

**EFEITO DO ÓLEO DE NIM NA VIRULÊNCIA E PERSISTÊNCIA  
DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*  
CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti***

**JONATHAN WILLIAM ALVES BASTOS DOS SANTOS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – 2016**

**EFEITO DO ÓLEO DE NIM NA VIRULÊNCIA E PERSISTÊNCIA  
DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*  
CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti***

**JONATHAN WILLIAM ALVES BASTOS DOS SANTOS**

Orientador: Adriano Rodrigues de Paula.

Coorientador: Richard Ian Samuels.

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – 2016**

Santos, Jonathan Willian Alves Bastos dos

Efeito do óleo de nim na virulência e persistência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas *Aedes aegypti* / Jonathan Willian Bastos dos Santos. – Campos dos Goytacazes, 2016.

63 f.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Adriano Rodrigues de Paula.

Área de concentração: Fitossanidade.

Bibliografia: f. 1-44.

1. CONTROLE BIOLÓGICO 2. MOSQUITO COMO TRANSMISSOR DE DOENÇAS 3. VETOR 4. FUNGOS I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia II. Título

CDD 595.7

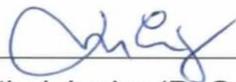
**EFEITO DO ÓLEO DE NIM NA VIRULÊNCIA E PERSISTÊNCIA  
DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*  
CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti***

**JONATHAN WILLIAN ALVES BASTOS DOS SANTOS**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 07 de Março de 2016.

Comissão Examinadora:



Dr. Milton Erthal Junior (D. Sc., Produção Vegetal) – IFF



Prof. Francisco José Alves Lemos (D.Sc., Ciências Biológicas) - UENF



Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D., Patologia de Insetos) – UENF  
(Coorientador)



Prof. Adriano Rodrigues de Paula (D.Sc., Produção Vegetal - Entomologia) –  
UENF (Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço a Deus por tudo que Ele tem feito na minha vida;
- Ao Dr. Adriano pela orientação e pelo apoio durante todo esse estudo;
- Ao prof. Dr. Richard pela coorientação e oportunidades;
- Ao Anderson e Leila pelo auxílio na criação dos mosquitos e produção do fungo entomopatogênico;
- Agradeço aos meus pais Raimundo e Célia e ao meu irmão Johny pela compreensão e a toda minha família por tudo que eles contribuíram na minha vida;
- Agradeço também à minha tia Maria José por todo apoio, incentivo e por toda colaboração que fez durante este período e por estar presente nos momentos mais difíceis, obrigado!
- Agradeço ao pessoal do LEF pela amizade. Muito obrigado!

## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>iv</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>vi</b> |
| <b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.1 - MORFOLOGIA E BIOLOGIA DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....</b>                            | <b>4</b>  |
| <b>2.2 – DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....</b>                           | <b>6</b>  |
| Doença Dengue .....  | 6         |
| Doença Febre Amarela.....  | 8         |
| Doença Chikungunya.....  | 9         |
| Doença Zika .....  | 10        |
| <b>2.3 - MÉTODOS DE CONTROLE DE INSETOS .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2.4 - UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O<br/>CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i>.....</b> | <b>15</b> |
| <b>2.5 - PRODUTOS NATURAIS PARA O CONTROLE DE INSETOS.....</b>                                       | <b>18</b> |
| <b>2.6 - UTILIZAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL DE NIM PARA CONTROLE DE<br/>INSETOS.....</b>                     | <b>20</b> |
| <b>3.0 – Hipótese .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>4.0 - OBJETIVOS GERAIS .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>5.0 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>25</b> |

|  |    |
|--|----|
| 5.1 - CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> SELVAGENS.....  | 25 |
| 5.2 - CULTIVO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO .....  | 26 |
| 5.3 - PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO DE NIM .....   | 26 |
| 5.4 - ENSAIO DE GERMINAÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> COMBINADO COM ÓLEO DE NIM .....  | 27 |
| 5.5 - ENSAIO DE CRESCIMENTO RADIAL DE <i>Metarhizium anisopliae</i> COMBINADO COM ÓLEO DE NIM.....   | 27 |
| 5.6 – PROTOCOLO DE TESTES COM FUNGO E/OU ÓLEO DE NIM.....  | 28 |
| 5.6.1 - AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE <i>Metarhizium anisopliae</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....                               | 28 |
| 5.6.2 - AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> EXPOSTAS AO ÓLEO DO NIM .....   | 28 |
| 5.6.3 - AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DA COMBINAÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> COM ÓLEO DE NIM CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> ..... | 29 |
| 5.6.4 - AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA COMBINAÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....               | 29 |
| 5.7 - ANÁLISE DOS RESULTADOS .....   | 30 |
| 6.0 – RESULTADOS.....  | 31 |
| 6.1 - ENSAIO DE GERMINAÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> COMBINADO COM ÓLEO DE NIM .....  | 31 |
| 6.2 - ENSAIO DE CRESCIMENTO RADIAL DE <i>Metarhizium anisopliae</i> COMBINADO COM ÓLEO DE NIM.....   | 32 |
| 6.3 - AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE <i>Metarhizium anisopliae</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....                                 | 32 |
| 6.4 - AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> EXPOSTAS AO ÓLEO DO NIM .....   | 34 |
| 6.5 - AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DA COMBINAÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....                   | 35 |
| 6.6 - AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE <i>Metarhizium anisopliae</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> QUANDO FORMULADO EM NIM .....       | 38 |
| 7 - DISCUSSÃO.....   | 41 |
| 8 – CONCLUSÕES.....  | 47 |
| 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 48 |

## RESUMO

Santos, J.W.A.B. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2016. Efeito do óleo de Nim na virulência e persistência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti*. Orientador: Dr. Adriano Rodrigues de Paula. Coorientador: Dr. Richard Ian Samuels.

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue, chikungunya e zika. Os fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para uso no controle integrado de vetores e muitos isolados são compatíveis com inseticidas naturais e sintéticos. O óleo de nim, inseticida natural de origem vegetal, tem atividade contra larvas de *A. aegypti*. No atual estudo foi avaliado o efeito do óleo de nim (N) na virulência e persistência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (F) contra larvas de *Aedes aegypti* selvagens. Primeiro foi avaliado a germinação e o crescimento radial da combinação F+N em meio SDA sólido. A germinação dos conídios foi avaliada 12h pós-início dos ensaios. Os ensaios de crescimento radial foram avaliados diariamente por um período de 7 dias. Cinco concentrações do F de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^9$  conídio/ml e cinco concentrações do N de 1% a 0,0001% foram testadas contra as larvas. O possível efeito sinérgico e efeitos na persistência da combinação F+N, F e N foram investigados contra larvas de *A. aegypti*. Nos

testes de persistência cada suspensão foi mantida de 0 a 50 dias em água e em intervalos de 5 dias larvas de *A. aegypti* foram colocadas em contato com a formulação. Em todos os testes a taxa de sobrevivência larval foi avaliada diariamente por 7 dias. Nenhuma das três concentrações de nim afetou negativamente a germinação e o crescimento radial do fungo. As concentrações de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^7$  conídios/ml do fungo resultaram em 30% e 73,3% sobrevivência de larvas, respectivamente. Essas duas concentrações foram selecionadas para serem combinadas com o N. A concentração de 1% do nim resultou em 18,8% de sobrevivência das larvas. A concentração de 0,001% resultou em 77% de sobrevivência larval não diferindo significativamente do controle (80%), portanto foi selecionada para ser formulada com o F. A combinação de F ( $10^7$  conídios/ml) + N (0,001%) resultou em 36,6% de larvas vivas, valor significativamente menor do que a taxa de sobrevivência das larvas nos testes realizados com F (74,4%) ou N (78,8%). O valor de  $S_{50}$  do tratamento F+N foi de 3 dias. A combinação de F ( $10^8$  conídios/ml) + N (0,001%) resultou em 12,2% de sobrevivência, valor significativamente menor do que a taxa de sobrevivência das larvas nos testes realizados com F (28,8%) ou N (75,5%). Os valores de  $S_{50}$  dos tratamentos F+N e F foram de 2 e 3 dias, respectivamente. Pelo teste de Log-rank a persistência da combinação F+N em reduzir as taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* foi significativa por até 30 dias, apresentando valor de  $S_{50}$  de 4 dias. A taxa de sobrevivência de larvas expostas imediatamente (0 dias) ao tratamento fungo foi de 30% e a porcentagem de sobrevivência de larvas expostas ao fungo mantido por 10 dias em água foi de 87,7%. A combinação de F+N diminuiu a taxa de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* e aumentou a persistência do fungo ao longo do tempo, portanto o uso de baixas concentrações de nim seria muito útil para uso em condições de campo. A redução da população do mosquito *A. aegypti* diminuirá a incidência das graves doenças transmitidas por esse vetor.

Palavras-chave: Controle biológico, mosquito, doenças, vetor, fungos, inseticida.

## ABSTRACT

Santos, J.W.A.B. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2016. Neem oil effect on virulence and persistence entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Aedes aegypti*. Advisor: Dr. Adriano Rodrigues de Paula. Co-advisor: Dr. Richard Ian Samuels.

The mosquito *Aedes aegypti* is the main vector of the dengue virus, chikungunya and zika. Entomopathogenic fungi are potential candidates for use in integrated vector management and many isolates are compatible with natural and synthetic insecticides. Neem oil, a natural insecticide of plant origin, has insecticidal activity against *A. aegypti* larvae. In the current study we evaluated the effect of neem oil (N) on virulence and persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (F) against wild-type *Aedes aegypti* larvae. Germination and radial growth of this fungus was evaluated when incubated in neem oil. Conidial germination was assessed 12 hours post-initiation of trials. The radial growth assays were assessed daily for a period of 7 days. Five concentrations of F ( $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^9$  conidia / ml and five neem concentrations (1% to 0.0001%) were tested against the larvae. The possible synergistic effect and effect on the persistence of the combination F + N, F only and N only were investigated against larvae of *A. aegypti*. In the persistence test, each suspension was maintained for 0 to 50 days in water and larvae added at 5 day

intervals. For all tests, larval survival rate was assessed daily for 7 days. None of the three neem concentrations negatively affected the germination and radial growth of the fungus. A concentration of  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^7$  conidia / ml resulted in 30% and 73.3% survival respectively. These two concentrations were selected for tests combining fungus with neem. A concentration of 1% neem resulted in 18.8% survival of larvae. A concentration of 0.001% resulted in 77% larval survival which did not differ significantly from controls (80%) and was thus selected to be formulated with the fungus. The fungus ( $10^7$  conidia / ml) + N (0.001%) resulted in 36.6% larval survival, significantly lower than the survival rate of larvae in tests with F (74.4%) or N (78.8%). The  $S_{50}$  value of F+ N treatment was 3 days. The combination of F ( $10^8$  conidia / ml) + N (0.001%) resulted in 12.2% survival, significantly lower than the survival rate larvae in tests with F (28.8%), or N (75.5%). The  $S_{50}$  values of N+F and F treatments were 2 and 3 days, respectively. The log-rank test for a combination of F + N to evaluate reduction in survival rates of *A. aegypti* larvae showed significant effects up to 30 days post-initiation, with  $S_{50}$  values of 4 days. The survival rate for larvae exposed immediately (0 days) to the fungus treatment was 30% and the percentage survival of larvae exposed to the fungus maintained for 10 days in water only was 87.7%. The combination of F + N decreased the rate of survival of *A. aegypti* larvae and increased persistence of the fungus over time, so the use of low concentrations of neem could be very useful for use in field conditions. A reduction of the population of *A. aegypti* mosquitoes will decrease the incidence of serious diseases transmitted by this vector.

Keywords: Biological control, mosquito, diseases, vector, fungus, insecticide.

## 1 - INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor de graves doenças humanas como dengue, chikungunya e zika. Essas doenças se agravam em países tropicais onde as condições do ambiente associadas à ineficácia das políticas públicas de saúde, favorecem o aumento da população de mosquitos. Apesar de muito pesquisada ainda não está disponível uma vacina contra vírus da dengue, sendo a diminuição da população de *A. aegypti* um importante meio de quebrar a cadeia de transmissão (Tauil, 2002). Os sorotipos (DENV 1-4) do vírus da dengue, gênero *Flavivirus*, causam diferentes quadros clínicos da doença podendo ser assintomático, clássico, hemorrágico e a síndrome do choque da dengue, sendo o primeiro mais brando e o último mais grave com queda da pressão arterial, palidez e perda da consciência. A presença simultânea de dois ou mais sorotipos na mesma região aumenta o risco de complicações da doença (Ministério da Saúde 2016).

A febre de chikungunya é uma arbovirose causada por um vírus da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*. A viremia persiste por até 10 dias após o surgimento das primeiras manifestações clínicas. A transmissão se dá através da picada de fêmeas do mosquito *A. aegypti* e *A. albopictus* infectados pelo vírus CHIKV. Os sintomas são clinicamente semelhantes ao da dengue, como febre, dores articulares e musculares, cefaleia, náusea, fadiga e exantema. A principal manifestação clínica que a difere da dengue são as fortes dores nas articulações (Ministério da Saúde 2016).

O zika vírus pertence à família Flaviridae e causa febre e outros sintomas gerais discretos, como cefaleia, exantema, mal-estar, edema e dores articulares. No entanto, apesar da doença parecer branda, no Brasil ocorre quadros mais severos, como comprometimento do sistema nervoso central (Vasconcelos, 2015). Em 2015 o Ministério da Saúde relacionou casos de microcefalia em fetos com infecção de grávidas pelo zika vírus. Em 2016, por ensaio de transcriptase polimerase em cadeia de reação reversa (RT-PCR), o ZIKV foi encontrado no tecido cerebral fetal (Mlarkar et al., 2016).

O uso dos inseticidas químicos para redução da população de mosquitos pode resultar em uma série de problemas como a resistência fisiológica do vetor, a poluição ambiental, a contaminação de alimentos, e os efeitos nocivos animais e insetos benéficos, além de apresentar um alto custo econômico (da-Cunha et al., 2005; Montella et al., 2007; Lima et al., 2011).

A utilização de fungos entomopatogênicos contra larvas e adultos de mosquitos vetores tem sido muito promissora. O uso de fungos entomopatogênicos para infecção de larvas de *A. aegypti* tem sido objeto de vários estudos (Clark, 1968; Alves, 2002 e Vieira, 2002). Pereira et al. (2009) mostraram que isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram altamente virulentos contra larvas de *A. aegypti*. Outras espécies de larvas também foram suscetíveis ao fungo. Bukhari et al. (2011) observaram em condição de semicampo que *M. anisopliae* ou *B.bassiana* formulados em um óleo sintético (Shellsol T) reduziram a sobrevivência de larvas de *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*. Recentemente o fungo *M. anisopliae* foi formulado em óleo de Nim e testado contra larvas e adultos de *A. gambiae* e adultos de *C. quinquefasciatus* (Seye et al., 2012, Seye et al., 2013). Os resultados mostraram que a formulação do fungo + Nim foi mais eficaz do que Nim sozinho. A formulação de fungos em água não foi tão eficaz comparado com o fungo formulado com óleo de Nim contra adultos, entretanto as larvas não foram expostas a formulações de fungo sem o Nim (Seye et al., 2013). Nosso grupo observou que *M. anisopliae* foi eficaz em reduzir a sobrevivência de mosquitos adultos de *A. aegypti* por até 23 dias quando formulado em óleo vegetal + isoparafina e aplicado a panos pretos fixos debaixo dos móveis em salas de ensaio simulando habitações humanas (Carolino et al., 2014).

Extrato da planta Nim (*Azadirachta indica*) é capaz de controlar grande número de pragas por meio de uma gama de compostos bioativos. A azadiractina, principal composto da planta de Nim com atividade inseticida, pode atuar no nível fisiológico, interferindo na síntese e liberação de hormônios levando a muda incompleta em insetos imaturos. Além disso, azadiractina é um composto antialimentar potente para muitos insetos (Isman, 2006). A combinação do fungo com óleo de Nim poderia aumentar a eficácia e a persistência do fungo entomopatogêno para redução de larvas de *A. aegypti*.

O objetivo do presente trabalho foi investigar os possíveis efeitos do óleo de Nim na virulência do fungo *M. anisopliae* visando melhorar o controle de larvas de *A. aegypti*

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - MORFOLOGIA E BIOLOGIA DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. A família Culicidae possui cerca de 3600 espécies (Consoli 1998).

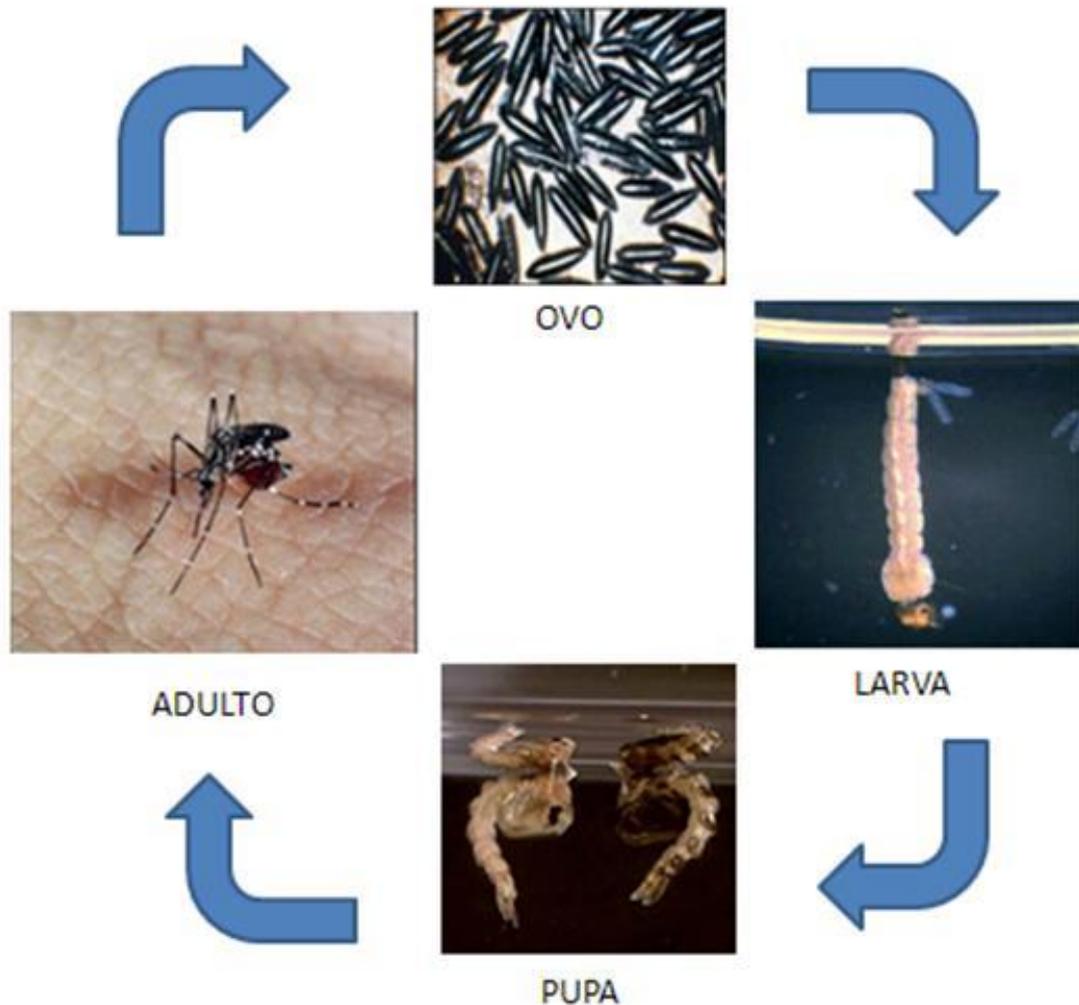
O mosquito *A. aegypti* tem desenvolvimento holometabólico (Figura 1) que compreende as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto. O ovo tem forma elíptica e é recoberto por uma camada impermeável chamada cório. Possui cor variável, de marrom a negra, e possui forma alongada e fusiforme. Seu desenvolvimento embrionário dura de 2 a 3 dias. Após a eclosão as larvas passam por 4 estádios para depois se desenvolverem as pupas e posteriormente os adultos (Strieder, 2005). Os ovos dos mosquitos são elípticos ou ovais, muitas vezes com um lado achatado, plano ou mesmo um tanto côncavo. Têm cor pálida no momento da oviposição tornando-se escuros após alguns minutos (Consoli & Oliveira, 1998). A oviposição não é feita diretamente na água, os ovos são depositados isoladamente na parede do recipiente acima da superfície da água.

As larvas dos mosquitos são aquáticas, têm aspectos vermiformes e com coloração que varia do esbranquiçado ao enegrecido. O corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome e ao contrário dos adultos que possuem aparelho

bucal picador sugador, as larvas dos mosquitos têm aparelho bucal do tipo mastigador-raspador (Consoli & Oliveira, 1998). A fase larvária é essencialmente aquática e compreende quatro estádios de desenvolvimento (L1 a L4). O corpo da larva é composto de cabeça, tórax e abdômen. Após um período variável de 4 a 7 dias as larvas se transformam em pupas.

As pupas também são aquáticas, porém não se alimentam, apenas respiram e se movimentam ativamente. Possuem o aspecto de vírgula e é nesta fase que elas cessam a alimentação devido ao período de metamorfose do estágio larval para o adulto. São divididas em cefalotórax e abdômen. Normalmente ficam paradas na superfície da água e se movimentam ativamente quando perturbadas (Marcondes, 2001). As pupas representam o período de transição em que ocorrem transformações que resultam na formação do mosquito adulto.

Os adultos apresentam coloração escura apresentando escamas branco-prateadas no tórax em forma de lira e pernas marcadas de preto e branco. Os machos se distinguem das fêmeas por apresentarem antenas plumosas e palpos mais longos (Consoli *et al.*, 1998; Eiras, 2005). As fêmeas após a cópula se alimentam de sangue. Nesse ato poderiam adquirir o vírus de um animal contaminado, e subsequentemente transmitir o vírus ao picar um outro hospedeiro. As fêmeas são hematófagas e se alimentam durante o dia (Consoli & Oliveira, 1998).



**Figura 1** - Ciclo de vida do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*.

## 2.2 – DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO O MOSQUITO *Aedes aegypti*

### Doença Dengue

Embora oriundo do Velho Mundo, provavelmente da região Etiópica, tendo sido originalmente descrito do Egito, o mosquito *A. aegypti* acompanhou o homem em sua longa e ininterrupta migração pelo mundo, e permaneceu onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação. Hoje é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais, compreendidas principalmente entre os paralelos (latitudes) 45°N e 35°S ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermais de 20°C (Consoli & Oliveira, 1998).

O primeiro caso de febre hemorrágica da dengue que se tem notícia apareceu na década de 50, nas Filipinas e na Tailândia. Após a década de 60 a presença do vírus intensificou-se nas Américas. Pesquisadores identificaram vários sorotipos da doença que foram numerados de 1 a 4. O sorotipo 1 apareceu pela primeira vez em 1977, inicialmente na Jamaica, mas foi a partir de 1980 que foram notificadas epidemias em vários países. O sorotipo 2, encontrado em Cuba, foi o responsável pelo primeiro surto de febre hemorrágica ocorrido fora do Sudoeste Asiático e Pacífico Ocidental e o segundo surto ocorreu na Venezuela, em 1989 (Ministério da Saúde, 2011).

No Brasil, há referências de epidemias desde 1916, em São Paulo, e em 1923, em Niterói, no Rio de Janeiro, sem comprovação laboratorial. A primeira epidemia, documentada clinicamente, ocorreu entre os anos de 1981 e 1982, em Boa Vista, Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4, considerados os mais perigosos. A partir de 1986, surtos importantes ocorreram nos estados de Alagoas, Ceará e na cidade do Rio de Janeiro, causados pelo sorotipo 1 do vírus da dengue (Finkelman, 2002).

Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias. Na epidemia de 1986, identificou-se a ocorrência da circulação do sorotipo 1, inicialmente no estado do Rio de Janeiro, disseminando-se, a seguir, para outros seis estados até 1990. Nesse mesmo ano, foi identificada a circulação do sorotipo 2, também no Estado do Rio de Janeiro, onde entre 1991 e 1992, foram identificados 462 casos de Febre Hemorrágica da Dengue, com 8 óbitos. A transcendência da doença assumiu outra dimensão, e esta passou a ser reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública no país, com o agravante de sua baixa vulnerabilidade às medidas de controle existentes (Ministério da Saúde, 2011).

A cidade do Rio de Janeiro sofreu uma grave epidemia de dengue em 2008. Esta foi a pior epidemia, caracterizada por um aumento acentuado na taxa de letalidade, principalmente entre os indivíduos mais jovens. Uma combinação de fatores como, clima, abundância de mosquitos, o acúmulo da população suscetível, ou evolução viral, poderia explicar a gravidade desta epidemia (Honório et al., 2009).

Nas últimas décadas tem aumentado consideravelmente a incidência de dengue no mundo. Antes de 1970, apenas nove países tinham experimentado epidemias de dengue graves. A doença agora atinge mais de 100 países da África, das Américas, do Mediterrâneo Oriental, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental. As regiões mais afetadas são Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental. Hoje, cerca de metade da população do mundo está em risco de contraí-la (WHO 2014).

Em 2002 uma epidemia com aproximadamente 800 mil casos de dengue, atingiu diversos Estados, dentre eles o Rio de Janeiro. Já em 2012, houve 200 mil casos notificados em todo território brasileiro e 33 óbitos (OPAS, 2013). Até fevereiro de 2013 por volta de 204.650 casos de dengue foram registrados no Brasil. Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, em 2014 o número de casos no território nacional caiu para aproximadamente 580 mil e 475 óbitos. Já em 2015 voltou a subir ultrapassando 1 milhão e meio de casos de dengue (Ministério da Saúde, 2015).

### **Doença Febre Amarela**

A febre amarela causada pelo vírus *Flavivirus* pode se manifestar epidemiologicamente nas formas de febre amarela silvestre e febre amarela urbana. A forma silvestre é transmitida na floresta por mosquitos *Haemagogus* que picam animais suscetíveis ao vírus, especialmente macacos, transmitindo a enfermidade entre eles, sendo o homem um hospedeiro acidental. Por outro lado, a forma urbana da febre amarela é transmitida nas cidades e vilas, de homem para homem pelo *A. aegypti* (Consoli & Oliveira, 1998). A febre amarela, após a eliminação do seu ciclo urbano em 1942, vem apresentando ciclos epidêmicos de transmissão silvestre, como ocorrido em 2000 (Goiás) e 2001 (Minas Gerais). Contudo, apesar da ampliação da área de transmissão para estados e municípios situados fora da área endêmica (Região Amazônica), tem sido observada uma redução na incidência da doença a partir do ano 2000 até o presente momento. A possibilidade de reintrodução do vírus causador da febre amarela no ambiente urbano, pela ampla dispersão do *A. aegypti*, tem motivado uma intensa atividade de vacinação, que registrou mais

de 60 milhões de doses aplicadas entre 1998 e 2002 (Finkelman, 2002). A febre amarela silvestre no Brasil atinge predominantemente indivíduos do sexo masculino, entre 16 e 35 anos de idade (ou seja, quem entra nas matas com finalidades extrativistas), manifestando-se sobre a forma esporádica ou de pequenos surtos, que ocorrem, anualmente, quase sempre na época das chuvas (Consoli & Oliveira, 1998).

### **Doença Chikungunya**

A febre Chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus da Chikungunya, da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*. A transmissão ocorre através da picada de fêmeas do mosquito *A. aegypti* ou *A. albopictus* infectados pelo vírus CHIKV (Donalisio et al., 2015). A principal manifestação clínica que difere da dengue são as fortes dores nas articulações. Embora a febre de Chikungunya não seja uma doença de alta letalidade, tem elevada taxa de morbidade associada à artralgia persistente, que pode levar a incapacidade e, conseqüentemente, redução da produtividade e qualidade de vida (Ministério da Saúde 2014).

No final de 2013 foram notificados os primeiros casos nas Américas e nas ilhas do Caribe. A doença continuou a se espalhar, com casos relatados em todo o Caribe e em vários Países do continente Americano. A febre chikungunya já foi notificada em mais de 60 Países na Ásia, África, Europa e nas Américas (WHO 2014).

O nome Chikungunya deriva de uma palavra “Makonde”, a língua falada por um grupo que vive no sudeste da Tanzânia e norte de Moçambique. Significa “aqueles que se dobram”, descrevendo a aparência encurvada de pessoas que sofrem com a artralgia característica. Chikungunya foi isolado inicialmente na Tanzânia por volta de 1952. Desde então, há relatos de surtos em vários países do mundo, inclusive nas Américas. Em comunidades afetadas recentemente, uma característica marcante foi de uma epidemia com elevada taxa de ataque, que varia de 38 a 63% (Ministério da Saúde 2014). Atualmente não existe vacina para combater o vírus da chikungunya (Thiboutot et al., 2010), nem para dengue e zika vírus. Surtos no Caribe, América Central e do Sul e México estão em curso com mais de um milhão de casos suspeitos e

confirmados de chikungunya desde dezembro de 2013 (WHO 2015). Até outubro de 2014, foram registrados 828 casos no país, sendo somente 39 vindos do exterior. Curiosamente, parece ter havido duas introduções virais diferentes nas Américas, pois o genótipo viral que foi isolado no Oiapoque e no Caribe não é o mesmo que o estudado na Bahia (Donalisio et al., 2015). Devido a isso, o controle do mosquito vetor se faz necessário para a prevenção da doença.

### **Doença Zika**

O Zika vírus é transmitido por meio da picada de um mosquito do gênero *Aedes* infectado. O vírus do gênero *Flavivirus* foi isolado pela primeira vez em 1947 nas florestas da Zika (Uganda), durante um estudo sobre a transmissão da febre amarela silvestre. Em 2007, houve o primeiro grande surto de infecção por vírus Zika na ilha de Yap (Micronésia). Posteriormente, um surto na Polinésia Francesa, iniciado no final de outubro de 2013, registrou cerca de 10.000 casos, dos quais 70 graves, com complicações neurológicas ou autoimunes. Em 2014 foram notificados casos na Nova Caledônia e Ilhas Cook e foi detectada a circulação do vírus nas Américas. Em fevereiro, na Ilha da Páscoa (Chile), onde o vírus foi relatado até o mês de junho (WHO 2015).

Surtos de Zika ocorreram também na África, no Sudeste da Ásia e nas Ilhas do Pacífico. Até dezembro de 2015, países das Américas confirmaram a circulação do vírus Zika: Brasil, Chile (na Ilha de Páscoa), Colômbia, El Salvador, Guatemala, México, Paraguai, Suriname, Venezuela e Panamá. Os sintomas mais comuns da Zika são febre, erupção cutânea, dor nas articulações ou olhos vermelhos. Outros sintomas incluem dor muscular, dor de cabeça, dor atrás dos olhos, e vômitos. Cerca de 1 em cada 5 pessoas infectadas com o vírus Zika fica doente. A doença é geralmente leve com sintomas que duram de vários dias a uma semana. Doença grave que requer hospitalização é incomum (WHO, 2015).

A associação do zika vírus com a microcefalia em recém-nascidos tem sido motivo de muita preocupação para os órgãos de saúde pública. O novo informe epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde em 2016 indica 4.180 casos suspeitos de microcefalia relacionada ao vírus Zika. Os casos

suspeitos de microcefalia em recém-nascidos são computados desde o início das investigações de outubro de 2015 até janeiro de 2016 e ocorreram em 830 municípios de 24 unidades da federação. Também estão em investigação 68 óbitos de bebês com microcefalia possivelmente relacionados ao vírus Zika, todos na região Nordeste (Ministério da Saúde 2016).

Mlarkar et al (2016) reportaram um caso de uma gestante que tinha uma doença febril com erupção cutânea no final do primeiro trimestre da gravidez, enquanto ela estava vivendo no Brasil. Já na Eslovênia uma ultrassonografia foi realizada na gestante com 29 semanas de gestação e revelou microcefalia com calcificações no cérebro fetal e placenta. Após receber a notícia a mãe pediu interrupção da gravidez, e foi realizada uma autópsia fetal. Foi observado na autópsia microcefalia, hidrocefalia e calcificações distróficas multifocais no córtex. O zika virus foi encontrado no tecido cerebral fetal no ensaio de transcriptase polimerase em cadeia de reação reversa (RT-PCR), com resultados consistentes em microscopia eletrônica. O genoma completo do ZIKV foi recuperado a partir do cérebro do feto. Sem vacina para doenças dengue, chikungunia e zika o controle do mosquito vetor *A. aegypti* deve ser priorizado.

### **2.3 - MÉTODOS DE CONTROLE DE INSETOS**

Desde sua descoberta o DDT, devido a seu grande poder inseticida, estabilidade elevada e baixo custo fizeram com que em pouco tempo, se tornasse o inseticida mais usado no mundo todo, tanto na agropecuária quanto por agentes de saúde pública no meio urbano. O BHC foi isolado e descrito por Linden em 1912, o isômero do BHC lindane é o que possui ação inseticida e tem sido também largamente usado. Os inseticidas clorados têm como características uma ação letal e um efeito residual muito longo (Neves et al 2011). O organofosforado temefos tem sido o larvicida usado no Brasil para o controle do *A. aegypti*. Com epidemias de dengue em 1986, seu uso foi amplamente intensificado. Em pouco tempo, casos de mosquitos resistentes ao temefos em diversas regiões do Brasil começaram a surgir, levando à implantação de programas de monitoramento da susceptibilidade do mosquito

aos inseticidas químicos (Andrade & Modolo, 1991; Polanczyk et al., 2003; Braga et al., 2004; Carvalho et al., 2004; Luna et al., 2004).

A resistência dos mosquitos *A. aegypti* aos inseticidas químicos organofosforados e piretroides tem sido mostrada em vários estudos (da-Cunha et al., 2005; Montella et al., 2007, Lima et al., 2011). Foi observada a resistência de *A. aegypti* a organofosforado e piretroide em todo o Brasil (Montela et al., 2007). Andrade et al., 2003 mostraram que o mosquito *C. quinquefasciatus* foi resistente aos inseticidas organofosforado e piretroide.

As estratégias de controle de *A. aegypti* precisam ser baseadas na utilização de produtos químicos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental. Portanto, devem-se investir em formas de controle alternativas que possam eliminar ou minimizar os riscos de desenvolvimento de resistência dos mosquitos aos produtos utilizados. Uma delas é o controle integrado, medida que está sendo incentivada no Brasil, envolvendo o controle químico, biológico e mecânico, com a participação da população e respeitando as peculiaridades de cada área infestada (Lima et al., 2006). A constante utilização do controle químico no combate aos insetos vetores pode causar grandes desequilíbrios ambientais mediante a eliminação de insetos benéficos, a contaminação do meio ambiente (solo, água, atmosfera e seres vivos), e intoxicações acidentais em pessoas devido à má utilização dos inseticidas.

O controle biológico é uma expressão que foi usada pela primeira vez em 1919 pelo pesquisador Harry S. Smith, quando se referiu ao uso de inimigos naturais no controle de insetos praga (Parra et al., 2002). O controle biológico pode ser feito através de predadores, parasitoides e patógenos. O controle microbiano é feito pelos e agentes entomopatogênicos que são micro-organismos que vivem ou se alimentam sobre ou dentro de um inseto hospedeiro. Além de micro-organismos como fungos, bactérias, vírus e protozoários, os nematoides também foram considerados agentes entomopatogênicos e usados no controle microbiano (Parra et al., 2002).

Dentre os métodos de controle biológico as bactérias e os fungos entomopatogênicos são os mais utilizados. No grupo das bactérias encontram-se as duas espécies mais estudadas e utilizadas, o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* que possuem elevadas propriedades larvicidas. Ambas produzem endotoxinas proteicas, as quais, quando ingeridas

pelas larvas atacam e destroem o epitélio do intestino médio, levando-as à morte (Consoli & Oliveira, 1998). A bactéria Bti é comercializada em larga escala para o controle de mosquitos e borrachudos, e um grande número de produtos eficientes está disponível no mercado (Polanczy et al., 2003).

Os fungos entomopatogênicos talvez sejam os mais adequados para o desenvolvimento de biopesticidas, porque eles não requerem a ingestão pelo hospedeiro, pois infectam via contato externo (Thomas et al., 2007). Vários fungos têm sido pesquisados como potenciais para o controle de mosquitos tanto na fase de larvas quanto adulto. As espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae* são as mais pesquisadas. Pereira et al., (2009) demonstraram o potencial de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de larvas de *A. aegypti*. Munguía et al., (2011) realizaram o primeiro estudo que demonstrou a transmissão de *B. bassiana*, por comportamento de acasalamento, de machos virgens contaminados com conídios para fêmeas saudáveis de *A. aegypti*, causando 90% de mortalidade em 15 dias. Esporos infectantes de *B. bassiana* e *M. anisopliae* têm sido usados no controle de larvas e adultos de mosquitos, mas têm como limitação a falta de persistência dos esporos (Scholte et al., 2004). Os fungos entomopatogênicos variam em seu modo de ação e virulência. Para a infecção ser bem-sucedida depende principalmente da capacidade de adesão e de penetração do fungo no tegumento do hospedeiro e uma variedade de enzimas extracelulares é produzida durante a degradação do tegumento do inseto (Shahid, et al., 2012).

Outros organismos também podem ser utilizados no controle biológico. Entre os vírus utilizados destacam-se os do grupo baculovírus por serem altamente específicos e, portanto, seguros para a saúde humana e ao ambiente (Souza, 2001). O controle biológico também pode ser feito com a utilização de peixes larvófagos. Pamplona et al., (2004) utilizaram para o controle de larvas do *A. aegypti* o peixe *Betta splendens* em tanques de cimento localizados ao nível do solo e observaram a capacidade dessa espécie como agente de controle biológico.

Desde 1980 o Programa de Controle da Dengue tem proposto o controle integrado para ser utilizado contra o vetor como medidas sanitárias, redução de criadouros, informação e participação da comunidade (Funasa, 1994). Em 1995 uma abordagem mais ampla para o problema foi iniciada com

o Plano Nacional de Erradicação do *A. aegypti* (Macoris, 2007). Esse plano propunha saneamento ambiental, comunicação e mobilização social e combate direto ao vetor (Sucen 1997, 2002). No entanto, as atividades de controle foram quase todas centradas no controle químico utilizando inseticidas para eliminar larvas e adultos.

A utilização de inseticidas está sendo prejudicada por problemas de desenvolvimento de populações resistentes de mosquitos, contaminação ambiental e riscos para a saúde humana (Hemingway & Ranson, 2000). Por isso, abordagens novas são necessárias para minimizar a seleção de insetos resistentes (Zaim & Guillet, 2002). O uso de produtos químicos em concentrações subletais junto com agentes biológicos é uma estratégia que permite reduzir a quantidade de resíduos químicos sobre os alimentos e a possibilidade de intoxicação dos trabalhadores rurais durante os processos de preparo da calda inseticida e sua aplicação (Tamai et al., 2002). Uma alternativa é a utilização de inseticidas em associação com entomopatógenos no manejo integrado de pragas que vêm mostrando eficiência na redução da densidade populacional de pragas (Borges & Nova, 2011).

Paula et al., (2011) verificaram uma maior redução na sobrevivência de mosquitos adultos da espécie *A. aegypti* ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* + inseticida químico Imidacloprid, quando comparado com a sobrevivência de larvas expostas à formulação apenas com fungo. Oliveira & Alves (2007) estudaram o sinergismo de *B. bassiana* com pó de fósseis de algas diatomáceas para o controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), considerado uma das principais pragas presentes em grãos da avicultura. Eles concluíram que pode ocorrer interação sinérgica entre os agentes dependendo da estratégia adotada, sendo a umidade do ambiente e a concentração do fungo os fatores limitantes para a interação. Em condições de campo Neves & Alves (1999) estudaram a eficiência do controle associado de colônias do cupim (*Cornitermes cumulans*) utilizando Imidacloprid juntamente com os fungos entomopatogênicos (*M. anisopliae* e *B. bassiana*) e observaram que ocorre ação sinérgica quando aplicados em associação com o Imidacloprid em concentrações subletais.

O controle integrado utilizando agrotóxicos seletivos e fungos entomopatogênicos é uma estratégia viável, porém alguns destes produtos

podem atuar negativamente sobre estes microrganismos, reduzindo crescimento vegetativo, esporulação e viabilidade (Andaló et al., 2004). Polanczyk & Alves (2005), ao estudarem em laboratório a interação de isolados de *B. thuringiensis* com *B. bassiana*, no controle da lagarta-do-cartucho, (*Spodoptera frugiperda*) não observaram efeito positivo ou negativo quando aplicaram os dois tratamentos ao mesmo tempo, sendo que os resultados foram altamente satisfatórios testados separadamente. Com isso, mais estudos precisam ser realizados.

#### **2.4 - UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti***

Os primeiros testes com fungos entomopatogênicos foram realizados pelo russo Metschnikoff no final do século XIX avaliando o potencial do *M. anisopliae* no controle de uma espécie de besouro (Faria et al., 2001). A doença causada por *M. anisopliae* chama-se muscardina verde, devido à cor verde de seus conídios. Quando estes conídios assexuados do fungo entram em contato com o tegumento de um inseto ocorre a germinação e as hifas que emergem penetram no tegumento do inseto (Freimoser, 2003). Entre as principais vantagens da utilização do *M. anisopliae* no controle biológico de insetos está a facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial, facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo decorrido de sua utilização e, principalmente, o reduzido impacto ambiental (Orlandelli & Pamphile, 2011).

Diversos autores já relataram a virulência de fungos entomopatogênicos em insetos vetores. Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* demonstraram ser virulentos contra ovos (Santos et al., 2009), larvas (Pereira et al., 2009) e adultos (Paula et al., 2008) do mosquito *A. aegypti*. Sua atividade ovicida foi demonstrada por Luz et al., (2008) quando eles avaliaram a virulência do *M. anisopliae* em ovos de *A. aegypti*. Santos et al., (2009) estudaram a atividade ovicida de *M. anisopliae* contra ovos de *A. aegypti*, após a infecção dos ovos com *M. anisopliae* houve uma significativa redução na eclosão das larvas desses mosquitos. Foi observada também a virulência do fungo *B. bassiana*

contra larvas de *C. tarsalis*, *A. albimanus*, *A. aegypti*, *A. sierrensis* e *A. nigromaculis* (Clark et al., 1968). Lacey et al (1987) estudaram a infecção de larvas de *C. quinquefasciatus* por *M. anisopliae* e observaram que os micélios dos conídios iniciaram seu crescimento no sifão respiratório, esse fungo também foi testado com eficiência contra larvas de *A. stephensi*, *A. quadrimaculatus*, *A. aegypti*, *Ochlerotatus atropalpus*, *O. taeniorhynchus*, *Culex pipiens*, *C. restuans* e *C. salinarius* (Roberts, 1970) .

Alves et al., (2002) utilizaram um isolado de *M. anisopliae* contra larvas de *C. quinquefasciatus* causando uma mortalidade de 50% 24 horas após a aplicação do fungo na água contendo as larvas. Bukari et al (2011) demonstraram que esporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* formulados com óleo sintético (Shell Sol T) foram eficientes contra larvas de *A. gambiae*, além disso, a combinação do óleo sintético com os esporos fúngicos aumentou significativamente a persistência desses esporos em condições de campo. Goettel et al (1988) estudaram a patogenicidade do fungo Hifomyceto *Tolyposcladium cylindrosporium* contra larvas de *A. aegypti*. O fungo *M. anisopliae* foi virulento contra mosquitos adultos do gênero *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* (Scholte et al., 2003 and 2007). Scholte et al. (2004) mostraram que em condições de laboratório fêmeas do mosquito *A. gambiae* infectadas com o fungo *M. anisopliae* poderiam infectar o macho durante a cópula. Howard et al (2010) observaram a redução da alimentação sanguínea do mosquito *C. quinquefasciatus* após sua infecção por *B. bassiana*. Um experimento verificou a redução da capacidade de voo de mosquitos *A. stephensi* infectados com *B. bassiana* ou *M. anisopliae* (George et al., 2011).

Blanford et al. (2011) mostraram que o mosquito *A. stephensi* exposto a telhas de barros impregnados com *B. bassiana* teve sua capacidade de voo significativamente reduzida. Pano preto impregnado com fungo entomopatogênico demonstrou ser um método eficiente no controle de insetos vetores. Scholte et al. (2005), colocaram panos pretos, impregnados com *M. anisopliae* em habitações humanas, e observaram a taxa de mortalidade e a redução da população de *Anopheles*, em trabalhos de campo na África. Estes insetos se infectaram quando pousaram sobre os panos pretos impregnados com o fungo.

Efeitos subletais do fungo também já foram observados. Foi demonstrado que *M. anisopliae* e *B. bassiana* reduziram significativamente a alimentação sanguínea dos mosquitos transmissores de malária, *An. gambiae* e *An. stephensi* (Scholte et al., 2006; Blanford et al., 2011). George et al., (2011) observaram a redução da capacidade de voo do mosquito *A. stephensi* infectado com *B. bassiana* ou *M. anisopliae*. Também mostraram que a infecção fúngica reduziu a capacidade de resposta dos mosquitos para receber sinais de odor. Scholte et al., (2007) avaliaram a patogenicidade e virulência de *M. anisopliae* contra mosquitos adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Mnyone et al., (2009) verificaram a redução da sobrevivência de mosquitos adultos de *A. gambiae* e *A. arabiensis* após a infecção por isolados fúngicos de *M. anisopliae*. Paula et al., (2011a) observaram que a combinação do *M. anisopliae* com o inseticida Imidacloprid (IMI) diminuiu significativamente a sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose. Paula et al. (2011b) verificaram que fêmeas alimentadas com sangue foram menos susceptíveis ao *M. anisopliae* quando comparadas com fêmeas alimentadas com sacarose. A imagem do processo de infecção de *M. anisopliae* em larvas e adultos de *A. aegypti* foi verificada (Vieira et al., 2013). Também já foi observado que a combinação do fungo + IMI reduziu a sobrevivência de fêmeas alimentadas com sangue (Paula et al., 2013a). Paula et al. (2013b) observaram em uma simulação de um cômodo residencial, que fêmeas de *A. aegypti* expostas a 5 panos pretos impregnados com fungo sozinho, fungo + 0,1 ppm e fungo + 10 ppm de IMI tiveram taxa de sobrevivência significativamente menor (44%, 43% e 38%, respectivamente) comparadas com testes controles ( $\pm$  80% sobrevivência). Utilizando uma câmara de acrílico foi verificado que nas primeiras 24h fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue tiveram menores taxas de pousos no pano preto, comparado com fêmeas alimentadas com sacarose e que o pano + fungo não repele o mosquito da dengue. Carolino et al.(2014) observaram que conídios extraídos de pano preto mantido em uma varanda de 2 a 18 dias permaneceram viáveis e virulentos resultando de 28 a 60% de sobrevivência de *A. aegypti*. No semicampo fixando panos pretos com fungo (F) formulado com óleo vegetal (V) e óleo isoparafina (I) (50:50) em móveis residenciais foi observada significativa redução da sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* comparado com testes

feitos com F+V ou F. Com isso, fungos entomopatogênicos parecem ser eficientes para redução da população do mosquito *A. aegypti*, entretanto mais estudos que garantam a persistência do fungo em matar insetos no campo devem ser realizados.

## 2.5 - PRODUTOS NATURAIS PARA O CONTROLE DE INSETOS

Nos últimos anos esforços têm sido feitos na busca de produtos naturais derivados de plantas e microrganismos como alternativa aos inseticidas químicos convencionais para controle de insetos (Quesada-Moraga et al., 2006). Pesticidas biológicos são muitas vezes apontados como sendo mais seguros e mais sustentáveis. Mas, eles também tendem a ser menos eficazes e mais caros limitando o seu uso generalizado (Thomas & Read, 2007).

A utilização de produtos naturais pode ser considerada como uma alternativa importante para o controle de insetos, uma vez que são biodegradáveis e não agredem ao ambiente. Algumas espécies vegetais têm demonstrado potencial no controle de insetos praga e vetores. O extrato vegetal de ramos de *Trichilia pallida* (Meliaceae) ao ser impregnado em folhas de milho causa mortalidade larval de 100% da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) em concentrações iguais ou superiores a 0,05%. Nas concentrações de 0006% afeta a sobrevivência e alonga a fase larval e em concentrações iguais ou inferiores a 0,0008% não provoca qualquer efeito aparente (Roel, et al., 2000).

Coitinho et al., (2006) avaliaram efeito residual de vários óleos vegetais, inclusive o óleo de Nim, sobre a mortalidade de *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho) em grãos de milho armazenado. Eles verificaram que no período inicial de armazenamento todos os óleos ocasionaram mortalidade acima de 79% e aos 60 e 120 dias, a mortalidade foi inferior a 2,5%.

Os óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* (Piperaceae) apresentaram efeito inseticida sobre o gorgulho *S. zeamais*, praga que afeta grãos armazenados no Brasil, e sua eficácia é dependente da via de intoxicação e da concentração do óleo aplicado (Estrela et al., 2006).

O extrato acetato de etila de folhas e ramos de *Trichilia pallida* (Meliaceae), impregnado em folhas de milho, causou mortalidade larval de 100% em *S.frugiperda* (lagarta-do-cartucho), em concentração igual ou superior a 0,05%, afetou a sobrevivência do inseto (Roel, et al., 2000).

Souza & Vendramim (2001) avaliaram a atividade inseticida de extratos aquosos de ramos, folhas, frutos verdes e frutos maduros de *Melia azedarach* e de ramos, folhas e córtex de *Trichilia pallida*, ambas Meliaceae, sobre ovos e ninfas da mosca-branca *Bemisia tabaci*, criada em tomateiro. Os leos essenciais de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* (Piperaceae) apresentaram efeito inseticida no gorgulho *S. zeamais*, praga que afeta grãos armazenados no Brasil. A eficácia  dependente da via de intoxicao e da concentrao do óleo aplicado (Estrela et al., 2006).

A espécie de planta *Schinus terebinthifolia*, popularmente conhecida como aroeira, tem mostrado eficiência no controle dos estdios de ovo, pupa e larvas das espécies de mosquitos *An. gambiae*, *An. arabiensis* e *C. quinquefasciatus* (Kweka, 2011). Os resultados obtidos por Pimenta et al., (2006) sugerem que extrato de frutos de *Pterodon polygalaeiflorus* (Leguminosae)  um promissor agente larvicida sobre *A. aegypti*. Silva et al., (2004) apresentaram pela primeira vez, o estudo fitoquímico das fraoes larvicidas isoladas da casaca do caule de *Magonia pubescens* (Sapindaceae), planta característica do Cerrado brasileiro, sobre larvas de 3 estdio de *A. aegypti*, e observaram que das nove fraoes de compostos obtidas apenas três apresentaram atividade tóxica.

Neto et al (2015) avaliaram o potencial larvicida de halogenados extraídos da alga *Laurência dendroidaidae* contra o vetor do mosquito da dengue *A. aegypti*, nesse estudo os halogenados extraídos e utilizados no experimento foram elatol e obtusol. O extrato elatol demonstrou uma atividade larvicida moderada enquanto obtusol teve uma alta atividade larvicida, assim o obtusol mostrou-se um promissor candidato para novos biopesticidas.

## 2.6 - UTILIZAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL DE NIM PARA CONTROLE DE INSETOS

A planta *A. indica* (Nim) é nativa da Índia (Dua et al., 2009) e cresce bem nas áreas de clima tropical e subtropical (Verkerk & Wright, 1993). A planta Nim pertence à família Meliaceae, como o mogno, e o porte da árvore pode variar de 15 a 20m de altura, com tronco semirreto a reto, de 30 a 80 cm de diâmetro, relativamente curto e duro, com fissuras e escamas, de coloração marrom-avermelhada (Mossini & Kemmelmeier, 2005). O diâmetro da copa varia de 8 a 12m, podendo atingir 15 m em árvores isoladas (Martinez, 2002).

A planta de Nim tem chamado a atenção de muitos pesquisadores por suas propriedades medicinais, usos na agricultura e na indústria, como árvore de sombra, produção de madeira etc. Tem sido observado, principalmente nas últimas décadas, que substâncias obtidas desta planta podem afetar mais de 200 espécies de insetos e também ácaros, nematoides, fungos, bactérias e mesmo alguns fito-vírus (Ferraz & Freitas 2008). Compostos bioativos contidos no núcleo das sementes e outras partes da planta Nim apresentam atividades inseticidas.

A azadiractina, um tetranortriterpenoide isolado da semente de Nim, constitui o mais importante princípio ativo do ponto de vista entomológico (Mordue, et al., 2000). Naqvi et al., (1991) estudaram o efeito de dois compostos a base de Nim contra larvas de *A. aegypti*. Dua et al., (2009) mostraram a atividade larvicida do óleo de Nim contra mosquitos do gênero *Anopheles*.

O óleo de Nim tem sido descrito como atividade antimalárica. Estudos relatam efeitos do óleo de sementes sobre o crescimento e desenvolvimento dos estágios sexual e assexual do parasita humano da malária *Plasmodium falciparum* (Mossini & Kemmelmeier, 2005). O composto azadiractina e o extrato aquoso das folhas também demonstram ação inibitória *in vitro* e *in vivo* sobre a replicação do vírus da Dengue tipo 2 (Parida, 2002). O óleo de Nim tem demonstrado afetar o desenvolvimento do protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* em diferentes espécies do vetor triatomíneo (Dhar, et al., 1998). O óleo de Nim parece ter ampla ação e várias são as possibilidades de utilização.

Todos os inseticidas naturais à base de Nim são produzidos por extração da planta e são biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente. Possuem ação repelente, antialimentar, reguladora de crescimento e inseticida, além de atividade acaricida, fungicida e nematocida (Martinez, 2003). O óleo de *A. indica* é retirado de sementes, onde os princípios ativos são mais concentrados e seus derivados mais efetivos (Oliveira et al., 2007). Produtos inseticidas de origem vegetal possuem efeito após a ingestão, inibindo algumas das funções vitais, tais como reprodução, alimentação, crescimento, sempre na dependência da concentração utilizada antes de provocar mortalidade (Rodriguez & Vendramim, 1997).

Umeh & Ivbijaro (1999) observaram a eficiência do óleo aquoso de Nim contra cupins que infestam as lavouras de milho, mostrando que o Nim pode ser eficiente em pequenas culturas. O óleo de Nim teve efeito tóxico contra larvas de *An. gambiae* e inibiu o desenvolvimento de pupas (Okumu et al., 2007). Dua et al., (1995) verificaram ação repelente de Nim contra mosquitos das espécies *A. albopictus*, *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *Anopheles culicifacies* e *Anopheles subpictus*.

A pulverização de soluções aquosas de óleo de Nim sobre plântulas de cafeeiros reduziu o número de ovos depositados por adultos de *Leucoptera coffeella* sobre as folhas mostrando a ação inibitória de oviposição do produto sobre a espécie vegetal. Verificaram também que a pulverização sobre ovos desta espécie reduziu a eclosão das larvas dependentes da dose, mostrando efeito larvicida de contato do produto sobre essa espécie (Martinez, 2003).

Para Mordue et al., (2000), a Azadiractina, principal composto tóxico do óleo de Nim, pode apresentar efeitos diretos causando inibição da divisão celular e na síntese de proteína acarretando paralisia dos músculos, necrose e falta de produção de enzimas no intestino médio de insetos. Aqui o óleo de Nim foi testado em Coleóptera, Lepdoptera, Hemiptera, Orthoptera e Hymenoptera. Su et al., (1998) demonstraram que o óleo de Nim suprimiu a fecundidade, a fertilidade masculina e a oviposição, atuando também nas atividades biológicas, tais como perda da capacidade de voo, imunossupressão e na divisão de ritmos biológicos.

Azevedo et al., (2005) estudaram o efeito do óleo de Nim no controle de *Bemisia tabaci* (mosca-branca) em cultura de meloeiro no Nordeste brasileiro e

verificaram que foi eficiente no controle de adultos e ninfas. Compostos inseticidas presentes no extrato aquoso de sementes de Nim atingem a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) quando aplicados na epiderme foliar e no solo e quando aplicados diretamente no inseto (Gervásio et al., 2007).

Moussini & Kelmmelmeier (2005) demonstraram que o óleo de Nim apresentou atividade antimalárica inibindo o desenvolvimento do *P. falciparum*. De fato o óleo de Nim tem se destacado como bioinseticida, pois ele pode atuar no nível fisiológico, interferindo na síntese e liberação de hormônios levando a muda incompleta em insetos imaturos, sendo também um potente composto antialimentar para muitos insetos (Ismam; 2006).

A associação de óleos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas, reduzindo custos e impactos ambientais. Foi demonstrado que o óleo de Nim não tem efeito na viabilidade dos fungos (Marques et al., 2004). Segundo os autores este resultado é importante, pois mostra o potencial de utilização conjunta de esporos do fungo com o óleo de Nim. Santos et al., (2009) avaliaram em laboratório a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* com o óleo de Nim em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Os autores observaram que ambas as linhagens fúngicas apresentaram compatibilidade com óleo de Nim. Dessa forma, espera-se que o produto considerado compatível nesse tipo de teste também o seja quando aplicado em condições de campo. Óleo de Nim tem demonstrado atividade ovicida contra os mosquitos *C. tarsalis* e *C. quinquefasciatus*, mostrando o potencial dos produtos de Nim como inseticidas (Su et al., 1998). Naqvi et al (1991) observaram a suscetibilidade de larvas de *A. aegypti* ao óleo Nim e verificaram que as larvas sobreviventes à toxicidade do óleo Nim originaram pupas melanizadas. As pupas apresentaram o abdômen reduzido e os poucos adultos que conseguiram emergir apresentaram anomalias nas pernas, abdômen e asas. Estudos visando observar os efeitos da combinação de fungo entomopatogênico com o óleo de Nim para infecção de larvas selvagens parecem ser promissores. E estudos de persistência da combinação do fungo com Nim para a infecção de larvas de *A. aegypti* também são um campo novo de pesquisa.

### **3.0 – HIPÓTESE**

Uma combinação de fungo entomopatogênico com óleo de Nim aumentaria a virulência e a persistência do fungo para infecção de larvas de *Aedes aegypti*.

#### 4.0 - OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do óleo de Nim na virulência e persistência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti* selvagens.

#### 4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se o óleo de Nim influenciaria na germinação e no crescimento radial do fungo *Metarhizium anisopliae*;

Investigar a patogenicidade e virulência de *Metarhizium anisopliae* para infecção de larvas de *Aedes aegypti*;

Verificar a toxicidade do óleo de Nim contra larvas de *Aedes aegypti*;

Avaliar o possível sinergismo da combinação de *Metarhizium anisopliae* com óleo de Nim para infecção de larvas de *Aedes aegypti*;

Avaliar a persistência ao longo do tempo da combinação de *Metarhizium anisopliae* com óleo de Nim para redução da sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* em condições de laboratório.

## 5.0 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de laboratório foram realizados no insetário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

### 5.1 - CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti* SELVAGENS

Os ovos de mosquitos *A. aegypti* foram coletados no campus da UENF utilizando armadilhas ovitrampas. Essas armadilhas foram feitas de vaso plástico preto de 500 ml com 250 ml de água de torneira e com 4 palhetas de eucatex preso na borda do vaso por um elástico. As ovitrampas foram distribuídas semanalmente no campus da UENF. Os ovos do mosquito *A. aegypti* foram identificados com auxílio de uma lupa (Labomed®). Palhetas com ovos de *A. aegypti* foram mantidas em um pote plástico com sílica até utilização. A eclosão das larvas foi estimulada por imersão total das palhetas com ovos em bandejas de 500 ml com 100 ml de água tratada com 0,05g de ração do camundongo (marca: NUVILAB). Larvas de 2º e 3º estágio foram utilizadas nos testes de laboratório e semicampo.

## 5.2 - CULTIVO DO FUNGO ENTOMOPATOGENICO

O fungo *M. anisopliae* (F) foi obtido da ESALQ (isolado ESALQ 818) em Piracicaba-SP. O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio sólido SDA (Dextrose 10g; Peptona 2,5g; Extrato de levedura 2,5g; Ágar 20g e água destilada 1L) e mantido por duas semanas a 27°C em câmara climatizada (marca: FANEM) e em seguida, armazenado a 4°C. Erlemeyers de 250ml contendo 25g de arroz parboilizado cru + 10 ml de água destilada, fechados com algodão, foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121°C). Com o auxílio de uma colher estéril os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados no arroz através de movimentos circulares até obter uma distribuição uniforme dos conídios entre os grãos de arroz. Os Erlemeyers foram mantidos em câmara climatizada a 27°C e a concentração dos conídios foi avaliada utilizando uma câmara de Neubauer. Todo o processo de coleta de conídios foi realizado em câmara de fluxo previamente desinfetada com álcool 70% e 15 minutos de exposição à UV. Para o preparo da suspensão do fungo foram utilizados conídios submetidos à secagem (BOD de secagem- marca: Nova Ética e com auxílio de uma máquina separadora de esporos (Mycoharvester®, Inglaterra), os conídios foram separados do arroz. Em seguida foi realizado diluição dos conídios usando 0,05% de Tween 80 (TW) até a obtenção da concentração requisitada para o experimento.

## 5.3 - PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO DE NIM

Para os tratamentos com óleo de Nim (N) foi utilizado o óleo comercial “Base Nim” da marca Base Fértil Nim (São Paulo, Brazil) com 0,12% p/p de Azadiractina, principal componente com atividade inseticida. O óleo de Nim foi diluído em água destilada até a concentração desejada.

#### **5.4 - ENSAIO DE GERMINAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* COMBINADO COM ÓLEO DE NIM**

Nesse ensaio F na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml foi formulado com N em três concentrações: 1%, 0,1% ou 0,01%. O tratamento controle foi feito com F+TW. As suspensões foram preparadas, em seguida foi retirada uma alíquota de 15  $\mu$ L de cada suspensão e adicionada em placas de Petri contendo o meio SDA sólido (dextrose; peptona; extrato de levedura; Ágar e água destilada) previamente autoclavada a 121° C, por 15 minutos a 1 atm. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 27°C e  $70 \pm 10$  % UR por 12 horas. Depois foi avaliada a germinação dos conídios no microscópio invertido (marca BIOVERA). Foram escolhidos três campos aleatoriamente no microscópio para quantificação de conídios germinados e não germinados, depois foram feitas porcentagens dos resultados. Foram utilizadas três placas para cada tratamento.

#### **5.5 - ENSAIO DE CRESCIMENTO RADIAL DE *Metarhizium anisopliae* COMBINADO COM ÓLEO DE NIM**

Nesse ensaio F na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/ml foi formulado com N em três concentrações: 1%, 0,1% ou 0,01%. O tratamento controle foi feito com F+TW. As suspensões foram preparadas, em seguida foi retirada uma alíquota de 50  $\mu$ L de cada suspensão e adicionada em placas de Petri contendo o meio SDA sólido (dextrose; peptona; extrato de levedura; Ágar e água destilada) previamente autoclavado a 121° C, por 15 minutos a 1 atm. As placas ficaram incubadas em câmara climatizada a 27°C e  $70 \pm 10$  % UR. Diariamente, utilizando uma régua, foi avaliado o crescimento radial (mm) do fungo durante o período de 7 dias. Foram utilizadas três placas para cada tratamento.

## **5.6 – PROTOCOLO DE TESTES COM FUNGO E/OU ÓLEO DE NIM**

Os testes foram realizados em condições de laboratório em 25°C; 75% de UR 16:8 D/N de fotoperíodo. As larvas foram colocadas em copos plásticos de 200 ml com 100 ml de água da torneira + a suspensão do F, N ou controle. Três copos de plástico com 10 larvas/cada foram usados totalizando 30 larvas por tratamento/repetição. Cada teste foi realizado três vezes. O número de larvas vivas foi avaliado diariamente por 7 dias. As larvas mortas foram retiradas da água dos tratamentos.

### **5.6.1 - AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti***

Nesse teste foi avaliada a virulência de *M. anisopliae* para infecção de larvas de *A. aegypti*. Cinco concentrações do fungo foram testadas em tratamentos distintos para infecção das larvas de *A. aegypti*:  $1 \times 10^9$  conídios/ml,  $1 \times 10^8$  conídios /ml,  $1 \times 10^7$  conídios /ml,  $1 \times 10^6$  conídios /ml e  $1 \times 10^5$  conídios /ml. O tratamento controle foi feito somente com TW. Nesse teste foram selecionadas duas concentrações do fungo, uma que resultasse em alta taxa de sobrevivência larval e outra em baixa porcentagem de sobrevivência de larvas para ser formulado com N e testado contra larvas de *A. aegypti*.

### **5.6.2 - AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* EXPOSTAS AO ÓLEO DO NIM**

Nesse experimento foi avaliada a toxicidade do óleo de Nim contra as larvas de *A. aegypti*. Cinco concentrações do Nim foram testadas contra larvas de *A. aegypti*: 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001%. O tratamento controle foi feito somente com água estéril. Nesse teste foi selecionada uma concentração do Nim que resultasse em alta taxa de sobrevivência para ser formulado com F e testado contra larvas de *A. aegypti* (testes de sinergismo e persistência).

### **5.6.3 - AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DA COMBINAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* COM ÓLEO DE NIM CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti***

Nesse teste foi verificado se a combinação do F+N reduziria significativamente a taxa de sobrevivência de larvas de *A. aegypti*, comparado com testes realizados com F, N e controle. Foi testado o fungo na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL e  $1 \times 10^8$  conídios/mL formulado com a concentração de 0,001% do Nim para infecção de larvas de *A. aegypti*.

Nesse teste foi selecionada a concentração do F para ser combinado com N para realização dos testes de persistência.

### **5.6.4 - AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA COMBINAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti***

Os testes foram realizados com F na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml e N na concentração de 0,001% para ser utilizada contra larvas de *A. aegypti*. As formulações foram preparadas F+N, F, N e controle (com água estéril) colocadas em copos plásticos com 100 mL de água e ao longo do tempo as larvas foram sendo adicionadas nos tratamentos. As larvas foram adicionadas imediatamente (0 dia), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 dias após a adição das formulações em água.

## 5.7 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes de germinação e crescimento radial foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan. A homogeneidade dos testes foi feita usando o teste de Log-Rank (Elandt-Johnson et al, 1980). Os resultados foram agrupados para análise da curva de sobrevivência, percentual da sobrevivência e desvio padrão. Os resultados dos grupos controle que não apresentaram diferenças significativas entre si foram agrupados (“pooled”) e somente uma curva de sobrevivência foi mostrada. As comparações das médias de sobrevivência dos mosquitos foram calculadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan. O tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) foi calculado pelo método de Kaplan-Meier (Blanford et al., 2005). As curvas de sobrevivência do teste de persistência foram comparadas utilizando o teste de Log-Rank (Elandt-Johnson et al, 1980).

## 6.0 – RESULTADOS

### 6.1 - ENSAIO DE GERMINAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* COMBINADO COM ÓLEO DE NIM

O óleo de Nim não afetou a germinação do fungo *M. anisopliae*. A porcentagem de conídios não germinados nos tratamentos fungo e fungo + Nim na concentração de 1%, 0,1% e 0,01% foi estatisticamente igual entre si ( $P>0,01$ ) (Tabela 1). O mesmo ocorreu com a taxa de conídios germinados ( $P>0,01$ ).

Tabela 1 – Porcentagem de conídios não germinados e germinados nos tratamentos realizados com fungo combinado com óleo de Nim (1%, 0,1% e 0,01%). O tratamento controle foi feito somente com o fungo.

|                  | % CONÍDIOS NÃO GERMINADOS | % CONÍDIOS GERMINADOS |
|------------------|---------------------------|-----------------------|
| <b>F</b>         | 23,8 a                    | 76,2 a                |
| <b>F+N 1%</b>    | 27,2 a                    | 72,8 a                |
| <b>F+N 0,1%</b>  | 26,6 a                    | 73,4 a                |
| <b>F+N 0,01%</b> | 25,7 a                    | 74,3 a                |

Os valores seguidos de letras iguais indicam que os resultados foram estatisticamente iguais quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade).

## 6.2 - ENSAIO DE CRESCIMENTO RADIAL DE *Metarhizium anisopliae* COMBINADO COM ÓLEO DE NIM

O óleo de Nim não afetou o crescimento radial do fungo *M. anisopliae*. A Figura 1 mostra que a média do crescimento radial (mm) nos tratamentos fungo e fungo + Nim na concentração de 1%, 0,1% e 0,01% foi estatisticamente igual entre si ( $P > 0,01$ ).

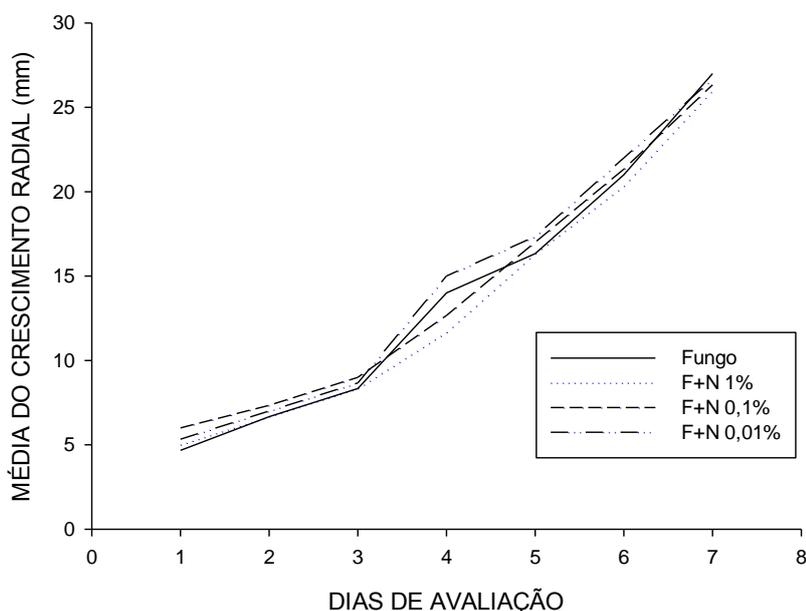


Figura 1 - Crescimento radial (mm) nos tratamentos F e F+N (1%, 0,1% e 0,01%).

## 6.3 - AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

O teste feito com a concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/mL do fungo resultou na menor taxa de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (24,4%) comparado com os resultados de sobrevivência dos demais ensaios ( $F_{6,20} = 31,405$ ;  $P < 0,01$ ). A maior porcentagem de sobrevivência ocorreu quando as larvas foram expostas à concentração do fungo de  $1 \times 10^5$  conídios/mL (85,5%; Tabela 2). As curvas de sobrevivência foram significativamente diferentes usando comparações Log-rank ( $\chi^2$  208,9; DF 5;  $p < 0,0001$ ; Figura 2). Os

valores de  $S_{50}$  para os tratamentos utilizando as concentrações de  $1 \times 10^9$  conídios/mL e  $1 \times 10^8$  conídios/mL foram de 3 dias.

Tabela 2 – Sobrevivência (%)  $\pm$  Desvio Padrão e Tempo Médio de Sobrevivência ( $S_{50}$ ) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cinco concentrações de *Metarhizium anisopliae*.

| Concentrações do fungo      | Sobrevivência (%) $\pm$ Desvio Padrão | $S_{50}$ |
|-----------------------------|---------------------------------------|----------|
| $1 \times 10^9$ conídios/mL | 24,4 $\pm$ 10,5 b                     | 3        |
| $1 \times 10^8$ conídios/mL | 30,0 $\pm$ 9,86 b                     | 3        |
| $1 \times 10^7$ conídios/mL | 73,3 $\pm$ 2,50 a                     | ND       |
| $1 \times 10^6$ conídios/mL | 81,1 $\pm$ 2,50 a                     | ND       |
| $1 \times 10^5$ conídios/mL | 85,5 $\pm$ 1,77 a                     | ND       |
| Controle                    | 88,8 $\pm$ 1,39 a                     | ND       |

Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). ND (Dados não determinados).

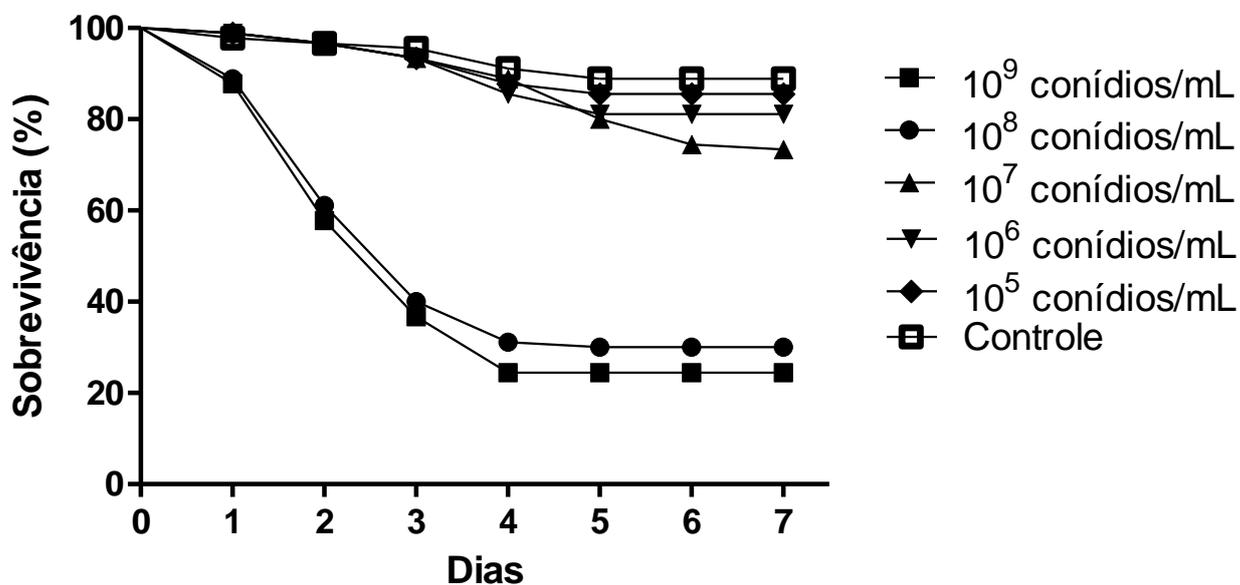


Figura 2 – Sobrevivência (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cinco concentrações de *Metarhizium anisopliae*.

Nesse teste duas concentrações do fungo foram selecionadas para serem formuladas com óleo de Nim testado para infecção de larvas de *A. aegypti*. A concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL foi selecionada por resultar em altas taxas de larvas vivas (73,3%) e  $1 \times 10^8$  conídios/mL por apresentar baixas porcentagens de larvas vivas (30%).

#### 6.4 - AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* EXPOSTAS AO ÓLEO DO NIM

O ensaio feito com a concentração de 1% de óleo de Nim e resultou na menor taxa de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (18,8%), comparado com os resultados dos demais ensaios ( $F_{5,17} = 22,218$ ;  $P < 0,01$ ). As porcentagens de sobrevivência de larvas expostas a 1%, 0,1% e 0,01% do óleo de Nim foram significativamente iguais ( $P > 0,01$ ). A maior taxa de sobrevivência ocorreu quando as larvas foram expostas à concentração de 0,0001% do óleo de Nim (80%) Tabela 3. As curvas de sobrevivência foram significativamente diferentes utilizando o teste Log-Rank ( $\chi^2 199,4$ ;  $df 5$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 3).

Tabela 3 – Sobrevivência (%)  $\pm$  Desvio Padrão e Tempo Médio de Sobrevivência ( $S_{50}$ ) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cinco concentrações do óleo de Nim.

| Concentrações do Nim | Sobrevivência (%) $\pm$<br>Desvio Padrão | $S_{50}$ |
|----------------------|--|----------|
| 1%                   | 18,8 $\pm$ 11,8 b                        | 2        |
| 0,1%                 | 25,5 $\pm$ 12,24 b                       | 2        |
| 0,01%                | 30 $\pm$ 10,0 b                          | 3        |
| 0,001%               | 77 $\pm$ 2,26 a                          | ND       |
| 0,0001%              | 80 $\pm$ 2,50 a                          | ND       |
| Controle             | 86 $\pm$ 0,95 a                          | ND       |

Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). ND (Dados não determinados).

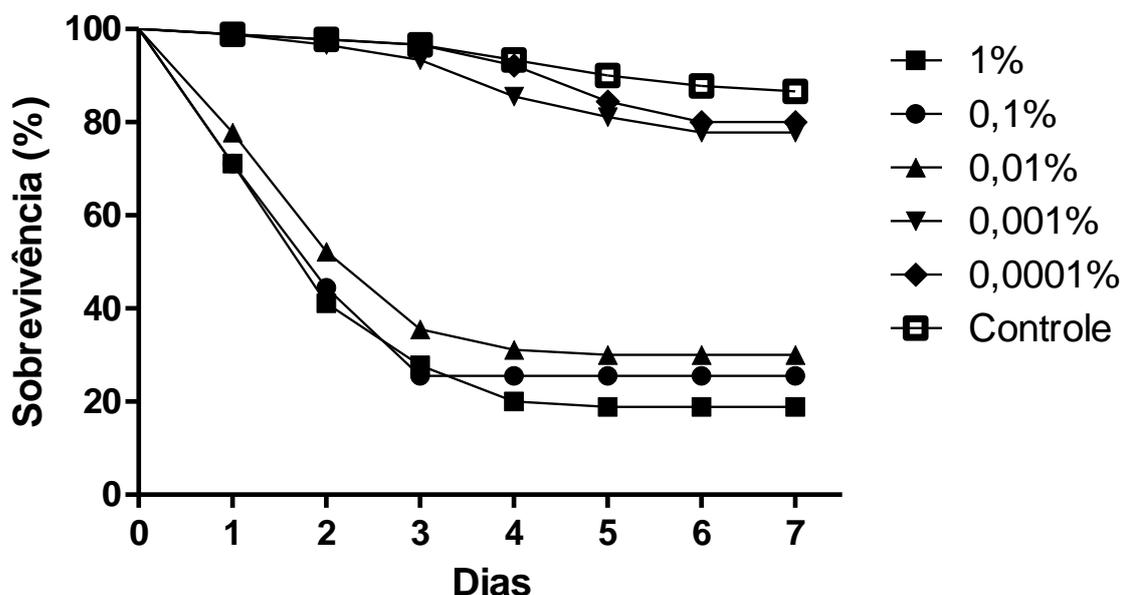


Figura 3 – Sobrevivência (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cinco concentrações do óleo de Nim.

Nesse ensaio a concentração de 0,001% do óleo de Nim foi selecionada para ser formulada com a concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL e  $1 \times 10^8$  conídios/mL do fungo e testada para infecção de larvas de *A. aegypti*. Essa concentração (0,001%) foi selecionada por sua taxa de sobrevivência larval (77%) ter sido significativamente igual à sobrevivência de larvas do tratamento controle (86%) ( $P > 0,01$ ).

### 6.5 - AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DA COMBINAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

#### Combinação do fungo na concentração de $1 \times 10^7$ conídios/mL com a concentração de 0,001% do óleo de Nim para infecção de larvas

A taxa de sobrevivência das larvas expostas à combinação do F+N foi significativamente menor (36,6%) comparado com a porcentagem de sobrevivência de larvas expostas ao F (74,4%), N (78,8%) e controle (81,1%) ( $F_{3,11}=18,30$  ;  $P < 0,01$ ; Tabela 4). Somente o tratamento F+N apresentou valor

de S<sub>50</sub> (3 dias). As curvas de sobrevivência dos tratamentos F+N, F, N e controle foram significativamente diferentes ( $\chi^2$  76.67; df 3;  $p < 0.0001$ ; Figura 4).

Tabela 4 – Sobrevivência (%)  $\pm$  Desvio Padrão e Tempo Médio de Sobrevivência (S<sub>50</sub>) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas à combinação do F+N, F ou N.

| Tratamentos                     | Sobrevivência (%) $\pm$<br>Desvio Padrão | S <sub>50</sub> |
|---------------------------------|--|-----------------|
| F+N                             | 36,6 $\pm$ 9,30 b                        | 3               |
| F (10 <sup>7</sup> conídios/ml) | 74,4 $\pm$ 2,36 a                        | ND              |
| N (0,001%)                      | 78,8 $\pm$ 2,28 a                        | ND              |
| Controle                        | 81,1 $\pm$ 1,90 a                        | ND              |

Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). ND (Dados não determinados).

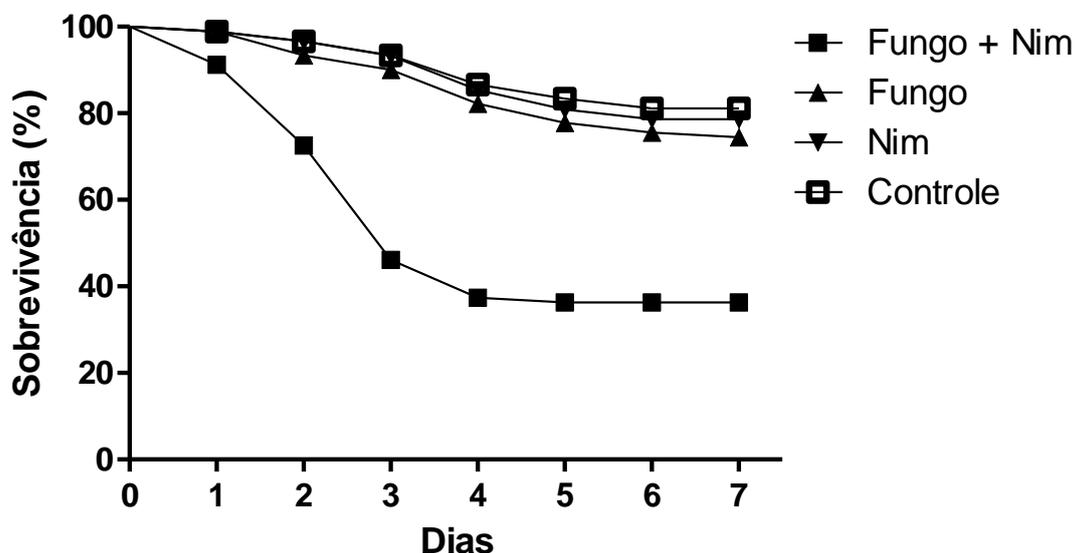


Figura 4 – Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* tratadas à combinação do F+N ou F ou N.

### Combinação do fungo na concentração de $1 \times 10^8$ conídios/mL com a concentração de 0,001% de óleo de Nim para infecção de larvas

A taxa de sobrevivência das larvas expostas à combinação do F+N foi significativamente menor (12,2%) comparado com a porcentagem de sobrevivência de larvas expostas ao F (28,8%), N (75,5%) e controle (90%) ( $F_{3,11} = 156,042$  ;  $P < 0,01$  ; Tabela 5). Os tratamentos F+N e F apresentaram valores de  $S_{50}$  de 3 e 2 dias, respectivamente. As curvas de sobrevivência dos tratamentos F+N, F, N e controle foram significativamente diferentes ( $\chi^2 161,6$ ;  $df 3$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 5).

Tabela 5 – Sobrevivência (%)  $\pm$  Desvio Padrão e Tempo Médio de Sobrevivência ( $S_{50}$ ) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas à combinação do F+N, F ou N.

| Tratamentos             | Sobrevivência (%) $\pm$<br>Desvio Padrão | $S_{50}$ |
|-------------------------|--|----------|
| F+N                     | 12,2 $\pm$ 11,5 d                        | 2        |
| F ( $10^8$ conídios/ml) | 28,8 $\pm$ 9,49 c                        | 3        |
| N (0,001%)              | 75,5 $\pm$ 2,41 b                        | ND       |
| Controle                | 90 $\pm$ 1,11 a                          | ND       |

Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). ND (Dados não determinados).

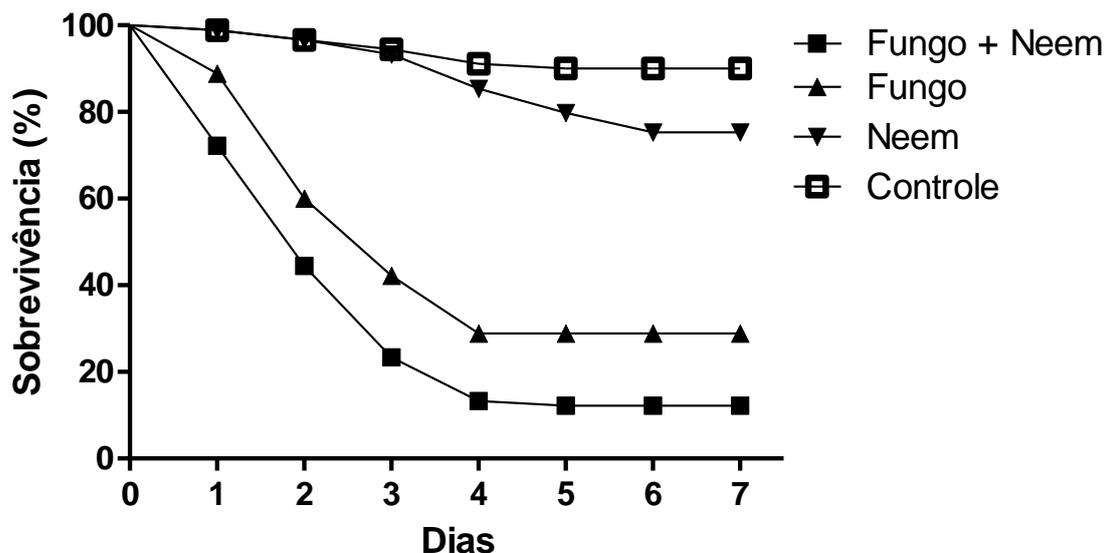


Figura 5 – Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* tratadas à combinação do F+N ou F ou N.

#### 6.6 - AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE *Metarhizium Anisopliae* CONTRA LARVAS DE *Aedes Aegypti* QUANDO FORMULADO EM NIM

Pelo teste de Log-rank a capacidade da combinação F+N em reduzir as taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* foi significativa por até 30 dias (Tabela 6) apresentando valor de  $S_{50}$  de 4 dias.

As larvas colocadas imediatamente (0 dias) na combinação de F+N apresentaram taxa de sobrevivência de 11,1% e valor de  $S_{50}$  de 3 dias. As porcentagens de sobrevivência das larvas aumentaram à medida que a combinação F+N foi mantida ao longo do tempo em água (Figura 6). O valor de  $S_{50}$  de 3 dias se manteve até o tratamento F+N 20 dias. As taxas de sobrevivência larval de 58,8% e 74% foram observadas nos tratamentos F+N 45 dias e F+N 50 dias, respectivamente.

A taxa de sobrevivência de larvas expostas imediatamente (0 dias) ao fungo foi de 30% (com valor de  $S_{50}$  de 3.5 dias) e a porcentagem de sobrevivência de larvas expostas ao fungo mantido em água por 10 dias foi de 87,7%. O tratamento N (0 dias) apresentou taxa de sobrevivência larval de

74,4%. O tratamento controle apresentou porcentagem de sobrevivência larval de 88,8%.

Tabela 6 – Sobrevivência  $\pm$  desvio padrão e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas à combinação do F+N, F, N e controle nos testes de persistência.

| TRATAMENTOS  | % SOBREVIVÊNCIA | Desvio<br>Padrão | S <sub>50</sub> |
|--------------|-----------------|------------------|-----------------|
| F+N 0 dias   | 11,1 #          | 10,8             | 3               |
| F+N 5 dias   | 13,3 #          | 10,7             | 3               |
| F+N 10 dias  | 18,8 #          | 11,1             | 3               |
| F+N 15 dias  | 22,2 #          | 10,8             | 3               |
| F+N 20 dias  | 27,7 #          | 11,3             | 3               |
| F+N 25 dias  | 30,0 #          | 10,9             | 4               |
| F+N 30 dias  | 33,3 #          | 11,1             | 4               |
| F+N 35 dias  | 40,0 *          | 10,7             | 5.5             |
| F+N 40 dias  | 48,8 *          | 9,93             | ND              |
| F+N 45 dias  | 58,8 *          | 8,34             | ND              |
| F+N 50 dias  | 74 *            | 4,57             | ND              |
| F 0 dias     | 30,0            | 9,20             | 3.5             |
| F 5 dias     | 48,8            | 7,63             | 4               |
| F 10 dias    | 87,7            | 1,51             | ND              |
| NIM (0 dias) | 74,4            | 4,23             | ND              |
| CONTROLE     | 88,8            | 1,51             | ND              |

No tratamento F+N as taxas de sobrevivência com símbolo # ou \* foram significativamente iguais entre si pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

A Figura 6 mostra as curvas de sobrevivência diária de larvas expostas aos tratamentos F+N, F, N e controle.

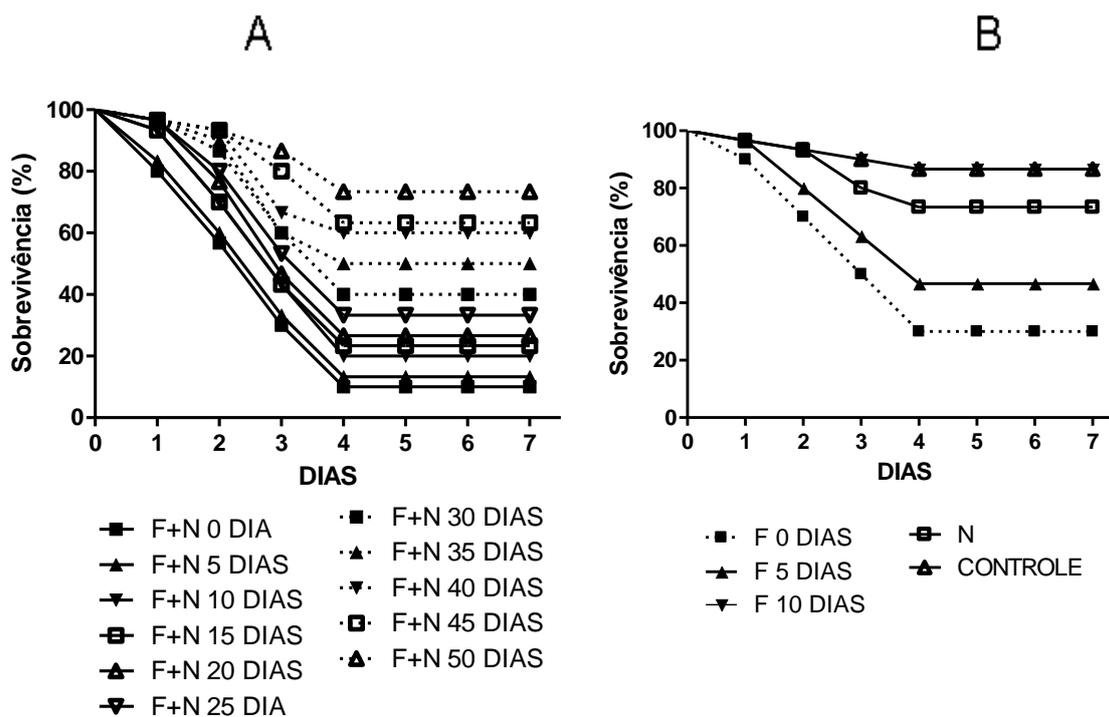


Figura 6 – (A) Sobrevivência (%) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas à combinação do F+N. (B) Sobrevivência (%) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com F, N e controle nos testes de persistência em condições de laboratório.

## 7.0 - DISCUSSÃO

Fungos entomopatogênicos são importantes candidatos para o controle de larvas de *A. aegypti*. No atual estudo foi observado que a concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/ml de *M. anisopliae* resultou no sétimo dia de avaliação do experimento, na menor taxa de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* selvagens (24,4%), valor que não diferiu significativamente da taxa de sobrevivência de larvas expostas à concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml (30% de larvas vivas). Isolados de fungo entomopatogênico já foram mostrados altamente virulentos contra larvas de *A. aegypti*. Pereira et al., verificaram que os isolados CG 144 e ESALQ 818 de *M. anisopliae* foram altamente virulentos e infectivos contra larvas de *A. aegypti* criadas em laboratório, resultando em 10% e 12% de larvas vivas, respectivamente. Um estudo recente mostrou que um isolado de *M. anisopliae* foi altamente eficaz para matar larvas de *A. aegypti*, com taxas de mortalidade de 60-90% observadas 72-96 horas pós-inoculação, no entanto, a morte das larvas não foi o resultado de um processo de infecção normal (Butt et al., 2013). Foi apresentada evidências de que a mortalidade dos insetos parece estar ligada à autólise através da atividade regulada por Hsp70, e esta resposta pode ser modificada por inibidores da protease. A interação inseto-fungo anormal foi atribuída ao fato de que *M. anisopliae* é um fungo terrestre e, portanto, não adaptado a um ambiente aquático.

Entre os compostos bioativos de origem vegetal, o óleo de Nim é um dos poucos a ser comercialmente bem-sucedidos para o uso agrícola. Extratos da árvore Nim foram testados quanto à toxicidade contra larvas e têm sido mostrados para matar *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (Dua et al., 2009, Seye et al., 2013, Murugan et al., 1996). No presente estudo o óleo de Nim foi tóxico contra larvas de *A. aegypti* selvagens. A concentração de 1% do óleo de Nim resultou no sétimo dia de avaliação do experimento, na menor taxa de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (18,8%). A concentração de 0,1% resultou em 25,5% de larvas vivas. As taxas de sobrevivência de larvas tratadas com 0,001% de Nim foram de 77% e com 0,0001% de Nim foram de 80%.

A azadiractina é o principal componente biologicamente ativo encontrado nas sementes de Nim. A presença de azadiractina em sementes de Nim tem sido altamente correlacionada com bioatividade contra insetos (Mulla et al., 1999). Em nível fisiológico, tem sido demonstrado que a azadiractina bloqueia a síntese e liberação de hormônios de desenvolvimento tais como os ecdisteroides, levando a muda incompleta de insetos imaturos. Sua ação como um regulador de crescimento enfraquece a cutícula larval, facilitando a penetração de organismos patogênicos (Su et al., 1998). Em fêmeas adultas, um mecanismo de ação semelhante leva à esterilidade, além de apresentar propriedades antialimentares (Schmutterer et al., 2009, Su et al., 1998; Isman et al., 2006). Os efeitos letais de produtos à base de Nim foram avaliados contra *A. aegypti* e demonstraram afetar o desenvolvimento dos estágios imaturos desse inseto, resultando em redução significativa na emergência de adultos (Dua et al., 2009; Ndione et al., 2007).

No caso dos vetores de malária, *A. stephensi* e *A. gambiae*, a administração de doses predeterminadas de Nim conduziu à inibição da alimentação e na redução de oviposição, bem como a redução significativa na formação de pupas e reduziu a emergência dos adultos (Ndione et al., 2007; Nathan et al., 2005). A maior concentração de Nim testado aqui (1%) resultou em uma redução de 50% na sobrevivência. Outros investigadores demonstraram que o óleo de Nim causou 95% de mortalidade, quando utilizado a uma concentração de 5% contra larvas de *A. stephensi* (Murugan et al., 1999). Esses pesquisadores também descreveram o efeito do óleo de Nim

sobre o desenvolvimento de pupas, com 5% de Nim inibindo totalmente a formação de pupas (Zebitz et al., 1984).

A utilização de uma combinação de óleo de Nim e *M. anisopliae* foi testada contra adultos de *A. gambiae* e *C. quinquefasciatus* pulverizando tecidos das gaiolas em que os mosquitos adultos foram posteriormente adicionados (Seye et al., 2014). No quarto dia do experimento a formulação fungo + Nim resultou em 4% de sobrevivência de *A. gambiae* e 12% para *Culex*, sendo altamente eficaz quando comparada com Nim sozinho (82 e 89% de sobrevivência, respectivamente) e fungos em água (58 e 70% de sobrevivência, respectivamente). No estudo dos efeitos de formulações de óleo de Nim + *M. anisopliae* contra larvas de *A. gambiae*, foram observadas modificações na emergência de adultos (Seye et al., 2013).

Antes de selecionar um adjuvante adequado para aplicação com fungos entomopatogênicos é necessário testar a toxicidade para o agente de controle biológico. Embora muitos inseticidas químicos sejam compatíveis com fungos entomopatogênicos, alguns têm demonstrado que causam efeitos deletérios sobre estes organismos. Uma das novas gerações de inseticidas, imidacloprid (neo-nicotinóide), foi demonstrada que não tem nenhum efeito sobre a germinação de *B. bassiana* (Santos et al., 2007). No entanto, alguns estudos têm mostrado que o óleo de Nim não é compatível com *B. bassiana*, inibindo o crescimento vegetativo e diminuindo a viabilidade dos conídios (Depieri et al., 2005). O óleo de Nim foi moderadamente tóxico para *B. bassiana*, quando utilizado em 0,5% e altamente tóxico a 1,5%. Outro estudo mostrou que o uso de óleo de Nim a menos de 1% não causou efeitos deletérios sobre o fungo *Metarhizium acridum* (Haroona et al., 2011). No atual estudo a porcentagem de conídios germinados da combinação de *M. anisopliae* com óleo de Nim (1%, 0,1% e 0,01%) foi significativamente igual à taxa de conídios não germinados do tratamento realizado com fungo ( $P > 0,01\%$ ). O mesmo ocorreu para os testes medindo o crescimento radial do fungo. Durante o período de 7 dias, avaliações diárias observaram que o crescimento radial do tratamento realizado com a combinação de F+N (1%, 0,1% e 0,01%) foi significativamente igual ao crescimento radial do tratamento realizado com fungo. Portanto, o óleo de Nim não afeta a germinação e o crescimento radial do fungo *M. anisopliae* nas concentrações testadas no presente trabalho.

No atual estudo foi avaliado que a combinação de *M. anisopliae* com uma baixa concentração de óleo de Nim reduziu a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* selvagens, comparado com testes feitos com somente fungo ou somente Nim. Foi possível aumentar significativamente a virulência de *M. anisopliae* contra larvas de *A. aegypti*, utilizando concentrações relativamente baixas do óleo de Nim. Importante observar nesse teste que a concentração de 0,001% do óleo de Nim resultou em 78% de sobrevivência larval, entretanto quando combinado com *M. anisopliae* na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL a taxa de sobrevivência larval caiu para 36% e na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL a porcentagem de lavas vivas foi de somente 12%. Embora o óleo de Nim possa ser usado sozinho para controlar as larvas do mosquito, seria pouco provável que seja economicamente viável para as grandes áreas geográficas que precisem ser tratadas.

O presente estudo mostrou também a persistência dessa combinação F+N (na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL + 0,001%, respectivamente) ao longo do tempo para diminuição da sobrevivência de larvas de *A. aegypti*. As taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas aos tratamentos F+N mantidos de 0 até 30 dias em água foram significativamente iguais entre si ( $P > 0,01$ ). A combinação F+N mantida na água por 30 dias apresentou 33% de larvas vivas e valor de  $S_{50}$  de 4 dias. As porcentagens de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas aos tratamentos F+N mantidos de 35 a 50 dias em água foram significativamente iguais ( $P > 0,01$ ). A combinação F+N mantidos na água por 35 dias apresentou 40% de larvas vivas e valor de  $S_{50}$  de 5.5 dias. Os tratamentos na qual a combinação F+N ficou mantida de 0 a 20 dias em água resultaram em baixas taxas de sobrevivência larval (menor de 27%) com valores de  $S_{50}$  de 3 dias.

Formulações em óleo vegetal facilitam a aderência dos conídios no tegumento dos insetos (Scholte et al., 2005; Blanford et al., 2005), propiciam um micro-ambiente que protege o fungo contra raios ultravioletas, desidratação (Prior et al., 1988; Batta, 2003). Atualmente a viabilidade, infectividade e persistência dos conídios em condições de campo são inadequadas, exigindo o desenvolvimento de formulações de longa duração (Knols et al., 2010). Bukari et al., (2011) demonstraram que esporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* formulados com óleo sintético (Shell Sol T) foram persistentes em reduzir a

sobrevivência de larvas de *A. gambiae* em condição de campo. Entretanto, as avaliações de persistência foram feitas por até 7 dias pós-aplicação das formulações na água e a avaliação das taxas de sobrevivência de larvas foi realizada quantificando o número de pupas formadas, pois a água estava muito turva para avaliar a mortalidade das larvas. No presente estudo foi quantificado as larvas mortas em todos os experimentos. Inyang et al (2000) demonstraram a eficiência e a persistência da combinação do fungo *M. anisopliae* com o óleo ShellSol T contra insetos, no caso, larvas do besouro da mostarda (*Phaedon cochleariae*) a persistência foi avaliada durante seis semanas. Coitinho et al., (2006) avaliaram efeito residual de vários óleos vegetais, inclusive o óleo de Nim, sobre a mortalidade do gorgulho do milho *S. zeamais* em grãos de milho armazenado. Eles verificaram que no período inicial de armazenamento todos os óleos ocasionaram mortalidade acima de 79%, mas ao longo de 60 e 120 dias a mortalidade foi inferior a 2,5%.

O óleo de Nim provavelmente evita efeitos nocivos do contato da água direto com os conídios do fungo. Quando esporos fúngicos secos são aplicados a um habitat aquático, típico para as larvas do mosquito, os nutrientes na água são geralmente suficientes para estimular germinação nos esporos (Hegedus et al., 1995, Burges et al., 1998). Uma vez que um esporo germina a camada exterior é rompida reduzindo a possibilidade de aderência ao hospedeiro, diminuindo assim a patogenicidade dos esporos. Além do mais os esporos secos ficam mais expostos à radiação UV e de altas temperaturas, que são conhecidos por afetar negativamente a persistência e a taxa de germinação (Moore et al., 1993, Moorley Davies et al., 1996).

Conídios secos de *M. anisopliae* ou *B. bassiana*, sem nenhuma formulação, perderam sua patogenicidade cinco dias depois de terem sido aplicados à superfície da água com a taxa de sobrevivência de larvas expostas aos esporos fúngicos semelhante aos dos controles (Bukari et al., 2011). Resultado semelhante foi mostrado em um estudo realizado por Alves et al. (2002), onde *M. anisopliae* não causou mortalidade em larvas de *C. quinquefasciatus* quatro dias após os esporos serem aplicados em água (Alves et al., 2002). Pereira, 2009 mostrou, em condição de laboratório, que larvas de *A. aegypti* expostas a conídios de *M. anisopliae* em um grão de arroz mantido na água por 10 dias apresentaram 25% de mortalidade e valor de  $S_{50}$  de 7 dias.

Em condição de semicampo 10 grãos de arroz com conídios de *M. anisopliae* mantidos em água por 7 dias resultaram em 52% de larvas de *A. aegypti* vivas. E 20 grãos de arroz com conídios de *M. anisopliae* mantidos em água por 10 dias resultaram em 54% de larvas de *A. aegypti* vivas.

No atual estudo a utilização de *M. anisopliae* + TW mantido em água por 5 dias apresentou taxa de sobrevivência larval de 48% e de *M. anisopliae* + TW mantido em água por 10 dias apresentou 87,7% de larvas vivas, valor estatisticamente igual ( $P < 0,01$ ) ao controle (88,8%). Ou seja, a persistência do fungo em água é baixa. Pereira et al. (2009) verificaram 50% de larvas mortas quando expostas aos conídios de *M. anisopliae* formulados com TW mantidos em água por 10 dias.

A combinação de F+N testada contra larvas de *A. aegypti* apresentou vários benefícios, como diminuição da taxa de sobrevivência larval, aumento da persistência do fungo ao longo do tempo e provavelmente redução das chances de desenvolvimento de resistência como mostrado quando se utiliza misturas de agentes de controle (Mackenzie et al., 1993).

## 8.0 – CONCLUSÕES

- O óleo de Nim não afetou a germinação e o crescimento radial do fungo *M. anisopliae*;
- O fungo *M. anisopliae* foi altamente virulento contra larvas de *A. aegypti*;
- O óleo de Nim foi tóxico contra larvas de *A. aegypti*;
- A taxa de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas à combinação de F+N foi significativamente menor do que a porcentagem de sobrevivência de larvas expostas ao F ou N sozinhos;
- A combinação F+N reduziu as taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* selvagens por até 30 dias mostrando que o óleo de Nim ajuda a manter a virulência do fungo durante esse período.

## 9.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, S. B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R. M., Vieira, S. A. (2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology*. 126: p.504-509

Andaló, V.; Moino Jr., A.; Cecília, L. V. C.; Souza, E. G. C. (2004). Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com Agrotóxicos Visando o Controle da Cochonilha-da-Raiz-do-Cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Neotropical Entomology* 33(4): 463-467.

Andrade C.F.S., Modolo M. (1991) Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev. Saúde. Publ.* 25: 184-187.

Azevedo, F. R.; Guimarães, J. A.; Sobrinhos, R. B.; Lima, M. A. A. (2005). Eficiência de produtos naturais para o controle de *Bemisia Tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em meloeiro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo.72(1): 73-79.

Batta, Y.A. (2003). 'Production and Testing of Novel Formulations of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphmycetes),' *Crop Protection*, 22, 415\_422.

Blandford S, Shi W, Christian R, Marden J.H, Koekemoer L.L, (2011). Lethal and Pre-Lethal Effects of a Fungal Biopesticide Contribute to Substantial and Rapid Control of Malaria Vectors. *PLoS ONE* 6(8): e23591.

Blanford, S., Chan, B. H. K. Jenkins, N. Sim. D., Turner, R. J Read, A. F., Thomas, M. B. (2005). Fungi pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* 2005, 308: p.1638-1641.

Borges, L. R. & Nova, M. X. V.(2011). Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no Manejo Integrado de Pragas uma revisão. *Ambiência Guarapuava* (PR). 7:(1). 179 – 190.

Braga I.A., Lima J.B.P., Silva S.S., Valle D. (2004) *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.

Bukhari T, Takken W, Koenraadt CJM (2011): Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasit Vectors* 2011, 4:23.

Burges H. D(1998). Formulation of mycoinsecticides. In Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Edited by: Burges HD. Kluwer, Dordrecht; 1998:131-185.

Butt TM, Greenfield BPJ, Greig C, Maffeis TGG, Taylor JWD, Piasecka J.(2013) *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. *PLoS ONE*. 2013;8:e 81686.

Carolino, A. T., Paula, A. R., Silva, C. P., Butt, T. M. Samuel, R. I. (2014) Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Parasites and Vectors*. (7): 2 – 7.

Carolino, A. T, Adriano, Paula, A. R, Morais, C. O. P, Ribeiro, Samuels, R. I.(2013). Persistência do Fungo *M. anisopliae* Formulado com Óleo Vegetal mais Isoparafina e Impregnado com Panos Pretos Contra *Aedes aegypti* em Condições de Semicampo. XVI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior - Universidade do Vale do Paraíba.

Carvalho M.S.L., Caldas E.D., Degallier N., Vilarinhos P.T.R., Souza L.C.K.R., Yoshizawa M.A.C., Knox M.B., Oliveira C. (2004) Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. *Rev. Saúde Pública*, 38: 623-629.

Clark, T. B., Kellen, W., Fukuda, T., Lindgren, J. E. (1968). Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal Invertebrates Pathology*.1968, 11: p. 1-7.

Coitinho, R. L. B.; Oliveira, J; V.; Godim Jr, M. G. C.; Câmara, C. A. G. (2006) Efeito residual de inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots em milho armazenado. *Caatinga* (Mossoró, Brasil), v.19, n.2, p.183-191.

Consoli, R. A. G. B., Oliveira R. L. (1998) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Reimpressão. 225p.

Da-Cunha, M. P., Lima, J.B., brogdon, W. G., Moya, G. E.; Valle, D. (2005) Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100: p. 1-4.

Dengue and severe dengue (2015): World Health Organization; 2015:117.<http://www.who.int/csr/don/12-november-2015-dengue/en/>. Acesso date: 02th Feb 2016.

Depieri RA, Martinez SS, Menezes JRAO (2005). Compatibility of the Fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. *Neotrop Entomol.* 2005;34:601–6.

Dhar, R., K. Zhang, G.P. Talwar, S. Grag & N. Kumar (1998). Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions *J. Ethnopharmacol.* 61: 31-9.

Donalisio, R. M; Freitas, R. R. A. (2015). Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *REV BRAS EPIDEMIOL JAN-MAR 2015*; 18(1): 283-5.

Dua, V.K., Pandey, C.A., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T.P. Dash, A. (2009) Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal.* 8(124):1-6.

Dua, V. K., Nagpal, B. N., Sharma, V. P. (1995). Repellent action of neem cream against mosquitoes. *Indian J Malariol.* 32(2): 47-53.

Eiras, A.E. (2005) Culicídeos. In: Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M. (eds.) *Parasitologia Humana*. 11. ed. Rio de Janeiro: *Atheneu I*, p. 55-367. Elandt-Johnson, R. & Johnson, N. L. (1980). *Survival models and data analysis* John Wiley and Sons, New York.

Estrela, J. L. V., Fazolin, M.; Catani, V., Alécio, M. R., Lima, M. S. (2006). Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* e *Sitophilus zeamais*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília. 41:(2). 217-222.

Faria, M. R., Magalhães, B.P. (2001) O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. 22: 18-21. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*

Ferraz, S., Freitas, L.G. (2008). O controle de fitonematóides por planta antagonistas e produtos naturais.

Finkelman, J. (2002). *Caminhos da saúde pública no Brasil*. Fiocruz. 328p.

Funasa. Fundação Nacional de Saúde (1994). *Manual de Normas Técnicas. Instruções para pessoal de operações*. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, 51p.

Freimoser, F. M., Screen, S., Bagga, S., Hu., Raymond, J. (2003). Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect. *Microbiology*, 149: p.239–247.

Gervásio, R. C. R. & Vendramim, J. D. (2007). Bioatividade do extrato aquoso de sementes de Nim sobre *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) em três formas de aplicação. *Ciênc. agrotec.*, Lavras. 31:(1). 28-34.

George J, Blandford S, Dominguez MJ, Thomas MB, Read AF, Baker, TC. (2011). Reduction in host-finding behaviour in fungus infected mosquitoes is correlated with reduction in olfactory receptor neuron responsiveness. *Malaria Journal*, 10:219.

Goettel, M.S. (1988), 'Pathogenesis of the Hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in the Mosquito *Aedes aegypti*', *Journal of Invertebrate Pathology*, 51, 259\_274.

Haroona WM, Pagesb C, Vassalb J-M, Abdallaa AM, Luong-Skovmandb M, Lecoq M. (2011). Laboratory and field investigation of a mixture of *Metarhizium acridum* and Neem seed oil against the Tree Locust *Anacridium melanorhodon melanorhodon* (Orthoptera: Acrididae). *Biocont Sci Technol*. 2011;21:353–66.

Hegedus DD, Khachatourians G.G. (1995). The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances* 1995, 13:455-490  
Hemingway, J., Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 369–389.

Honório, N. A., Nogueira, R. M. R., Codeço, C. T., Carvalho, M. S., Cruz, O. G., Magalhães, M. A. F. M., Araújo, J. M. G., Araújo, E. S. M., Gomes, M. Q., Pinheiro, L. S., Pinel, C. S., Oliveira, R. L. O. (2009) Spatial Evaluation and Modeling of Dengue Seroprevalence and Vector Density in Rio de Janeiro, Brazil. *Dengue Seroprevalence and Vector Density in Brazil.* 3: 1-11.

Howard, A. F. V., Koenraadt, C. J. M., Farenhost, M., B. G. J., Takken, W. (2010). Pyrethroid resistance in *anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungo *Metarhizium anisopliae* and *Beauveira bassiana*. *Malaria Journal.* 2010, 9: (168). p.2-9.

Inyang EN, McCartney HA, Oyejola B, Ibrahim L, Pye BJ, Archer SA, Butt TM: Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research* 2000, 104:653-661.

Isman, M.B. (2006). Botanical insecticides, deterrent and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomic.* 51: 45-66.

Knols BG, Bukhari T, Farenhorst M. (2010). Editorial: Entomopathogenic fungi as the next-generation control agents against malaria mosquitoes. *Future Microbiology* 5:339-341.

Kweka, E. J., Nyindo, M., Mosha, F., Silva, A. G. (2011) Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. *Parasites & Vectors* 4:(129) 1-10.

Lacey, C. M., Lacey, L. A., Roberts, D. R. (1987) Route of invasion and histopathology of *Metharizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52: p.108-118.

Lima, E. P., Paiva, M. H. S., Araújo, A. P., Silva, E. V. G., Silva, U. M., oliveira, L. N., Santana, A. E., Barbosa, C. N., Neto, C. C. P., Goulart, M., Wilding, C. S., Ayres, C. F. J., Santos, M A. V. N. (2011) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*. 4 (5): 2-12.

Lima, E. P., Oliveira Filho, A. M. O., Lima, J. W. O., Júnior, A. N. R., Cavalcanti, L. P. G., Pontes, R. J. S. (2006) Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(3): 259-263.

Luna, J.E.D, Martins M.F, Anjos A.F, Kuwabara E.F, Navarro-Silva M.A. (2004) Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefos e ci-permetrina, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 38: 842-843.

Luz C, Tai M.H.H, Santos A.H, Silva H.H.G (2008).Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2: 214-215.

Marcondes, C.B. (2001). Entomologia Médica e Veterinária, São Paulo: *Atheneu*. 59-103.

Macoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., Otrera, V. C. G., Carvalho, L. R., Caldas Júnior, A. L., Brogdon, W. G. (2007). Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 102(8): 895-900.

Marques, C. C. A.; Marques, G. R. A.; Brito, M.; Neto, L. G. S.; Ishibashi, V. C.; Gomes, F. A. (1993). Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. *Rev. Saúde Pública*, 27(4). 237-241.

Marques, R. P.; Monteiro, A. C.; Pereira, G. T. (2004). Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*, Santa Maria. 34: (6). 1675-1680.

Martinez, S.S. (Ed) (2002) O Nim - *Azadirachta indica* Natureza, Usos Múltiplos, Produção. Publicado pelo IAPAR - Londrina.

Martinez, S. S. (2003). O Uso do Nim no Café e em outras Culturas. *Revista Agroecologia Hoje*. 4:13-14. McKenzie, C.L, Byford, R.L.(1993). Continuous, Alternating, and Mixed Insecticides Affect Development of Resistance in the Horn Fly (Diptera: Muscidae) *J Econ Entomol* 1993, 86: 1040-1048.

Ministério da saúde (2011). Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. *Dengue: diagnóstico e manejo clínico*. Brasília. 52p.

Ministério da Saúde (2014). Febre de Chikungunya Manejo Clínico.

Ministro da saúde (2016). Febre Zika. Acessado em Fevereiro de 2016.

Mlakar, M. D. j; Korva, Ph. D. M; Tul, M. D. N; Popović, M.D., Ph.D., Poljšak-Prijatelj, M; Mraz, M. Sc; Kolenc, M. Sc. M; Resman, R. K; Vesnaver, V; Vodusek, M. D., Vizjak, A; Jože, P; Petrovec, M; and Županc, T. A. (2016) Zika Virus Associated with Microcephaly. *The new england journal of medicine*. published on February 10, 2016, at NEJM.org.

Mnyone, L.L., Russell, T.L., Lyimo, I.N., Lwetoijera, D.W., Kirby, M.J., Luz, C. (2009) First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s.p and *A. arabiensis* (Diptera; Culicidae). *Parasites & Vectors*, 2:59-63.

Montella, I. R., Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B., Braga, I. A., Valle, D. (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes Aegypti*

populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77: p. 467-477.

Moore D, Bridge PD, Higgins PM, Bateman RP, Prior, C. (1993). Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology* 1993, 122:605-616.

Mordue, A. J. & Nisbet, A. J. (2000). Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: (4) 615-632.

Morley-Davies J, Moore D, Prior C: Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycological Research* 1996, 100:31-38.

Mossini, S. A. G. & Carlos Kemmelmeier, C. (2005). A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (1): 139-148.

Mulla MS, Su T. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J Amer Mosq Cont Assoc*. 1999;15:133–52.

Munguía, A. M. G., Hernández, J. A. G., Tellez, E. A. R., Pérez, M. A. R., Villanueva, F. R. (2011) Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female. *Vetores Parasit*. 4: (24). 1-6.

Murugan K, Babu R, Jeyabalan, D; Kumar, N.S; Sivaramakrishnan S. (1996). Antipupational effect of neem oil and neem seed kernal extract against mosquito larvae of *Anopheles stephensi* (Liston). *J Entomol Res* 1996, 20:137–139.

Murugan, K. Jeyabalan, D. (1999). Effect of certain plant extracts against the mosquito *A. stephensi*. Liston. *Current science*,16,631-633.

Naqvi, S. N; Ahmed, S. O; Mohammad, F. A. (1991). Toxicity and IGR effect of two new neem products against *Aedes aegypti* (PC SIR Strain). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. V.4, n.1, p.71-76, 1991.

Nathan SS, Kalaivani K, Murugan K. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Trop*. 2005;96:47–55.

Ndione, R. D., Faye, O., Ndiaye, M., Dieye, A., Afoutou, J. M. (2007) Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *African Journal of Biotechnology*. 6 (24): 2846-2854.

Neto, O. S; Gomes, A. Z; Ribeiro, S. A; Machado, S. L. F; Samuels, I. R; Fonseca, N. R; Menezes, S. J; Moraes, C. L. J; Campos, E; Mury, B. F; Silva, R. J. (2016) Larvicidal Potential of the Halogenated Sesquiterpene (+)-Obtusol, Isolated from the Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiaceae: Rhodomelaceae), against the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). *marine drugs*. Academic Editor: Peer B. Jacobson.

Neves, P. D.(2011). *Parasitologia Humana*. 13. Edição. São Paulo, *Atheneu*. p.428.

Neves, P. J. & Alves, S. B. (1999). Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e Imidacloprid. *Sci. agric*. 56 (2): Piracicaba. 305-311.

Okumu, F. O., Knols, B. G. J., Knols, U. (2007). Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 6: (63). p1-8.

Oliveira, D. G. P.& Alves, L. F. A. (2007). Interação do Fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Com Terra Diatomácea para o Controle de *Alphitobius*

*diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), o Cascudinho dos Aviários. *BioAssay* 2: (6).1-7.

Oliveira, M.S.S., Roel, A.R., Arruda, E.J., Marques, A.S. (2007) Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartuch-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec. Lavras*. 31(2):326-331.

Orlandelli, R.C. & Pamphile, J.A. (2011) Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.* 6(2):79-82.

Pamplona, L. G.; Lima, J. W. O.; Cunha, J. C. L.; Santana, E. W. P. (2004). Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques decimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(5): 400-404.

Parida, M.M., C. Upadhyay, G. Pandya & A.M. Jana (2002). Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.* 79: 273-8.

Parra, J. R. P.; Botelho, P. S. M.; Ferreira, B. S. C.; Bento, J. M. S. (2002). Controle Biológico no Brasil- Parasitóides e Predadores. São Paulo. 635p.

Paula, A. R., Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2013a). The use of fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. *Parasites & Vectors*.

Paula, A. R., Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2013b) Efficiency of fungus impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Letters in Applied Microbiology*. Letters in Applied Microbiology. 1-7.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Paula, C. O., Samuels, R. I. (2011a) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the Dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Parasites & Vectors*. 4 (8): 2-8.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2011b) Susceptibility of adult females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites & Vectors* 4 (91): 2-7.

Paula, A. R., Brito, E., Pereira, C., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science Technology*. 18: 1-21.

Pereira, C. R., Paula, A. R., Gomes, S. A., Pedra Jr, P. C. O, Samuels, R.I. (2009) The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) larval. *Biocontrol Science and Technology*. 19: 1-6.

Pimenta, A. T. A., Santiago, G. M. P., Arriaga, A. M. C., Menezes, G. H. A., Bezerra, S. B. (2006). Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(4): 501-505.

Polanczyk, R. A. & Alves, R. A. (2005). Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica). 74. 24- 33.

Polanczyk, R. A., Garcia, M. O., Alves, S. B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelenses* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*. 37(6): 813-816

Prior, C. & Jollands, P. (1988) Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytesplutus* (Coleoptera : Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **52**: 66±72.

Quesada-Moraga E, Carrasco-Diaz J.A, Santiago-Alvarez C. (2006) Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J Appl Entomol* **130**: 442–452.

Roberts, D.W. (1970) Coelomyces, Entomophora, *Beauveria* and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, **7**:140-155.

Rodriguez, H. C. & Vendramim, J. D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (1997). *Revista da Agricultura*, Piracicaba. **72**: 305-318.

Roel, A. R.; Vendramim, J. D.; Frighetto, R. T. S.; Frigheto, N. (2000). Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia*, Campinas. **59**(1): 53-58.

Santos, A. B. S.; Silva, T. F. B.; Santos, A. C.; Paiva, L. M.; Lima, E. A. L. A. (2009). Efeito fungitóxico do óleo de Nim sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Caatinga* (Mossoró,Brasil). **22**(2): 17-22.

Santos, A. H, Tai, M. H. H, Rocha, L. F. N, Silva, H. H. G, Luz, H. (2009). Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. DMIPP, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil. *Biological Control* **50** (2009) 37–42.

Santos, A. V.; Oliveira, B. L.; Samuels, R. I. (2007). Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia*. 1-8.

Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* 1990 35:197–271.

Scholte, E.J., Takken, W., Knols, B.G.J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102: 151-158.

Scholte, E-J, B.G.J, Takken, W., Knols B.G.J., (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Elsevier Inc*. All rights reserved. doi:10.1016/j.jip.10.006.

Scholte, E-J, Knols, B. G. J., Samson, R. A., Takken ,W. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Sci* 308: 1641-1642.

Scholte, E-J, Knols, B. G. J., Samson, R. A., Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*. 4:(19): 1-24.

Scholte, E. J., Basilio, N. N., Smallegange, R. C., Takken, W., Knols, B. G. J. (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae*) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*. 1-8.

Seye, F; Bawin , T; Boukraa; Zimmer, J. W; Ndiaye, M; Delvigne, F; Francis, F. (2014). Effect of entomopathogenic *Aspergillus*. strains against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*. August 2014, Volume 49, Issue 3, pp 453-458.

Seye F, Ndione D, Touré M, Ndiaye M, Boukraa S, Bawin T. (2013). Laboratory and semi-field environment tests for the control efficacy of *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (suneem) against *Anopheles gambiae* s. l. adult emergence. *Acad J Biotech.* 2013;1:046–52.

Seye, F, Ndiaye, M, Faye, O, Afoutou, J.M. (2012). Evaluation of Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults, Malaria Chemotherapy, *Control & Elimination* 1:6.

Shalan, E. A.S, Canyon, D, Younes, M.W.F, Abdel-Wahab, H, Mansour, A.H.(2005). A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Internat* 2005 31:1149 – 1166

Shahid, A. A., Rao, A. Q., Bakhsh, A., Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 64 (1): 21-42.

Shaikh, M. A., Naqvi, S. N., Khani, Z. A. K. (2009). Efeitos do óleo de Nim (Neem) na estrutura e função de ovários de ratas albinas adultas. *einstein.* 7(1): 28 - 34.

Silva, H. H. G.; Silva, I. G.; Santos, R. M. G.; Filho, E. R.; Elias, C. N. (2004). Atividade larvica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(5): 396-399.

Souza, M. L. (2001). Utilização de microrganismos na Agricultura- Usos de agentes microbianos na agricultura brasileira. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* nº 21, p. 28-31.

Souza, A. P. & Vendramim, J. D. (2001). Atividade Inseticida de Extratos Aquosos de Meliáceas sobre a Mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology* 30(1): 133-137.

Strieder M.N. (2005) Controle eficiente dos borrachudos. *Ciência Hoje*. 36: 70–71.

Su T, Mulla MS. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Amer Mosq Cont Assoc*. 1998;14:204–9.

Sucen. Superintendência de Controle de Endemias (2002). *Normas e Recomendações técnicas para Vigilância e Controle do Aedes aegypti*, Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 70p.

Sucen. Superintendência de Controle de Endemias (1997). *Plano de erradicação de Aedes aegypti*. Guia de Instruções, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 47p.

Tamai, M. A.; Alves, S. B.; Lopes, R. B.; Faion, M.; Padulla, L. F. L. (2002). Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.69, n.3, p.89-96.

Tauil, P.L. (2002) Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 18(3):867-871, mai-jun, 2002.

Thiboutot, M. M; Kannan<sup>2</sup>, S; Kawalekar, O. U; Shedlock, J. V; . Khan, A. S; Sarangan, G; Srikanth, P; Weiner, D. B; Muthumani, K. (2010). Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? *PLoS Negl TropDis* 4(4): e623. doi:10.1371/journal.pntd.0000623.

Thomas, M. B. & Read, A. F. (2007) Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews | microbiology*. 5: 377-383.

Umeh, V. C.; Ivbijaro, M. F. (1999). Effects of termite damage to maize of seed extracts of *Azadirachta indica* and *Piper guineense* in farmers Fields. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 133: 403-407.

Vasconcelos, C. F. P. (2015). Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, Ananindeua, v. 6, n. 2, p. 9-10, jun. 2015. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, Ananindeua, v. 6, n. 2, p. 9-10, jun. 2015.

Verkerk, R.H.J. & D.J. Wright (1993). Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* Pest. Sci. 37:83-91. [www.ufersa.edu.br/caatinga](http://www.ufersa.edu.br/caatinga).

Vieria, L. P., Paula, A. R., Paula, C. O., DaMatta, R. M., Samuels, R. I (2013) Infection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and adults by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. *British Microbiology Research Journal*. 20:309-317.

World Health Organization WHO (2015). Zika disease. Atualizado em 10 de janeiro de 2016. Acessado em 02 de fevereiro de 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>.

Zaim, M., Guillet, P. (2002). Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol* 18: 161-163.

Zebitz C.P.W. (1984). Effect of some crude and azadirachtin-enriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. *Entomol Exp Appl* 1984, 35: 1-16.