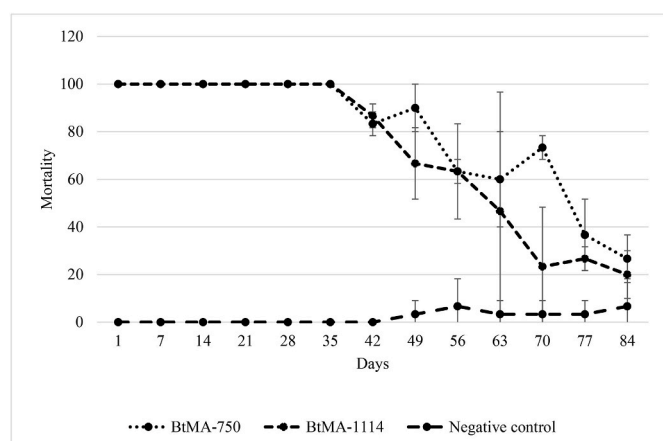


**Fig. 4.** Protein profile of *Bacillus thuringiensis* strains, encapsulated using starch, and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*. MM: molecular marker (Broad Range Protein Molecular 225 - 10 kDa), Bti 1 - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* T14 001 and Bti 2 formulated VectoBac.

### 3.6. Bacterial effectiveness

It was found that the encapsulated bacterial strains of BtMA-750 (250 mg) and BtMA-1114 (200 mg) caused high mortality in *Ae. aegypti* larvae when compared to the negative control (without bacillary inoculation). Tests using the encapsulated bacterial strains of BtMA-750 and BtMA-1114 maintained 100% larval mortality for 35 days of the experiment. For the BtMA-750 bacterium, larval mortality was greater than 50%, achieving 73.33% after 70 days of the experiment, whilst the BtMA-1114 strain presented mortality of greater than 50%, reaching 63.33% after 56 days of the experiment (Fig. 5). Larval mortality persisted until about seventy days after treatment, when the mortality rate of BtMA-750 and BtMA-1114 strains was less than 26.7% and 20%, respectively (Fig. 5). The negative control, which represents the larvae that were not exposed to the action of the bacteria, showed a mortality of less than 5% over 84 days.

It can be observed that the experimental results obtained by us were very precise and the average mortality fluctuation was equal to 0% when the batch time was less than 42 days and equal to  $\pm 10\%$  when the batch time was less than 84 days. Consequently, the average fluctuation of



**Fig. 5.** Larvicidal activity of bacterial strains encapsulated with starch.

reported average mortality was equal to  $\pm 0\%$  when the batch time was less than 42 days and equal to  $\pm 5\%$  when the batch time was less than 84 days.

## 4. Discussion

In the present study, microencapsulation was explored as a potential method to extend the longevity of *B. thuringiensis* strains, which are toxic to the larvae of *Ae. aegypti*. The encapsulation process allows the control of the release of the asset, in addition to ensuring greater protection of the asset against the external environment. In this context, the use of the inverse suspension polymerization technique is very advantageous, since it allows the *in situ* encapsulation of the asset, presents lower levels of impurities and greater ease for product recovery (Machado et al., 2007; Way et al., 2018; De Souza e Castro et al., 2020).

Another advantage of the use of inverse suspension polymerization is that it is possible to obtain micrometer-scale particle diameters of regular sizes, as observed in the present study (Kiparissides, 1996; Machado et al., 2007). Bianco (2016) reports that the viscosity of the polymer solution directly influences the uniform production of microspheres. Thus, one of the advantages of using the inverse suspension encapsulation technique is the ease of controlling the size distribution of hydrophilic particles by manipulating the agitation and the amount of suspending agent (Machado et al., 2007).

Research conducted by Rokhade et al. (2006), with natural polymers such as gelatin and sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) and involving the controlled release of the drug ketorolac from tromethamine, also obtained microspheres with average diameters ranging from 247 to 535  $\mu\text{m}$ . These authors also observed that, with the increase in the amount of polymer in the reaction, the particle size also increased. In the present study, when the concentration of bacteria in the microparticles increased, there was a difference in the mean diameter and size distribution of these particles; however, such differences did not affect the feeding of the larvae of *Ae. aegypti*, which indicates the importance of analyzing the particle size of the microspheres for the use of new techniques and formulations in the control of mosquito vectors. As discussed in the literature, the larvae of *Ae. aegypti* exhibit a filter system formed by brushes located around the oral cavity that move and create a flow that carries food particles to the oral orifice. In this sense, the feeding of the larvae is mainly governed by the dimensions of the particles present in the medium. These particles are classified as large (particles with diameters greater than 1 mm), fine (particles with diameters less than 1 mm and greater than 50  $\mu\text{m}$ ) and ultrafine (particles with diameters less than 50  $\mu\text{m}$  and greater than 0.5  $\mu\text{m}$ ) (Clements, 1992).

The results referring to the spectroscopy in the infrared region (FT-IR) did not show significant changes in the intensity of the peaks when compared to the spectra of the crosslinked starch. Many studies also report the main characteristic absorptions of the starch structure (Thygesen et al., 2003; Fang et al., 2004; Muscat et al., 2012; Fazeli et al., 2019; Ahmad et al., 2020). Thus, apparently, the major chemical functions that were observed in the FT-IR spectra are related to the starch matrix, which is probably because of the low amount of bacteria and also because of a low concentration of bacteria on the surfaces of the starch particles, indicating that they may be mainly located on the inner region of the particles.

In the studies conducted by De Souza and Castro et al. (2020), who analyzed the encapsulation of hydrophilic ingredients in starch microparticles, an initial mass loss of around 100  $^{\circ}\text{C}$  was also noted, as was also observed in the present study, which occurs as a function of the water adsorbed on the particles. The peaks of mass loss around 200, 300, and 400  $^{\circ}\text{C}$  correspond to the thermal degradation of starch and glucose, which was observed in the present study with peaks of mass loss around 294.75–309.8  $^{\circ}\text{C}$ . Navarro-Mtz et al. (2019) analyzed the high-energy milling treatment of soybeans for use in culture media for *Bacillus thuringiensis* and also demonstrated mass loss of around 100  $^{\circ}\text{C}$ , which was associated with loss of moisture.

The microencapsulation using the inverse suspension polymerization technique and the use of a starch-based biopolymer was promising for the encapsulation of *B. thuringiensis* and maintained the biological activity of this bacterium. This was observed in the BtMA-750 and BtMA-1114 strains that were adequately incorporated into the starch-based polymer matrix and presented a high number of bacterial colonies at concentrations of  $10^{-1}$  and  $10^{-3}$  CFU/mL, respectively.

Eski et al. (2019) used starch as a wall material for the encapsulation of *B. thuringiensis*, and, through spore count tests, observed a spore viability of  $3.4 \times 10^{11}$ ,  $4.1 \times 10^{11}$ , and  $5.1 \times 10^{11}$  CFU/g<sup>-1</sup>. Rodríguez et al. (2015) employed the spray-drying technique and, as a wall material, used amaranth starch to encapsulate *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1 (*Bt*-HD1). These authors reported that the material used in microencapsulation and drying of these matrices can influence the viability of spores and their insecticidal efficiency.

By analyzing the protein content, the present study demonstrated that the encapsulated bacteria expressed proteins with molecular masses corresponding to Cry and Cyt proteins. Álvarez López et al. (2011) analyzed the toxicity of microencapsulated *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1 against *Manduca sexta* (Linnaeus) and observed the proteins using electrophoresis (SDS-PAGE), in which the *cry* genes encoded approximately 133 kDa. He et al. (2017) developed microcapsules of *B. thuringiensis* in the control of Lepidoptera and, through the results obtained by SDS-PAGE, demonstrated that these microcapsules provided considerable protection for the encapsulated crystals against the environmental stresses that were analyzed during the research.

The continued expression of the insecticidal proteins of the two encapsulated strains BtMA-750 and BtMA-1114 was confirmed via the SDS-PAGE technique. These strains have different gene profiles, including different combinations of Cry toxins (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, and *cry11Ba*) and Cyt toxins (*cyt1Aa*, *cyt1Ab*, and *cyt2Aa*), which are toxic for *Ae. aegypti*, as noted in the research conducted by Soares-da-Silva et al. (2017) and Vieira-Neta et al. (2021).

*B. thuringiensis* stands out for having the presence of the  $\delta$ -endotoxins Cry and Cyt, which are synthesized as protoxins and produced in large quantities during sporulation. The ingestion of the crystals by insect larvae leads to the solubilization of these protoxins and conversion into toxins, and, consequently, ultrastructural changes and cell death (Viana et al., 2021b). Cry proteins are encoded by one or several copies of the same gene, or different *cry* genes, in which there are strains containing different combinations and different toxicity profiles, as observed in the protein analysis of this study. Cyt proteins have been reported to act synergistically with Cry toxins, and have proved themselves to be important for increasing the efficiency of an isolate in the biological control of mosquito vectors (Crickmore et al., 1998; Jouzani et al., 2008; Ben-Dov, 2014).

In the present study, 100% mortality was observed after 35 days of exposure to the encapsulated bacterial strains. The results presented by Nasser et al. (2021), involving K-carrageenan-based hydrogels, showed that the samples produced were effective in the gradual release and persistence of *B. thuringiensis* var. *israelensis* against *Ae. aegypti* larvae during 11 weeks of laboratory bioassay, with a mortality rate of around 100%. He et al. (2017) performed the microencapsulation of crystal proteins (Cry1Ac) produced by *B. thuringiensis* HD73 (*Bt*-HD73) and also observed that microcapsules can increase the effectiveness of the bacterium.

The encapsulated strains BtMA-750 and BtMA-1114 evaluated in the present study showed efficacy in the control of immature *Ae. aegypti* in the laboratory. In the work carried out by Elçin (1995), in which the authors encapsulated *B. thuringiensis* var. *israelensis* in alginate microcapsules against larvae of *Culex* sp, after 24 h of bacterial exposure, 30–50% mortality was observed. This demonstrates that the encapsulation process does not interfere with the larvicidal action of the bacteria, as was also observed in the present study.

The encapsulation of *B. thuringiensis* using the technique of inverse suspension polymerization and starch as a polymer material proved to

be an excellent strategy for the development of new larvicides for mosquito control. It is important to mention that some further assays may be conducted in order to evaluate possible off-target effects of the encapsulated product.

## 5. Conclusion

Given the results, it was evident that both strains of bacteria were successfully encapsulated in the starch microparticles. It was possible to observe that the higher amounts of the biopesticide caused a slight decrease in the diameter of the particles; however, even the encapsulated biopesticide still presents an average diameter that is of an adequate size to be consumed by the *A. aegypti* larvae. In addition, the chemical groups and the thermal stability of the starch-crosslinked materials were maintained, despite the increase in the amount of encapsulated bioinsecticide. It was also noted that the encapsulated spores guaranteed the insecticidal activity of *B. thuringiensis*, since the toxic characteristics of the BtMA-750 and BtMA-1114 strains were preserved, maintaining 100% larval mortality even after 35 days, which is twice the period detected for the free form of the bacteria. Such findings highlight the great potential of the inverse microencapsulation technique for encapsulating bacteria in starch matrices, and demonstrate that microencapsulation of *B. thuringiensis* not only guarantees the bacterial activity, but also prolongs the biopesticide action. One further benefit is that it avoids the use of pesticides and chemical insecticides that are harmful to ecosystems, thus reinforcing the environmental benefits of the product developed in this study.

## Author's statement

Firstly, I would like to thank the Reviewer for his suggestions to improve the quality of the manuscript "Microencapsulation of *Bacillus thuringiensis* strains for the control of *Aedes aegypti*". The manuscript text was reviewed by a native English professional, with a degree in Portuguese and a postgraduate degree in English.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

The authors do not have permission to share data.

## Acknowledgments

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), POSGRAD 2022/FAPEAM e CAPES (Finance code 001), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) for the scholarships and financial support, Universidade Estadual do Maranhão - Campus Caxias, Universidade Federal do Maranhão, Campus VII, Codó, MA, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) and Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

## References

- Abdillahi, H., Chabrat, E., Rouilly, A., Rigal, L., 2013. Influence of citric acid on thermoplastic wheat flour/poly (lactic acid) blends. II. Barrier properties and water vapor sorption isotherms. Ind. Crops Prod. 50, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.028>.
- Ahmad, M., Gani, A., Hassan, I., Huang, Q., Shabbir, H., 2020. Production and characterization of starch nanoparticles by mild alkali hydrolysis and ultra-

- sonication process. *Sci. Rep.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60380-0>.
- Álvarez López, D.I.G., 2011. Toxicidade de microencapsulados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre larvas em primer instar de Manduca sexta (Linneo). Doctorado Ingeniera Agrónoma Fitotecnista) - Universidad Autónoma De San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- Alves, S.B., 1998. Controle microbiano de insetos, segunda ed. FEALQ, Piracicaba-SP.
- Angelo, E., Vilas-Bôas, G.T., Castro-Gómez, R.J.H., 2010. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. *Semina Ciências Agrárias* 31, 945–958.
- Araújo, B.A., De Freitas, L.S., Sarmento, K.K.F., Bezerra, V.R., De Lima, C.A.P., De Medeiros, K.M., 2021. A aplicação de polímeros biodegradáveis como uma alternativa sustentável. *Res., Soc. Dev.* 10, e49010918248–e49010918248 <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18248>.
- Azevedo, L.C., De Sá, A.S.C., Rovani, S., Fungaro, D.A., 2018. Propriedades do amido e suas aplicações em biopolímeros. *Cad. Prospec.* 11, 351. <https://doi.org/10.9771/cp.v11i2.23173>.
- Batra, C.P., Mittal, P.K., Adak, T., 2000. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 16, 321–323.
- Ben-Dov, E., 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins* 6, 1222–1243. <https://doi.org/10.3390/toxins6041222>.
- Bianco, L.R., 2016. Produção de 1,3-propanodiol em biorreator por *Clostridium butyricum* imobilizado em microesferas. Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- Bilal, M., Iqbal, H.M.N., 2019. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* 130, 462–482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>.
- Brasil Ministério da saúde, 2022. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 51 de 2022. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico, p. 48. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contenido/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53no48/view>. (Accessed 10 May 2022).
- Canevarolo JR., S.V., 2006. Ciência Dos Polímeros, segunda ed. Artliber, São Carlos.
- Clements, A.N., 1992. The Biology of Mosquitoes. Development, Nutrition and Reproduction, vol. 1. Chapman & Hall, Londres.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807–813. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998>.
- Crickmore, N., 2023. Full List of Delta-Endotoxins. <http://www.btnomenclature.info/>. (Accessed 10 February 2023).
- De Souza e Castro, N.L., Nele, M., Pinto, J.C., 2020. Production of crosslinked starch microparticles through inverse suspension polymerization using statistical experimental design. *Macromol. Symp.*, 2000125 <https://doi.org/10.1002/masy.202000125>.
- Elçin, Y.M., 1995. Control of mosquito larvae by encapsulated pathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Microencapsul.* 12, 515–523. <https://doi.org/10.3109/02652049509006782>.
- Eski, A., Demirbağ, Z., Demir, İ., 2019. Microencapsulation of an indigenous isolate of *Bacillus thuringiensis* by spray drying. *J. Microencapsul.* 36, 1–9. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1572238>.
- Fang, J.M., Fowler, P.A., Sayers, C., Williams, P.A., 2004. The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction condition. *Carbohydr. Polym.* 55, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.10.003>.
- Favaro-Trindade, C.S., Pinho, S.C., Rocha, G.A., 2008. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz. J. Food Technol.* 11, 103–112.
- Fazeli, M., Florez, J.P., Simão, R.A., 2019. Improvement in adhesion of cellulose fibers to the thermoplastic starch matrix by plasma treatment modification. *Compos. B Eng.* 163, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.11.048>.
- He, X., Sun, Z., He, K., Guo, S., 2017. Biopolymer microencapsulations of *Bacillus thuringiensis* crystal preparations for increased stability and resistance to environmental stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2779–2789. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8070-y>.
- Hernández-Suárez, M., Hernández-Castillo, F.D., Gallegos-Morales, G.R., Lira-Saldivar, H., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N., 2011. Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 6, 189–195. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.189.195>.
- Jouzani, G.S., Abad, A.P., Seifinejad, A., Marzban, R., Kariman, K., Maleki, B., 2008. Distribution and diversity of dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 83–94. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0269-6>.
- Kiparissides, C., 1996. Polymerization reactor modeling: a review of recent developments and future directions. *Chem. Eng. Sci.* 51, 1637–1659. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(96\)00024-3](https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)00024-3).
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lecadet, M.M., Chauvaux, J., Ribier, J.E., Lereclus, D., 1991. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 840–849. <https://doi.org/10.1128/aem.58.3.840-849.1992>.
- Machado, F., Lima, E.L., Pinto, J.C., 2007. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. *Polímeros* 17, 166–179. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282007000200016>.
- Muscat, D., Adhikari, B., Adhikari, R., Chaudhary, D.S., 2012. Comparative study of film forming behaviour of low and high amylose starches using glycerol and xylitol as plasticizers. *J. Food Eng.* 109, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.019>.
- Nasser, S., Da Costa, M.P.M., De Mello Ferreira, I.L., Lima, J.B.P., 2021. k-Carrageenan-*Bacillus thuringiensis israelensis* hydrogels: a promising material to combat larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2, 100125 <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100125>.
- Navarro-Mtz, A.K., Martín-García, R., Urzua-Valenzuela, M., Roldan-Sabino, C., Kakazey, M., Juárez-Arellano, E.A., 2019. High-energy ball milling treatment of soybean for *Bacillus thuringiensis* culture media. *J. Biosci. Bioeng.* 128, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.02.010>.
- Rabinovitch, L., De Oliveira, E.J., 2015. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. CEP 21040, 900.
- Rodríguez, A.P.G., Martínez, M.G., Barrera-Cortés, J., Ibarra, J.E., Bustos, F.M., 2015. Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: studies on the propagation “in vitro”. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 38, 329–339. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1273-7>.
- Rokhade, A.P., Agnihotri, S.A., Patil, S.A., Mallikarjuna, N.N., Kulkarni, P.V., Aminabhavi, T.M., 2006. Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. *Carbohydr. Polym.* 65, 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.013>.
- Santos, F.P., Lopes, J., Vilas-Bôas, G.T., Zequi, J.A., 2012. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* 122, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.11.018>.
- Soares-da-Silva, J., Queirós, S.G., Aguiar, J.S., Viana, J.L., Neta, M.R.A.V., Silva, M.C., Pinheiro, V.C.S., Polanczyk, R.A., Carvalho-Zilse, G.A., Tadei, W.P., 2017. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. *Acta Trop.* 176, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.006>.
- Suave, J., Dallagnol, E.C., Pezzin, A.P.T., Silva, D.A.K., Meier, M.M., Soldi, V., 2006. Microencapsulação: Inovação em Diferentes Áreas. *Rev. Saúde Meio Ambiente/Health Environ.* 7, 12–20.
- Thygesen, L.G., Løkke, M.M., MicklandER, E., Engelsens, S.B., 2003. Vibration microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 50–57. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00243-1).
- Van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>.
- Vargas, L.D.L., Ferreira, S.M.B., Souza, M.D., Da Silva, C.A.L., Shimoya-Bittencourt, W., 2022. Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle: estado da arte do conhecimento. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 21, 98–116. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v21i1.44458>.
- Viana, J.L., Neta, M.D.R.A.V., da Silva, J.S., dos Santos Andrade, A.T., Bezerra, J.M.T., Tadei, W.P., Pinheiro, V.C., 2021a. Larvicide activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in simulated field condition. *Braz. J. Dev.* 7, 43248–43264. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-676>.
- Viana, J.L., Soares-da-Silva, J., Vieira-Neta, M.R.A., Tadei, W.P., Oliveira, C.D., Abdalla, F.C., Peixoto, C.A., Pinheiro, V.C.S., 2021b. Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). *Braz. J. Biol.* 81, 114–124. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.223389>.
- Vieira-Neta, M.R.A., Soares-da-Silva, J., Viana, J.L., Silva, M.C., Tadei, W.P., Pinheiro, V.C.S., 2021. Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). *Braz. J. Biol.* 81, 872–880. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228790>.
- Way, D.V., Nele, M., Pinto, J.C., 2018. Production of doxycycline-loaded gelatin microspheres through thermal treatment in inverse suspensions. *Polym. Eng. Sci.* 58, 802–809. <https://doi.org/10.1002/pen.24628>.
- World Health Organization - WHO, 2005. Dept. Of communicable disease prevention, control and eradication & WHO pesticide evaluation scheme. In: Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. World Health Organization, Geneva. <http://www.who.int/iris/handle/10665/69101>. (Accessed 10 May 2022).