



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CAIO DE AZEVEDO LIMA

**Bioprospecção de extratos bacterianos do Cerrado para o controle
de *Aedes aegypti***

BRASÍLIA

2026

CAIO DE AZEVEDO LIMA

**Bioprospecção de extratos bacterianos do Cerrado para o controle
de *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas, da Universidade de Brasília (UnB), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador (a): Professor(a) Doutor (a) Lorena Carneiro Albernaz.

BRASÍLIA
2026

CAIO DE AZEVEDO LIMA

**Bioprospecção de extratos bacterianos do Cerrado para o controle
de *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas, da Universidade de Brasília (UnB), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em 09 de abril de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Professor(a) Doutor(a) Lorena Carneiro Albernaz – Presidente da Banca
Departamento de Farmácia
Universidade de Brasília

Professor(a) Doutor(a) Helson Mário Martins do Vale
Departamento de Fitopatologia
Universidade de Brasília

Professor (a) Doutor (a) Náira da Silva Campos
Departamento de Farmácia
Universidade de Brasília

Professor(a) Doutor (a) Rodrigo da Silva Ferreira
CONFORMER Therapeutic/ Butantan

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus e ao Senhor Jesus por me conceder além do privilégio da vida, inúmeras oportunidades de educação e aprendizado e por estar ao meu lado como amigo fiel em todos os momentos. Agradeço aos meus familiares por todo amor e incentivo à educação durante a minha criação, e por conseguinte na realização da minha pós-graduação. Em especial e amorosamente, a minha esposa e, por enquanto, única participante do meu novo núcleo familiar, Priscila Campos Marques Crespo Lima. Que entre me incentivar, zelar, amar e compartilhar dos fardos da vida, segurou ativamente minha mão, como amiga inseparável e indômita diversas vezes no desenvolver e atenção ao detalhe desse trabalho e nunca desistiu de mim, nem mesmo quando eu o fazia. Aos meus amigos, pela amizade, suporte e incontáveis vezes que me concederam um ombro e ouvido, quando eu não podia recorrer a mais nenhum. Agradeço aos colegas de laboratório da Farmacognosia que me ensinaram muito e me ajudaram em todas as etapas do trabalho. Aos amigos do laboratório da Coleção Micológica, do Instituto de Biologia, Jefferson dos Reis e Mayara Rodrigues, tributo minha gratidão. Agradeço à professora Dra. Laila Salmen Espindola, por me acolher e ter me proporcionado tantas oportunidades de trabalho, aprendizado e desenvolvimento. Agradeço à professora e orientadora Dra. Lorena Carneiro Albernaz por ter aceitado me orientar neste trabalho, pelos ensinamentos e imensa e indubitável paciência. Agradeço aos membros da banca Helson Mário Martins do Vale, Rodrigo da Silva Ferreira e Náira da Silva Campos, pela disposição e gentileza de avaliar meu trabalho. Agradeço a Universidade de Brasília por toda a formação e oportunidades de desenvolvimento profissional assim como o Programa de Graduação em Ciências Médicas (PPGCM) e a todos professores que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

As arboviroses transmitidas por *Aedes aegypti* representam um grave problema de saúde pública, agravado pela crescente resistência aos inseticidas disponíveis. Neste contexto, a bioprospecção de metabólitos bacterianos surge como uma alternativa sustentável. Este estudo avaliou o potencial larvicida de extratos brutos de bactérias isoladas do bioma Cerrado. Após cultivo em meio líquido e extração com acetato de etila, trinta e nove extratos bacterianos foram obtidos para triagem. A identificação taxonômica das linhagens foi realizada por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA (método de Sanger). As sequências foram analisadas e a inferência filogenética foi conduzida utilizando o método de Máxima Verossimilhança. Os extratos foram avaliados quanto à atividade larvicida em larvas de terceiro ínstar (L3) de *Ae. aegypti*, conforme diretrizes da OMS. Os ensaios larvicidas mostraram que 33 extratos causaram mortalidade superior a 80% em até 72 horas. Os extratos Arbo29A063A e Arbo29A064C apresentaram os menores valores de CL_{50} , inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ em 72 horas. A análise filogenética baseada no gene 16S rRNA confirmou que todas as bactérias estudadas pertencem ao gênero *Bacillus*, com predominância de linhagens relacionadas aos complexos *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*. Para os extratos com maior atividade larvicida, realizou-se uma caracterização química por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS). Os dados obtidos foram analisados na plataforma GNPS2 (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) utilizando a abordagem de *molecular networking*, o que permitiu a anotação de lipopeptídeos da família das surfactinas. A presença desses metabólitos sugere seu envolvimento na atividade biológica observada. Os resultados mostram que bactérias, particularmente do gênero *Bacillus*, são fontes promissoras de metabólitos com potencial como bioinseticidas para o controle de *Ae. aegypti*. O estudo reforça o valor estratégico da biodiversidade microbiana brasileira para a inovação biotecnológica.

Palavras-chave: Bioprospecção; *Bacillus*; Bioinseticida; Cerrado; *Aedes aegypti*; LC-MS/MS; *Molecular Networking*; 16S rRNA.

ABSTRACT

Aedes aegypti transmitted arboviruses represent a major public health concern, further exacerbated by the increasing resistance to available insecticides. In this context, the bioprospecting of bacterial metabolites emerges as a sustainable alternative. This study evaluated the larvicidal potential of crude extracts obtained from bacteria isolated from the Cerrado biome. After cultivation in liquid medium and extraction with ethyl acetate, thirty-nine bacterial extracts were obtained for screening. Taxonomic identification of the strains was performed through 16S rRNA gene sequencing (Sanger method). The sequences were analyzed, and phylogenetic inference was conducted using the Maximum Likelihood method. The extracts were evaluated for larvicidal activity against third-instar (L3) larvae of *Ae. aegypti*, following WHO guidelines. Larvicidal assays showed that 33 extracts caused mortality greater than 80% within 72 hours. The extracts Arbo29A063A and Arbo29A064C exhibited the lowest LC₅₀ values, below 50 µg/mL at 72 hours. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene confirmed that all studied bacteria belong to the genus *Bacillus*, with a predominance of strains related to the *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. subtilis* complexes. For the extracts with the highest larvicidal activity, chemical characterization was performed using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The resulting data were analyzed using the GNPS2 (Global Natural Products Social Molecular Networking) platform with a molecular networking approach, enabling the annotation of lipopeptides from the surfactin family. The presence of these metabolites suggests their involvement in the observed biological activity. The results indicate that bacteria, particularly those belonging to the genus *Bacillus*, are promising sources of metabolites with potential as bioinsecticides for the control of *Ae. aegypti*. This study highlights the strategic value of Brazilian microbial biodiversity for biotechnological innovation.

Keywords: Bioprospecting; *Bacillus*; Bioinsecticide; Cerrado; *Aedes aegypti*; LC-MS/MS; Molecular Networking; 16S rRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do protocolo de extração de DNA genômico de bactérias pelo método CTAB/TES para sequenciamento do gene 16S rRNA.	25
Figura 2 – Frascos reagentes borossilicato 3.3 (frasco Schott) contendo meio bacteriano líquido .	29
Figura 3 - Cultivo de <i>Bacillus</i> spp. em meio líquido sob condição estática para obtenção de biomassa e produção de extratos brutos.	29
Figura 4 - Etapa de partição líquido-líquido em funil de separação: separação das fases aquosa e orgânica (acetato de etila) para obtenção do extrato bruto.	30
Figura 5 - Extratos brutos obtidos por partição líquido-líquido com acetato de etila após secagem completa do solvente em capela de fluxo.	30
Figura 6 - Esquema de diluição seriada (250–31,25 µg/mL) dos extratos bacterianos em placa de 12 poços para bioensaios larvicidas com <i>Ae. Aegypti</i> .	31
Figura 7 - Manutenção de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em bandejas plásticas durante o desenvolvimento até a fase de pupa.	32
Figura 8 – Gaiolas utilizadas para o desenvolvimento e reprodução de mosquitos (<i>Aedes aegypti</i>).	33
Figura 9 - Sistema UHPLC-ESI-qTOF utilizado para aquisição dos dados de espectrometria de massas (MS/MS) e construção da rede molecular no GNPS2.	34
Figura 10 - Gel de agarose 1% com amostras coradas com GelRed: visualização sob luz UV das bandas de DNA genômico bacteriano após extração pelo método CTAB/TES.	35
Figura 11 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada em sequências do gene 16S rRNA evidenciando o posicionamento taxonômico das cepas de <i>Bacillus</i> spp. isoladas do Cerrado.	36
Figura 12 – Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24-72 horas (1).	39
Figura 13 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24-72 horas (2).	39
Figura 14 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24-72 horas (3).	40
Figura 15 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24-72 horas (4).	40
Figura 16 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24-72 horas (5).	41
Figura 17 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A062C.	41
Figura 18 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A063A.	42
Figura 19 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A064C.	42
Figura 20 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A068A.	43

Figura 21 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A074C.	44
Figura 22 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A086C.	44
Figura 23 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A068B.	45
Figura 24 - Curva CL ₅₀ para <i>Aedes aegypti</i> : Arbo29A068C.	46
Figura 25 - Rede de similaridade molecular dos extratos ativos obtida por análise UPLC-MS/MS e análise no GNPS2 (24 horas).	47
Figura 26 - Agrupamento de surfactinas por comparação espectral com a biblioteca GNPS2 em extratos ativos (24 horas).	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes da mistura de reação e seus parâmetros para PCR (amplificação do gene 16S rRNA).	26
Tabela 2 – Parâmetros do ciclo térmico para amplificação do gene 16S rRNA utilizados.	27
Tabela 3 – Parâmetros (Thermal Cycler) para purificação enzimática dos produtos de PCR.	27
Tabela 4 – Massa dos extratos brutos bacterianos obtidos por extração com acetato de etila após cultivo estático em meio líquido.	37
Tabela 5 – Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A062C.	41
Tabela 6 - Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A063A.	42
Tabela 7 - Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A064C.	43
Tabela 8 - Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A068A.	43
Tabela 9 - Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A074C.	44
Tabela 10 - Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A086C.	45
Tabela 11 - Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A068B.	45
Tabela 12 - Dados da curva CL ₅₀ da amostra Arbo29A068C.	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Origem e identificação das cepas bacterianas isoladas de diferentes nichos ecológicos do Cerrado.	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Exo 1. Exonuclease I

Bti. *Bacillus thuringiensis israelenses*

°C: Graus Celsius

bp: Pares de base (*base pairs*)

g: Grama

L: Litro

mM: Milimolar

mV: Milivolt

mg: Miligrama

mL: Mililitro

pH: Potencial Hidrogeniônico

rpm: Rotações por minuto

V: Volt

v/v: Volume por volume

µg/mL: Microgramas por mililitro

µL: Microlitro

LISTA DE SIGLAS

ATCC American Type Culture Collection

BDA Batata Dextrose Ágar

BLAST Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides

BtMA-459 Isolado da bactéria *Bacillus thuringiensis* proveniente do estado do Maranhão

CEPA COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CDR1 Gene que codifica uma bomba de efluxo em *Candida*

CIM Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀ Concentração Letal Média

CL₉₀ Concentração Letal 90

COVID-19: Doença do Coronavírus 2019

CTAB Brometo de Cetiltrimetilamônio

DF Distrito Federal

dNTPs Desoxirribonucleotídeos Trifosfato

ddNTPs Didesoxirribonucleotídeos Trifosfato

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DMSO Dimetilsulfóxido

ECDC European Center for Disease Prevention and Control

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetraacético

EMRO Eastern Mediterranean Region

ERG3 Gene da via de biossíntese do ergosterol

ERG11 Gene que codifica a enzima alvo dos azóis

EURO European Region

GNPS2 *Global Natural Products Social Molecular Networking*

GO Goiás

HIV/Aids Vírus da Imunodeficiência Humana / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IRS Pulverização Residual Intradomiciliar

LLIMs Mosquiteiros Tratados com Inseticida de Longa Duração

LCMU - Laboratório de Coleção Micológica da UNB

MATOPIBA Acrônimo para os estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia

NCBI National Center for Biotechnology Information
OPAS Organização Pan-Americana da Saúde
PDA Potato Dextrose Agar
PCR Reação em Cadeia da Polimerase
PVP Polivinilpirrolidona
RNA Ácido Ribonucleico
rRNA RNA Ribossômico
RPMI Roswell Park Memorial Institute
SAP Fosfatase Alcalina de Camarão
SEARO South-East Asia Region
S-layer Camada de Superfície
SPE Extração em Fase Sólida
TE / TE Tris-EDTA
UFC Unidade Formadora de Colônia
UTI Unidade de Terapia Intensiva
UV Ultravioleta
WPR Western Pacific Region
OMS Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
O desafio das arboviroses e a resistência a inseticidas.....	12
Potencial de metabólitos bacterianos.....	14
Importância do Cerrado	16
Uso de ferramenta GNPS2 para otimizar a prospecção	19
2 OJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Isolamento, identificação e manutenção de microrganismos	21
3.1.1 Origem de bactérias usadas.....	21
3.1.2 Taxonomia filogenética	23
3.1.2.1 Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA).....	23
3.1.2.2 Eletroforese	24
3.1.2.3 PCR	26
3.1.2.4 Purificação de DNA	26
3.1.2.5 Sequenciamento Sanger	27
3.2 Manutenção de meios e produção de extratos	28
3.2.1 Meio de batata dextrose ágar (BDA)	28
3.2.2 Repique.....	28
3.2.3 Meio de cultura líquido bacteriano	29
3.2.4 Inóculo bacteriano	29
3.2.5 Produção dos extratos brutos	30
3.3 Ensaios biológicos	31
3.3.1 Testes de extratos em larvas L3 de <i>Aedes aegypti</i>	31
3.3.2 Parâmetros para avaliação de testes em <i>Aedes aegypti</i>	32
3.3.3 Criação de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	32
3.4 Análise quimiométrica	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Taxonomia filogenética	34
4.2 Produção de extratos	37
4.3 Testes biológicos	38

4.3.1 Testes em larvas L3 <i>Aedes aegypti</i>	38
4.4 Avaliação por redes de similaridade espectral.....	46
5 DISCUSSÃO.....	48
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	50
7 CONCLUSÃO	51
8 REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O desafio das arboviroses e a resistência a inseticidas

As arboviroses transmitidas por *Aedes aegypti* representam um dos principais desafios atuais em saúde pública global, sendo responsáveis por elevada morbidade e mortalidade em regiões tropicais e subtropicais. Esse mosquito possui extrema relevância epidemiológica, especialmente no Brasil, por atuar como vetor não apenas do vírus da dengue, mas também de outras arboviroses emergentes, como Zika e chikungunya. O vírus Zika, por exemplo, foi identificado no país em maio de 2015, marcando um novo e crítico cenário epidemiológico (POMBO, 2016). A complexidade do controle desse vetor é intensificada pela circulação simultânea desses vírus em diversas regiões, o que eleva o risco de dispersão dos patógenos e de ocorrência de coinfeções (PESSOA *et al.*, 2016). Estima-se que mais de 40% da população mundial esteja sob risco de infecção por doenças transmitidas por mosquitos, com a dengue ameaçando aproximadamente metade da população global e resultando em 100 a 400 milhões de infecções anuais (PRASHAR *et al.*, 2025; OMS, 2025).

No Brasil, tem-se registrado aumento expressivo na incidência de dengue nas últimas décadas, consolidando a doença como um importante problema de saúde pública. Dados do Ministério da Saúde indicam que o país registrou 6.484.890 casos prováveis de dengue e 5.972 óbitos em 2024, configurando a maior epidemia já registrada no território nacional (BRASIL, 2025). Informações provenientes dos sistemas oficiais de vigilância epidemiológica, especialmente o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) disponibilizado por meio do DATASUS, apontam que até a 34ª semana epidemiológica de 2025 foram registrados aproximadamente 1.557.961 casos prováveis e 1.595 óbitos, com incidência de cerca de 732,9 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2025). Além disso, estima-se que mais de 8.600 casos de infecção por dengue foram registrados somente no DF em 2025 (CODEÇO *et al.*, 2018; INFODENGUE, 2025).

A expansão geográfica dessas arboviroses tem sido impulsionada por fatores como mudanças climáticas, urbanização desordenada, intensificação do comércio internacional e globalização. Esses elementos favoreceram a adaptação do *Ae. aegypti* ao ambiente urbano, contribuindo para o aumento da transmissão viral (DONALISIO *et al.*, 2017). Dados recentes indicam que, desde o início de 2024, mais de 3,6 milhões de casos de dengue e aproximadamente 1.900 mortes foram registrados em 94 países distribuídos entre as regiões das Américas, Europa, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental, África e Mediterrâneo Oriental (ECDC, 2024; WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2025).

Segundo Barik *et al.* (2025), esse cenário é agravado pela crescente resistência dos vetores aos inseticidas químicos convencionais, que constituem a base das estratégias atuais de controle, como a pulverização residual intradomiciliar e o uso de mosquiteiros tratados com inseticidas de longa duração. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023) atualmente, mais de 88 países já relataram resistência a essas ferramentas, comprometendo significativamente sua eficácia.

E embora a busca por alternativas de controle conte com inúmeros extratos de diversas fontes, principalmente vegetais e bacterianas, que apresentam atividade contra *Ae. aegypti*, há a necessidade de validação analítica e biológica rigorosa destes, como evidenciado por estudos como de Morais *et al.* (2023), que relatam a falta de padronização e validação como o principal obstáculo entre a pesquisa preliminar e a transformação em um produto útil de saúde pública, pois diferenças metodológicas podem influenciar significativamente os resultados obtidos e dificultar ainda mais o combate ao vetor.

A análise da literatura realizada neste estudo permitiu observar que, assim como ocorre em muitos ensaios conduzidos no Brasil e no mundo, há variações consideráveis no método empregado, apesar da existência de normas estabelecidas pela OMS – *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides* (WHO, 2005). Fato que é enfatizado, no trabalho de Paulins *et al.* (2022) e Lees *et al.* (2024), ao revisarem o uso do bioensaio da OMS, constataram que mais da metade dos artigos analisados utilizava versões desatualizadas do protocolo e que 44% dos estudos empregavam insetos com idade inadequada, comprometendo a comparabilidade dos resultados.

A mesma observação foi feita por Silvério *et al.*, 2025, que relatam que muitos estudos apresentam variações no estágio larval avaliado, no tempo de exposição e no uso de controles — havendo inclusive trabalhos que não descrevem nenhum tipo de controle. Essa variação metodológica não apenas dificulta a comparação direta entre estudos, mas também pode mascarar ou superestimar o real potencial de novos extratos (ALTHOFF e HUIJBEN, 2022; MACORIS *et al.*, 2005). Portanto, a padronização torna-se um pilar fundamental para distinguir efeitos biológicos genuínos de vieses introduzidos por metodologia inadequada, garantindo que descobertas promissoras tenham validade reprodutível e possam avançar de forma confiável para fases de desenvolvimento aplicadas.

Diante desse cenário, a busca por controles das formas imaturas do mosquito, ovos, larvas e pupas torna-se uma estratégia central no controle, uma vez que o *Ae. aegypti* é um inseto holometábolo e essas fases ocorrem em criadouros relativamente acessíveis. O combate direto às larvas é, portanto, uma das principais estratégias para reduzir a densidade populacional

do vetor (FORATTINI, 2002; SILVA *et al.*, 2021; SOUSA *et al.*, 2020; SILVÉRIO *et al.*, 2025; DONALISIO *et al.*, 2017; MORAIS *et al.*, 2023).

Potencial de metabólitos bacterianos

Compostos de origem bacteriana emergem como ferramentas para o desenvolvimento de bioinseticidas, apresentando atividade larvicida e menor impacto sobre organismos não alvo. Além disso tendem a possuir maior especificidade, biodegradabilidade e menor pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência (PRASHAR *et al.*, 2025; LUKOSE *et al.*, 2023).

Evidências reforçam esse potencial, extratos de culturas bacterianas do gênero *Bacillus* sp. (isolado NIO 707), por exemplo, demonstraram mortalidade superior a 70% em larvas de *Ae. aegypti* (PRASHAR *et al.*, 2025). Bactérias isoladas de solos agrícolas, como *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), constituem fontes amplamente reconhecidas de compostos bioativos eficazes contra diversos vetores, incluindo o *Ae. aegypti* (LUKOSE *et al.*, 2023). Filtrados dessas culturas bacterianas causaram 100% de mortalidade em larvas de primeiro e segundo ínstar, evidenciando a atividade larvicida desses microrganismos. Resultados semelhantes têm sido observados em estudos com isolados de gêneros como *Bacillus* e *Streptomyces*, os quais abrangem grande número de espécies amplamente distribuídas em solos e, em alguns casos, associadas a plantas (DIZON *et al.*, 2024; SANTHISHKUMAR *et al.*, 2023).

Estudos recentes, conduzidos por Katak *et al.*, (2021), em biomas brasileiros reforçam ainda mais o potencial de bactérias nativas como fontes de metabólitos bioinseticidas: isolados de *Bacillus* spp., provenientes de microambientes amazônicos, demonstraram atividade larvicida significativa contra o *Ae. aegypti*, com algumas cepas alcançando 100% de mortalidade em 24 horas, padrão também observado para o controle positivo do Bti. Além disso, para determinados isolados, os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram estatisticamente indistinguíveis daqueles observados para o Bti. Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que a fração pellet (células inteiras) das culturas bacterianas mostraram-se particularmente ativa, sugerindo que os compostos tóxicos estão frequentemente associados às estruturas celulares ou localizados intracelularmente.

Extratos de bactérias marinhas isoladas da costa sudeste do Brasil, obtidos de linhagens de *Streptomyces* e *Bacillus*, exibiram atividade larvicida moderada em *Ae. aegypti*, com taxas de mortalidade superiores a 80% em concentrações de 250 µg/mL (MOREIRA *et al.*, 2022). Análises metabolômicas avançadas desses extratos ativos revelaram a presença de

classes de compostos com reconhecido potencial inseticida, como lipopeptídeos e terpenos, indicando que a diversidade química dos metabólitos bacterianos constitui uma fonte para a descoberta de novos bioinseticidas (MOREIRA *et al.*, 2022).

No contexto dos biomas Cerrado e Caatinga, isolados de *Bacillus thuringiensis* provenientes do estado do Maranhão apresentaram elevada diversidade genética de genes *cry* e *cyt*, que codificam toxinas proteicas com ação específica contra dípteros (VIANA *et al.*, 2021). Isolados como BtMA-459, que possui cinco genes tóxicos (*cry1*, *cry4*, *cry32*, *cyt1* e *cyt2*), causaram danos histopatológicos severos no epitélio intestinal das larvas, culminando em sua morte. Essa diversidade genética observada entre isolados de diferentes biomas brasileiros ressalta o potencial de identificação de novas combinações de toxinas com elevada eficácia e possíveis mecanismos de ação sinérgicos, passíveis de exploração no desenvolvimento de formulações bioinseticidas mais eficientes e sustentáveis (KATAK *et al.*, 2021; VIANA *et al.*, 2021).

Bactérias como actinobactérias e *Bacillus* spp. produzem substâncias como lipopeptídeos, policetídeos e antibióticos peptídicos que também demonstram ampla atividade inseticida (MNIF, 2015). Lipopeptídeos como surfactinas, iturinas e fengicinas, por exemplo, apresentam mecanismos multifatoriais, incluindo: perturbação da membrana celular, indução de estresse oxidativo, neurotoxicidade, inibição enzimática e interferência na síntese da matriz extracelular, demonstrando propriedades inseticidas e baixa probabilidade de induzir resistência (BÉRDY, 2005; ZHAO *et al.*, 2017; MADDURI *et al.*, 2025).

Observa-se nestes estudos que a integração de abordagens tradicionais de triagem de atividade biológica com ferramentas modernas de identificação molecular e metabolômica tem se mostrado essencial para a exploração do potencial biotecnológico desses microrganismos. Técnicas como o sequenciamento do gene 16S rRNA, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de genes de toxinas e o *molecular networking* têm contribuído de forma decisiva para a identificação de compostos bioativos e para a compreensão de seus mecanismos de ação. Em conjunto, esses estudos consolidam a importância da biodiversidade microbiana brasileira como uma fonte ainda pouco explorada, porém de elevado valor estratégico, para a inovação no controle biológico de vetores, especialmente do *Ae. aegypti* (KATAK *et al.*, 2021; VIANA *et al.*, 2021; MNIF, GHRIBI, 2015).

Importância do Cerrado

Localizado na região do Planalto Central do Brasil, o Cerrado é classificado, segundo Bustamante et al. (2012), como a segunda maior formação vegetal do país, com cerca de 2 milhões de km², o que corresponde a aproximadamente 24% do território brasileiro. O bioma abriga nascentes de três grandes bacias hidrográficas sul-americanas: Tocantins-Araguaia, Paraná-Prata e São Francisco. Miranda et al. (2014) relatam que o Cerrado é reconhecido como a savana tropical mais biodiversa do mundo e exerce papel relevante na oferta de serviços ecossistêmicos, como regulação hídrica, sequestro de carbono e manutenção da biodiversidade endêmica, além de abranger dez das doze principais regiões hidrográficas do país (FAÇANHA et al., 2025; SOARES et al., 2025).

Sua classificação como hotspot de biodiversidade reforça essa importância, já que essas regiões, marcadas por alta concentração de espécies endêmicas, reúnem mais de 4.000 espécies de plantas nativas e concentram aproximadamente um terço da biodiversidade brasileira (PEARCE, 2011; MIRANDA et al., 2014). Segundo Myers et al. (2000), estima-se que cerca de 44% das espécies de plantas vasculares e 35% das espécies de vertebrados estejam restritos a apenas 25 hotspots de biodiversidade, que, juntos, ocupam somente 1,4% da superfície terrestre.

No entanto, o bioma vem sofrendo forte pressão antrópica. Em apenas seis anos (2002-2008), foram registrados mais de 85.074 km² de desmatamento acumulado, o equivalente a 14.179 km² por ano (MIRANDA et al., 2014). Segundo Zimbres et al. (2020), aproximadamente 50% de sua cobertura vegetal original já foi suprimida, principalmente em razão da expansão agropecuária e de alterações nos regimes naturais de fogo, fatores que afetam o funcionamento ecológico desses ecossistemas e resultam em fragmentação do habitat e perda de conectividade da paisagem (SOARES et al., 2025; BUSTAMANTE et al., 2012).

Esse processo é agravado por uma legislação ambiental menos restritiva no Cerrado quando comparada à Amazônia. Enquanto na Amazônia a exigência de reserva legal é de 80%, no Cerrado ela é de 20%, o que favorece a conversão de áreas nativas (SOARES et al., 2025; SANTOS et al., 2021). Além disso, o novo Código Florestal (Lei nº 12.651/2012) enfraqueceu, em certa medida, a proteção de ecossistemas sensíveis do Cerrado, como as veredas, e poucos estados dispõem de legislação complementar efetiva para suprir essa lacuna (SANTOS et al., 2021). Soma-se a isso o avanço da fronteira agrícola, especialmente na região do MATOPIBA (acrônimo para os estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia), que pode levar o bioma a um ponto de inflexão ecológica, com risco de degradação irreversível do solo, poluição hídrica e perda de biodiversidade (SOARES et al., 2025; ZIMBRES et al., 2020).

A Embrapa confirma a dimensão dessa expansão ao registrar que, em uma década, a produção de grãos na região passou de 6 para 14 milhões de toneladas, crescimento associado à conversão de áreas de vegetação nativa em áreas agrícolas (BOLFE et al., 2017). Além disso, a baixa representatividade das unidades de conservação federais — apenas 8,21% do bioma, a menor porcentagem entre os biomas brasileiros, segundo o ICMBIO (2024) — e a escassez de planos de manejo efetivos ampliam essas ameaças, colocando em risco não apenas a biodiversidade conhecida, mas também recursos genéticos ainda pouco estudados, espécies não descritas e serviços ambientais importantes para a sustentabilidade regional e global (SOARES et al., 2025; DANTAS, ALVES, 2021; SANTOS et al., 2021; BOLFE et al., 2017).

Apesar da expressiva biodiversidade vegetal e microbiana e de seu potencial de aplicação em diferentes áreas, o Cerrado ainda permanece parcialmente subexplorado, uma vez que os esforços voltados à descrição de sua diversidade microbiana são relativamente recentes e vêm ocorrendo em paralelo à perda contínua desse patrimônio biológico (ZIMBRES et al., 2020; CASTRO et al., 2016). Os microrganismos associados a esse bioma exercem funções importantes tanto na agricultura quanto na biotecnologia. Estudos com bactérias isoladas do Cerrado mostram sua capacidade de promover o crescimento do arroz de terras altas, mesmo em condições de baixa fertilidade, associadas a solos intemperizados, ácidos e com alto teor de argila, além de déficit hídrico (FAÇANHA et al., 2025; CASTRO et al., 2016).

Essas interações evidenciam vínculos ecológicos entre os microrganismos e a flora que vão além de relações simbióticas e mutualísticas associadas a práticas agrícolas mais sustentáveis e à redução do uso de insumos químicos. Elas também apontam para uma fonte ainda pouco explorada de recursos de interesse biotecnológico (DIZON et al., 2024; CASTRO et al., 2016).

O interesse pelo Cerrado também se relaciona à presença de microrganismos endofíticos, epifíticos e edáficos, como bactérias e fungos associados a espécies vegetais endêmicas. Revisões sistemáticas mostram que esses microrganismos apresentam diversidade considerável e produzem metabólitos secundários com atividades inseticidas, antifúngicas, antibacterianas, antimaláricas e anticancerígenas, o que os torna fontes relevantes para a descoberta de novos fármacos e compostos de interesse industrial (DANTAS, ALVES, 2021; DIZON et al., 2024; FAÇANHA et al., 2025; MOREIRA, 2009).

Nesse contexto, o bioma abriga espécies do gênero *Bacillus*, como *B. safensis*, *B. paramycoides* e *B. velezensis*, isoladas principalmente do solo e da filosfera de plantas nativas. Essas bactérias são reconhecidas por produzir metabólitos bioativos, incluindo compostos com atividade larvicida em *Ae. aegypti* (FALQUETO et al., 2021; ARSHAD et al., 2025). Extratos

lipopeptídicos contendo surfactinas, iturinas e fengicinas apresentaram baixa toxicidade para células mamíferas e organismos não alvo, como *Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella* (PRASHAR et al., 2025; FALQUETO et al., 2021). Além disso, moléculas relacionadas, como proteínas de camada de superfície identificadas por Arshad et al. (2025) em *Geobacillus thermopakistaniensis* MAS1, demonstraram atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*. Essa proteína apresentou termoestabilidade, característica de interesse para formulações biopesticidas.

Embora essa última cepa não seja oriunda do Cerrado, a metodologia empregada e a estabilidade observada nessas proteínas são relevantes para a prospecção de compostos bioativos em bactérias termofílicas de solos brasileiros (DURIC et al., 2019). Esses achados sugerem que a microbiota do Cerrado pode contribuir para o desenvolvimento de novas aplicações em saúde e biotecnologia. A prospecção sistemática desses microrganismos, especialmente de linhagens produtoras de metabólitos secundários ainda pouco estudados, pode favorecer o desenvolvimento de biopesticidas seguros e estáveis (ZIMBRES et al., 2020; FAÇANHA et al., 2025; CASTRO et al., 2016; DIZON et al., 2024).

A diversidade química ainda pouco explorada desses organismos representa uma fonte para a descoberta de moléculas bioativas com possíveis mecanismos de ação distintos, capazes de contornar a resistência a inseticidas convencionais. Investir na caracterização e preservação desse patrimônio microbiológico não se limita à conservação: trata-se também de uma oportunidade para inserir o Brasil de forma mais consistente na bioeconomia global, transformando a riqueza biológica do Cerrado em respostas para desafios em saúde, agricultura e sustentabilidade (DANTAS, ALVES, 2021; DIZON et al., 2024; BODE, 2009; SAYED et al., 2020; CASTRO et al., 2016).

Diante do avanço das arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti*, da crescente resistência aos inseticidas químicos convencionais e da demanda por alternativas eficazes, seletivas e ambientalmente sustentáveis, torna-se necessário ampliar o conhecimento sobre a prospecção sistemática de metabólitos bacterianos provenientes de biomas ainda pouco explorados, como o Cerrado brasileiro, com foco na atividade larvicida (OMS, 2023; ECDC, 2024; PRASHAR et al., 2025; DONALISIO et al., 2017; ZIMBRES et al., 2020; CASTRO et al., 2016).

Embora bactérias do gênero *Bacillus* sejam reconhecidas como fontes importantes de compostos bioinseticidas, a maior parte dos estudos concentra-se em cepas comerciais ou em toxinas clássicas, com exploração ainda limitada de linhagens nativas, de seus extratos brutos e de sua diversidade metabólica associada (LUKOSE et al., 2023; VIANA et al., 2021; KATAK et al., 2021; PRASHAR et al., 2025).

Assim, apesar da demanda por novas alternativas e da diversidade de fontes potenciais, o cenário do controle biológico ainda é amplamente dominado por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, cuja eficácia e segurança são bem documentadas e frequentemente utilizadas como referência de bioinseticida (EPA, 2016; VIANA et al., 2021; LUKOSE et al., 2023; KATAK et al., 2021). No entanto, a dependência de um único agente levanta preocupações quanto à pressão seletiva e ao possível surgimento de resistência em longo prazo (ALTHOFF & HUIJBEN, 2022; MACORIS et al., 2005; BOYCE et al., 2013). Isso reforça a necessidade de investigar novas linhagens bacterianas com modos de ação distintos, como estratégia para a sustentabilidade do controle vetorial (VIANA et al., 2021; MOREIRA et al., 2022).

Ao tratar de fontes naturais vivas, é importante considerar que as condições ambientais podem influenciar sua fisiologia e, conseqüentemente, a composição de suas moléculas ativas. Isso inclui as relações ecológicas mantidas por esses organismos ao longo de seu ciclo de vida, no qual bactérias precisam não apenas defender seu habitat de insetos por meio de toxinas proteicas, mas também competir com outros microrganismos pelos nutrientes disponíveis (BODE, 2009; SAYED et al., 2020; DIZON et al., 2024).

Nessa perspectiva, a exploração de ambientes e nichos ecológicos ainda pouco investigados torna-se relevante. Biomas como o Cerrado brasileiro, com biodiversidade e condições ambientais particulares — incluindo fisionomias que variam de campos de savana a formações florestais, solos ácidos, intemperizados e com alto teor de argila, períodos de seca intensa e ocorrência de incêndios naturais — constituem uma ecorregião que seleciona uma microbiota adaptada a estresses severos, em estreita relação com a sazonalidade do solo e com a cobertura vegetal (CASTRO et al., 2016; BODE, 2009).

De modo semelhante, Sayed et al. (2020) mostraram que biomas complexos e extremos, como os desertos de Atacama, podem atuar como fonte de novas bactérias produtoras de moléculas bioativas. Assim, a riqueza microbiana do Cerrado pode representar um reservatório de linhagens bacterianas capazes de produzir compostos larvicidas adaptados a pressões evolutivas específicas.

Uso da ferramenta GNPS2 para otimizar a busca

A abordagem metabolômica e a análise química são ferramentas importantes para compreender a composição de extratos bacterianos e investigar seu potencial bioinseticida. Nesse contexto, a plataforma GNPS2 se apresenta como uma ferramenta inicial para a análise desses dados. Trata-se de uma plataforma colaborativa online que permite a análise e o

compartilhamento de dados de espectrometria de massas tandem (MS/MS) (WANG et al., 2016; PETRAS et al., 2022).

Seu princípio baseia-se no fato de que moléculas com estruturas químicas semelhantes tendem a gerar padrões de fragmentação (espectros MS/MS) semelhantes quando analisadas em espectrômetros de massas (NOTHIAS et al., 2020; ARON et al., 2020). A partir disso, a plataforma compara esses espectros e os organiza em redes moleculares, nas quais cada nó representa um espectro e as arestas indicam o grau de similaridade entre eles (WANG et al., 2016; NOTHIAS et al., 2020). Essa abordagem permite a identificação de compostos já descritos por comparação com bibliotecas espectrais e também a visualização de agrupamentos de espectros sem correspondência, que podem indicar moléculas ainda não caracterizadas (ARON et al., 2020).

Dessa forma, o GNPS2 permite uma análise química inicial dos extratos, fornecendo um perfil preliminar e auxiliando na definição de etapas posteriores de fracionamento, como a confirmação estrutural por RMN e a comparação com padrões em espectrometria de massas (PETRAS et al., 2022; WANG et al., 2016; NOTHIAS et al., 2020). A ferramenta é particularmente útil para extratos brutos, pois possibilita visualizar famílias de compostos coexistentes e suas abundâncias relativas, além de orientar hipóteses sobre possíveis interações entre metabólitos (NOTHIAS et al., 2020; ARON et al., 2020).

A aplicação dessa abordagem em estudos com extratos bacterianos já permitiu a anotação de classes como lipopeptídeos e terpenos com atividade inseticida, como descrito por Moreira et al. (2022). Nesse sentido, o uso do GNPS2 contribui para direcionar a triagem química, reduzir redundâncias e auxiliar na identificação de grupos moleculares associados à atividade larvicida contra *Ae. aegypti* (MOREIRA et al., 2022). Com base nisso, parte-se da hipótese de que bactérias isoladas do Cerrado, adaptadas a condições ambientais específicas e associadas a diferentes nichos (solo e superfície foliar de espécies nativas ou adaptadas ao bioma), produzem metabólitos secundários com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Essa hipótese orienta a investigação de extratos bacterianos e sua caracterização química por LC-MS/MS associada ao *molecular networking*.

Nesse contexto, este trabalho investiga a atividade larvicida de extratos obtidos de bactérias isoladas do Cerrado, provenientes de solo não rizosférico e da superfície foliar de espécies vegetais. Busca-se também identificar quais classes químicas estão associadas a essa atividade, considerando a presença de microrganismos do gênero *Bacillus* spp. adaptados às condições de estresse do bioma. Para isso, serão avaliados os efeitos larvicidas dos extratos em larvas L3 de *Ae. aegypti*, seguida da identificação filogenética das linhagens ativas por

sequenciamento do gene 16S rRNA. A caracterização química será realizada por LC-MS/MS, com análise baseada em *molecular networking* na plataforma GNPS2 (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), permitindo a anotação de famílias químicas, como lipopeptídeos do tipo surfactina. Com essa abordagem, o estudo busca ampliar o conhecimento sobre metabólitos bacterianos do Cerrado e sua aplicação no controle de *Aedes aegypti*, contribuindo para o desenvolvimento de bioinseticidas de origem microbiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial larvicida de extratos brutos de bactérias isoladas do Cerrado sobre larvas de *Ae. aegypti*, bem como anotar compostos que possam estar ligados à atividade biológica.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar filogeneticamente as linhagens bacterianas isoladas do bioma Cerrado por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Produzir extratos brutos das linhagens bacterianas selecionadas, a partir de cultivo em meio líquido e extração por solvente orgânico;
- Avaliar a atividade larvicida inicial dos extratos brutos frente a larvas de terceiro ínstar (L3) de *Ae. aegypti*, por meio de ensaios de mortalidade em diferentes tempos de exposição;
- Selecionar os extratos mais ativos com base em mortalidade $\geq 80\%$ em 24 horas e determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) desses extratos frente a larvas de *Ae. aegypti*;
- Caracterizar quimicamente os extratos larvicidas ativos em 24 horas por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS);
- Aplicar a abordagem de *molecular networking* clássico no GNPS2 para a anotação de famílias químicas presentes nos extratos ativos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento, identificação e manutenção de microrganismos

3.1.1 Origem de bactérias usadas.

As cepas de bactérias utilizadas neste estudo foram cedidas ao Laboratório de Farmacognosia pela equipe do Laboratório de Coleção Micológica (UnB). As amostras foram coletadas em diferentes sítios amostrais, abrangendo áreas dos estados de Goiás (GO) e do Distrito Federal (DF), com o objetivo de obter uma coleção amostral mais representativa. A coleta em diferentes locais foi somada a coleta em diferentes habitats (solo e superfície de folhas), o que contribui para a ampliação da representatividade do potencial metabólico microbiano, uma vez que microrganismos epífitos foliares e edáficos tendem a exibir perfis metabólicos distintos em função do nicho ecológico ocupado.

No Jardim botânico de Brasília, foram isoladas cepas associadas as folhas de *Struthanthus* sp. As amostras isoladas de *Diospyros lasiocalyx*, espécie nativa do Cerrado, estas da Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Além destas, amostras bacterianas provenientes de solo do tipo “*bulk soil*” (solo não rizosférico) foram coletadas no Jardim Louise Ribeiro (DF).

Isolados de superfície de folhas e solo não rizosférico de *Glycine max* (espécie não nativa, mas adaptada ao bioma estudado) também foram obtidos, estas no município de Cristalina (GO), área de relevância agrícola regional. Uma vez isoladas, as espécies foram individualmente codificadas pelo laboratório para facilitar o rastreamento de cada uma (Quadro 1).

Quadro 1 – Origem e identificação das cepas bacterianas isoladas de diferentes nichos ecológicos do Cerrado

Código	Código	Origem	Hospedeira/solo	Local de coleta	Estado
Arbo 29A052A	A1P1-16	Folhas	<i>Struthanthus</i> sp.	Jardim Botânico de Brasília	DF
Arbo 29A056C	A1P2-9				
Arbo 29A051	A1P3P3				
Arbo 29A052B	A1P3P4				
Arbo 29A056A	A2P1-7				
Arbo 29A056B	A2P3				
Arbo 29A052C	A2P3-P3				
Arbo 29A074C	BDA.D3.(10 ⁻¹)		<i>Diospyros lasiocalyx</i>	Reserva Ecológica do IBGE	
Arbo 29A086D	YM.D1.1(10 ⁻¹)				
Arbo 29A064B	YM.D1.1a(10 ⁻³)				
Arbo 29A064C	YM.D1.1b(10 ⁻³)				
Arbo 29A086B	YM.D1.1c(10 ⁻¹)				
Arbo 29A086C	YM.D1.2(10 ⁻¹)				
Arbo 29A062C	YM.D1.3.(10 ⁻¹)				

Arbo 29A064A	YM.D1.4(10 ⁻¹)				
Arbo 29A074A	YM.D2.1(10 ⁻¹)				
Arbo 29A063C	YM.D2.1(10 ⁻²)				
Arbo 29A063B	YM.D2.10.(10 ⁻¹)				
Arbo 29A074B	YM.D2.7(10 ⁻¹)				
Arbo 29A063A	YM.D2.9.(10 ⁻¹)				
Arbo 29A085A	YM.D3.1(10 ⁻¹)				
Arbo 29A085B	YM.D3.2(10 ⁻¹)				
Arbo 29A085C	YM.D3.3(10 ⁻¹)				
Arbo 29A086A	YM.D3.4(10 ⁻¹)				
Arbo 29A062A	Boc IV	Solo	<i>Bulk soil</i>	Jardim Louise Ribeiro	
Arbo 29A062B	Boc-MAY				
Arbo 29A058C	Boc-PIV				
Arbo 29A054A	Boc.PI				
Arbo 29A058B	Boc.PII				
Arbo 29A058C	Boc.PVI				
Arbo 29A058B	Boc.PVII				
Arbo 29A058A	Boc.PVIII				
Arbo 29A098A	Isolado 1				
Arbo 29A098B	Isolado 2				
Arbo 29A098C	Isolado 3	Folhas	<i>Glycine max</i>	Cristalina	GO
Arbo 29A098D	Isolado 4				
Arbo 029A068A	Pseud1				
Arbo 029A068B	Pseud3				
Arbo 029A068C	Pseud4				

3.1.2 Taxonomia filogenética

3.1.2.1 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

O procedimento de extração de DNA foi realizado com base no protocolo do kit comercial *Wizard Genomic DNA* (Promega), com adaptações que incluíram etapas de maceração mecânica e adição de polivinilpirrolidona (PVP).

As bactérias foram previamente cultivadas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) por 24 horas. A biomassa bacteriana foi coletada com alças de platina esterilizadas em chama e transferida para microtubos de 2 mL. Para a lise celular, foram adicionados 600 µL de tampão CTAB/TES, 100 mg de PVP e quatro esferas metálicas (*beads*). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos, seguidas de maceração mecânica em homogeneizador de esferas (4.000 rpm, 90 s) e incubação em banho seco a 65 °C por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 20 segundos e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, aproximadamente 600 µL

do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos contendo 600 μ L de isopropanol 100% gelado. A mistura foi homogeneizada por inversão durante 5 minutos e incubada a -20 °C por 1 hora.

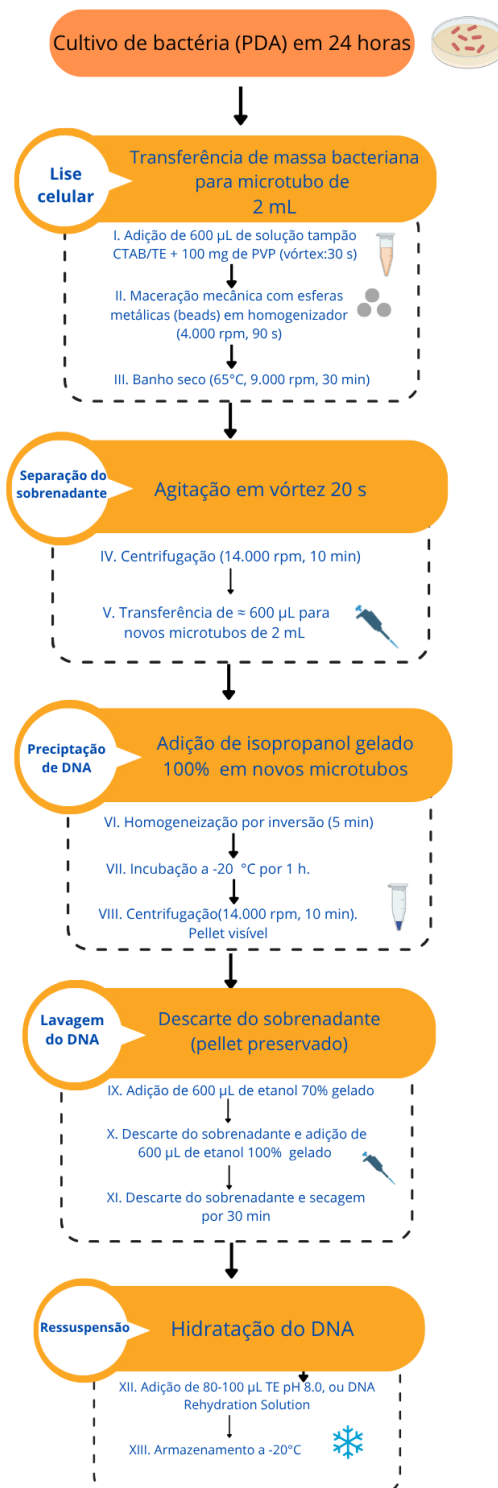
Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado sequencialmente com 600 μ L de etanol 70% gelado e, em seguida, com 600 μ L de etanol 100% gelado. Após cada lavagem, o sobrenadante foi removido. O pellet foi então seco à temperatura ambiente por 30 minutos.

O DNA foi ressuspenso em 80–100 μ L de tampão Tris-EDTA (TE), pH 8,0, ou solução de reidratação de DNA, e armazenado a -20 °C até as análises posteriores. A esquematização do procedimento está apresentada na Figura 1.

3.1.2.2 Eletroforese

A eletroforese em gel de agarose foi empregada para avaliar a qualidade e a integridade do DNA extraído. O gel foi preparado a 1% (0,5 g de agarose/50 mL) em tampão Tris-EDTA (TE), utilizando agarose Kasvi®. As amostras de DNA foram analisadas em gel ao longo das etapas do processo, desde a extração até a purificação final. Para aplicação no gel, o DNA foi misturado ao corante GelRed® na proporção 1:1. A corrida eletroforética foi realizada a 90 V por 40 minutos. Após esse período, as bandas foram visualizadas sob luz UV em transiluminador (Benchtop COMIC).

Figura 1 – Fluxograma do protocolo de extração de DNA genômico de bactérias pelo método CTAB/TEs para sequenciamento do gene 16S rRNA.



Fonte: próprio autor.

3.1.2.3 PCR

As reações de PCR foram realizadas em termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Para cada reação, foi preparado um mix contendo 6,25 μL de Taq Master Mix (2x) (Bio-Rad), 4,65 μL de água ultrapura e 0,3 μL de cada primer (27F e 1492R), totalizando 11,5 μL . Em seguida, 1 μL de DNA extraído foi adicionado a cada tubo, resultando em um volume final de 12,5 μL por reação. O mix foi preparado em volume suficiente para todas as amostras, incluindo controle negativo, a fim de garantir uniformidade entre as reações. A composição detalhada da mistura de reação está apresentada na Tabela 1. As condições de amplificação utilizadas no termociclador encontram-se descritas na Tabela 2.

3.1.2.4 Purificação de DNA

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a solução comercial ExoSAP-IT®, composta pelas enzimas Exonuclease I (Exo I), responsável pela remoção de primers não incorporados, e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), que degrada dNTPs residuais. A solução foi previamente diluída na proporção de 1:9 (ExoSAP-IT/água ultrapura). Em seguida, foram adicionados 4 μL da solução diluída a cada amostra de DNA amplificado. Para o preparo do volume total, considerou-se um excedente para compensar perdas por pipetagem. Assim, para 40 amostras, o volume foi ajustado para 45 reações, resultando em uma mistura contendo 18 μL de ExoSAP-IT e 180 μL de água ultrapura. As condições de incubação utilizadas para a purificação encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 1 – Componentes da mistura de reação e seus parâmetros para PCR (amplificação do gene 16S rRNA).

Componente	Concentração do Estoque	Volume por microtubo (μL)	Volume do Mix Amostra/controle (μL)	Concentração Final
Taq Master Mix (comercial, 2x)	2x	6,25	12,5	1x
Primer Forward	10 μM	0,3	0,6	0,24 μM
Primer Reverse	10 μM	0,3	0,6	0,24 μM
Água ultrapura	—	4,65	9,3	—
Volume total do mix de reação	—	11,5	23,0	—
Volume total do mix de reação com DNA	—	12,5	—	—

Tabela 2 - Parâmetros do ciclo térmico para amplificação do gene 16S rRNA usados.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturação	95 °C	30 s	34×
Anelamento (annealing)	48 °C	30 s	34×
Extensão	72 °C	1 min	34×
Extensão final	72 °C	5 min	1
Manutenção	∞ (indefinido)	—	1

Tabela 3 - Parâmetros (*Thermal Cycler*) para purificação enzimática dos produtos de PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Digestão	37 °C	15 min	1
Inativação	80 °C	15 min	1
Manutenção	12 °C	∞	1

3.1.2.5 Sequenciamento Sanger

As amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger, com foco no gene ribossomal 16S rRNA, amplamente utilizado como marcador filogenético conservado para identificação bacteriana. O sequenciamento foi realizado pela MacroGen, empresa de biotecnologia, sediada em Seul na Coreia do Sul. Os cromatogramas brutos gerados pelo sequenciamento Sanger foram analisados e as sequências de nucleotídeos foram montadas e editadas utilizando o programa DNA Dragon para a resolução de eventuais ambiguidades.

Posteriormente, as sequências consenso foram alinhadas e submetidas a análises filogenéticas preliminares com o auxílio do software MEGA versão 7.0. Para a identificação molecular e construção de um banco de dados de referência, as sequências foram comparadas

com as depositadas em bancos de dados públicos por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) no portal do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o que permitiu a atribuição de identidades e a seleção de sequências homólogas para estudos comparativos.

As sequências obtidas, juntamente com as sequências de referência recuperadas do BLAST, foram organizadas em uma planilha no software Microsoft Excel, utilizando como *outgroup* a espécie *Lactobacillus mulieris*. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o software MAFFT, para garantir o alinhamento de regiões homólogas. Regiões mal alinhadas ou ambíguas foram removidas do alinhamento utilizando o programa Gblocks. A partir da matriz de sequências obtida, a inferência filogenética foi conduzida pelo método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) implementado no software IQ-TREE. O modelo de evolução nucleotídica mais adequado foi selecionado automaticamente pelo próprio programa, e a confiabilidade dos ramos foi avaliada por meio de 1.000 réplicas (*bootstrap*). Finalmente, a árvore filogenética resultante foi visualizada e editada para fins de apresentação utilizando o software FigTree, permitindo a clara distinção dos agrupamentos.

3.2 Manutenção de meios e produção de extratos.

Para o manuseio e manutenção de bactérias isoladas foi usado meio Ágar Batata Dextrose (BDA) em placas de Petri descartáveis estéreis. Para o crescimento bacteriano e produção do extrato, foi usado meio líquido à base de glicose, peptona e extrato de levedura, (detalhados na seção 3.2.3).

3.2.1 Meio de Batata Dextrose Ágar (BDA)

Os meios de cultura sólidos foram preparados com meio BDA (Kasvi®), 39 g foram dissolvidos em 1L de água destilada, sob agitação e fervura. A solução foi em seguida autoclavada a 121 °C por 15 min. Após autoclavagem, a solução foi distribuída em placas de Petri estéreis com tampa ou tubos e armazenados na geladeira.

3.2.2 Repique

Os repiques das bactérias foram realizados em câmara de fluxo laminar em tubos de ensaio ou placas de Petri com BDA, utilizando alça estéril descartável, 24 horas antes do início da produção do extrato bruto.

3.2.3. Meio de cultura líquido bacteriano

Para os meios de cultura líquidos foram utilizados 10 g de peptona bacteriana, 10 g de açúcar (dextrose/sacarose) e 5 g de extrato de levedura em 500 mL de água destilada autoclavados (Figura 2). A ausência de contaminação foi verificada após 24 horas de incubação.

Figura 2 – Frascos reagentes Borossilicato (Frasco Schott) contendo meio bacteriano líquido.



Fonte: próprio autor.

3.2.4 Inóculo bacteriano

Em câmara de fluxo laminar, as bactérias esporuladas (incubadas a 36 °C) foram transferidas de placas de Petri para frascos Erlenmeyer contendo 500 mL de meio líquido. Tiras de ágar foram seccionadas com bisturi estéril e incubadas em condição estática por 14 dias a 25 °C, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Cultivo de *Bacillus* spp. em meio líquido sob condição estática para obtenção de biomassa e produção de extratos brutos.



Fonte: próprio autor.

3.2.5 Produção dos extratos brutos

A biomassa bacteriana foi submetida a extração por acetato de etila. Após 24 horas, o extrato foi filtrado a vácuo, e as fases (orgânica/aquosa) separadas em funil de separação de (Figura 4). A fase orgânica foi concentrada em evaporação sob pressão reduzida (rotaevaporador). Os extratos foram armazenados em tubos de vidro estéreis previamente pesados e identificados (Figura 5).

Figura 4 – Etapa de partição líquido-líquido em funil de separação: separação das fases aquosa e orgânica (acetato de etila) para obtenção do extrato bruto.



Fonte: próprio autor.

Figura 5 – Extratos brutos obtidos por partição líquido-líquido com acetato de etila após secagem completa do solvente em capela de fluxo.



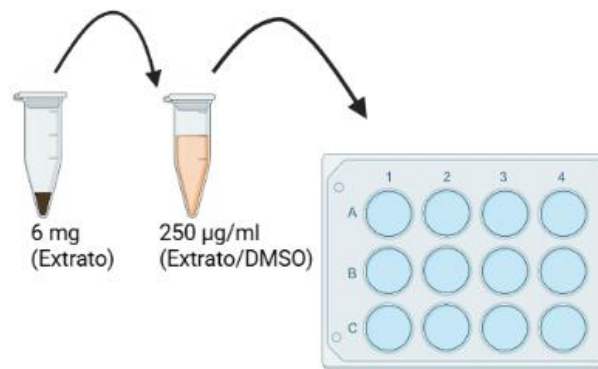
Fonte: próprio autor.

3.3 Ensaios biológicos

3.3.1 Testes de extratos em larvas L3 de *Aedes aegypti*

Os ensaios foram conduzidos em placas de 12 poços. Em cada poço foram adicionadas 10 larvas L3 de *Aedes aegypti*, 3 mL de água e a amostra a ser testada. As amostras foram dissolvidas em DMSO (15 mg/mL) e testadas em diferentes concentrações: 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6). O controle negativo foi o DMSO. Os testes foram repetidos seis vezes para cada amostra em todas as concentrações.

Figura 6 – Esquema de diluição seriada (250–31,25 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos bacterianos em placa de 12 poços para bioensaios larvicidas com *Ae. aegypti*



Fonte: BloRender.

3.3.2 Parâmetros para avaliação de testes em *Aedes aegypti*

Em relação aos parâmetros usados para avaliação dos ensaios foram seguidos os seguintes pontos: caso 20% das larvas se desenvolvessem em pupas em 48 horas, o experimento era interrompido pois as larvas estavam no estágio incorreto. Se a mortalidade do controle negativo estivesse acima de 5% o teste era interrompido. O resultado positivo era dado quando a amostra apresentou pelo menos 80% de letalidade em larvas. Ademais, quaisquer mudanças morfológicas eram observadas e relatadas.

3.3.3 Criação de mosquitos *Aedes aegypti*

Os ensaios biológicos foram realizados com larvas da cepa Rockefeller de *Aedes aegypti*, mantidas no Insetário ArboControl – Laboratório Prof. José Elias de Paula, anexo ao Laboratório de Farmacognosia da UnB. A colônia foi estabelecida e mantida seguindo as

orientações da Organização Mundial da Saúde, com temperatura controlada entre 25 e 28 °C e umidade relativa do ar entre 60 e 80%.

A eclosão dos ovos foi induzida em câmara sob pressão reduzida. Para cada criadouro, utilizou-se 0,05 g de ovos, que foram transferidos para recipientes contendo água e submetidos a vácuo (0,7 bar ou -550 mmHg) por 5 minutos. Após a normalização da pressão, a suspensão permaneceu em repouso por 60 minutos para conclusão da eclosão. As larvas eclodidas foram transferidas para bandejas plásticas (Figura 7) e alimentadas com ração triturada para peixes, sob dieta controlada até a fase de pupa.

Entre o oitavo e o décimo primeiro dia de criação, as pupas foram separadas visualmente por sexo e transferidas para gaiolas de criação na proporção de um macho para cada três fêmeas. Após a emergência dos adultos, os mosquitos foram alimentados com solução aquosa de açúcar a 10% como suplemento alimentar em gaiolas (dimensões 33 × 33 × 33 cm) (Figura 8). Para a maturação dos ovos, as fêmeas receberam alimentação sanguínea duas vezes por semana, com intervalo de dois a três dias entre as sessões. Foram oferecidos de 5 a 7 mL de sangue equino, fornecido pelo Hospital Veterinário da UnB. O sangue foi mantido aquecido por condução térmica, com reposição horária da água aquecida até o final do período de oferta.

Figura 7 – Manutenção de larvas de *Aedes aegypti* em bandejas plásticas durante o desenvolvimento até a fase de pupa.



Fonte: próprio autor

Figura 8 – Criadouros Gaiolas usadas para o desenvolvimento de mosquitos e sua reprodução.



Fonte: próprio autor

3.4 Análise Quimiométrica

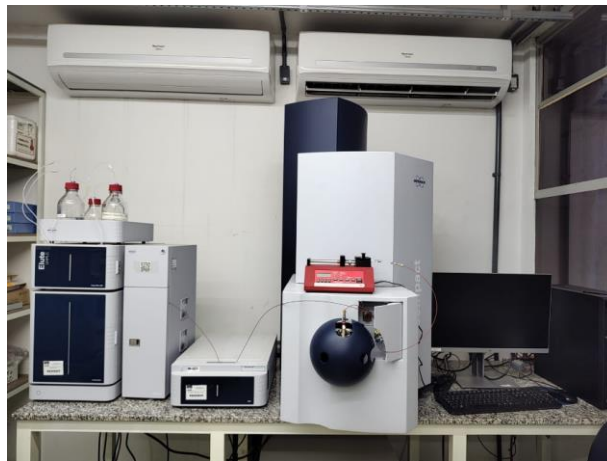
Extratos brutos foram ressuspensos em metanol (1 mg/mL), filtradas (0,22 μ m) e analisadas por UHPLC-MS/MS (Bruker Daltonics: Elute pump UHPLC, autosampler, Elute DAD) acoplado a espectrômetro de massa ESI-qTOF (Compact otofControl) (Figura 9). A separação foi realizada em coluna C18 ODS (100 \times 2,1 mm, 1,8 μ m), com fase móvel composta por acetonitrila grau HPLC (JTBaker®) e água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição iniciou com 5% de metanol, aumentando até 98% em 16 minutos, seguido de lavagem final de 3 minutos para reequilíbrio da coluna. Temperatura: 40 °C; fluxo: 0,5 mL/min. Parâmetros da fonte: 4.500 V (não capilar), nebulizador 4 bar, gás seco 9 L/min, temperatura da fonte 200 °C.

Extratos com mortalidade larval igual a 100% em 24 h foram considerados ativos. Os dados obtidos (.d) foram convertidos para mzXML com o software DataAnalysis e processados com o MZmine, usando os módulos padrão: detecção de massa, construção de cromatograma, deconvolução (algoritmo amplitude de ruído), agrupamento isotópico, alinhamento (20 ppm m/z; 2 min RT), preenchimento de lacunas, alinhamento e filtragem.

O *Molecular networking* foi construído na plataforma GNPS (GNPS2 – Analysis Hub, acessado em 4 de janeiro de 2026) utilizando o fluxo de trabalho *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN). A predição de compostos ativos foi realizada conforme descrito por Nothias *et al.* (2020). Para a construção da rede molecular, os parâmetros de agrupamento dos

dados foram definidos como: tolerância de 0,01 Da para íons precursores; tolerância de 0,01 Da para massas dos fragmentos; escore mínimo de cosseno $> 0,7$; e topK mínimo de 10. A rede molecular resultante foi visualizada utilizando o software Cytoscape (v. 3.10.3).

Figura 9 – Sistema UHPLC-ESI-qTOF utilizado para aquisição dos dados de espectrometria de massas (MS/MS) e construção da rede molecular no GNPS2.



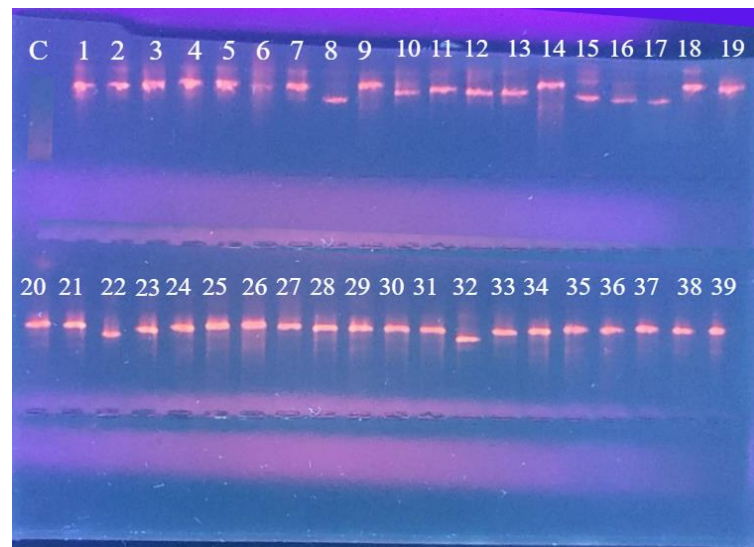
Fonte: próprio autor.

4 RESULTADOS

4.1 Taxonomia filogenética

Os resultados da extração de DNA, PCR e purificação, foram averiguados por eletroforese após cada etapa. Os resultados, pouco antes do envio dos DNAs purificados para Macrogen, são mostrados na Figura 10 , seguindo a seguinte ordem: C- controle, 1- Arbo29A051, 2- Arbo29A052A, 3- Arbo29A052B, 4- Arbo29A052C, 5-Arbo29A054A, 6- Arbo29A054B, 7-Arbo29A054C, 8- Arbo29A056A, 9-Arbo29A056B, 10-Arbo29A056C, 11- Arbo29A058A, 12-Arbo29A058B, 13-Arbo29A058C, 14-Arbo29A062A, 15-Arbo29A062B, 16-Arbo29A062C, 17-Arbo29A063A, 18-Arbo29A063B, 19-Arbo29A063C, 20- Arbo29A064A, 21-Arbo29A064B, 22-Arbo29A064C, 23-Arbo29A074A, 24-Arbo29A074B, 25-Arbo29A074C, 26-Arbo29A085A, 27-Arbo29A085B, 28-Arbo29A085C, 29- Arbo29A086A, 30-Arbo29A086B, 31- Arbo29A086C, 32- Arbo29A086D, 33- Arbo29A098A, 34- Arbo29A098B, 35-Arbo29A098C, 36-Arbo29A098D, 37- Arbo029A068A, 38-Arbo029A068B, 39-Arbo029A06C.

Figura 10 – Gel de agarose 1% com amostras coradas com Gelred: visualização sob luz UV das bandas de DNA genômico bacteriano após extração pelo método CTAB/TES.

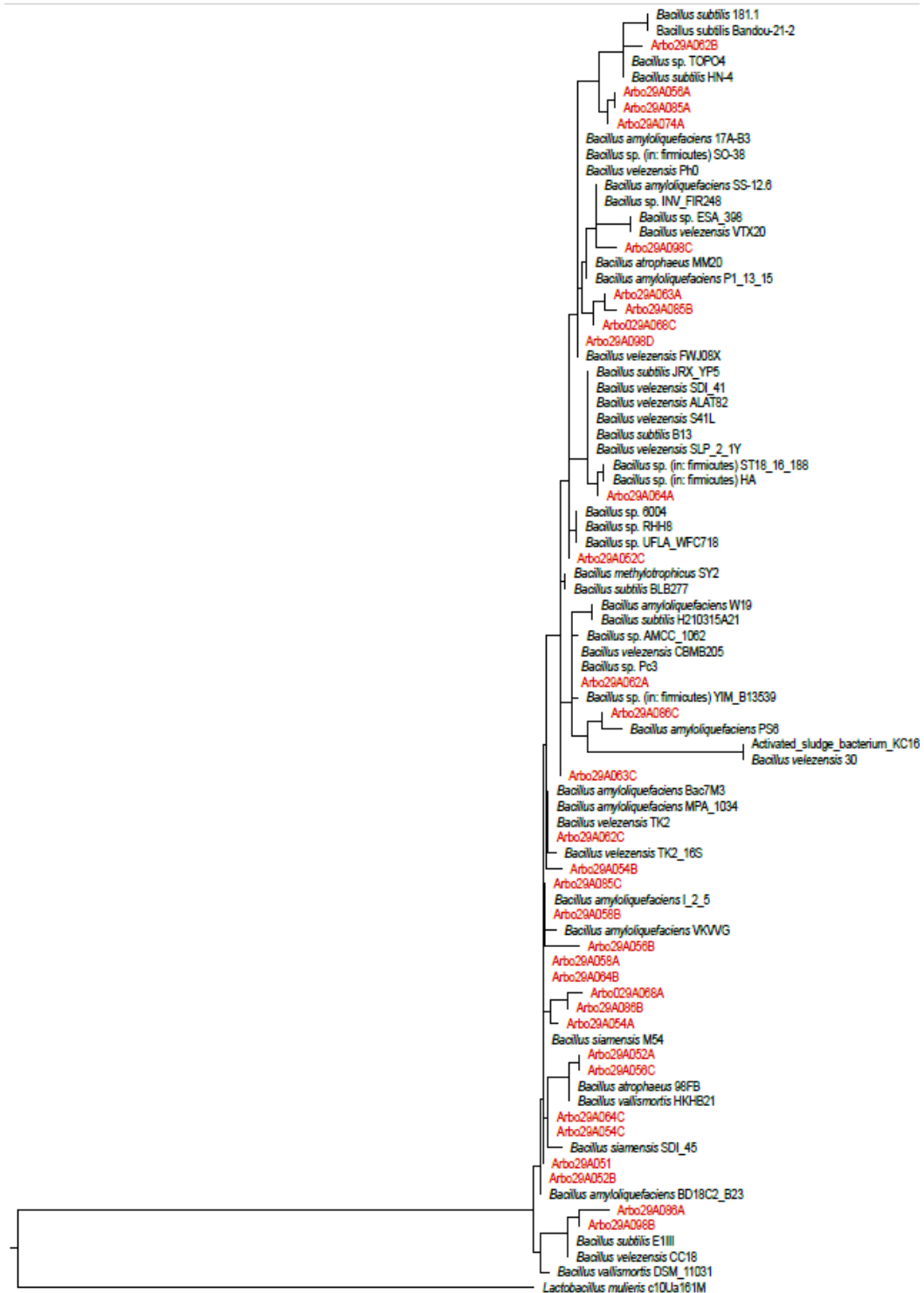


Fonte: próprio autor.

A utilização do gene marcador 16S, como marcador molecular permitiu uma inferência taxonômica até o gênero. Como principal conclusão, a análise agrupando as bactérias dentro do gênero *Bacillus* spp e, como já citado, utilizando como *outgroup* a espécie *Lactobacillus mulieris*. A confirmação de que todos os isolados pertencem ao gênero *Bacillus* é um primeiro passo crítico, uma vez que este gênero abriga uma imensa diversidade metabólica e ecológica e é o gênero de estudo deste trabalho. A identificação genérica correta direciona esforços futuros, focando as linhagens de interesse para uma futura caracterização mais aprofundada de seu potencial biotecnológico.

Apesar das limitações inerentes à taxonomia filogenética em nível de gênero, observou-se que a maioria das sequências apresentou maior similaridade com *Bacillus velezensis* (12 ocorrências), *Bacillus amyloliquefaciens* (10 ocorrências) e *Bacillus subtilis* (8 ocorrências). Esses resultados indicam uma predominância de isolados geneticamente relacionados a espécies amplamente reconhecidas por sua versatilidade metabólica e capacidade de produzir compostos bioativos (MNIF; GHRIBI, 2015; ZHAO *et al.*, 2017; FALQUETO *et al.*, 2021). Para as amostras Arbo29A068B e Arbo29A074C, a obtenção de sequências por Sanger não foi bem-sucedida, ainda que a integridade do DNA tenha sido confirmada por eletroforese em gel de agarose em três extrações independentes, por esta razão não constam na árvore filogenética (Figura 11).

Figura 11 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada em sequências do gene 16S rRNA evidenciando o posicionamento taxonômico das cepas de *Bacillus* spp. isoladas do Cerrado.



Fonte: figtree.

4.2 Produção de extratos

Os 39 extratos foram pesados (Tabela 4) e o rendimento da produção de extratos não pode ser calculado pois uma vez expostas ao solvente orgânico, o crescimento bacteriano nos filtros de papel tinha peso zero.

Tabela 4 – Massa dos extratos brutos bacterianos obtidos por extração com acetato de etila após cultivo estático em meio líquido

Código	Massa (mg)
Arbo29A052A	461,74
Arbo29A056C	159,91
Arbo29A056B	82,63
Arbo29A051	488,83
Arbo29A056A	156,43
Arbo29A052B	238,27
Arbo29A052C	500,01
Arbo29A054A	291,7
Arbo29A054B	722,5
Arbo29A054C	2211,1
Arbo29A058A	233,2
Arbo29A058B	467,3
Arbo29A058C	363,01
Arbo29A062A	600,5
Arbo29A062B	1609,90
Arbo29A062C	1046,10
Arbo29A063A	115,5
Arbo29A063B	390,3
Arbo29A063C	110,3

Arbo29A064A	362,3
Arbo29A064C	322,4
Arbo029A068A	132,3
Arbo029A068B	126,8
Arbo029A068C	120,5
Arbo29A074A	312,8
Arbo29A074B	269,1
Arbo29A074C	128,1
Arbo29A08EA	144,3
Arbo29A08SB	547,3
Arbo29A08SC	825,6
Arbo29A08GA	497,4
Arbo29A08BB	533,5
Arbo29A08BC	1059,2
Arbo29A08BD	480,3
Arbo29A09BA	340,3
Arbo29A09BB	310
Arbo29A09BC	462,5
Arbo29A09BD	656

Fonte: próprio autor.

4.3 Testes biológicos

4.3.1 Testes em larvas L3 de *Aedes aegypti*

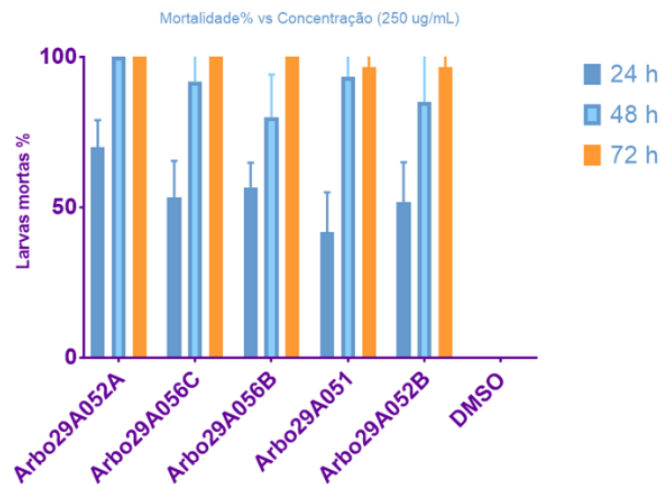
Trinta e três amostras demonstraram mortalidade de pelo menos 80 % em 72 horas segundo os parâmetros apresentados nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16. Apenas seis amostras demonstraram atividade biológica em larvas abaixo de 80%: Arbo29A056A, Arbo29A058A, Arbo29A063, Arbo29A074B, Arbo29A085A e Arbo29A085C.

As amostras de maior letalidade apresentaram resultados consistentes em 24 horas: Arbo29A062C (Figura 17 / Tabela 5), Arbo29A063A (Figura 18/ Tabela 6), Arbo29A064C

(Figura 19/ Tabela 7), Arbo029A068A (Figura 20/Tabela 8), Arbo029A068B (Figura 23/ Tabela 11), Arbo029A068C (Figura 24/ Tabela 12), Arbo29A074C (Figura 21/ Tabela 9) e Arbo29A086C (Figura 22/ Tabela 10).

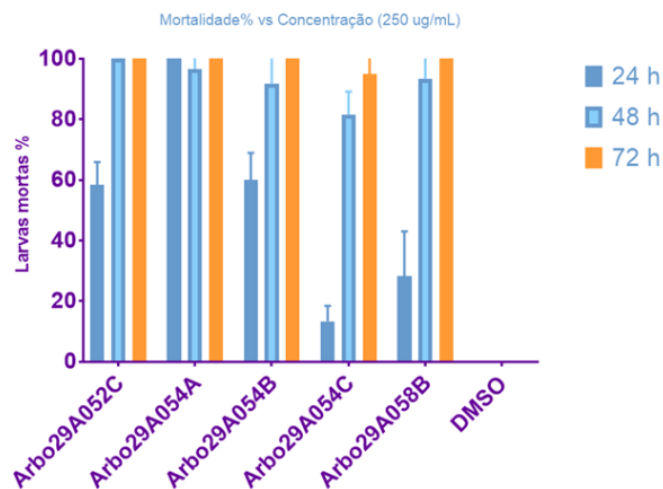
Todas as amostras ativas em 24 horas mantiveram constância em seus resultados, apresentando mortalidade de larvas em 250 $\mu\text{g/mL}$, no período citado. O mesmo resultado é apresentado por todas estas amostras em 72 horas até concentrações até 125 $\mu\text{g/mL}$. Vale ressaltar que os resultados apresentados por Arbo29A063A e Arbo29A064C chegaram a 83% e 100% de larvas mortas respectivamente em concentrações de até 31,25 $\mu\text{g/mL}$, em 72 horas.

Figura 12 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24 -72 horas(1)



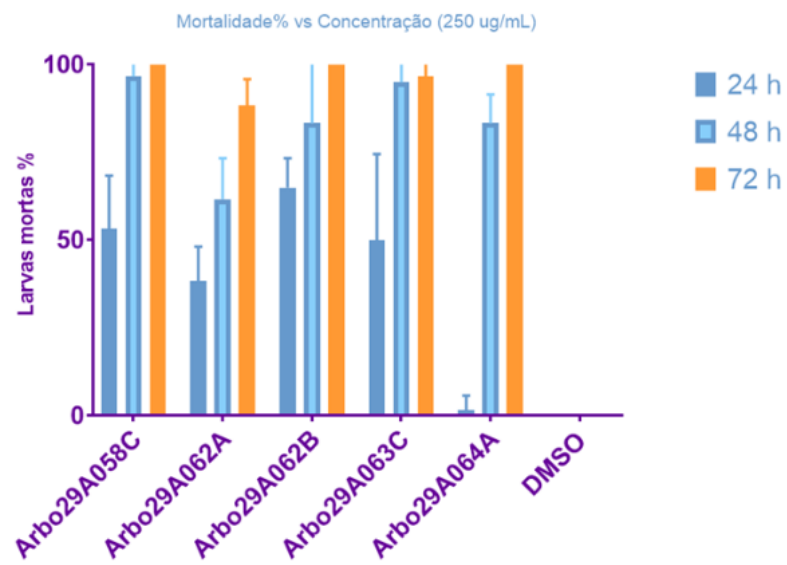
Fonte: próprio autor.

Figura 13 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24 -72 horas(2)



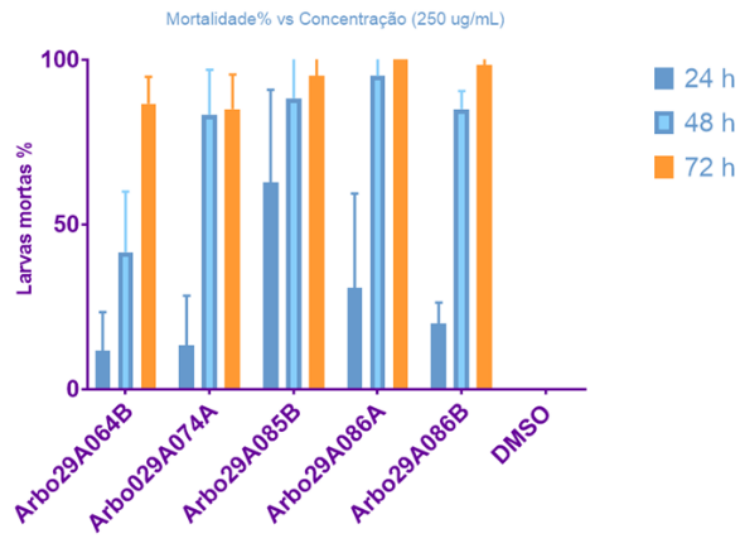
Fonte: próprio autor.

Figura 14 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24 -72 horas(3)



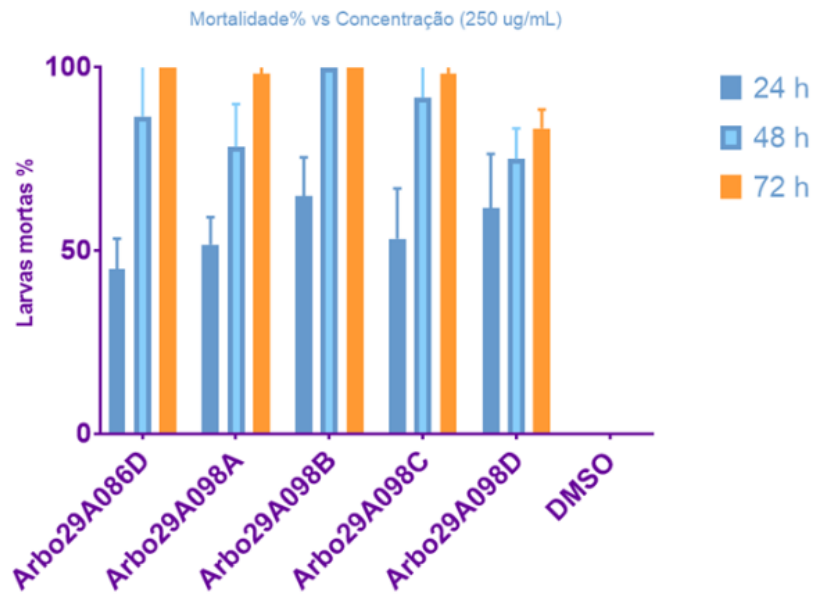
Fonte: próprio autor.

Figura 15 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24 -72 horas(4)



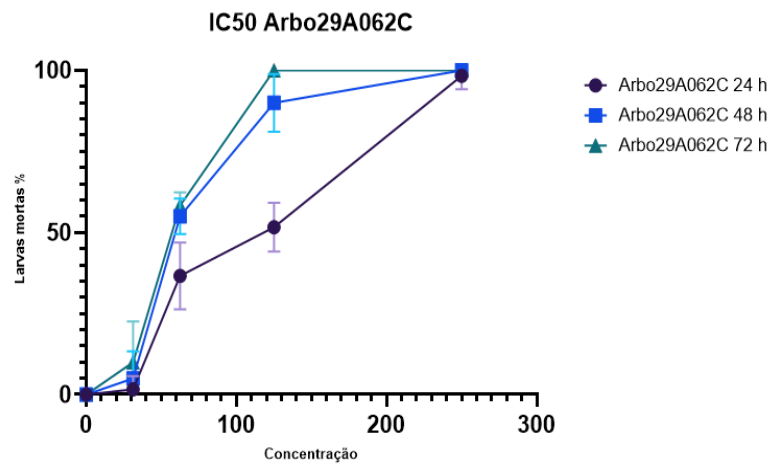
Fonte: próprio autor.

Figura 16 - Mortalidade de larvas L3 de amostras ativas em 24 -72 horas (5)



Fonte: próprio autor.

Figura 17 – Curva CL_{50} para *Ae. aegypti*: Arbo29A062C

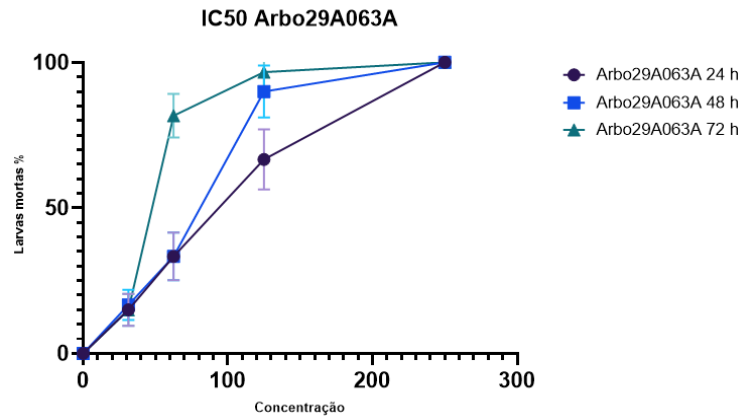


Fonte: próprio autor.

Tabela 5 – Dados da curva CL_{50} da amostra Arbo29A062C

	24h	48h	72h
IC₅₀	98,8	60,35	56,85
EC₅₀	± 5,885	± 1,532	± 1,376
IC 95%	87,18 - 111,8	57,29 - 63,63	53,91 - 59,72

Figura 18 - Curva CL₅₀ para *Ae. aegypti*: Arbo29A063A



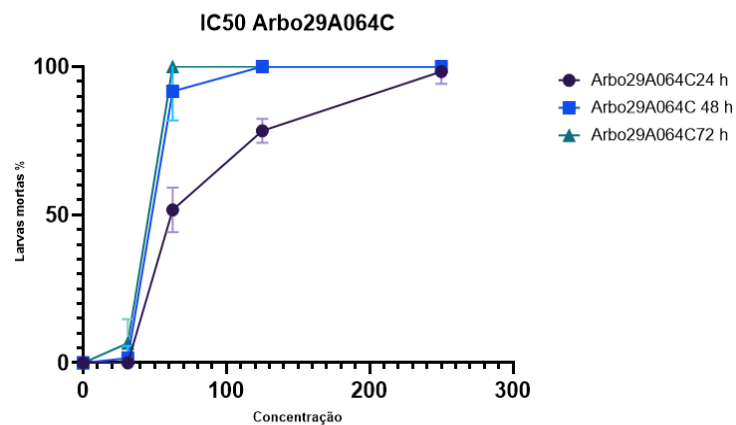
Fonte: próprio autor.

Tabela 6 – Dados da curva CL₅₀ da amostra Arbo29A063A.

	24h	48h	72h
IC₅₀	83,82	74,92	45,39
EC₅₀	± 3,65	± 2,88	± 0,94
IC 95%	76,5 - 91,7	69,19 - 80,97	43,51 - 47,35

Fonte: próprio autor.

Figura 19 - Curva CL₅₀ para *Ae. aegypti*: Arbo29A064C

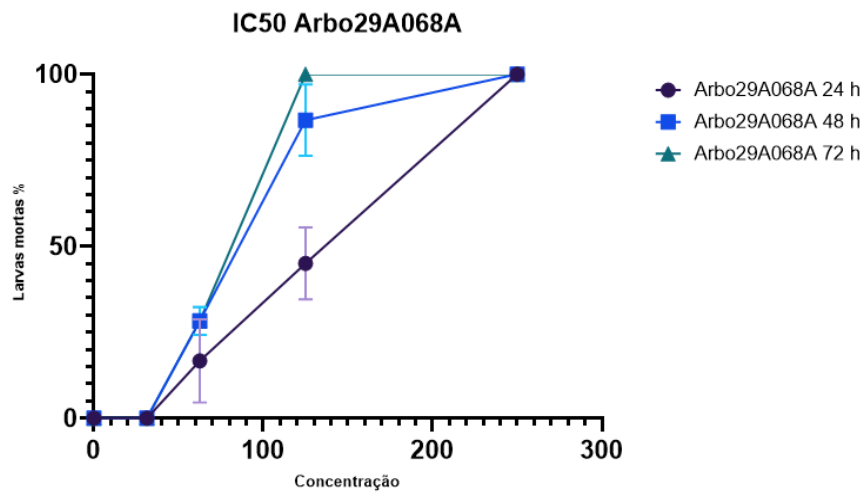


Fonte: próprio autor.

Tabela 7 - Dados da curva CL_{50} amostra Arbo29A064C

	24h	48h	72h
IC₅₀	62,43	46,42	45,06
EC₅₀	± 2,518	± 2,286	± 0,9569
IC 95%	62,3 - 73,16	43,14 - 47,07	45,59 - 47,25

Fonte: próprio autor.

Figura 20 - Curva CL_{50} para *Ae. aegypti*: Arbo29A068A

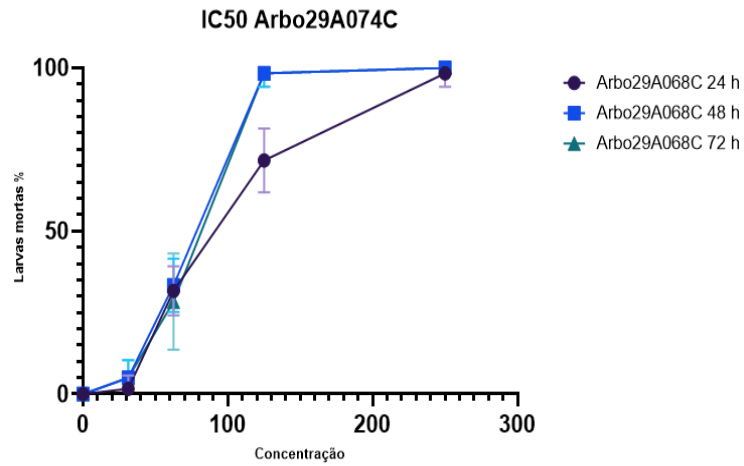
Fonte: próprio autor.

Tabela 8 - Dados da curva LC_{50} amostra Arbo29A068A

	24h	48h	72h
IC₅₀	125	78,65	64,21
EC₅₀	± 3,944	± 4,166	± 3,263
IC 95%	188,3 - 134,6	54,58 - 71,4	54,59 - 67,41

Fonte: próprio autor.

Figura 21 - Curva CL₅₀ para *Ae. aegypti*: Arbo29A074C



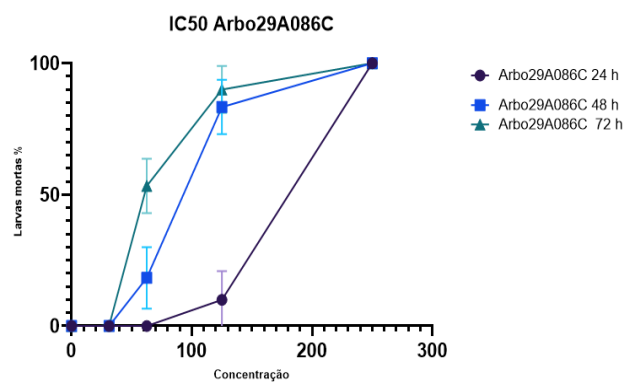
Fonte: próprio autor.

Tabela 9 - Dados da curva CL₅₀ amostra Arbo29A074C

	24h	48h	72h
IC₅₀	74,98	57,08	53,06
EC₅₀	± 2,769	± 1,592	± 2,912
IC 95%	67,53 - 83,82	51,15 - 64,2	45,6 - 62,04

Fonte: próprio autor.

Figura 22 - Curva CL₅₀ para *Ae. aegypti*: Arbo29A086C

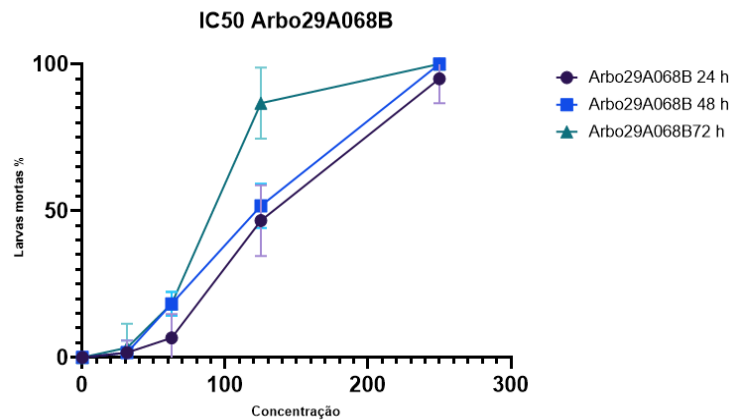


Fonte: próprio autor.

Tabela 10 - Dados da curva CL₅₀ amostra Arbo29A086C

	24h	48h	72h
IC₅₀	148,5	86,57	61,71
EC₅₀	± 6,06	± 1,939	± 0,8288
IC 95%	155 - 172	82,78 - 90,52	60,09 - 63,85

Fonte: próprio autor.

Figura 23 - Curva CL₅₀ para *Ae. aegypti*: Arbo29A068B

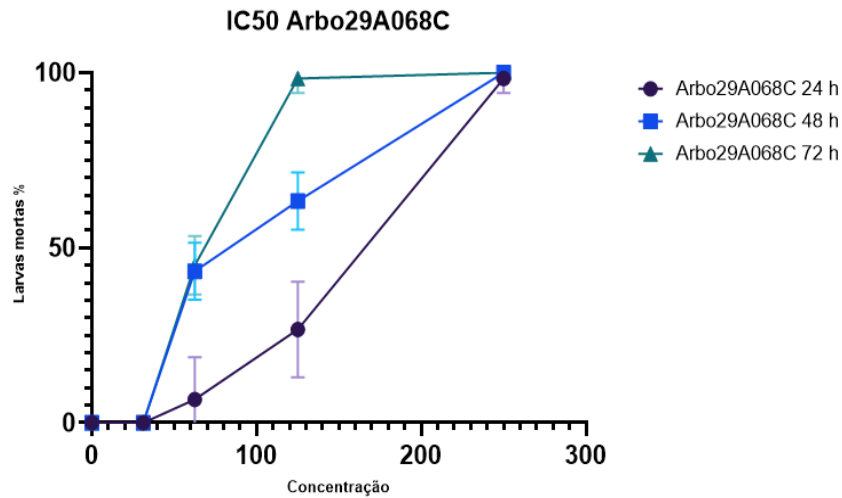
Fonte: próprio autor.

Tabela 11 - Dados da curva CL₅₀ amostra Arbo29A068B

	24h	48h	72h
IC₅₀	128,4	114,9	84,94
EC₅₀	± 3,699	± 3,439	± 2,482
IC 95%	120,9 - 136,3	107,6 - 122,3	80,03 - 90,16

Fonte: próprio autor.

Figura 24 - Curva CL₅₀ para *Ae. aegypti*: Arbo29A068C



Fonte: próprio autor.

Tabela 12 - Dados da curva CL₅₀ amostra Arbo29A068C

	24h	48h	72h
IC ₅₀	145,1	83,05	64,41
EC ₅₀	± 7,066	± 4,291	± 0,7876
IC 95%	99,41 - 161	55,43 - 74,13	44 - 54,12

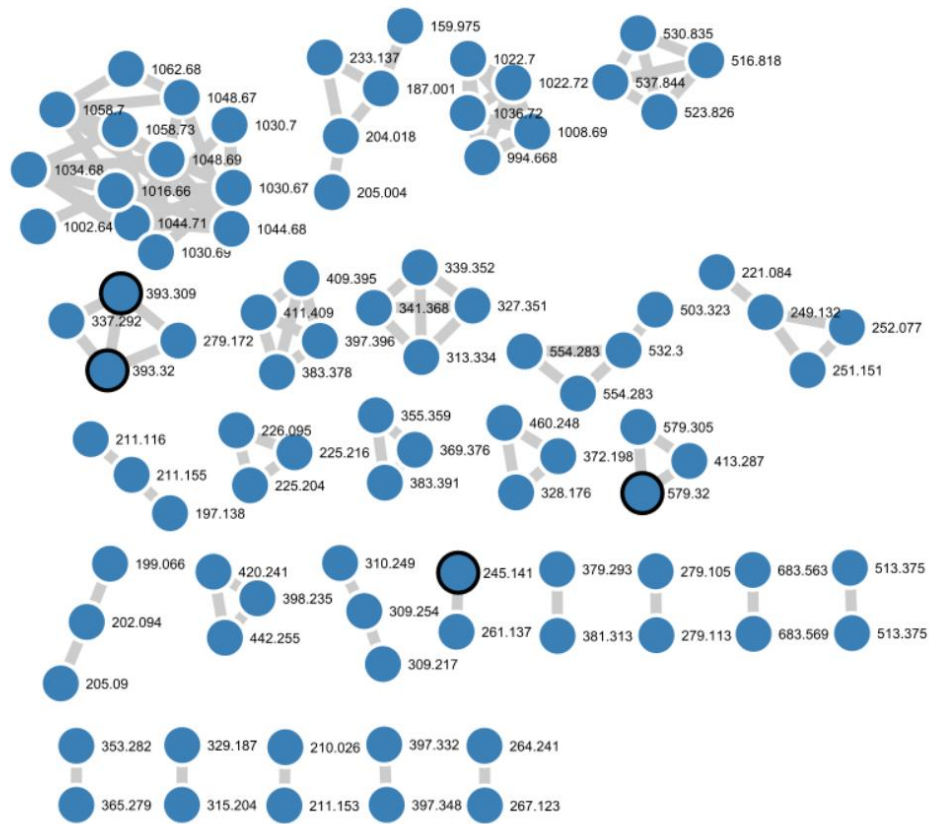
Fonte: próprio autor.

4.4 Avaliação por redes de similaridade espectral

Os extratos mais ativos em larvas em 24 horas, foram analisados por UPLC–MS/MS para anotação dos íons presentes. Esse processo permitiu uma melhor visualização dos dados ao gerar uma rede de similaridade espectral com agrupamentos (*clusters*) correspondentes a diferentes classes de compostos (Figura 25). Os agrupamentos são formados por nós, e as linhas de conexão constituem as arestas.

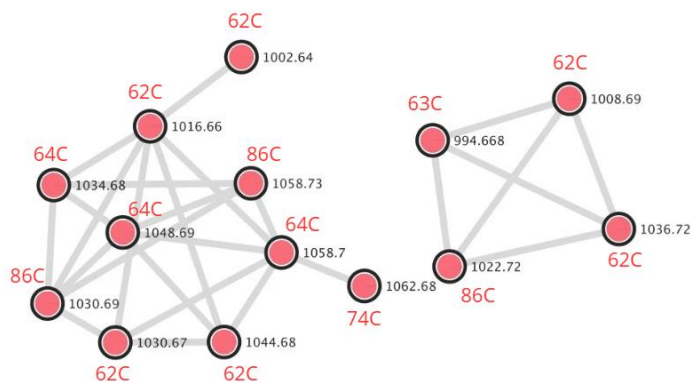
Neste estudo, a rede molecular total (MN), visualizada no Material Suplementar como Figura SM1, consistiu em 29 agrupamentos e 256 auto-laços (Task ID 06aa5d779c78495fad539a874e25dace). Foi possível anotar possíveis surfactinas (Figura 26) comparando seus espectros de massa com a biblioteca GNPS2.

Figura 25 - Rede de similaridade molecular dos extratos ativos obtida por análise UPLC-MS/MS e plataforma GNPS2 de extratos ativos em 24 horas.



Fonte: cytoscape.org

Figura 26 - Agrupamento de surfactinas por comparação espectral com a biblioteca GNPS2 apresentadas em análises de extratos ativos em 24 horas



Fonte: cytoscape.org

5 DISCUSSÃO

Previamente à discussão dos resultados, faz-se necessário salientar particularidades metodológicas que balizam a interpretação dos dados. Neste trabalho, os ensaios larvicidas foram conduzidos com base nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005), com adaptações. O protocolo da OMS recomenda o uso de copos descartáveis com 100 mL de solução e 25 larvas por réplica como método padrão. Neste estudo, optou-se por adaptar o ensaio para placas de 12 poços, contendo 3 mL de solução e 10 larvas por poço.

Essa miniaturização do ensaio é adotada em estudos de bioprospecção, pois permite maior número de réplicas, reduz a quantidade de amostra e aumenta a eficiência da triagem inicial, sem comprometer a confiabilidade dos resultados, desde que controles adequados sejam mantidos (SILVA et al., 2021; SOUSA et al., 2020; SILVÉRIO et al., 2025; DONALISIO et al., 2017; MORAIS et al., 2023). As concentrações testadas (250 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$), o tempo de exposição (24 a 72 horas) e a mortalidade no controle negativo mantida abaixo de 5% seguiram as recomendações da OMS (2005). A realização de seis experimentos independentes assegurou a robustez dos dados.

Os resultados obtidos evidenciam o potencial de metabólitos secundários produzidos por bactérias, especialmente do gênero *Bacillus*, como fontes promissoras de agentes bioinseticidas. Na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, 33 amostras (mais de 80%) apresentaram mortalidade superior a 80%, e oito amostras (20%) atingiram 100% de mortalidade em até 24 horas, com atividade mantida em concentrações menores. As amostras Arbo29A063A e Arbo29A064C destacaram-se, com valores de CL_{50} de 83,82 e 62,43 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas, reduzindo para valores inferiores a 46 $\mu\text{g/mL}$ em 72 horas. Comparativamente, estudos que utilizaram extração com acetato de etila apresentam resultados variáveis. Saravana Kumar et al. (2022) relataram CL_{50} de 84,7 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas, próximo aos valores observados neste estudo. Por outro lado, Nabar & LokeGaonkar (2015) reportaram CL_{50} superiores a 150 $\mu\text{g/mL}$ para extratos de *Bacillus*, reforçando a variabilidade associada à origem dos isolados e às condições experimentais.

Embora muitos estudos utilizem extratos com diferentes níveis de purificação, algumas comparações são possíveis. Falqueto et al. (2021) observaram CL_{50} entre 110 e 120 $\mu\text{g/mL}$ para *Bacillus velezensis*, enquanto toxinas isoladas de *Bacillus subtilis* apresentaram CL_{50} próximas de 34 $\mu\text{g/mL}$ (GEETHA & MANONMANI, 2008), sugerindo influência da espécie e do grau de purificação. Assim, os extratos brutos do Cerrado apresentam desempenho competitivo, mesmo com baixo nível de processamento.

Resultados ainda mais expressivos foram descritos por Kim et al. (2022), com CL_{50} de 1,2 $\mu\text{g/mL}$, utilizando extração combinada (pellet + sobrenadante), evidenciando o papel da sinergia entre metabólitos intra e extracelulares. Esse padrão também foi observado em estudos com *Bacillus* amazônicos (KATAK et al., 2021). Esses dados sugerem uma relação entre a eficácia larvicida e o grau de purificação, bem como com a interação entre diferentes classes de metabólitos. Nesse contexto, o fracionamento dos extratos torna-se essencial para identificar os compostos responsáveis pela atividade observada.

A elevada proporção de extratos ativos no presente estudo (84,6%) supera valores reportados para outros ambientes, como bactérias marinhas (Moreira et al., 2022; Prashar et al., 2025). Esse resultado sugere que o nicho ecológico influencia diretamente o potencial biossintético dos microrganismos. A análise da origem das amostras revelou que os isolados mais ativos foram obtidos da superfície foliar de *Diospyros lasiocalyx* e *Glycine max*, indicando que tanto espécies nativas quanto cultivadas podem abrigar microrganismos com potencial inseticida. A filosfera emerge, portanto, como um microambiente relevante para a seleção de linhagens metabolicamente especializadas.

A caracterização molecular confirmou que todas as cepas pertencem ao gênero *Bacillus*, grupo reconhecido pela produção de metabólitos bioativos. A proximidade filogenética com o complexo *B. subtilis* / *B. velezensis* / *B. amyloliquefaciens* sugere associação com a produção de lipopeptídeos, como surfactinas, iturinas e fengicinas.

A análise por molecular networking (GNPS2) indicou a presença de surfactinas nos extratos mais ativos, especialmente nas amostras Arbo29A062C e Arbo29A064C. Esses compostos são conhecidos por sua capacidade de desestabilizar membranas biológicas, o que pode explicar a atividade larvicida observada. Além disso, foram detectadas dicetopiperazinas (DKPs), ampliando o espectro de metabólitos envolvidos. Apesar dos resultados promissores, algumas limitações devem ser consideradas. A produção bacteriana sem controle rigoroso de temperatura pode ter influenciado o perfil metabólico. Além disso, o uso de extratos brutos impede a identificação inequívoca dos compostos ativos e a avaliação de efeitos sinérgicos ou antagonísticos. A anotação química por GNPS2, embora útil para triagem, não substitui a confirmação estrutural por técnicas como RMN e espectrometria de massas com padrões autênticos. Adicionalmente, a ausência de ensaios ecotoxicológicos e de testes em condições de campo limita a avaliação da segurança e aplicabilidade dos extratos.

Por fim, a exploração da biodiversidade do Cerrado mostrou-se estratégica, revelando microrganismos com elevado potencial biotecnológico. A conservação desse bioma é

fundamental para a manutenção de recursos genéticos com potencial aplicação em saúde pública.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A continuidade deste trabalho deve contemplar abordagens integradas voltadas à validação e ao desenvolvimento tecnológico dos extratos ativos. As principais perspectivas incluem:

- Fracionamento guiado por bioensaios: isolamento dos compostos ativos por técnicas cromatográficas, orientado por ensaios biológicos, visando à identificação inequívoca das moléculas responsáveis pela atividade larvicida.
- Elucidação estrutural: confirmação das estruturas químicas por técnicas complementares, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas, preferencialmente com o uso de padrões autênticos.
- Ensaios ecotoxicológicos: avaliação da toxicidade dos extratos e dos compostos isolados em organismos não alvo (como peixes, microcrustáceos e polinizadores), com o objetivo de determinar sua seletividade e segurança ambiental.
- Estudos de estabilidade: investigação da degradação dos extratos sob diferentes condições (temperatura, pH e exposição à radiação UV), a fim de estimar sua meia-vida ambiental e sua adequação para formulações comerciais.
- Sinergismo com inseticidas convencionais: avaliação de possíveis interações sinérgicas entre os extratos e inseticidas já utilizados, com o intuito de reduzir doses e mitigar o desenvolvimento de resistência.
- Escalonamento da produção: desenvolvimento de protocolos de cultivo em biorreatores para produção em larga escala dos metabólitos de interesse, assegurando a consistência química e biológica entre os lotes.
- Testes em campo: validação da eficácia em condições reais de aplicação, considerando variáveis ambientais e a dinâmica populacional do vetor.

7 CONCLUSÃO

A prospecção biológica demonstrou que extratos brutos de bactérias nativas do Cerrado apresentam atividade biológica relevante. No ensaio larvicida, a maioria dos extratos causou mortalidade superior a 80% em larvas L3 de *Ae. aegypti* após 72 horas. Dentre eles, oito extratos destacaram-se por induzir esse efeito letal já nas primeiras 24 horas de exposição. A determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) para esses extratos confirmou sua elevada potência, com destaque para as amostras Arbo29A063A e Arbo29A064C, que apresentaram os menores valores, inferiores a 50 µg/mL em 72 horas.

A identificação molecular das linhagens bacterianas, realizada por sequenciamento do gene 16S rRNA, confirmou que todas as cepas produtoras dos extratos ativos pertencem ao gênero *Bacillus*. Adicionalmente, a caracterização química preliminar, por meio de molecular networking (GNPS2), nos extratos mais ativos permitiu a anotação de lipopeptídeos da família das surfactinas, estabelecendo uma correlação inicial entre o perfil químico e o efeito biológico observado.

A análise da origem das amostras mais ativas revelou possíveis padrões ecológicos. As cepas com atividade larvicida (Arbo29A062C, Arbo29A063A, Arbo29A064C, Arbo29A074C, Arbo29A086C, Arbo029A068A, Arbo029A068B e Arbo029A068C) foram isoladas de folhas de *Diospyros lasiocalyx* (espécie nativa do Cerrado) e de *Glycine max* (soja). Esses achados indicam que tanto a vegetação nativa quanto espécies não nativas, mas adaptadas ao bioma, podem abrigar microrganismos com potencial inseticida. Essa atividade sugere que nichos ecológicos específicos, como a superfície foliar, podem selecionar linhagens bacterianas com perfis metabólicos especializados, inclusive em espécies cultivadas, como a soja. Esses resultados reforçam a importância de explorar diferentes microambientes do Cerrado na prospecção de compostos bioativos.

Como perspectivas derivadas deste trabalho, recomenda-se a purificação e a elucidação estrutural completa dos lipopeptídeos anotados, especialmente das surfactinas, bem como a avaliação de sua atividade larvicida de forma isolada. A análise da toxicidade seletiva dos compostos purificados em organismos não alvo e em modelos celulares é uma etapa essencial para validar sua segurança. Investigações futuras devem também focar na elucidação do modo de ação larvicida e na avaliação de possíveis efeitos sinérgicos com inseticidas convencionais.

Os resultados obtidos posicionam os extratos de *Bacillus* spp. do Cerrado, especialmente as amostras Arbo29A063A e Arbo29A064C, como candidatos promissores ao desenvolvimento de bioinseticidas. Considerando a escala Technology Readiness Level (TRL), este estudo situa-se entre os níveis TRL 2 (formulação do conceito tecnológico) e TRL 3 (prova

de conceito experimental), uma vez que a atividade biológica foi demonstrada em condições controladas de laboratório, sem validação em ambiente semi-campo ou desenvolvimento de formulação.

Para avançar nessa escala, as próximas etapas incluem: (i) fracionamento bio-orientado dos extratos mais ativos, visando ao isolamento e à identificação estrutural dos compostos responsáveis pela atividade (por RMN e espectrometria de massas de alta resolução); (ii) ensaios de toxicidade seletiva em organismos não alvo; (iii) avaliação da estabilidade dos extratos sob diferentes condições de armazenamento e exposição ambiental; (iv) desenvolvimento de formulações que aumentem a persistência e a eficácia em campo; e (v) testes em condições simuladas de campo para validação pré-comercial. O potencial larvicida desses extratos agrega valor biotecnológico e abre perspectivas para aplicações mais amplas, incluindo o controle de patógenos de relevância médica e agrícola.

Em síntese, esta dissertação demonstra que bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas do bioma Cerrado, produzem metabólitos secundários com atividade larvicida significativa contra *Ae. aegypti*. Os resultados validam o potencial desses microrganismos nativos para a bioprospecção e reforçam a importância estratégica da conservação da biodiversidade do Cerrado como fonte sustentável de inovações biotecnológicas voltadas ao enfrentamento de desafios em saúde pública.

8 REFERÊNCIAS

1. ADENIS, A. A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, Oxford, v. 18, n. 10, p. 1150-1159, Oct. 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30354-2.
2. ALBERNAZ, L. C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 131, n. 2, p. 336-342, Sept. 2010. DOI: 10.1016/j.jep.2010.06.011.
3. ALNAHARI, A. A. et al. Evaluating bioassay efficacy of extremophile bacillus species for environmentally safe control of *Aedes aegypti* larvae. *Scientific Reports*, London, v. 15, n. 1, p. 24469, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-99513-8.
4. ALTHOFF, R. A.; HUIJBEN, S. Comparison of the variability in mortality data generated by CDC bottle bioassay, WHO tube test, and topical application bioassay using *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, London, v. 15, n. 476, 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05583-2.
5. ARON, A. T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, London, v. 15, n. 6, p. 1954-1991, 2020.
6. ARSHAD, H. et al. Identification and structural analysis of a surface layer protein from *Geobacillus thermopakistanensis* MAS1: highlighting its larvicidal potential against *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *International Journal of Biological Macromolecules*, Guildford, v. 315, part 2, p. 144307, 2025.
7. BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian Journal of Medical Research*, New Delhi, v. 139, p. 195-204, 2014.
8. BARIK, Tapan Kumar et al. Impact of insecticide resistance on controlling mosquito vectors and its potential contribution to behavioural modifications. *Malaria Journal*, London, v. 25, n. 1, p. 25, 5 Dec. 2025. DOI: 10.1186/s12936-025-05294-w.
9. BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005. DOI: 10.1038/ja.2005.1.
10. BOBEK, J. et al. Polyenic Antibiotics and Other Antifungal Compounds Produced by Hemolytic *Streptomyces* Species. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 23, n. 23, p. 15045, Nov. 2022.
11. BOLFE, É. L. et al. Matopiba em crescimento agrícola: aspectos territoriais e socioeconômicos. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, v. 25, n. 4, p. 38-62, 2017.

- Disponível em: <https://rpa.sede.embrapa.br/RPA/article/view/1202>. Acesso em: 14 abr. 2025.
12. BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*, Basel, v. 3, n. 4, p. 57, 2017. DOI: 10.3390/jof3040057.
 13. BOYCE, R. et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, Oxford, v. 18, n. 5, p. 564-577, 2013.
 14. BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Brasília, 2025. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/>. Acesso em: 12 jun. 2025.
 15. BRASIL. Ministério da Saúde. Informe epidemiológico das arboviroses no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude>. Acesso em: 11 mar. 2025.
 16. BRASIL. Ministério da Saúde. Painel de monitoramento das arboviroses: dengue. Brasília, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue/painel-de-monitoramento>. Acesso em: 16 ago. 2025.
 17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Candidíase Sistêmica: Situação Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiase-sistematica/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 2025.
 18. BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, Washington, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004404.
 19. BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. (ed.). *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill Education, 2011.
 20. BUSTAMANTE, M. M. C. et al. Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 72, n. 3, p. 655–671, 2012.
 21. CASTRO, Alinne Pereira de et al. Microbial diversity in Cerrado biome (neotropical savanna) soils. *PLoS One*, San Francisco, v. 11, n. 2, p. e0148785, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0148785.

22. CODEÇO, C. T. et al. Infodengue: a nowcasting system for the surveillance of arboviruses in Brazil. *Nature Communications*, London, v. 9, 2018.
23. COLOMBO, A. L. et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Berlin, v. 22, p. 470-474, 2003.
24. DANTAS, S. B. S.; ALVES, F. A. M.; CHAPLA, V. M. Chemical, diversity and biotechnological potential of endophytic fungi isolated from Brazilian Cerrado plants. *Biota Neotropica*, Campinas, v. 21, n. 2, p. e20201069, 2021. DOI: 10.1590/1676-0611-BN-2020-1069.
25. DEMAÏN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009. DOI: 10.1038/ja.2008.16.
26. DIZON, K. et al. Insecticidal potential of *Streptomyces* spp. against dengue mosquito, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). *Philippine Journal of Science*, Manila, v. 153, n. 1, 2024.
27. DONALISIO, M. R. C.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 51, p. 30, 2017.
28. DULGER, G.; DULGER, B. Antifungal Activity of Soil *Streptomyces* Isolates Against *Cryptococcus neoformans*. *Düzce University Journal of Science & Technology*, Düzce, v. 9, p. 591-595, 2021. DOI: 10.29130/dubited.862551.
29. DURIC, Kemal et al. Studying mass balance and the stability of (Z)-ligustilide from *Angelica sinensis* helps to bridge a botanical instability–bioactivity chasm. *Journal of Natural Products*, Washington, DC, v. 82, n. 9, p. 2400–2408, set. 2019. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00962.
30. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Dengue worldwide overview. Stockholm: ECDC, 2024. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>. Acesso em: 2025.
31. FAÇANHA, A. C. M. et al. Bacteria from the Brazilian Savanna as growth promoters in upland rice. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 55, p. e83152, 2025. DOI: 10.1590/1983-40632025v5583152.
32. FALQUETO, S. A. et al. *Bacillus* spp. metabolites are effective in eradicating *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 179, p. 107525, 2021.

33. FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, New York, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018. DOI: 10.1126/science.aap7999.
34. FORATTINI, O. P. *Culicidologia médica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. v. 2.
35. GARCIA, L. F. A.; CORREIA, M. V. A madeira como fonte de larvicidas naturais contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, v. 43, e202002174, 2023. DOI: 10.4336/2023.pfb.43e202002174. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/2174>. Acesso em: 15 jun. 2026.
36. GEETHA, I.; MANONMANI, A. M. Mosquito pupicidal toxin production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. *Biological Control*, Orlando, v. 44, n. 2, p. 242-247, 2008. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2007.10.007.
37. GENILLOUD, O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, London, v. 34, n. 10, p. 1203-1232, 2017. DOI: 10.1039/C7NP00026J.
38. HOENIGL, M. et al. The emergence of COVID-19 associated mucormycosis: a review of cases from 18 countries. *The Lancet Microbe*, Oxford, v. 3, n. 7, p. e543-e552, 2022. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00237-8.
39. HSU, A. J. et al. Pipeline of Novel Antifungals for Invasive Fungal Disease in Transplant Recipients: A Pediatric Perspective. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, Oxford, v. 13, suplemento 1, p. S68-S77, 2024. DOI: 10.1093/jpids/piad115.
40. ICMBIO. Cerrado. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/cerrado>. Acesso em: 18 mar. 2025.
41. INFODENGUE. Sistema de alerta para arboviroses no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Getulio Vargas, [2025]. Disponível em: <https://info.dengue.mat.br/>. Acesso em: 16 nov. 2025.
42. KATAK, R. M. et al. Larvicidal Activities against *Aedes aegypti* of Supernatant and Pellet Fractions from Cultured *Bacillus* spp. Isolated from Amazonian Microenvironments. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, Basel, v. 6, n. 2, p. 104, 2021. DOI: 10.3390/tropicalmed6020104.
43. KIM, Seong Jong et al. *Streptomyces distallicus*, a potential microbial biolarvicide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 70, n. 36, p. 11274–

- 11280, 2022. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c03537. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03537>. Acesso em: 21 mar. 2025.
44. LEES, R. et al. Unpacking WHO and CDC Bottle Bioassay Methods: A Comprehensive Literature Review and Protocol Analysis Revealing Key Outcome Predictors. *Gates Open Research*, London, v. 8, 2024. DOI: 10.12688/gatesopenres.16123.1.
45. LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 64, n. 2, p. 134-140, 2017. DOI: 10.1093/cid/ciw691.
46. LUKOSE, J. et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* VCRC B650 culture filtrate useful for mosquito oviposition attractant and larvicidal action. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, 2023.
47. MACORIS, M. L. G. et al. Standardization of Bioassays for Monitoring Resistance to Insecticides in *Aedes aegypti*. *Dengue Bulletin*, New Delhi, v. 29, p. 176-182, dec. 2005. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/164040>. Acesso em: 12 mar. 2025.
48. MADDURI, M.; RUDRAMURTHY, S. M.; ROY, U. *Bacillus*-derived lipopeptides inhibit and eradicate *Candida tropicalis* Biofilms: An in vitro exploration. *Biofilm*, Amsterdam, v. 10, p. 100294, June 2025. DOI: 10.1016/j.bioflm.2025.100294.
49. MEDEIROS, S. M. F. R. S. et al. Prevalence of invasive yeast infections in a COVID-19 intensive care unit in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 58, p. e13915, 2025.
50. MIRANDA, S. C. et al. Regional variations in biomass distribution in the Brazilian Cerrado. *Biotropica*, Hoboken, v. 46, n. 2, p. 125-138, 2014.
51. MNIF, I.; GHRIBI, D. Lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers*, New York, v. 104, n. 3, p. 129-147, 2015. DOI: 10.1002/bip.22630.
52. MORAIS, L. S. et al. Edible plant extracts against *Aedes aegypti* and validation of a *Piper nigrum* L. ethanolic extract as a natural insecticide. *Molecules*, Basel, v. 28, n. 3, p. 1-17, 2023. DOI: 10.3390/molecules28031264.
53. MOREIRA, B. T. Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/2149>. Acesso em: 15 abr. 2025.

54. MOREIRA, E. A. et al. Marine Bacteria from the Southeast Coast of Brazil as a Source of Insecticidal Compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 32, p. 724-733, 2022. DOI: 10.1007/s43450-022-00293-3.
55. MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, London, v. 403, p. 853–858, 2000.
56. NABAR, G. M.; LOKEGAONKAR, S. P. Larvicidal activity of metabolites of extremophilic bacteria against against vector mosquitoes. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 3, n. 2, p. 56–60, 2015.
57. NAGHDIFAR, S.; MADANI, M.; SHAKIB, P. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* M13-RW0 from Soil and Evaluation of its Antifungal Activity. *Current Drug Discovery Technologies*, Hilversum, v. 20, n. 4, e190423216028, 2023. DOI: 10.2174/1570163820666230419090347.
58. NIÑO-VEGA, G. A.; PADRÓ-VILLEGAS, L.; LÓPEZ-ROMERO, E. New Ground in Antifungal Discovery and Therapy for Invasive Fungal Infections: Innovations, Challenges, and Future Directions. *Journal of Fungi*, Basel, v. 10, n. 12, p. 871, 2024. DOI: 10.3390/jof10120871.
59. NISHIMOTO, A. T. et al. In vitro activities of the novel investigational tetrazoles VT-1161 and VT-1598 compared to the triazole antifungals against azole-resistant strains and clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 63, n. 6, p. e00341-19, June 2019. DOI: 10.1128/AAC.00341-19.
60. NOTHIAS, L.-F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, New York, v. 17, n. 9, p. 905-908, set. 2020. DOI: 10.1038/s41592-020-0933-6.
61. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological Update: Neurological syndrome, congenital anomalies, and Zika virus infection. 17 January 2016. Washington, D.C.: PAHO/WHO, 2016.
62. PEARCE, Fred. The Cerrado: Brazil's other biodiversity hotspot loses ground. *Yale Environment* 360, 2011. Disponível em: https://e360.yale.edu/features/the_cerrado_brazils_other_biodiversity_hotspot_loses_ground. Acesso em: 5 abr. 2025.
63. PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. *Nature Reviews Drug Discovery*, London, v. 16, n. 9, p. 603-616, 2017. DOI: 10.1038/nrd.2017.46.

64. PESSOA, R. et al. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in Pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue virus type 1. *Medicine*, Baltimore, v. 95, n. 12, p. e3201, 2016.
65. PETRAS, D. et al. GNPS Dashboard: collaborative exploration of mass spectrometry data in the web browser. *Nature Methods*, New York, v. 19, n. 2, p. 134-136, 2022.
66. POMBO, A. P. M. M. *Aedes aegypti*: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo. 2016. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
67. PRASHAR, C. et al. Potent targeted larvicidal activities of marine-derived *Bacillus* sp. bacterial extracts on mosquito vectors. *Scientific Reports*, London, 2025.
68. PRAULINS, G. et al. Reviewing the WHO Tube Bioassay Methodology: Accurate Method Reporting and Numbers of Mosquitoes Are Key to Producing Robust Results. *Insects*, Basel, v. 13, n. 6, p. 544, 2022. DOI: 10.3390/insects13060544. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4450/13/6/544>. Acesso em: 12 mar. 2025.
69. PUUMALA, E. et al. Advancements and Challenges in Antifungal Therapeutic Development. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 37, n. 1, p. e00142-23, 2024. DOI: 10.1128/cmr.00142-23.
70. RAAFAT, D. et al. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008. DOI: 10.1128/AEM.00453-08.
71. RAMESH, S. et al. A promising antifungal lipopeptide from *Bacillus subtilis*: its characterization and insight into the mode of action. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 108, n. 1, p. 161, 2024. DOI: 10.1007/s00253-023-12976-5.
72. REVATHI, K. et al. Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, San Diego, v. 107, n. 3, p. 369-376, 2013. DOI: 10.1016/j.pestbp.2013.10.005.
73. SANTHOSHKUMAR, T. et al. Biological synthesis of nickel nanoparticles using extracellular metabolites of *Bacillus sphaericus*: Characterization and vector-borne disease control applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Amsterdam, 2023.
74. SANTOS, E. V. et al. Análise da legislação ambiental brasileira para proteção das veredas. *Revista de Geografia*, Recife, v. 38, n. 1, p. 365-388, 2021. DOI: 10.51359/2238-6211.2021.247491.

75. SARAVANA KUMAR, Pachaiyappan et al. Bio-efficacy of soil actinomycetes and an isolated 1,2-benzenedicarboxylic acid from *Nonomuraea* sp. against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, New York, v. 194, n. 10, p. 4765–4782, 2022. DOI: 10.1007/s12010-021-03766-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03766-8>. Acesso em: 21 mar. 2026.
76. SAYED, A. M. et al. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 128, n. 3, p. 630-657, 2020. DOI: 10.1111/jam.14386.
77. SILVA, M. V. S. G. et al. Essential oil from leaves of *Eugenia calycina* Cambes: natural larvicidal against *Aedes aegypti*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 101, n. 3, p. 1202-1208, 2021.
78. SILVA, R. L. et al. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 178, p. 114568, 2022. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114568.
79. SILVÉRIO, M. et al. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. *Molecules*, Basel, v. 25, n. 15, p. 3484, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25153484>. Acesso em: 2025.
80. SOARES, A. C. S. et al. Ameaças e oportunidades para a conservação da biodiversidade e uso sustentável nas zonas de amortecimento de parques nacionais no Cerrado brasileiro. *Sustentabilidade*, [S.l.], v. 17, n. 14, p. 6597, 2025.
81. SOARES-DA-SILVA, J. et al. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 59, n. 1, p. 1-6, 2015. DOI: 10.1016/j.rbe.2015.02.001.
82. SONG, B. et al. Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 97, n. 14, p. 7141-7150, 2013.
83. SOUSA, F. D. M. et al. Dereplication and isolation of larvicidal compounds from Annonaceae species against *Aedes aegypti*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 123-126, 2020.
84. STEVENSON, P. C. et al. Novel agmatine derivatives in *Maerua edulis* with bioactivity against *Callosobruchus maculatus*, a cosmopolitan storage insect pest. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, v. 9, p. 1506, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01506. Disponível

- em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01506/full>. Acesso em: 16 jun. 2025.
85. TAFF, H. T. et al. Mechanisms of Candida biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, London, v. 8, n. 10, Oct. 2013. DOI: 10.2217/fmb.13.101. PubMed PMID: 24020743; PubMed Central PMCID: PMC3765315.
 86. THEODORO, P. N. E. T. Atividade antifúngica de tanino isolado de planta do Cerrado. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
 87. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Bti for Mosquito Control. Washington, DC: EPA, 5 jul. 2016. Disponível em: <https://www.epa.gov/mosquitocontrol/bti-mosquito-control>. Acesso em: 4 mar. 2025.
 88. TSAY, S. V. et al. Burden of candidemia in the United States, 2017. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 71, n. 9, p. e449-e453, Nov. 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa193.
 89. VIANA, J. L. et al. Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 81, n. 1, p. 114-124, 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.225717.
 90. WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, New York, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.
 91. WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and Drug Resistance*, Auckland, v. 10, p. 249-259, 2017. DOI: 10.2147/IDR.S124918.
 92. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Geneva: WHO, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 21 nov. 2025.
 93. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: WHO, 2005. (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-WHOPES-GCDPP-2005.13>. Acesso em: 16 jan. 2025.
 94. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report 2023. Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>. Acesso em: 11 mar. 2025.
 95. WORLD MOSQUITO PROGRAM. World Mosquito Day 2025 - A global health crisis. Escrito por Alex Jackson. Publicado em: 11 ago. 2025. Disponível em:

<https://www.worldmosquitoprogram.org/news-stories/world-mosquito-day-2025-global-health-crisis>. Acesso em: 19 ago. 2025.

96. ZARE, A. et al. Evaluating the larvicidal effect of *Bacillus Thuringiensis* M-H-14 on *Aedes aegypti* larvae under laboratory and semi-field conditions in Southern Iran. *Scientific Reports*, London, v. 15, n. 1, p. 43052, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-26966-2.
97. ZHAO, H. et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* against *Candida albicans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 101, n. 20, p. 7551-7560, 2017. DOI: 10.1007/s00253-017-8396-0.
98. ZIMBRES, Barbara et al. Savanna vegetation structure in the Brazilian Cerrado allows for the accurate estimation of aboveground biomass using terrestrial laser scanning. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v. 458, p. 117798, 2020.