

**FORMULAÇÃO EM ÓLEO AUMENTA A PERSISTÊNCIA DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO PARA USO NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes
aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

ALINE TEIXEIRA CAROLINO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE-DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES**

Abril 2012

**FORMULAÇÃO EM ÓLEO AUMENTA A PERSISTÊNCIA DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO PARA USO NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes*
aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)**

ALINE TEIXEIRA CAROLINO

“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”.

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
Abril de 2012**

**FORMULAÇÃO EM ÓLEO AUMENTA A PERSISTÊNCIA DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO PARA USO NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes
aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

ALINE TEIXEIRA CAROLINO

“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 02 de abril de 2012.

Comissão Examinadora:

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

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

Prof. César Ronald Pereira Gomes (D.Sc., Produção Vegetal) – FMC

Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D., Patologia de Insetos) - UENF
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense- Darcy Ribeiro pela oportunidade;

A FAPERJ pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Richard Ian Samuels, pela orientação, ensinamentos e confiança;

Ao professor Francisco José Alves Lemos do CBB pelos mosquitos cedidos;

Aos professores, a Rita do LEF, Patrícia e Fátima da secretaria PGPV por toda ajuda e paciência;

Ao Adriano Rodrigues de Paula pela coorientação e ensinamentos;

A toda equipe do laboratório de Entomologia e Fitopatologia: Denise, Arli, Thalles, Verônica, Sheila e em especial a toda equipe de dengue: Simone, Cátia, Laerciana, Mariana, Paulo Anderson e Gustavo pela amizade, ajuda nos experimentos e pelo apoio durante toda a minha caminhada no Mestrado;

Ao César Ronald pela oportunidade de trabalhar na UENF;

À minha família pela compreensão, apoio, amor. E especialmente à minha mãe Cláudia, minha tia Valéria e minha avó Nair por sempre terem sido meu porto seguro ao longo de todos esses anos, auxiliando e incentivando;

Às minhas primas e ao meu irmão: Andreiza, Érika e Leandro pelo incentivo e amizade;

Às minhas amigas Thais, Aline Luiza, Aline Barreto, Tatiana e Carla pelo companheirismo, amizade e compreensão.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos biológicos de <i>Aedes aegypti</i>	4
2.2. Distribuição geográfica do <i>Aedes aegypti</i> e histórico da dengue	7
2.3. Características da dengue	8
2.4. Controle do <i>Aedes aegypti</i> e ações integradas de mobilização social	9
2.5. Controle mecânico do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	10
2.6. Controle químico do <i>Aedes aegypti</i>	11
2.7. Controle biológico	12
2.7.1. Bactérias entomopatogênicas	12
2.7.2. Fungos entomopatogênicos no controle biológico	13
2.7.3. Persistência e combinação do fungo entomopatogênico com óleo	18
2.8. Mecanismos gerais de infecção dos fungos entomopatogênicos	19
3. OBJETIVO	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Criação do <i>Aedes aegypti</i> (Linhagem Rockefeller)	21
4.2. Criação do <i>Aedes aegypti</i> oriundos de ovos coletados no campo	21
4.3. Cultivo do fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
4.4. Separação dos conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	22

4.5. Preparo da formulação do fungo	23
4.6. Tratamento dos panos pretos impregnados com fungo entomopatogênico	24
4.7. Manipulação dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	24
4.8. Testes feitos em condições de laboratório	25
4.8.1 Teste de germinação de <i>Metarhizium anisopliae</i> formulado com óleo isoparafina, óleo vegetal ou Tween em condições de laboratório	25
4.8.2. Avaliação da patogenicidade e virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos mantidos em condições naturais	25
4.8.3. Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos mantidos em ambientes diferentes	26
4.9. Testes feitos em condições de semicampo	27
4.9.1. Persistência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos contra <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo	27
4.9.2. Avaliação da persistência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos e mantido na varanda do insetário	28
4.9.3. Efeitos da infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> na oviposição de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo	29
4.9.4. Teste de semicampo avaliando a patogenicidade e virulência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos contra fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> oriundas do campo	29
5. Análise dos resultados	30
6. Resultado	31
6.1 Testes em condições de laboratório	31
6.1.1 Teste de germinação de <i>Metarhizium anisopliae</i> formulado com óleo isoparafina, óleo vegetal ou Tween em condições de laboratório	31
6.1.2 Avaliação da patogenicidade e virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos mantidos em condições naturais	32
6.1.3 Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos mantidos em ambientes diferentes	34
6.2. Testes feitos em condições de semicampo	35

6.2.1. Persistência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos contra <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo	35
6.2.2. Avaliação da persistência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos e mantido na varanda do insetário	37
6.2.3. Efeitos da infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> na oviposição de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo	38
6.2.4. Teste de semi-campo avaliando a patogenicidade e virulência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> impregnado em panos pretos contra fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> oriundas do campo	39
7. DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÕES	45
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

Carolino, A.T. MSc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2012. Formulação em óleo aumenta a persistência do fungo entomopatogênico para uso no controle do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

Os fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para o controle do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*. Trabalhos têm mostrado que panos pretos impregnados com fungo reduziram a sobrevivência do mosquito *Anopheles*, vetor da malária. Entretanto, apenas um trabalho mostrou a eficiência de fungos entomopatogênicos para controle do *A. aegypti* em condições de semicampo. Em se tratando da utilização de fungos entomopatogênicos em simulações de semicampo, formulações em óleo apresentam potencial para promover proteção aos conídios dos fungos, facilitar a adesão dos esporos às superfícies hidrofóbicas do tegumento dos insetos e proporcionar melhores condições para causar infecção. No presente trabalho, o fungo *Metarhizium anisopliae* isolado ESALQ 818 [F] formulado com a mistura dos óleos Isoparafina [I] e Vegetal [V] (óleo de girassol) ou somente com o óleo vegetal (F+V), não apresentou efeito negativo na germinação dos conídios. A formulação F+V+I se mostrou eficiente em condições de semicampo com apenas 32% de sobrevivência de mosquitos *A. aegypti* expostos a cinco panos impregnados com o fungo durante os primeiros 0-5 dias do experimento. A persistência da formulação F+V+I se manteve viável até 24-29 dias sendo estatisticamente diferente do grupo controle (87,3%) com 77,3% de sobrevivência dos mosquitos ($F_{6,14} = 54,96$; $p < 0,01$). Mosquitos expostos por 48 horas em condições de semicampo aos panos impregnados com F+V+I, também tiveram redução significativa na oviposição (37 ovos) comparado com o grupo controle (206 ovos), panos sem fungo. A formulação F+V apresentou sua menor taxa de sobrevivência quando os mosquitos ficaram expostos aos panos durante os 0-5 dias do experimento, com 36,6% de sobrevivência. A persistência nesta formulação se manteve até 6-11 dias, com 50% de sobrevivência. Após a exposição dos panos com fungo (F+V+I) a condições naturais, a sobrevivência dos mosquitos via contato indireto com o fungo na sala de semicampo, foi comparada com contato direto pela pulverização dos mosquitos com uma suspensão dos conídios de *M. anisopliae* extraídos dos panos. A sobrevivência

também foi reduzida ($p < 0,01$). Entretanto, em comparação com os resultados do semicampo, os panos que ficaram em condições naturais tiveram redução na viabilidade dos conídios. Contudo mesmo com essa observação o fungo se manteve virulento com persistência de 12 dias, com 65% e 48% de sobrevivência. Nos ensaios de semicampo, a formulação F+V+I também se mostrou virulenta reduzindo a sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* oriundos do campo com 34,6% de sobrevivência comparado com o grupo controle (78,8%). O presente estudo mostra que panos pretos impregnados com a formulação F+V+I pode ser uma potencial ferramenta para controle do mosquito *A. aegypti* em condições de campo. Do ponto de vista epidemiológico, a redução na população do mosquito *A. aegypti* reduzirá as incidências de dengue.

Palavras-chave: Formulação, *Aedes aegypti*, semicampo, fungo entomopatogênico, *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

Carolino, A.T. MSc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April 2012. Oil formulation increases the persistence of entomopathogenic fungi for use in the control of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Advisor: Prof. Richard Ian Samuels.

Entomopathogenic fungi are potential candidates for controlling the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. Studies under field conditions showed that black cloths impregnated with fungus reduced the survival of the malaria vector mosquito, *Anopheles*. However only one study has been conducted using entomopathogenic fungi for control of adult *Aedes aegypti* under field simulated conditions. Oil formulations have potential to protect entomopathogenic fungi, facilitating spore adhesion on hydrophobic surfaces and thus increasing infections rate. Oil formulations could also increase tolerance of conidia to abiotic factors. In the current study the formulation of the fungus ESALQ 818 in vegetable oil (sunflower oil) and isoparaffin had no negative effect on conidial germination. Formulation of fungi (F) + Vegetable oil (V) +Isoparaffin (I) increased efficiency, with 32% survival of mosquitos exposed to fungus impregnated cloths during the initial 0-5 days period. The persistence in the formulation F+V+I was maintained up until 24-29 days, with 77,3% mosquito survival compared to the controls with 87% survival ($F_{6,14} = 54,96$ $p < 0,01$). Mosquitoes exposed to cloth impregnated with F+V+I for 48hours in semi-field conditions resulted in a significant reduction in oviposition (37 eggs) compared with control group (206 eggs). The F+V formulation resulted in the lowest survival rate (36,6%) when mosquitoes were exposed to cloths maintained in semi-field conditions over 0-5 days. The persistence of this formulation was maintained until 6-11 under semi-field conditions, with 50% survival. Mosquitoes infected by indirect contact (cloths in semi-field conditions) or following direct spray contact with the fungus re-suspended from the cloths that had been exposed to adverse conditions, also reduced survival ($p < 0,01$). However, in comparison with the semi-field results, the fungus on the cloths maintained under adverse conditions had reduced viability, although the conidia remained virulent for 12 days with 65% and 48% survival. Under semi- field conditions, the formulation F+V+I was also virulent reducing the survival of mosquitoes from wild type populations, with 34,6% survival compared to the controls

(78,8%). The present study shows that black cloths impregnated with the formulation F+V+I could be potential tools for the control of adult *A. aegypti* under field conditions. From an epidemiological standpoint, the reduction in the *A. aegypti* mosquito population could reduce the incidence of dengue.

Keywords: Formulation, *Aedes aegypti*, semi-field, entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença reemergente e um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, por ser considerada a principal arbovirose a afetar o homem (WHO, 2009). Esta situação se agrava pelo fato que o arbovírus ocorre nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. As epidemias de dengue ocorrem principalmente no verão, devido às altas temperaturas e chuvas intensas favorecendo o desenvolvimento do mosquito vetor (Beserra *et al.*, 2006; Lambrechts *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), já foram notificados casos da doença em mais de 100 países e cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob risco de infecção. O seu espectro clínico é muito amplo, variando de formas assintomáticas até formas mais graves (Tauil, 2002; WHO, 2009).

No Brasil, o primeiro registro de dengue com confirmação laboratorial ocorreu em Boa Vista (Roraima) em 1982, onde foram confirmados a circulação dos sorotipos 1 e 4. A partir de 1986, vários estados brasileiros já apresentavam surtos ou epidemias de dengue clássica (FUNASA, 2001; Figueredo *et al.*, 2004).

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor da dengue e também da febre amarela. Essas duas doenças são causadas por *Flavivirus* (Família *Flaviridae*). Oriundo da África, esse mosquito acompanhou o homem em sua migração pelos continentes (Consoli *et al.*, 1998)

As medidas de controle químico para insetos vetores foram implantadas desde o começo do século XX. Com a descoberta do DDT, este se tornou o principal método utilizado em programas de erradicação do mosquito. No entanto, o uso intensivo do DDT provocou o aparecimento de resistência na população de *A. aegypti*, passando-se então para a utilização de inseticidas organofosforados.

Porém, o emprego dos organofosforados de forma intensiva também acarretou o surgimento de resistência na população de *A. aegypti*, além dos danos causados para saúde humana (Ranson *et al.*, 2001; Braga & Valle, 2007; Wondji *et al.*, 2008).

Estratégias de controle biológico têm sido amplamente estudadas. As bactérias entomopatogênicas são os agentes de controle de mosquitos mais utilizados em todo o mundo. As duas espécies mais estudadas e utilizadas são *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* que possuem elevadas propriedades larvicidas por produzirem endotoxinas proteicas às quais quando ingeridas pelas larvas, atacam e destroem as células epiteliais (intestino médio) levando-as à morte (Neto *et al.*, 1985; Costa *et al.*, 2010). Desde a descoberta da patogenicidade do *B. sphaericus* em larvas de *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae) iniciou-se a utilização desta no controle larvário de mosquitos, pois as espécies do gênero *Culex* e *Anopheles* se mostraram sensíveis à ação patogênica dessa bactéria (Silva *et al.*, 2002).

A utilização do Bti para o controle de *A. aegypti* se intensificou devido ao seu alto grau de virulência para larvas deste vetor. Estudos apontam ainda a identificação de diferentes cepas de Bt, as quais exercem ação patogênica não somente para larvas de mosquitos como também para outras ordens de inseto como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, e outros (Praça *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2006; Porcar *et al.*, 2008).

Os fungos entomopatogênicos também se mostram promissores e têm sido usados com eficiência no controle de pragas agrícolas e também no controle de mosquitos vetores: *Culex quinquefasciatus* (Scholte *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2010b) *Anopheles* (Scholte *et al.*, 2004; Scholte *et al.*, 2005), e *Aedes aegypti* (Scholte *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2008). Diferente das bactérias, a ação dos fungos não está restrita somente às larvas, há a possibilidade de infecção desde o ovo até o estágio adulto do inseto (Scholte *et al.*, 2004; Luz *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009).

Em condições de campo superfícies têm sido impregnadas com fungo entomopatogênico com objetivo de reduzir a população adulta de insetos vetores. Ensaio utilizando vasos de barro impregnados com *Metarhizium anisopliae* apontaram a eficiência do mesmo, infectando mosquitos *Anopheles* (Farenhost *et al.*, 2008). Panos pretos impregnados com fungo também se mostram promissores e

têm sido usados para infecção de *A. gambiae* em condições de campo (Scholte *et al.*, 2005) e de *A. aegypti* em condições de semicampo (Paula *et al.*, 2008).

Como esses entomopatógenos são sensíveis às condições ambientais, formulações à base de óleo mostram potencial por promover proteção aos conídios, facilitar a adesão dos esporos às superfícies hidrofóbicas do tegumento dos insetos e proporcionar a estes melhores condições para causar infecção (Luz *et al.*, 2005). Além disso, visam aumentar a resistência dos conídios a fatores abióticos (Alves *et al.*, 2002; Leucona *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2005; Hedimbi *et al.*, 2011).

Testes de persistência e patogenicidade de fungos utilizando o óleo sintético Shellsol nas formulações de fungos entomopatogênicos se mostram promissores (Howard *et al.*, 2011). O ensaios realizados por Bukhari *et al.* (2011) mostraram um aumento na persistência de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* formulados com esses óleos para uso contra larvas de *Anopheles*. Em experimentos com adultos do mesmo vetor, Mnyone *et al.* (2010) observaram em condições de laboratório a persistência e patogenicidade do fungo *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* quando impregnados em panos pretos por até 28 dias e expostos aos mosquitos *Anopheles*. Entretanto, apenas um trabalho mostrou em condições de semicampo a eficiência de fungos entomopatogênicos para controle do mosquito *A. aegypti* (Paula *et al.*, 2008).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a persistência do fungo *M. anisopliae* formulado em óleo e impregnado em panos pretos que foram expostos ao mosquito *A. aegypti* em condições de semicampo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos biológicos de *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* é holometábolo com seu ciclo biológico passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (figura 1). Os ovos são elípticos ou ovais, podendo apresentar um lado achatado, plano ou mesmo côncavo. Os ovos do mosquito *A. aegypti* são postos de forma isolada no substrato acima do nível da água parada e pobre em matéria orgânica, onde o embrião se desenvolve entre 2 e 3 dias (Consoli *et al.*, 1998; Neves *et al.*, 2005). Os ovos do *A. aegypti* podem permanecer em ambiente desfavorável por mais de um ano. De acordo com Regis *et al.* (2008), essa facilidade em permanecer em ambientes hostis, facilita a dispersão do vetor e aumenta a capacidade de permanência no meio ambiente. A oviposição em diferentes lugares é uma estratégia realizada pela fêmea para evitar superlotação e competição larval em locais onde a disponibilização alimentar possa ser limitada (Tsunoda *et al.*, 2010).

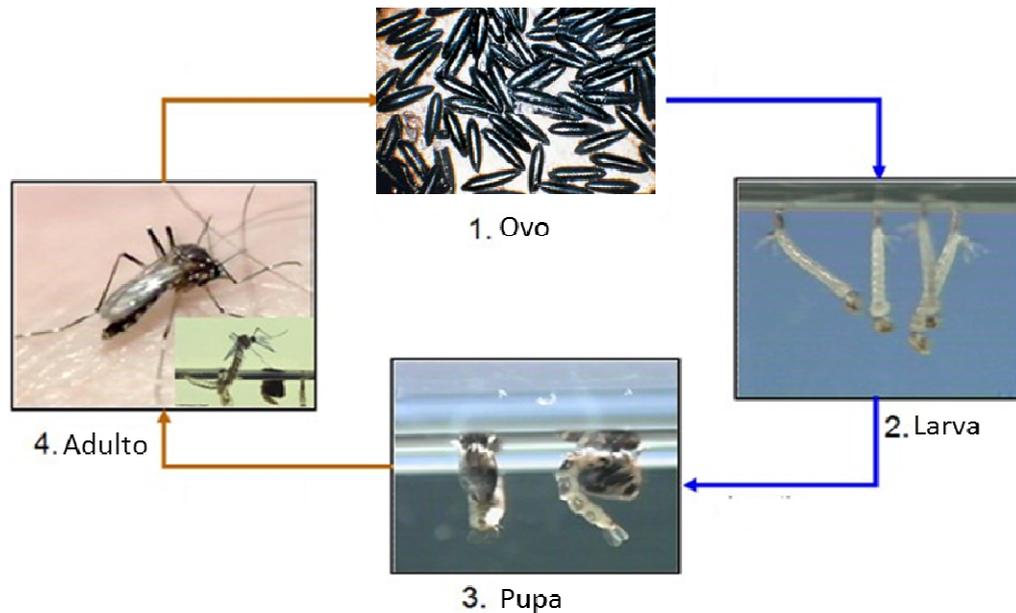


Figura 1. Ciclo Biológico do *Aedes aegypti*. Fonte: Center for Disease Control and Prevention.

A fase larvária é essencialmente aquática e compreende quatro estádios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e 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. Assim como as larvas, as pupas também são aquáticas, porém não se alimentam, apenas respiram e se movimentam ativamente. 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)

Esta espécie em sua trajetória evolutiva desenvolveu comportamento altamente sinantrópico e antropofílico, sendo relacionado à espécie de culicídeos que mais se associa ao homem (Natal, 2002). Os culicídeos na natureza nutrem-se de néctar de flores e frutos que são essenciais ao seu desenvolvimento, contudo as fêmeas adultas necessitam da alimentação sanguínea para maturação de seus ovos, daí a busca constante de hospedeiros. (Barata *et al.*, 2001). De acordo com Canyon *et al.* (1999) as fêmeas do mosquito *A. aegypti* após a realização de um repasto sanguíneo e na ausência de novos repastos, podem atrasar o seu ciclo de oviposição. E em condições altamente estressantes como a falta de um local úmido para a postura de seus ovos, a oviposição pode ser retardada por um período de um

a quatro dias, o que acaba por favorecer a dispersão desse vetor para áreas mais favoráveis (Canyon *et al.*, 1999 ; Harrington & Edman, 2001; Colton *et al.*, 2003).

A.aegypti é altamente urbanizado, utilizando recipientes naturais ou artificiais para oviposição, sobretudo materiais recicláveis como latas, pneus, garrafas. Estes recipientes se transformam em criadouros dos mosquitos, pois acumulam água principalmente nas épocas mais chuvosas, período simultâneo às ascensões térmicas que precedem a chegada do verão. Estes dois fatores atuando juntos favorecem a eclosão dos ovos, que podem ficar depositados nos referidos recipientes por até um ano. Iniciando assim uma geração de mosquitos imaturos (Consoli *et al.*, 1998; Gaugler *et al.*, 2011).

Na atualidade, o mosquito *A. aegypti* não é dependente apenas dos recipientes manufaturados pelo homem, pois foi observado que o mosquito já vem ao longo dos anos se adaptando a outros locais como bromélias. Estudos comprovaram a presença de formas imaturas de *A. aegypti* nos meses de novembro a janeiro em *Alcantarea imperialis* (Gonçalves & Messias, 2008). Varejão *et al.* (2005) realizaram levantamento em cinco áreas do Espírito Santo e observaram a presença do *A. aegypti* em bromélias próximas a prédios residenciais ou comerciais.

A periodicidade do hábito alimentar do *A. aegypti* é predominantemente diurna, realizando todas as suas atividades neste período (Consoli *et al.*, 1998; Chadee & Martinez, 2000). Lima-Camara (2010), entretanto, demonstrou atividade do mosquito no período noturno e ressaltou que a necessidade nutricional talvez seja um fator relevante para esse comportamento. O estudo observou também que durante as horas mais tardias de períodos chuvosos, havia comportamento de busca, principalmente nos hospedeiros que buscavam repouso.

A infecção da fêmea do *A. aegypti* pelo vírus ocorre quando esta pica um indivíduo em fase de viremia. Em 2010, o ministério da saúde registrou um número de óbitos superior à última grande epidemia no Brasil. Até outubro de 2010 o registro compunha 592 mortes por dengue, chegando a superar o número de indivíduos que vieram a óbitos por complicações por dengue em 2008, onde o Ministério da Saúde registrou 478 casos (Ministério da Saúde, 2011).

2.2. Distribuição geográfica do *Aedes aegypti* e histórico da dengue

A. aegypti é de origem africana, migrando para o continente americano através de embarcações. Os primeiros relatos indicam que o mosquito teria vindo para as Américas nos navios negreiros no século XIX (Eiras, 2005). A dengue é uma doença comumente encontrada em localidades de clima tropical e subtropical do mundo. A primeira pandemia global de dengue teve início no Sudoeste da Ásia e Regiões do Pacífico durante e após a Segunda Guerra Mundial. Mudanças ecológicas que ocorreram naquele momento, provavelmente favoreceram a expansão geográfica do vetor e o aumento de sua densidade. Acredita-se que o elevado número de indivíduos suscetíveis como as populações locais e os soldados que se movimentavam para diferentes localidades, criaram condições para a dispersão do vírus. (Gubler, 1997).

No Brasil, na década de 50 *A. aegypti* foi considerada erradicada com as medidas de controle químico. Entretanto, como nem todos os países do continente americano foram eficientes na erradicação do mosquito, esse vetor foi reintroduzido no país a partir de 1967 no Pará (PA). Em 1976, o mosquito *A. aegypti* foi detectado na cidade de Salvador (BA) e no ano seguinte, no Rio de Janeiro (RJ), instalando-se definitivamente no território brasileiro. Atualmente encontra-se presente em todos os estados brasileiros (SUCEN, 2011).

O combate ao *A. aegypti* foi institucionalizado no Brasil de forma sistematizada a partir do século XX devido à ocorrência de diversas epidemias de febre amarela no país, levando a óbito milhares de pessoas (Braga & Valle, 2007). Com o objetivo de impedir que o mosquito se tornasse um grande problema de saúde pública, foi implantado o Programa de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa), um programa que resultou em um fortalecimento das ações de combate ao mosquito, intensificando o uso de inseticidas para combater o mosquito no campo. Essa estratégia, comum aos programas de controle de doenças transmitidas por vetores em todo o mundo, mostrou-se absolutamente incapaz de responder à complexidade epidemiológica da dengue (Braga & Valle, 2007).

Os resultados obtidos no Brasil e o próprio panorama epidemiológico internacional não foram eficientes para erradicar o mosquito. A partir dessa constatação, em 2001 o Ministério da Saúde estabeleceu o Plano Nacional de Controle da Dengue, a fim de modificar as medidas de controles existentes,

incorporando elementos como a mobilização social e a participação comunitária. (FUNASA, 2002). De acordo com Tauil (2006), é importante que antes de se iniciar uma alternativa de controle, alguns fatores sejam levados em consideração e um deles é a urbanização da população. Verifica-se que quase 70% dos casos notificados da dengue no país se concentram em municípios com mais de 50.000 habitantes que, em sua grande maioria, fazem parte de regiões metropolitanas ou polos de desenvolvimento (Tauil, 2006; Maciel-de-Freitas *et al.*, 2007).

Em 2002 foram notificados cerca de 700 mil casos de dengue no país, ocorrendo uma redução em 2003 para 281.000 casos, porém em 2005 o número de casos da doença voltava a assustar chegando a registrar 585.769 casos em 2008 (Portal da Saúde, 2011). Até setembro de 2011 o Ministério da Saúde registrou um total de 721.546 casos da doença no Brasil, sendo 47,6% deste no Sudeste. Um dado comparativo entre os meses de Janeiro a Dezembro mostra que o Rio de Janeiro e o Espírito Santo foram os estados que registraram um aumento no número de casos comparados ao mesmo período de 2010. O Rio de Janeiro chegou a registrar 155.771 comparando com 26.512 no mesmo período de 2010 (Ministério da Saúde, 2011).

Se considerar que estas notificações representam apenas 15% do total notificado (Lima *et al.*, 1999) é possível que o número de casos tenha sido da ordem de 10 milhões. Além disso, se considerar ainda que grande parte das infecções pelo vírus da dengue é assintomática (Teixeira *et al.*, 2002), o número real de casos pode ter sido superior a 40 milhões, cerca de 20% da população do país. É, pois, de considerável relevância combater esta doença em nosso meio (Câmara *et al.*, 2007).

2.3. Características da dengue

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa de etiologia viral e transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelo *A. aegypti*. A doença pode apresentar diferentes manifestações clínicas: assintomática, febre da dengue (FD) também conhecida como dengue clássica ou ainda a febre hemorrágica da dengue (FHD), às vezes com síndrome do choque da dengue (Clyde *et al.*, 2006).

A infecção da dengue é causada por um vírus de genoma RNA pertencente ao grupo dos arbovírus, do gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*. O vírion tem aproximadamente 50 nm de diâmetro e seu genoma possui 11kb de extensão. São conhecidos 4 sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 onde todos já tiveram seu genoma sequenciado (Rothman, 2004; Portal da Saúde, 2011).

O vírus da dengue possui três proteínas estruturais sendo: a proteína C (capsídeo), a proteína M (membrana e a proteína E (envelope), além de outras sete proteínas não estruturais. A proteína E é a principal proteína estrutural e está relacionada com a ligação do vírus aos receptores celulares dos hospedeiros (Folly *et al.*, 2011).

Embora todos os sorotipos da dengue possam estimular a formação de anticorpos específicos, a imunidade induzida por um sorotipo fornece parcialmente uma ação protetora contra outros sorotipos (imunidade cruzada), entretanto a imunidade conferida pela infecção do vírus (homóloga) é permanente para o sorotipo que causou a infecção (Silva & Richtmann, 2006).

A resposta imunológica à infecção por dengue pode ser primária ou secundária. A resposta primária ocorre em pessoas que não tiveram exposição anteriormente ao *Flavivirus* e acarreta na elevação dos níveis de anticorpos de forma mais lenta. A resposta secundária ocorre em indivíduos que já tiveram uma infecção prévia do *Flavivirus* ocorrendo uma produção de forma mais acentuada nos níveis de anticorpos na tentativa de combater o antígeno (Secretaria de Vigilância em Saúde / MS, 2011).

Como as vacinas ainda se encontram em situação de desenvolvimento, necessita-se intensificar as medidas de controle do mosquito *A. aegypti*.

2.4. Controle do *Aedes aegypti* e ações integradas de mobilização social

A dengue é uma doença que envolve questões culturais e sociais. Um problema enfrentado são as condições encontradas no Brasil, que favorecem a dispersão do mosquito *A. aegypti*. Os aglomerados urbanos, as inadequadas condições de habitação, irregularidade no abastecimento de água, destinação imprópria de resíduos e o crescente trânsito de pessoas e cargas vindo de outros países, acabam sendo um dos fatores culminantes para a proliferação desse vetor (Funasa, 2001). Os dados do IBGE apontam um aumento da população brasileira

que só no período de 2000-2004 teve um incremento de 10 milhões de habitantes, sem contar que 81% da população vivem em áreas urbanas, situações que acabam por ser determinantes para a proliferação do mosquito e a transmissão da dengue (Coelho, 2008). A secretaria de vigilância em saúde e órgãos de publicidade vem divulgando a importância em se combater o mosquito da dengue mesmo em períodos não epidêmicos, a importância de monitorar domicílios e peridomicílios (Funasa, 2001; Siqueira *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011).

2.5. Controle mecânico do mosquito *Aedes aegypti*

O controle mecânico consiste na adoção de práticas capazes de impedir a procriação do *A. aegypti*, tendo como principais atividades a destruição ou eliminação de seus criadouros (Secretaria de Vigilância Sanitária, 2011). Os locais conhecidos como terrenos baldios têm mostrado a existência de um número acentuado de formas imaturas do mosquito *A. aegypti* em copos plásticos e tampas de garrafas PET. Mendonça *et al.* (2011) apontam a necessidade da manutenção desses locais para reduzir significativamente a presença de larvas do *A. aegypti*.

O descarte de pneus é um dos grandes problemas enfrentados na tentativa de exterminar os criadouros do mosquito. Uma parceria com a iniciativa privada e os municípios resultou na implantação de Ecopontos, locais de armazenamento de pneus que têm mostrado uma evolução importante na eliminação desses potenciais criadouros (Secretaria de Vigilância Sanitária, 2011).

Outra medida de controle que vem sendo utilizada pelas prefeituras é a implantação de capas para vedação de depósitos de água e bueiros de áreas urbanas. Serpa *et al.* (2010) mostraram a importância que se deve ter ao manipular esse tipo de material. Um trabalho realizado pela superintendência de controle de Endemias do Estado de São Paulo atentou para possíveis formas incorretas de colocação dessas telas ou capas. Uma avaliação realizada por Serpa *et al.* (2010) entre os anos 2004 -2008, observou-se que as telas se encontravam muito próximas à água, com aspecto ressecado e quebradiço devido à ação do tempo. Em 77% dos locais vistoriados foram encontradas formas imaturas do *A. aegypti*.

Sob o ponto de vista teórico, parece muito fácil a eliminação de criadouros instalados em recipientes artificiais. Contudo, além da execução física propriamente dita, torna-se necessário obter a cooperação dos habitantes locais (Forattini, 1962;

Siqueira *et al.*, 2004; Mendonça *et al.*, 2011). Campanhas educativas bem planejadas podem se tornar um importante veículo de informação nas cidades e municípios, o que resultará no alerta a população residente e assim uma melhor cooperação.

2.6. Controle químico do *Aedes aegypti*

A partir do início do século XX a aplicação de substâncias químicas para o combate a mosquitos e outros vetores começou a ser utilizada intensamente (Forattini, 1962). Na década de 40, a utilização de inseticidas como o DDT foi considerado um fator de grande importância para as autoridades de saúde, alcançando sucesso no controle das doenças transmitidas por insetos vetores. Em 1946 foi reportado o primeiro caso de resistência ao DDT, observado em moscas na Itália. Os mosquitos começaram a mostrar resistência ao DDT mais ou menos no mesmo período das moscas e o primeiro caso foi observado em *Culex pipens* (Hammerstrom, 1958; Ranson *et al.*, 2001; Wondji *et al.*, 2008).

Durante os anos 90, a incidência de dengue aumentou consideravelmente em todo território nacional, se intensificando a partir de 1994. Era, portanto, necessário buscar formas eficientes para o controle do mosquito *A. aegypti*. Entre os anos de 1997-1998, começou-se a utilizar o organofosforado Temephos para controle químico das formas imaturas do mosquito *A. aegypti* (Braga & Valle, 2007). Porém, entre 1999-2000, casos de resistência ao Temephos começaram a surgir (Campos & Andrade, 2001; Polanczyk *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2004; Beserra *et al.*, 2006; Horta *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Prophiro *et al.*, 2011). Hoje o controle larvário da dengue é realizado com Diflubenzuron, um regulador de crescimento (Ministério da Saúde, 2010). Borges *et al.* (2004) utilizando o Diflubenzuron nas concentrações de 0.1 e 1ppm, observaram o potencial do inseticida. Ocorreram mudanças no corpo gorduroso das larvas e inibição da formação de uma nova cutícula durante o processo de muda e conseqüentemente a morte das larvas.

Na África o uso de inseticidas é uma medida de controle intensamente usada no combate do mosquito vetor da malária (Mabaso *et al.*, 2004), porém evidências mostraram resistência dos mosquitos aos produtos químicos utilizados (Brooke, 2001). Em vista das constantes dificuldades encontradas no controle de mosquitos

com inseticidas químicos, intensificou-se a busca por medidas alternativas de controle de vetores, enfatizando a importância dos agentes de controle biológico (Debach & Rosen, 1991). Com isso, o número de pesquisadores investigando o uso de agentes microbianos para o controle de mosquitos tem se intensificado (Scholte *et al.*, 2004; Paula *et al.*, 2011a).

2.7. Controle biológico

O controle biológico pode ser definido como qualquer medida que envolva a utilização de inimigos naturais (parasitas, patógenos ou predadores) visando reduzir ou suprimir uma população de um inseto praga ou vetor (Lenteren & Godfray, 2004).

2.7.1. Bactérias entomopatogênicas

A utilização de compostos químicos para controle de insetos vetores foi amplamente difundida principalmente pelo seu amplo espectro de ação, porém esses agentes de controle acabaram por provocar altos impactos ambientais, sem contar na seleção de insetos resistentes. Analisando todos esses aspectos negativos, ampliou-se a busca por alternativas de controle que permitissem segurança no manejo e também eficiência do mesmo (Becker *et al.*, 2003).

As bactérias entomopatogênicas esporulantes como as do gênero *Bacillus* e *Clostridium*, se tornaram uma alternativa de controle biológico por apresentarem estruturas de resistências conhecidas como endósporo, os quais permitem a passagem por condições ambientais adversas (Costa *et al.*, 2010).

Na agricultura, o controle de pragas por meio de bactérias entomopatogênicas é realizado com *Bacillus thuringiensis* (Bt). A partir de 1976, com a descoberta do isolado *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) começou-se a utilizar essa bactéria no controle de vetores de doenças (Charles *et al.*, 2000). No Brasil, o uso do Bti iniciou-se entre 2000-2001, quando a Fundação Nacional de Saúde (Funasa) optou por implantar o uso de biolarvicidas no controle larvário do *A. aegypti* (Braga & Valle, 2007).

Essa bactéria comumente encontrada no solo, formadora de esporos, nos quais inclui toxinas de elevado poder inseticida, apresenta a vantagem de ser praticamente inócua para o homem, exercendo sua ação no intestino médio do

inseto, provocando-lhes a lise de membranas. O Bti foi usado com grande sucesso no Peru, Equador e na região Amazônica do Peru, local onde após dez semanas da aplicação foi observada uma redução média de 60% na população de adultos do vetor da malária (mosquito do gênero *Anopheles*) (Kroeger *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 2010).

Em condições de laboratório, Lima *et al.* (2005) constataram 95% de mortalidade de larvas de *A. aegypti* tratadas com o Bti. Resultado semelhante foi observado por Espíndola *et al.* (2008) que mostraram nos ensaios a eficiência da bactéria reduzindo significativamente a população das larvas do *A. aegypti*, com 99,5% de mortalidade. Em condições de campo, Lima *et al.* (2005) evidenciaram efeito residual do Bti de 3 a 5 semanas.

Entretanto, apesar desses microrganismos apresentarem estruturas que favoreçam sua persistência no campo, Vilarinhos *et al.* (1998) acreditam que a exposição direta à luz solar pode diminuir a virulência da bactéria.

Em trabalhos realizados por Pontes *et al.* (2005), foi investigado o efeito residual de uma marca comercial de Bti (E vectobac- WDG do fabricante Valent Biosciences, USA) na ausência dos raios solares em condições de laboratório. O grupo observou em 40 dias de experimento mais de 90% de mortalidade das larvas. O ensaio corrobora com os resultados obtidos por Luz *et al.* (2001) de persistência do Bti na ausência de luminosidade para controle do *A. aegypti*.

2.7.2. Fungos entomopatogênicos no controle biológico

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem usados no controle microbiano. Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agente etiológico os fungos. A presença de uma grande variabilidade genética é uma das principais vantagens desses entomopatógenos no controle biológico (Alves, 1998). Dentre os gêneros mais importantes de fungos entomopatogênicos encontram-se *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (Faria & Magalhães, 2001).

Os fungos entomopatogênicos se destacam por serem os únicos microrganismos utilizados no controle biológico que não dependem da ingestão dos esporos pelos insetos. O fungo depende apenas do contato com a cutícula do

hospedeiro, podendo infectar todos os estágios de desenvolvimento do inseto, desde o ovo até ao adulto (Alves, 1998).

As espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os agentes mais conhecidos e utilizados no controle de pragas e isso se deve à sua ampla distribuição geográfica e às diferentes espécies de hospedeiros as quais esses fungos acometem. Além disso, são mais fáceis de serem isolados, tanto do solo quanto de insetos. Devido a essa eficiente dispersão, é crescente o interesse científico por esses microrganismos para utilização no controle biológico (Alves, 1998; Almeida & Filho, 2001; Lanza *et al.*, 2009).

A espécie *B. bassiana* foi o primeiro fungo a ser estudado com detalhes pelo italiano Agostino Bassi, este fungo é responsável por causar uma patologia nos insetos denominada “Muscardine branca” onde os indivíduos atacados apresentam o tegumento coberto por micélio branco. O fungo *B. bassiana* se tornou conhecido internacionalmente pelo produto soviético Boverin, formulado com agentes químicos que promovem um sinergismo dos compostos para redução de pragas como: *Leptinotarsa decemlineata* e *Cydia pomonella* (Alves, 1998).

No controle biológico de insetos, o fungo *M. anisopliae* foi o primeiro agente a ser utilizado para controle de pragas. Os primeiros ensaios foram realizados pelo russo Metschnikoff no final do século XIX (1879), quando avaliou o potencial deste entomopatógeno para controle da praga do trigo *Anisopliae austríaca*. Desde então, já foram relatadas mais de 300 espécies de hospedeiros artrópodes infectados por este fungo (Alves, 1998; Faria & Magalhães, 2010).

No Brasil os estudos com fungos entomopatogênicos começaram em 1923, quando foram identificadas duas espécies de cigarrinhas infectadas pelo fungo *M. anisopliae*. Este fungo passou a ser utilizado então no controle da cigarrinha *Tomaspis liturata* em situação de campo (Faria & Magalhães, 2001). Atualmente esse entomopatógeno é foco de estudo no controle microbiano de mosquitos e sua ação patogênica é comprovada por diferentes grupos de pesquisa (Scholte *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009; Farenhorst *et al.*, 2010; Paula *et al.*, 2011a).

A estratégia de utilização de fungos para controle de mosquitos partiu do anseio por novas abordagens e que as mesmas pudessem ser patogênicas e reduzir os impactos ambientais. Deste modo, propiciou-se a investigação de isolados de fungos que pudessem ser virulentos e patogênicos aos mosquitos. Desta forma, a atividade ovicida de fungos entomopatogênicos foi evidenciada por Luz e

colaboradores (2007), que utilizaram diferentes isolados de fungos entomopatogênicos, constatando que os ovos imersos na formulação do fungo, tiveram redução da eclosão das larvas. Os ovos tratados com *M. anisopliae* e incubados por 25 dias a 98% de UR proporcionaram apenas 11 % da eclosão dos ovos e eclosão de 28% dos ovos quando tratados com *B. bassiana*.

Luz *et al.* (2008), em condições de laboratório, utilizaram a cepa IP 46 do *M. anisopliae*, fungo isolado de solo de Goiânia, para mostrar a virulência do fungo em questão. Este trabalho observou redução da eclosão das larvas apenas para ovos de *A. aegypti* que estiveram com umidade relativa próxima à saturação de 100%. Em uma nova formulação da cepa IP 46 do *M. anisopliae* combinada com o óleo vegetal de girassol, Albernaz & Luz. (2009) também evidenciaram uma redução na eclosão das larvas de *A. aegypti*, porém também em umidade relativa acima ou igual a 90%. O grupo concluiu que a umidade é um fator primordial para redução da taxa de eclosão de ovos tratados com fungo. Estudo com a cepa IP 46 do *M. anisopliae* também demonstrou virulência contra mosquitos adultos de *Anopheles* (Myone *et al.*, 2009).

Ensaio visando o controle de formas imaturas de mosquitos, Daoust & Roberts (1982) constataram alta virulência do fungo *M. anisopliae* para controle larvário de *Culex pipens*, quanto para larvas de *A. aegypti* e *Anopheles stephens*. Resultado semelhante foi observado por Alves (2002) que utilizou *M. anisopliae* para controle de *Culex quinquefasciatus* transmissor da filariose.

Trabalhos conduzidos por Silva *et al.* (2004) utilizando isolados de *M. anisopliae* em larvas de *A. aegypti*, observaram através de análise microscópica que com apenas 24 horas de contato com o fungo, as larvas apresentavam conídios não germinados do fungo no canal alimentar, infectando-as e reduzindo suas atividades.

Para verificar a virulência de isolados de fungos entomopatogênicos no controle de larvas do *A. aegypti*, Pereira *et al.* (2009) realizaram bioensaios com dois isolados do fungo *B. bassiana* e oito isolados do fungo *M. anisopliae* em larvas de segundo e terceiro instar. Nos ensaios foram observados 82% de mortalidade das larvas submetidas ao isolado CG 24 (*B. bassiana*), 90 e 88 % de mortalidade das larvas tratadas com os isolados CG 144 e o ESALQ 818, ambos *M. anisopliae*. O mesmo estudo avaliou a sobrevivência de pupas oriundas de larvas expostas aos fungos. Foi observado que 20% destas não completaram o ciclo de vida, diferente das pupas do controle que obtiveram 100% de viabilidade.

O potencial para controle de mosquitos na fase adulta utilizando fungos entomopatogênicos também tem sido evidenciado. Scholte *et al.* (2004) relataram a disseminação de esporos entre as populações do *Anopheles* em condições de laboratório, onde fêmeas infectadas com o fungo *M. anisopliae* foram capazes de infectar o macho durante a cópula. O macho pode disseminar os esporos do fungo para outras fêmeas durante novas cópulas reduzindo a sobrevivência dos mosquitos. De forma semelhante, García-Munguía *et al.* (2011) e Reyes-Villanueva *et al.* (2011) em ensaios com *A. aegypti*, infectaram machos virgens com o fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana*, constatando que esses foram capazes de infectar fêmeas durante o comportamento de acasalamento, assim reduzindo a sobrevivência e a fecundidade das fêmeas.

A malária é uma das doenças de maior importância no mundo, infectando cerca de 100 milhões de pessoas anualmente, principalmente em países africanos. Blandford *et al.* (2005) realizaram estudos para reduzir a população de mosquitos competentes. Os resultados apontam que fungos entomopatogênicos foram capazes de infectar fêmeas de *Anopheles stephensi* previamente inoculadas com o *Plasmodium chaboudi*, inibindo o desenvolvimento do parasita. Resultando em uma redução na capacidade do mosquito em transmitir malária para a população humana.

Tais pesquisas incentivaram testes de patogenicidade e virulência de fungos entomopatogênicos no controle de mosquitos resistentes a inseticidas. Um problema preocupante quando o foco é reduzir a população desses vetores. Nessa abordagem, bons resultados utilizando fungos foram evidenciados por Farenhorst *et al.* (2009), que recentemente observaram que mosquitos *Anopheles* resistentes a inseticidas e mosquitos não resistentes quando infectados com fungos entomopatogênicos, foram igualmente suscetíveis à infecção fúngica. Resultado semelhante foi evidenciado por Kikankie *et al.* (2010) que observaram que a suscetibilidade ao fungo não é afetada pela resistência a inseticidas. O grupo determinou neste caso, a temperatura como um fator influenciável na mortalidade dos mosquitos resistentes a inseticidas e infectados com o fungo *B. bassiana*. Foi evidenciada esporulação do fungo em mais de 90% dos insetos que foram mantidos durante todo período experimental a 25°C comparando com 70% de esporulação de mosquitos mantidos a 21°C.

A eficiência de fungos entomopatogênicos no controle de mosquitos resistentes a inseticida foi relatada por Howard *et al.* (2010a). Entretanto, o grupo utilizou apenas duas populações diferentes em seus ensaios. Os resultados mostraram que o fungo entomopatogênico *B. bassiana* foi mais virulento aos mosquitos *Anopheles* resistentes a piretroides, comparando com mosquitos não resistentes.

Paula *et al.* (2011a) mostraram em seus ensaios que a combinação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com doses baixas de inseticida, pode ser eficiente e promissora na redução da sobrevivência de mosquitos. A utilização de 0.1 ppm do inseticida imidacloprid (IMI) combinado com fungo e pulverizado em papel filtro, resultou em 56% de mortalidade dos mosquitos *A. aegypti* com apenas 3 horas de exposição ao papel impregnado com a suspensão do fungo.

Analisando esse comportamento de descanso apresentado por mosquitos adultos, as superfícies impregnadas com fungo têm sido consideradas altamente promissoras. Farenhost *et al.* (2008) impregnaram o interior de vasos de barro com o fungo *M. anisopliae* por considerar o local como o preferido das fêmeas do *Anopheles* para repouso. Nos resultados, o grupo observou que 95% dos mosquitos que adentraram o local tratado adquiriram a infecção fúngica.

Em condições de campo na África, Scholte *et al.* (2005) investigaram os efeitos do fungo *M. anisopliae* impregnado em panos pretos e expostos em habitações humanas na África. Observaram que o pano preto atraiu os mosquitos e o fungo impregnado nos panos foi patogênico infectando os mosquitos à medida que os insetos repousavam no local tratado. As infecções promovidas por fungos entomopatogênicos alteram as atividades comportamentais ou metabólicas do inseto e que poderiam resultar na diminuição da transmissão de doenças sem necessariamente precisar matar o inseto (Thomas & Read, 2007).

Corroborando com os resultados obtidos por Scholte e colaboradores (2005), Lwetoijera *et al.* (2010) realizaram ensaios de campo onde utilizaram uma cabana que portava em seu interior dois panos pretos impregnados com fungo *M. anisopliae*. Constataram mais de 80% de infecção dos mosquitos *Anopheles arabiensis* que adentravam a cabana para realizar o descanso nos panos.

Nenhum trabalho de campo tem sido realizado com o mosquito *A. aegypti* e apenas um ensaio de semicampo foi realizado. Paula e colaboradores (2008) avaliaram em condições de semicampo que panos pretos impregnados com fungo

entomopatogênico *M. anisopliae* formulado com Tween 80 (0,05%) foram virulentos para o mosquito *A. aegypti*, com 70% de mortalidade dos insetos em apenas 7 dias de avaliação.

Esses resultados corroboram com a necessidade em se investigar a virulência e a persistência de fungos entomopatogênicos impregnados em panos pretos para controle do *A. aegypti* no campo.

2.7.3. Persistência e combinação do fungo entomopatogênico com óleo

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* quando usado no campo pode sofrer alteração pela radiação ultravioleta, diminuindo sua viabilidade e virulência. Formulações de fungos feitas com óleo visam aumentar a viabilidade dos conídios exercendo uma ação protetora, permitindo a estes uma maior adesão ao tegumento do hospedeiro, acarretando em maiores índices de mortalidade da praga alvo. Avaliando os efeitos do óleo vegetal sobre o fungo em laboratório, Silva *et al.* (2006) observaram média de 96 % de germinação dos conídios do *M. anisopliae*. De acordo com Alves & Faria (2010), este óleo fornece ao esporo do fungo uma proteção contra os raios UV.

Em outras formulações, a mistura do ShellSol T mais o óleo Ondina, protegeu os conídios contra os efeitos deletérios de 6h de exposição à radiação UV (Alves *et al.*, 1998). Experimentos com adultos fêmeas do *Anopheles* ressaltaram a eficiência da mistura do ShellSol T aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na redução da sobrevivência dos mosquitos (Lwetoijera *et al.*, 2010; Farenhorst *et al.*, 2010). Mnyone *et al.* (2010) constataram que os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* formulados com óleo e impregnados em panos pretos apresentaram persistência por até 28 dias, contra mosquitos adultos de *Anopheles*.

A persistência do fungo *M. anisopliae* também foi evidenciada por Scholte *et al.* (2005) quando impregnaram panos pretos com *M. anisopliae* para controle de *Anopheles*. A persistência do fungo formulado com 5% de óleo vegetal foi observada por até 3 semanas.

Bukhari *et al.* (2011) avaliaram os efeitos de persistência dos fungos *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* formulados com óleo sintético ShellSol T e formulados com Tween 80 contra larvas de *Anopheles* em condições de campo no Quênia. O estudo constatou que formulações oleosas são mais eficientes

comparadas às formulações feitas com Tween 80. A mistura dos fungos em óleo melhorou a dispersão dos conídios na superfície da água reduzindo significativamente a população dos mosquitos *Anopheles* em 39-50%.

Em ensaios com fêmeas do *A. aegypti* alimentadas com sangue, Paula *et al.* (2011b) observaram que fêmeas expostas ao fungo *M. anisopliae* formulado com Tween 80 foram menos suscetíveis à infecção do fungo. Resultado semelhante foi observado por Myone *et al.* (2011) quando expuseram fêmeas do *Anopheles* alimentadas com sangue aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Entretanto, um resultado preliminar utilizando a formulação do fungo combinado com óleo isoparafina + óleo vegetal mostrou-se virulento contra fêmeas do *A. aegypti* alimentadas com sangue em condições de semicampo, reduzindo a sobrevivência dos mosquitos, resultado este que requer maiores investigações (dados não publicados).

2.8. Mecanismos gerais de infecção dos fungos entomopatogênicos

A relação fungo-hospedeiro depende muito das condições ambientais. O primeiro sítio de ligação do fungo entomopatogênico é a adesão, seguido de germinação, penetração e colonização do seu hospedeiro. A adesão dos conídios ao tegumento do inseto depende de enzimas (esterases e proteases) que ocorrem na superfície dos conídios e que por ventura alteram a superfície do tegumento do inseto favorecendo o processo de germinação do fungo. Ocorre então a formação de um tubo germinativo e em sua extremidade a dilatação das hifas formando uma estrutura denominada apressório (Alves, 1998; Fang *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2008).

Durante a penetração estão envolvidos processos físicos de pressão da hifa terminal sobre a cutícula e fatores enzimáticos (proteases, lipases e quitinases), os quais facilitam a penetração do fungo e o metabolismo do tubo germinativo. Durante o processo de colonização do fungo no hospedeiro, ocorre a liberação de toxinas como as destruxinas que afetam as células e a resposta imune do hospedeiro. As hifas do fungo chegam então a hemocele e colonizam o inseto. Após a morte do hospedeiro, o fungo cresce interiormente e todos os tecidos são penetrados pelas hifas. Ao final do processo infeccioso é possível observar o corpo do inseto externamente tomado pelos esporos do fungo (Alves, 1998; Wang & Leger, 2007).

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Avaliar a persistência do fungo *M. anisopliae* impregnado em panos pretos contra adultos do *Aedes aegypti* em condições de laboratório e de semicampo, usando diferentes formulações.

3.2. Específicos

- Investigar a formulação do fungo *M. anisopliae* combinado com óleo visando o controle de adultos do mosquito *A. aegypti*;
- Ensaios de virulência e patogenicidade em condições de laboratório contra *A. aegypti*, utilizando panos pretos impregnados com fungo e subsequentemente expostos a condições adversas simulando condições de campo;
- Avaliar a persistência da virulência do fungo *M. anisopliae* impregnado em panos pretos em condições de semicampo contra adultos de *A. aegypti*;
- Observar os efeitos de panos pretos impregnados com a combinação do fungo + óleo na oviposição de fêmeas do *A. aegypti* alimentadas com sangue em condições de semicampo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da Universidade Estadual do Norte Fluminense- Darcy Ribeiro (UENF), no município de Campos dos Goytacazes RJ.

4.1. Criação do *Aedes aegypti* (Linhagem Rockfeller)

A criação dos mosquitos adultos do *A. aegypti* (Linhagem Rockfeller) foi realizada no insetário do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB/UENF). Os mosquitos foram mantidos em gaiolas plásticas (30 cm x 20 cm x 20 cm). Após a fertilização, as fêmeas foram alimentadas com sangue de camundongo para a maturação de seus ovos. Para a postura dos ovos, foi adicionado um pote plástico de 100 ml com água e envolvido internamente com papel filtro. As fêmeas recém-alimentadas com sangue ovipositaram no substrato acima do nível da água. Após a oviposição, o papel filtro foi transferido para bandejas com água para a eclosão das larvas. As pupas foram retiradas das bandejas e colocadas em copos plásticos (250 ml) no interior de novas gaiolas que foram cobertas com tecido do tipo organza. Os mosquitos foram alimentados com uma solução de sacarose (10%) e mantidos a uma temperatura de 25°C, 70 ± 10 % UR.

4.2. Criação do *Aedes aegypti* oriundos de ovos coletados no campo

Para criação dos mosquitos *A. aegypti* oriundos do campo foram utilizadas 10 armadilhas ovitrampas para coletar os ovos dos mosquitos *A. aegypti* no campus da UENF. As ovitrampas foram feitas de um vaso preto de 500 mL com 4 palhetas de madeira compensada fixas verticalmente nos vasos. Essas armadilhas foram

espalhadas no campus da Universidade. Após uma semana todas as ovitrampas foram coletadas e as palhetas permaneceram 24 horas secando para posteriormente serem imersas em bandejas com água para eclosão das larvas. A criação dos mosquitos de campo foi realizada igualmente ao item 4.1.

4.3. Cultivo do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Foi utilizado o fungo *M. anisopliae* isolado ESALQ 818 (ESALQ - Piracicaba SP). Esta amostra foi reisolada do mosquito *A. aegypti*. O isolado ESALQ 818 foi considerado altamente virulento contra fêmeas de *A. aegypti* (Paula *et al.*, 2008).

Primeiramente o isolado ESALQ 818 foi cultivado em placas de Petri contendo meio sólido SDA (Dextrose 10g; Peptona 2,5g; Extrato de levedura 2,5g; Ágar 20g e 1000 ml de água destilada) e mantidos em câmara climatizada do tipo BOD por duas semanas a 27°C e 70 ± 10 % UR.

Arroz parboilizado (marca: sepé) foi utilizado para produção massal do fungo.

Foram colocados 25g de arroz com 10 ml de água destilada em Erlemeyers e autoclavados por 15 min a 1 atm (120°C). Logo após, com o auxílio de uma espátula esterilizada, os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados ao arroz. Em seguida os Erlemeyers foram incubados a 27°C por 10 a 15 dias e 70 ± 10 % UR.

4.4. Separação dos conídios de *Metarhizium anisopliae*

Para o processo de secagem do arroz com conídios do isolado ESLQ 818 foram utilizados 300g do arroz com o fungo germinado, ou seja, crescido no arroz.

No total, 300g do arroz com conídios do fungo foi embalado em sacos de papel e mantido a 33°C e 22% UR em BOD de secagem [marca: Nova Ética; (Figura 2. A)] por um período de 24h.

Com o auxílio da máquina separadora de esporos (Mycoharvester, Inglaterra) (Figura 2.B) os conídios previamente secos foram retirados do arroz, colocados em sacos plásticos e mantidos em um recipiente com sílica e gel para armazenamento.



Figura 2. (A) Fungo embalado em sacos de papel e seco em BOD; (B) máquina separadora de esporos.

4.5. Preparo das formulações do fungo

A formulação do fungo foi preparada utilizando 4g do conídio seco do isolado ESALQ 818 que foi acrescido à mistura de 50 % de óleo Isoparafina + 50% de óleo vegetal de girassol ou somente 4g do fungo com o óleo vegetal de girassol.

O volume total da solução foi de 200 mL com concentração de 1×10^8 conídios/mL⁻¹.

Essa concentração foi determinada pela contagem dos conídios em câmara de Neubauer.

Nos ensaios foram utilizadas as seguintes formulações:

- a) Fungo + Vegetal + Isoparafina (F+V+I);
- b) Fungo + Vegetal (F+V);
- c) Fungo + Tween (F+TW);
- d) Formulação controle utilizando somente: Vegetal + Isoparafina (V+I), sem adição de fungo.

4.6. Tratamento dos panos pretos impregnados com fungo entomopatogênico

Para infecção dos mosquitos fêmeas do *A. aegypti* com panos pretos impregnados com ESALQ 818, primeiramente todos os panos foram autoclavados por 15 min a 1 atm (120 °C) e impregnados com o fungo *M. anisopliae* da seguinte forma:

- Os panos (8 cm x 7 cm) usados nos testes de laboratório e os panos (20 cm x 15 cm) usados nos ensaios de semicampo, após a serem autoclavados foram imersos em 200mL da formulação do fungo (F+V+I ou F+V ou F+TW) na concentração de 1×10^8 conídios/mL⁻¹. Todos os controles (V+I) foram realizados da mesma forma, porém sem fungo.
- Todos os panos depois de imersos na formulação do fungo ficaram secando pendurados em varais de chão em numa sala do insetário LEF/UENF por 48 horas (25°C, 70 ± 10% UR). Somente após esse período foram utilizados nos ensaios.
- Todos os panos impregnados com o fungo e que foram mantidos em condições ambientais em numa varanda LEF/UENF, após as 48 horas de secagem, ficaram estendidos em varais protegidos de radiação solar direta e chuva durante todo o período experimental.

4.7. Manipulação dos mosquitos *Aedes aegypti*

Os mosquitos fêmeas do *A. aegypti* utilizados nos experimentos foram adormecidos com CO₂ por 20 segundos e posteriormente com o auxílio de uma pinça foram cuidadosamente separados em grupos para a utilização nos ensaios. Para a alimentação dos mosquitos no semicampo, foram preparadas quatro soluções de sacarose a 10% que foram colocadas em vidros de 10 mL e adicionadas nas salas fungo e controle. Nos ensaios de laboratório, um papel filtro embebido com sacarose a 10% foi colocado na parte superior das gaiolas (9cmx 7 cm) para alimentação dos mosquitos.

4.8. Testes feitos em condições de laboratório

4.8.1 Teste de germinação de *Metarhizium anisopliae* formulado com óleo isoparafina, óleo vegetal ou Tween em condições de laboratório

No ensaio foi utilizado o isolado ESALQ 818 em diferentes combinações a fim de investigar o efeito dos óleos na germinação do fungo.

As formulações utilizadas foram: F+V+I, F+V, F+I e o controle positivo formulado com Tween 0,05% (F+TW). Foi retirada uma alíquota de 15 µL das formulações na concentração 1×10^6 conídios/mL⁻¹. Em seguida, foram adicionadas em placas de Petri contendo o meio SDA sólido (Dextrose, Peptona, Extrato de levedura, Ágar e água destilada). As placas ficaram incubadas em câmara climatizada a 27°C e 70 ± 10 % UR para avaliar a germinação dos conídios depois de 12 horas. Foram escolhidos três campos de forma aleatória de cada placa de Petri para verificação da presença do tubo germinativo nos conídios.

No ensaio foram utilizadas três placas para cada tratamento. Posteriormente esta formulação foi utilizada nos experimentos.

4.8.2. Avaliação da patogenicidade e virulência de *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos mantidos em condições naturais

Foram utilizadas fêmeas previamente alimentadas com a solução de sacarose (10%). Os ensaios de laboratório foram realizados utilizando panos pretos (8 cm x 6 cm) autoclavados durante 15 min a 120 °C. Depois de esterilizados, os panos foram imersos na formulação F+V+I na concentração de 1×10^8 conídios/mL⁻¹. Estes ficaram armazenados em uma sala climatizada a 25°C, 70 ± 10% UR por 48h. Após esse período os panos foram transferidos para uma varanda coberta e ficaram pendurados em um varal por 2, 6, 12, 18, 24, ou 30 dias para posterior ensaio de viabilidade. O grupo controle foi conduzido somente utilizando V +I, sem fungo.

Após a exposição dos panos no campo, retirou-se 1cm² do centro de cada pano. O retalho foi colocado em tubo Eppendorf, sendo adicionado 1mL de Tween 80 (0,05%). O material foi agitado em vortex para posterior pulverização da suspensão nos mosquitos de forma direta com o auxílio da Torre de Potter (Burkhart, Inglaterra).

Para realizar a pulverização direta da suspensão, as fêmeas foram separadas cuidadosamente em grupos de 10 insetos para pulverização e depois colocadas em três gaiolas (9 cm x 7 cm). Foram utilizadas 30 fêmeas em cada um dos seis tratamentos, respectivo com o dia de exposição do pano (0, 6, 12, 18, 24, ou 30 dias) e 20 fêmeas do grupo controle (n=20), sem adição do fungo. Os mosquitos (fêmeas) foram mantidos em BOD, alimentados com sacarose a 10%. A sobrevivência dos insetos foi monitorada por 7 dias.

4.8.3. Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos mantidos em ambientes diferentes

Neste ensaio, cinco panos pretos, imersos na formulação F+V+I na concentração de 1×10^8 conídios/mL⁻¹, ficaram mantidos por 48 horas como descrito no item 4.6 e depois mantidos em situação de campo em uma varanda da UENF por 5, 10, 15 e 20 dias.

Os panos foram levados até o laboratório para analisar a viabilidade dos conídios impregnados nos mesmos panos, de acordo com os dias de exposição no campo. A análise da viabilidade foi realizada através de unidades formadoras de colônias (UFC). Como controle, foram utilizados panos pretos com fungo que permaneceram secando em numa sala do insetário LEF/UENF, idem ao item 4.6, esses panos não foram levados a nenhum dos ambientes testados (geladeira, sala e varanda).

Foi cortado 1cm² do centro dos panos e colocados em tubos Eppendorf com 1mL de Tween 80 (0,05%). Este material foi agitado vigorosamente em vortex. Posteriormente, uma suspensão na concentração 1×10^8 conídios mL⁻¹ foi colocada em placas de Petri com meio de cultura SDA. Foram utilizadas três placas para cada dia de tratamento e para cada concentração utilizada. As placas foram então incubadas a 27°C e 70 ± 10 % UR por 36 horas e depois foram contados o número de colônias.

4.9. Testes feitos em condições de semicampo

4.9.1. Persistência do fungo *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos contra *Aedes aegypti* em condições de semicampo

Os testes de persistência tiveram como objetivo avaliar por quanto tempo os conídios do fungo se mantinham viáveis e virulentos nos panos pretos (20 cm x 15 cm) em condições de semicampo. Entretanto, primeiramente antes da realização dos ensaios, foi realizado simultaneamente testes nas duas salas (6m²) do semicampo a fim de avaliar as salas através da sobrevivência dos mosquitos expostos somente a V+I, sem fungo. Posteriormente uma das salas foi utilizada para testes controle e a outra sala somente para os tratamentos com fungo.

Nos ensaios de semicampo, utilizaram-se dois tratamentos. Para o primeiro tratamento fungo, a formulação utilizada foi F+V.

Cinco panos foram imersos em uma suspensão 200mL de F+V com concentração de 1×10^8 conídios/mL⁻¹ e armazenados em uma sala como descrito no item 4.6. O controle foi somente V+I (sem fungo).

O segundo tratamento seguiu da mesma forma, porém utilizando a formulação F+V+I. Os controles foram realizados sem adição de fungo, somente V+I.

Os cinco panos pretos (20 cm x 15 cm) impregnados com o fungo foram fixados embaixo de mesas e cadeiras (Figura 3-A). Em cada uma das salas foram liberados 50 mosquitos fêmeas de *A. aegypti*. As portas e janelas foram vedadas com fita adesiva. A alimentação dos mosquitos foi realizada com solução de sacarose a 10%. Cinco dias depois, foi colocada na sala uma armadilha para capturar os mosquitos vivos (BG-Sentinel – Figura 3-B), que ficou instalada na sala por 24 horas. Essa armadilha coletora possui em seu interior um atraente sintético (BG Lure) que atrai as fêmeas do *A. aegypti* para o interior da armadilha, facilitando a captura dos mosquitos.



Figura 3- (A) Panos pretos fixos em móveis em condições de semicampo. (B) Armadilha de captura de insetos vivos.

Depois que todos os mosquitos foram capturados, houve adição de mais 50 mosquitos nas salas dando continuidade ao experimento. No total, foram liberados na sala 6 grupos de mosquitos e estes ficaram em contato com os mesmos panos que permaneceram nas salas por diferentes períodos: 0-5, 6-11, 12-17, 18-23, 24-29, e 30-35 dias.

Dessa forma, pode-se observar a persistência do fungo ao longo do tempo a partir da taxa de sobrevivência dos mosquitos de cada grupo. Foi considerada persistente nos ensaios, a taxa de sobrevivência dos mosquitos que foi significativamente menor do que o grupo controle.

4.9.2. Avaliação da persistência do fungo *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos e mantido na varanda do insetário

O ensaio de campo foi realizado seguindo o mesmo procedimento do experimento anterior. Após a secagem dos cinco panos (20 cm x 15 cm) idem ao item 4.6. Os panos foram levados até a varanda do Insetário LEF/UENF, onde foram separados em três grupos.

Cada um dos grupos foi exposto às condições ambientais por 2, 12 e 18 dias, respectivamente. Após dois dias de exposição dos panos no campo (varanda), o primeiro grupo de panos foi levado até as salas do semicampo (tratamentos fungo e controle), onde foram fixados embaixo de mesas e cadeiras por um período de cinco dias. Em cada uma das duas salas foram liberados 50 mosquitos fêmeas de *A. aegypti*. As duas salas foram lacradas com fita adesiva.

No quinto dia, foi adicionada uma armadilha BG-Sentinel para capturar os insetos vivos. O mesmo procedimento foi realizado com os demais grupos de diferentes períodos na varanda.

O tratamento controle foi realizado seguindo o mesmo procedimento, porém sem fungo, somente utilizando a formulação V+I.

4.9.3. Efeitos da infecção de *Metarhizium anisopliae* na oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* em condições de semicampo

Neste ensaio foi utilizada a formulação F+V+I na concentração de 1×10^7 conídios/mL⁻¹ onde 5 panos pretos foram tratados como descrito no item 4.6.

O experimento foi conduzido utilizando duas salas iguais (6m²) (denominadas tratamento fungo e tratamento controle [sem fungo]). Os 5 panos impregnados com F+V+I ou apenas V+I foram fixados embaixo de mesas e cadeiras das salas. Foram liberadas 30 fêmeas na sala do tratamento fungo e 30 fêmeas na sala controle.

Os mosquitos ficaram expostos aos panos por 48 horas. Posteriormente dois voluntários entraram por 10 min em cada uma das salas (sala com fungo e sala controle: sem fungo) para que as fêmeas pudessem realizar o repasto sanguíneo. Em seguida, foram adicionadas duas armadilhas tipo ovitrampa. As ovitrapas foram feitas com vaso preto de 500 ml com 4 palhetas de madeira compensada fixas verticalmente nos vasos. Essas ovitrapas mostraram a taxa de oviposição das fêmeas de *A. aegypti* nos tratamentos, fungo e controle. Mesmo após a entrada dos voluntários, os panos previamente fixados nos móveis não foram removidos, e permaneceram ali para exposição dos mosquitos por um período total de 7 dias.

4.9.4. Teste de semicampo avaliando a patogenicidade e virulência do fungo *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos contra fêmeas de *Aedes aegypti* oriundas do campo

Esse teste foi realizado da mesma forma que o item 4.9.1. Entretanto, vale ressaltar que este ensaio foi o único que utilizou fêmeas de *A. aegypti* oriundas de ovos coletados no campo. Após a fixação de cinco panos impregnados com F+V+I em cinco móveis (três mesas e duas cadeiras) simulando um cômodo residencial, apenas um grupo de mosquitos (n=50) foi liberado na sala tratamento fungo e na

sala controle (n=50) que foi utilizado à formulação V+I sem fungo. Os mosquitos ficaram expostos aos panos por 5 dias e subsequentemente foi introduzida uma armadilha coletora para quantificar a sobrevivência dos insetos vivos de cada sala tratada.

5. Análise dos resultados

Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas usando teste *post hoc* de Duncan, admitindo-se $\alpha = 0,05$. Utilizando o programa SPSS for Windows (versão 11.0).

As curvas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência (S_{50}) foram comparados usando o teste de Log Rank em 95% de nível de significância. Este método foi conduzido pelo GraphPad Prism 4.0 Software.

Foram analisadas as repetições de cada tratamento, com o objetivo de verificar se as curvas de sobrevivência entre as repetições não eram estatisticamente diferentes. Não ocorrendo diferenças significativas entre repetições, as três repetições de cada experimento foram juntadas (“pooled”). Dando início a análise das curvas de sobrevivência entre os tratamentos foram feitas três repetições para cada experimento.

6. RESULTADOS

6.1 Testes em condições de laboratório

6.1.1 Teste de germinação de *Metarhizium anisopliae* formulado com óleo isoparafina, óleo vegetal ou Tween em condições de laboratório

Primeiramente foi observado as porcentagens de germinação do isolado ESALQ 818 formulado com óleo isoparafina (F+I), óleo vegetal (F+V) ou 50% de óleo vegetal e 50% de isoparafina (F+V+I). O tratamento controle foi feito com ESALQ 818 em 0,05% de Tween (F+TW). Não houve diferença significativa comparando os tratamentos entre si ou com o grupo controle ($P > 0,01$). Depois de 12 horas de incubação, a formulação F+I apresentou 98,6% de germinação, o tratamento F+V teve 99,3% de germinação, a combinação F+V+I apresentou 99,6% de germinação e o tratamento controle (F+TW) teve 98,3% (Figura 1).

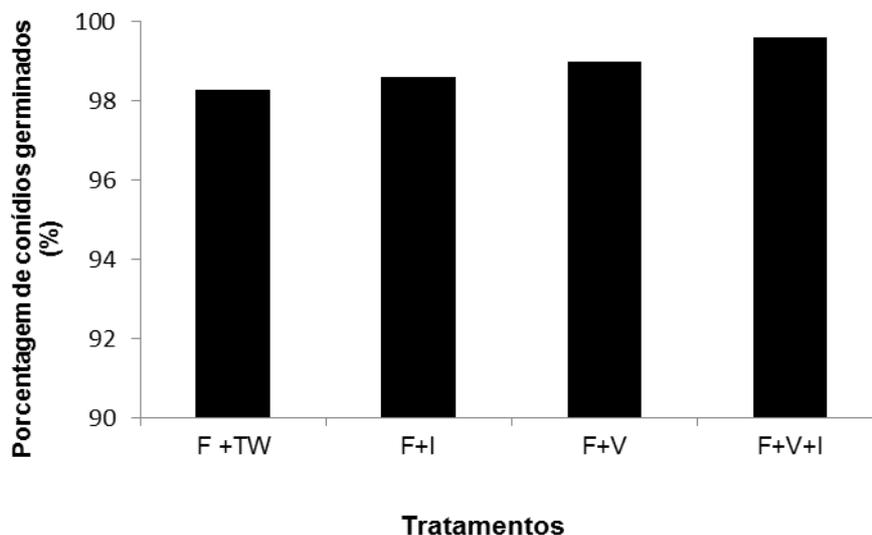


Figura 1- Porcentagem de germinação do isolado ESALQ 818 formulado com óleo vegetal (F+V); Isoparafina (F+I); óleo vegetal + isoparafina (F+V+I). O tratamento controle foi feito com 0,05% Tween 80 + ESALQ 818 (F+TW).

6.1.2 Avaliação da patogenicidade e virulência de *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos mantidos em condições naturais

Nesse teste cinco panos pretos foram impregnados com F+V+I e mantidos por 6 períodos em condições naturais em uma varanda. Depois, 1 cm² de cada pano foi cortado e agitado em Tween. A suspensão resultante foi pulverizada sobre os mosquitos. Os tratamentos controles foram feitos da mesma maneira, entretanto os panos foram impregnados somente com V+I. A sobrevivência dos mosquitos foi quantificada por 7 dias.

Os mosquitos pulverizados com a suspensão de F+V+I oriunda de panos pretos mantidos na varanda por 2 dias apresentaram a menor taxa de sobrevivência (28,8%) e o menor valor de S₅₀ (5 dias), comparado com os outros tratamentos e grupo controle [Tabela 1; F_{6,20} = 20,42 (p<0,01)].

A maior porcentagem de sobrevivência (75,5%) ocorreu quando os insetos foram pulverizados com F+V+I oriundo de panos mantidos por 30 dias na varanda.

A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que as taxas de sobrevivência de *A. aegypti* expostas aos panos mantidos por 2, 6 e 12 dias na varanda foram significativamente diferentes da sobrevivência do controle [F_{6,20} = 20,42 (p<0,01)]. Entretanto os períodos subsequentes (18, 24 e 30 dias) resultaram em taxas de sobrevivência de insetos iguais ao controle (p>0,01). Com isso considerou-se que os panos pretos impregnados com F+V+I e mantidos em uma varanda continuaram a ser viáveis por até 12 dias para o controle de *A. aegypti*.

O maior valor de S₅₀ dos insetos foi de 7 dias, resultado encontrado quando a infecção foi feita usando panos mantidos por 12 dias na varanda. Para os demais períodos (18, 24 e 30 dias) não foi possível determinar o valor de S₅₀.

A figura 1 mostra as taxas de sobrevivência diárias dos mosquitos *A. aegypti* infectados com F+V+I oriundo de panos pretos mantidos na varanda por 6 períodos.

Tabela 1 – Sobrevivência (média %) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas de *A. aegypti* tratados com F+V+I oriundo de panos pretos mantidos em uma varanda por 6 períodos consecutivos. Os mosquitos foram pulverizados com F+V+I diretamente via Torre de Potter. O tratamento controle foi feito da mesma maneira, mas com V+I.

Períodos em que os panos foram mantidos na varanda	% Sobrevivência \pm DP*	S_{50}
2 dias	28,8 \pm 8,35c	5
6 dias	41,1 \pm 7,29cb	6
12 dias	48,8 \pm 6,26b	7
18 dias	60,0 \pm 4,70a	ND
24 dias	70,0 \pm 3,43a	ND
30 dias	75,5 \pm 2,47a	ND
CONTROLE	76,6 \pm 2,08a	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). Dados não determinados (ND). Por não apresentarem diferenças significativas entre si ($P>0,01$) os tratamentos controles foram agrupados e apresentado apenas uma média.

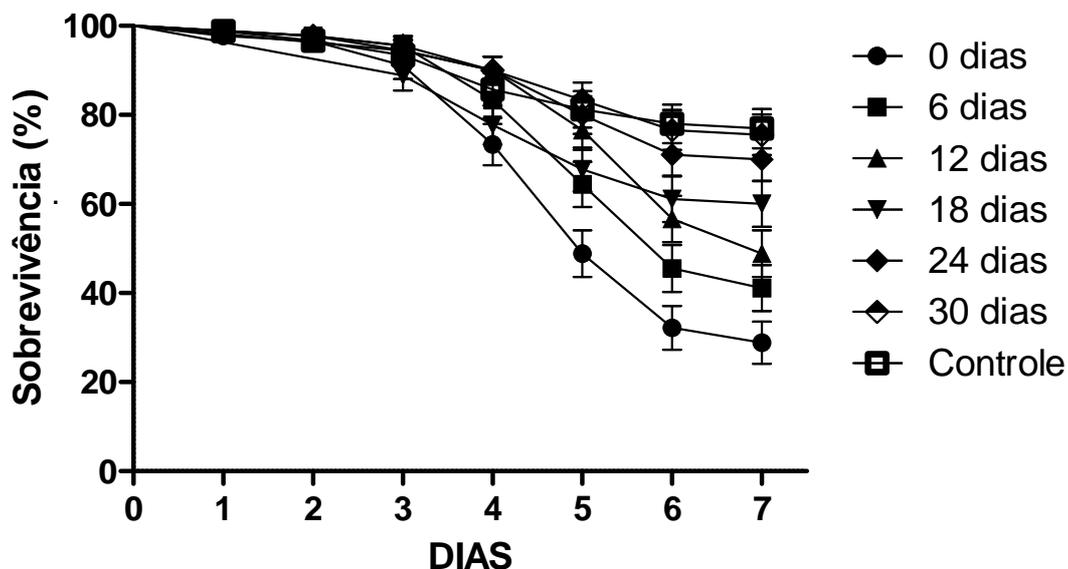


Figura 1 – Sobrevivência diária (%) de fêmeas de *A. aegypti* tratados com F+V+I oriundo de panos pretos mantidos em uma varanda por 6 períodos consecutivos. Os mosquitos foram pulverizados com F+V+I diretamente via Torre de Potter. O tratamento controle foi feito da mesma maneira, mas com V+I. Por não apresentarem diferenças significativas entre si ($P>0,01$) os tratamentos controles foram agrupados e apresentados apenas por uma curva.

6.1.3 Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos em ambientes diferentes

Esse teste foi feito para avaliar a viabilidade do fungo combinado com V+I através da observação de unidades formadoras de colônia (UFC). Os panos foram deixados por 4 períodos (5, 10, 15 e 20 dias) em três condições diferentes: em geladeira, em uma sala e na varanda do insetário LEF/UENF.

A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que a média da UFC do controle diferiu significativamente de todos os outros tratamentos [Tabela 2; $F_{14,44} = 2810,70$ ($P < 0,01$)]. Os panos que foram mantidos na geladeira por 5, 10, 15 e 20 dias tiveram médias de UFC significativamente diferentes dos demais tratamentos [$F_{14,44} = 2810,70$ ($P < 0,01$)]. Os demais tratamentos não apresentaram UFC diferentes significativamente entre si ($P > 0,01$).

Tabela 2 - Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) da combinação F+V+I impregnado em panos pretos mantidos em geladeira, sala e varanda.

Germinação de Conídios (Média + DP)			
Período	Tratamentos		
	Geladeira	Sala	Varanda
Controle	---	49433,3 ± 404,1 a	---
5 dias	15166,7 ± 1001,6 b	235,3 ± 20,9 e	160,7 ± 4,0e
10 dias	7033,3 ± 1929,5 c	82 ± 14,7 e	146,7 ± 20,5e
15 dias	6166,7 ± 802,0 cd	36,7 ± 4,5 e	97,7 ± 9,2 e
20 dias	5166,7 ± 611,0 d	12 ± 10,8 e	14,7 ± 12,6 e

6.2. Testes feitos em condições de semicampo

6.2.1. Persistência do fungo *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos contra *Aedes aegypti* em condições de semicampo

Esse experimento teve o objetivo de avaliar a persistência do isolado ESALQ 818 formulado com V ou V+I e impregnado em panos pretos para testes contra *A.*

aegypti em condições de semicampo. Os panos pretos foram fixados em uma sala simulando um cômodo residencial. Depois, sete grupos de mosquitos foram liberados na sala. A cada cinco dias o número de insetos sobreviventes foi quantificado. Os tratamentos controles foram feitos igualmente, entretanto os panos foram impregnados com V ou V+I.

Primeiramente foram feitos testes controles nas duas salas (sala 1 e sala 2). Os mosquitos foram expostos por 5 dias a cinco panos pretos impregnados com V+I fixados em móveis. Não houve diferença significativa na sobrevivência dos insetos liberados na sala 1 comparado com a sala 2 ($P>0,01$). A partir desse teste foi estabelecida uma sala para serem feitos os tratamentos com fungo e outra controle.

Nos testes feitos com panos impregnados com F+V foi observado que os insetos liberados no período de 0 a 5 dias pós-fixação dos panos na sala apresentam a menor taxa de sobrevivência (36,6%), comparado com os demais tratamentos (Tabela 3).

A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que as porcentagens de sobrevivência dos grupos de mosquitos liberados de 0 a 5 e 6 a 11 dias pós-fixação dos panos com F+V foram significativamente diferentes comparadas com os demais tratamentos e controle [Tabela 3; $F_{5,17} = 70,34$ ($P<0,01$)].

A maior porcentagem de sobrevivência de *A. aegypti* exposto aos panos com F+V ocorreu quando os mosquitos foram liberados 24 dias pós-fixação dos panos nos móveis (82,6% de sobrevivência). Esse grupo não apresentou taxas de sobrevivência diferente significativamente diferente do controle ($p>0,01$).

Tabela 3. Sobrevivência (média %) e Desvio padrão (DP) de *Aedes aegypti* expostos a panos pretos impregnados com a formulação F+V ou F+V+I em condições de semicampo. Os tratamentos controles foram feitos com V ou V+I. Os panos ficaram fixados na sala por um total de 35 dias e diferentes grupos de mosquitos foram expostos aos panos durante esses períodos.

Grupos de mosquitos expostos aos panos	% Sobrevivência ± DP*	
	Tratamento F+V	Tratamento F+V+I
0-5 dias	36,6 ± 1,5 c	32,6 ± 2,08 d
6-11 dias	50 ± 2,64 b	40,6 ± 0,57 d
12-17 dias	78,6 ± 2,80 a	60 ± 2,64 c
18-23 dias	81,3 ± 3,21 a	64,6 ± 2,51 c
24-29 dias	82,6 ± 1,52 a	77,3 ± 0,57 b
30-35 dias	ND	83,3 ± 2,51 ab
CONTROLE	84,6 ± 2,08 a	87,3 ± 4,16 a

*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). Dados não determinados (ND). Por não apresentarem diferenças significativas entre si ($P > 0,01$), os tratamentos controles foram agrupados e apresentados em apenas uma média.

Nos testes realizados com F+V+I os mosquitos expostos de 0 a 5 dias pós-fixação dos panos nos móveis tiveram a menor taxa de sobrevivência (32,6%) comparado com os outros testes. A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que as taxas de sobrevivência dos mosquitos liberados de 0 a 5, 6 a 11, 12 a 17, 18 a 23 e 24 a 29 dias pós-fixação dos panos foram significativamente diferentes comparadas com controle [$F_{6,20} = 54,96$ ($P < 0,01$)]. A liberação dos mosquitos 30 dias depois de fixação dos panos não resultou em taxas de sobrevivência estatisticamente diferente do controle ($p > 0,01$).

Estabeleceu-se como persistência o fungo que resultou em porcentagem de sobrevivência de mosquitos significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,01$). Sendo assim a persistência do tratamento feita com a formulação F+V foi de 11 dias, enquanto a persistência da formulação F+V+I foi de 29 dias.

6.2.2. Avaliação da persistência do fungo *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos e mantido na varanda do insetário

Esse ensaio teve o objetivo de avaliar a persistência da formulação F+V+I impregnada em panos-pretos mantidos em uma varanda por 3 períodos (2, 12, 18 dias). A avaliação de persistência dos conídios foi feita em condição de semicampo. Houve a liberação de apenas um grupo de mosquitos. Os mosquitos ficaram expostos aos panos por 5 dias. No quinto dia foi quantificado o número de insetos sobreviventes. Os tratamentos controles foram feitos da mesma maneira, entretanto os panos foram impregnados com V+I.

A Tabela 4 mostra que os mosquitos expostos aos panos mantidos por 2 dias na varanda tiveram a menor taxa de sobrevivência (39,3%) comparado com os demais tratamentos. A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que os panos que ficaram na varanda por 12 dias resultaram em uma taxa de sobrevivência significativamente diferente de todos os outros tratamentos feitos com F+V+I e do grupo controle [$F_{3,11} = 70,55$ ($p < 0,01$)].

Os mosquitos expostos aos panos mantidos na varanda por 18 dias tiveram a maior porcentagem de sobrevivência (83,3%) comparado com os outros tratamentos, sendo igual à sobrevivência do grupo controle [85,3% ($P > 0,01$)].

O fungo manteve sua viabilidade no pano preto durante 12 dias. Entretanto, quando os mosquitos foram expostos aos panos 5 dias depois, as taxas de sobrevivência não foram significativamente diferentes do grupo controle [$F_{3,11} = 70,55$ ($p < 0,01$)].

Tabela 4 – Sobrevivência (média %) e Desvio padrão (DP) de *Aedes aegypti* expostos a 5 panos pretos impregnados com F+V+I em condições de semicampo. Os panos foram mantidos em uma varanda antes dos testes de viabilidade dos fungos. Os tratamentos controles foram feitos com V+I.

Períodos em que os panos foram mantidos na varanda	% Sobrevivência ± DP*
2 dias	39,3 ± 1,52 c
12 dias	65,3 ± 2,08 b
18 dias	83,3 ± 3,21 a
CONTROLE	85,3 ± 1,52 a

*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). Por não apresentarem diferenças significativas entre si ($P>0,01$) os tratamentos controles foram agrupados e apresentado apenas uma média.

6.2.3. Efeitos da infecção de *Metarhizium anisopliae* na oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* em condições de semicampo

O presente experimento teve o objetivo de avaliar se fêmeas de *A. aegypti* previamente (48 horas antes) expostas a panos pretos impregnados com F+V+I e posteriormente alimentadas com sangue de dois voluntários, reduziriam a taxa de oviposição em armadilhas “ovitrampas”, comparado com fêmeas expostas a somente V+I (controle).

Após a exposição a F+V+I, o número total de ovos colocados das fêmeas foi menor (37 ovos) comparado com a quantidade de ovos contabilizados no tratamento controle (206 ovos). Sobressalta-se que a taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos ao pano com F+V+I foi significativamente igual à sobrevivência do grupo controle (Tabela 5; $P>0,01$).

Tabela 5 - Sobrevivência (média%) \pm Desvio Padrão (DP) e Número de ovos coletados de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas com F+V+I em condições de semicampo

TRATAMENTOS	% Sobrevivência \pm DP*	TOTAL DE OVOS
F+V+I	73,3 \pm 0,70a	37
Controle	76,6 \pm 1,41a	206

*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).

6.2.4. Teste de semicampo avaliando a patogenicidade e virulência do fungo *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos contra fêmeas de *Aedes aegypti* oriundas do campo

Esse experimento teve o objetivo de avaliar a sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* oriundas de ovos coletados no campo expostas a cinco panos pretos impregnados com F+V+I em condições de semicampo.

Os mosquitos oriundos do campo foram suscetíveis à combinação F+V+I. A porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos ao F+V+I (34,6%) foi significativamente diferente comparado com a sobrevivência do grupo controle (78,8%) [$F_{1,5} = 54,45$ ($p < 0,01$)].

7. DISCUSSÃO

Recentes estudos vêm demonstrando cada vez mais o potencial dos fungos entomopatogênicos para controle de insetos vetores de doenças (Scholte *et al.*, 2005; Mnyone *et al.*, 2009; Farenhorst *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2010a; Paula *et al.*, 2011a). Sua ação patogênica já foi evidenciada contra todos os estágios de desenvolvimento dos mosquitos desde o ovo até o adulto (Luz *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2011a).

Entretanto, poucos trabalhos foram realizados em condições de campo com *A. aegypti* para investigar os possíveis efeitos dos fungos entomopatogênicos no controle do mosquito adulto. Paula *et al.* (2008) observaram a virulência do fungo *M. anisopliae* formulado com Tween 80, impregnado em panos pretos para controle do *A. aegypti* em condições de semicampo (gaiolas grandes).

O presente estudo buscou utilizar uma formulação que proporcionasse certa estabilidade ao fungo quando utilizado em condições de semicampo. Formulações a base de óleo podem melhorar a persistência e a capacidade de adesão dos conídios de fungos às superfícies impregnadas e também ao tegumento dos insetos. Em nossos ensaios de semicampo, a formulação do fungo combinado com óleo vegetal + Isoparafina (F+V+I) se mostrou eficiente. Os mosquitos adultos do *A. aegypti* foram suscetíveis à infecção fúngica reduzindo sua sobrevivência. Isto suporta estudos anteriores que demonstraram o potencial de fungos entomopatogênicos formulado em óleo para controle de mosquitos adultos (Scholte *et al.*, 2005; Farenhorst *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2010a; Mnyone *et al.*, 2010). Em outros ensaios com Diptera, Wright *et al.* (2004) observaram que a formulação do fungo *M. anisopliae* em óleo foi mais eficiente reduzindo a sobrevivência de moscas (50-70%) comparado com a formulação do fungo em Tween (10-20%) durante 10 dias.

Em geral o óleo apresenta certo benefício e proteção aos esporos contra os fatores que influenciam na viabilidade dos conídios, ou seja, a temperatura, umidade. Estes fatores abióticos podem tornar os conídios mais suscetíveis aos danos pela exposição à radiação UV (Alves *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2005; Hedimbi *et al.*, 2011). Em nossos ensaios de germinação, não houve efeito negativo dos óleos sobre os conídios (90% dos conídios germinados), corroborando os dados da literatura (Alves *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2011).

De acordo com Howard *et al.* (2011), além da formulação, algumas variáveis devem ser levadas em consideração em se tratando de viabilidade e persistência de fungos entomopatogênicos, como por exemplo, a metodologia e o substrato usado para aplicação do fungo.

Em nossos ensaios a utilização de panos pretos (100% algodão) se mostrou eficiente para aplicação do fungo. Este fato provavelmente se deu pela qualidade das fibras naturais do tecido que tem redução na utilização de substâncias químicas no processo de fabricação, o que poderia influenciar na viabilidade dos conídios. Como metodologia para aplicação do fungo, os panos foram banhados, ao invés de pulverizados como testado anteriormente por nosso grupo (Paula *et al.*, 2008). Isso provavelmente facilitou a aderência dos esporos entre as fibras do tecido. Resultado semelhante foi verificado por Howard *et al.* (2010a) quando também utilizaram a técnica da imersão de panos brancos na formulação do fungo *B. bassiana* formulado com óleo, para utilização nos ensaios de campo com linhagens de *Anopheles* resistentes a inseticidas.

O substrato escolhido no presente estudo (panos pretos), já foi evidenciado na literatura como potencial superfície para aplicação de fungos entomopatogênicos (Scholte *et al.*, 2005). Entretanto, relatos de variações na eficácia dos fungos quando aplicados nessas superfícies já foram reportados (Howard *et al.*, 2010; Mnyone *et al.*, 2010). Em outra linha de pesquisa, Vatandoost *et al.* (2006) usando panos como substrato, observaram que piretroides quando impregnados nos panos também apresentavam oscilações na eficiência. Contudo, nossos resultados com panos de algodão banhados na formulação F+V+I tiveram persistência de 29 dias (Tabela 3), reduzindo a sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* em condições de semicampo.

Mnyone *et al.* (2010) utilizando panos de poliéster, verificaram a redução na eficiência do fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae* aplicados nos panos e formulados com o óleo Shellsol T (solvente sintético). Foi sugerido que o fator negativo

provavelmente vinha justamente na produção dos tecidos como uso de químicos para amaciar as fibras. Mesmo com a redução parcial da viabilidade dos conídios, Mnyone *et al.* (2010) em condições controladas no laboratório, observaram que os fungos previamente aplicados (28 dias) foram capazes de infectar 73-82% dos mosquitos *Anopheles* por até 14 dias.

Outras superfícies impregnadas com o fungo entomopatogênico também se mostraram promissoras. Lwetoijera *et al.* (2010) impregnaram o interior de vasos de barro com o fungo *M. anisopliae* e observaram a infecção dos mosquitos *Anopheles* em condições de campo na África. Mnyone *et al.* (2010) observaram a eficácia dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando aplicados em painéis de barro, comparado com a aplicação do fungo em panos pretos visando o controle do *Anopheles*.

Nos nossos ensaios com *A. aegypti*, os panos foram mantidos em condições de semicampo para chegar mais perto possível da realidade do campo. Os panos ficaram sujeitos aos efeitos adversos durante todo o período experimental. A formulação F+V+I acarretou em significativo impacto na sobrevivência dos mosquitos até 11 dias de experimentação (40,6% [Tabela 3]). A formulação F+V apresentou 50% de mosquitos sobreviventes ao passo dos 11 dias (Tabela 3). Entretanto, não se mostrou persistente por um período mais prolongado. Já a formulação F+V+I foi eficiente com persistência e virulência por até 29 dias, mesmo com certo declínio na viabilidade dos conídios.

O óleo vegetal e o óleo Isoparafina, já foram relatados na literatura como adjuvantes promissores na proteção dos conídios em condições de campo (Alves *et al.*, 1998; Alves & Faria, 2010; Howard *et al.*, 2010a). O fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana* se mostrou eficiente quando formulado com o óleo Shelsol T para controle de larvas de Coleoptera (besouro mostarda) e contra larvas de *Anopheles*, mesmo as condições do campo tendo apresentado oscilações climáticas (Inyang *et al.*, 2000; Bukhari *et al.*, 2011).

Em nossos ensaios, o contato indireto (semicampo) dos mosquitos com panos impregnados com a formulação F+V+I acarretou significativo impacto no número de ovos postos por fêmeas do *A. aegypti* com apenas 48 horas de exposição aos panos, com um total de 41 ovos encontrados nas ovitrampas, comparado com 206 ovos do grupo controle, que não estiveram em contato com o fungo *M. anisopliae* (Tabela 5).

A redução na virulência dos conídios impregnados nos panos que ficaram sob condições naturais, comparado com os conídios nos panos que estiveram em situação de semicampo, pode ter tido influência pelos picos de temperaturas (36°C) encontrados durante o período experimental em campo. Howard *et al.* (2011) acreditam que os extremos é que afetam a viabilidade dos conídios. Em seus ensaios observaram perda da viabilidade de esporos de *B. bassiana* quando a temperatura chegou a atingir 38.6°C. Em se tratando de entomopatógenos, é de caráter relevante às variações genéticas e fisiológicas encontradas em cada isolado de fungo, mesmo estes pertencendo à mesma espécie de fungo (Alves, 1998).

No presente estudo, mesmo com as oscilações térmicas e o declínio da viabilidade dos conídios que ficaram expostos no campo, foi evidenciado, em 20 dias de experimento, esporos viáveis através de ensaios de unidades formadoras de colônias (Tabela 2). Este resultado foi diferente do encontrado por Darbro & Thomas (2009), que observaram em condições de laboratório redução significativa da viabilidade dos conídios do fungo *M. anisopliae* quando pulverizados em lâminas, sendo zero a partir do 21º dia.

Deste modo, quando os mosquitos entraram em contato com o fungo presente nos panos expostos a condições naturais, foi observado virulência do entomopatógeno por até o 12º dia com 48,8% de sobrevivência dos mosquitos pulverizados com a suspensão dos conídios presentes nos panos. Em comparação foi observado 65% de sobrevivência dos mosquitos expostos a cinco panos pretos em condições de semicampo (Tabela 1).

Em se tratando de microrganismos, a termotolerância sempre se torna uma preocupação quanto à utilização no campo, principalmente em países de clima tropical e subtropical, aonde a temperatura chega a exceder àquelas que permitem o crescimento dos fungos (faixa de 32° a 34°). O calor e a umidade podem causar desnaturação das proteínas dos conídios, tornando-os inviáveis (Leucona *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2005).

Rangel *et al.* (2005) apontam que isolados de fungos de diferentes localidades e altitudes também podem ter uma influência na termotolerância dos entomopatógenos. Em ensaios utilizando isolados de *M. anisopliae* de altas latitudes (61°N to 54° S), observaram que a maioria tolera 40 ° muito bem. Lui *et al.* (2003) submetem isolados de *M. anisopliae* a 40° para observar efeito negativo na

germinação dos conídios, e constataram, assim como Lekimme *et al.* (2008), que 35° é a faixa limite para o crescimento do fungo.

Análise do efeito residual de outros agentes de controle também já foi reportada. Em ensaios de campo usando uma formulação comercial de Bti “Vectobac G”, houve persistência de três semanas, Lima *et al.* (2005) observaram que as oscilações de temperatura entre os meses de julho a agosto influenciaram nos resultados, tendo assim persistência por até cinco semanas. Pontes *et al.* (2005) observaram redução de 18% na mortalidade de larvas do *A. aegypti* tratadas com Bti durante 90 dias.

O efeito residual de inseticidas também apresenta reduções com o passar do tempo, mas em comparação com os biopesticidas esses apresentam persistência elevada, além de ser um fator altamente dependente da dosagem (Lindblade, 2005; Pontes *et al.*, 2005).

O principal objetivo deste estudo foi o de proporcionar uma nova ferramenta no controle biológico de adultos de *Aedes aegypti* e que a mesma se mantivesse virulenta e persistente por um período prolongado em ensaios de semicampo. A redução na taxa de sobrevivência (40,6%) dos mosquitos durante 11 dias, atingindo 77,3 % de sobrevivência em 29 dias, mostra que o fungo se manteve persistente (Tabela 3). Hancock (2009) avalia que superfícies tratadas com fungos capazes de infectar população de vetores em diferentes idades do seu ciclo de vida exercem considerável impacto epidemiológico. Nesse ponto de vista, reduzir a capacidade de transmissão de doenças causadas por insetos vetores é o principal objetivo dos atuais estudos. Howard *et al.*, (2010b) observaram que a infecção do fungo *B. bassiana* reduziu a procura por alimentação sanguínea de *C. Quinquesciatus* transmissor da filariose. Redução na busca a hematofagia também foi observado por Scholte *et al.*, (2006) quando infectaram mosquitos *Anopheles* com o fungo *M. anisopliae*.

O presente estudo mostra o potencial da formulação F+V+I impregnados em panos pretos para controle de adultos do mosquito *A. aegypti*.

7. CONCLUSÕES

- Panos pretos impregnados com o fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ 818) se apresentaram eficientes para redução do número de mosquitos *A. aegypti* em condição de semicampo, com potencial para serem usados no campo;
- A formulação F+V+I causou maior impacto na sobrevivência dos mosquitos, comparado à formulação F+V;
- A formulação F+V+I reduziu a taxa de oviposição das fêmeas do *A. aegypti* em condições de semicampo;
- A persistência do fungo *M. anisopliae* na formulação F+V+I foi de 29 dias com 77% de mosquitos sobreviventes. Entretanto, do ponto de vista epidemiológico qualquer redução significativa na sobrevivência dos mosquitos é considerado promissor no combate a mosquitos vetores de doenças.

Deste modo, foi constatada a persistência do fungo *M. anisopliae* (ESALQ 818) impregnado em panos pretos com a formulação de óleo de girassol e Isoparafina, apresentando potencial auxílio no controle do mosquito *A. aegypti*, visando à redução da incidência de Dengue no país.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albernaz, D.A.S., Tai, M.H.H., Luz, C. (2009). Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 23: 141–147.
- Almeida, J.E.M., Filho, A.B. (2001). Banco de Microrganismos Entomopatogênicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 20: 30-33.
- Alves, S. B. (1998) *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba. 1163p.
- Alves, R.T., Bateman, R. P., Prior, C., Leather, S. R. (1998) Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection* . vol 17. p.675-679.
- Alves, R.T., Bateman, R.P., Gunn, J., Prior, C., Leather, S.R. (2002). Effects of Different Formulations on Viability and Medium-Term Storage of *Metarhizium anisopliae* Conidia. *Neotropical Entomology*, 31: 091-099.
- Alves, R.T., Faria, M. (2010). *Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos*. 1° Ed. Planaltina. Embrapa Cerrado. 50 p.
- 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* (Dipt., Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 126: 504–509.
- Anderson, J.R., Rico-Hesse, R. (2006). *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 886–892.
- Barata, E.A.M.F., Costa, A.I.P., Neto, F.C., Glasser, C.M., Barata, J.M.S., Natal, D (2001). População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 35: 237-42.
- Becker, N. (2003). Ice granules containing endotoxins of microbial control agents for the control of mosquito larvae – a new application technique. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19: 63-66.

- Beserra, E. B., Castro, F.P., Santos, J.W., Santos, T.S., Fernandes, C.R.M (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae) provenientes de quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35:853-860.
- Beserra, E.B., Fernandes, C.R.M., Ribeiro, P.S. (2009). Relação entre Densidade Larval e Ciclo de Vida, Tamanho e Fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em Laboratório. *Neotropical Entomology*, 38: 847-852.
- Blanford, S., Chan, B.H.K., Jenkins, N., Sim, D., Turner, D.,R.J., Read, A.F., Thomas, M.B. (2005). Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission. *Science*, 308: 1638-1641.
- Borges, R.A., Cavasin, G.M., Silva, I.G., Arruda, W., Oliveira, E.S.F., Silva, H.H.G.; Flavia, M. (2004). Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do Diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista de Patologia Tropical*, 33: 91-104.
- Braga, I.A., Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16: 113 – 118.
- Brooke, B.D., Kloke, G., Hunt, R.H., Koekemoer, L.L., Temu, E.A., Taylor, M.E., Small, G., Hemingaway, J., Coetzee, M. (2001). Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 91: 265–272.
- Bukhari, T., Takken, W., Koenraadt, C.J.M. (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for controlo of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors*, 4:23.
- Câmara, F.P., Theophilo, R.L.G., Santos, G.T., Pereira, S.R.F.G., Câmara, D.C.P., Matos, R.R.C. (2007). Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 192-196.
- Campos, J., Andrade, C.F.S. (2001). Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista Saúde Pública*, 35: 232-6.
- Canyon, D.V., Hii, J.L.K., Muller, R. (1999). Adaptation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behavior in response to humidity and diet. *Journal of Insect Physiology*, 45: 959–964.
- 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). Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 38: 623-629.

- Chadee, D.D., Martinez, R. (2000). Landing periodicity of *Aedes aegypti* with implications for dengue transmission in Trinidad, West Indies. *Journal of Vector Ecology*, 25: 158-159.
- Charles, J. F., Delecluse, A., Leroux, C. N. (2000). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to Field application*. Dordrecht, Holanda. Kluwer Academic Publishers. 455p.
- Clyde, K., Kyle, J.L., Harris, E. (2006). Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, 23: 11418–11431.
- Coelho, G.E. (2008). Dengue: desafios atuais. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, 17: 231-233.
- Colpitts, T.M., Cox, J., Vanlandingham, D.L., Feitosa, F.M., Cheng, G., Kurscheid, S., Wang, P., Krishnan, M.N., Higgs, S., Fikrig, E. (2011). Alterations in the *Aedes aegypti* Transcriptome during Infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses. *PLoS Pathogens*, 7: 9.
- Colton, Y. M., Chadee, D.D., Severson, D.W. (2003). Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 195–204.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira R.L. (1998). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Reimpressão. 225p.
- Costa, E.L.N., Lucho, A.P.R., Fritz, L.L., Fiuza, L.M. (2010). Artrópodes e Bactérias Entomopatogênicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 38: 4-13.
- Cruz, C. R. (2011). Conselho regional de Medicina do Estado da Paraíba. Disponível em: <http://www.crm-pb.cfm.org.br/>. Acessado em: 05/07/2011.
- Daoust, R.A., Roberts, D.W. (1982). Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 107-117.
- Darbro, J.M., Thomas, M. (2009). Spore Persistence and Likelihood of Aeroallergenicity of Entomopathogenic Fungi Used for Mosquito Control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 992–997.
- Debach, P., Rosen, D. (1991). *Biological control by natural enemies*. 2° ed. Cambridge. Cambridge University Press. 408p.
- Eiras, A.E (2005). Culicidae. In: Neves, D.P., Melo, A.L., Linardi, P.M., Vitor, R.W.A. *Parasitologia Humana*, Atheneu, São Paulo. 355-367.
- Espindola, C.B., Guedes, R.N., Souza, R.C.P. (2008). Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas Imaturas do *Aedes*

- (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório. *EntomoBrasilis*, 1: 10-13.
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y., Pei, Y. (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 363–370.
- Farenhorst, M., Farina, D., Scholte, E., Takken, W., Hunt, R.H., Coetzee, M., Knols, B.G.J. (2008). African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the Malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 910–916.
- Farenhorst, M., Knols, B.G.J., (2010). A novel method for standardized application of fungal spore coatings for mosquito exposure bioassays. *Malaria Journal*, 9:27.
- Farenhorst, M., Mouatchob, J.C., Kikankieb, C.K., B.D., Brookeb, B.D., Huntc, R.H., Thomas, M.B., Koekemoer, L.L., Knols, B.G.J., Coetzee, M. (2009). Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Early Edition. 106: 17443–17447.
- Faria, M.R., Magalhães, B.P. (2001). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 22: 18-21.
- Figueiredo, R.M.P., Thatcher, B.D., Lima, M.L., Almeida, T.C., Alecrim, W.D., Guerra, M.V.F. (2004). Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37: 476-479.
- Folly, B.B., Weffort-Santos, A.M., Fathman, C.G., Soares, L.R.B (2011). Dengue-2 Structural Proteins Associate with Human Proteins to Produce a Coagulation and Innate Immune Response Biased Interactome, *BMC. Infectious Diseases*, 11:34.
- Forattini, O.P (1962). Entomologia Médica. São Paulo, Editora USP. Vol. 1. 664p.
- Fundação Nacional de Saúde (2001). Dengue: Instruções de Combate ao Vetor. Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Fundação Nacional de Saúde (2002). Programa Nacional de Controle da Dengue. Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Garcia, M.V., Monteiro, A.C., Szabó, M.P.J., Prette, N. (2008). Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60: 855-863.

- García-Munguía, A.M., Garza-Hernández, J.A., Rebollar-Tellez, E.A., Rodríguez-Pérez, M.A., Reyes-Villanueva, F. (2011). Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 4: 1-6.
- Gaugler, R., Suman, D., Wang, Y. (2011). An autodissemination station for the transfer of an insect growth regulator to mosquito oviposition sites. *Medical and Veterinary Entomology*, 26: 37–45.
- Gonçalves, K. S., Messias, M. C. (2008). Ocorrência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) em bromélias, no município do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). *Biota Neotropica*, 8: 235-237.
- Gubler, D.J. (1997). Epidemic Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: A Global Public Health Problem in the 21st Century. *Dengue Bulletin*, 21: 1-19.
- Hammerstrom, R.J. (1958). Insect Resistance to Insecticides. *Public Health Reports*, 73: 1126-1132.
- Hancock, P.A., Thomas, M.B., Godfray, H.C.L. (2009). An age-structured model to evaluate the potential of novel malaria-control interventions: a case study of fungal biopesticide sprays. *Proceedings of the Royal Society*, 276: 71–80.
- Harrington, L.C. e Edman, J.D. (2001). Indirect Evidence Against Delayed “Skip-Oviposition” Behavior by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of Medical Entomology*, 38: 641-645.
- Hedimbi, M., Ndeuyeka, E., Chinsebu, K.C. (2011) Effects of sunscreens on germination of fungi *Metarhizium anisopliae* with a view to enhance conidia survival under field conditions. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3: 248-253.
- Hong, T.D., Edgington, S., Ellis, R.H., Muro, M.A., Moore, D. (2005). Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 136–143.
- Horta, M.A.P., Castro, F.I., Rosa, C.S., Daniel, M.C., Melo, A.L. (2011). Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to Temephos in Brazil: A Revision and New Data for Minas Gerais. *State BioAssay*, 6: 7.
- Howard, A.F.V., N’Guessan. R., Koenraadt, C.J.M., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbéto, M., Knols, B.G.J., Takken, W. (2011). First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *Malaria Journal*, 10: 24.
- Howard, A.F.V., Koenraadt, C.J.M., Farenhorst, M., Knols, B.G.J., Takken, W. (2010a). Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malaria Journal*, 9: 168.

- Howard, A.F.V., N'Guessan. R., Howard, A.F.V., N'Guessan. R., Koenraadt, C.J.M., Asidi, A., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbéto, M., Thomas, M.B., Knols, B.G.J., Takken, W. (2010b). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. *Parasites and Vectors*, 3:87.
- Inyang, E.N., McCartney, H.A., Oyejola, B., Ibrahim, L., Pye, B., Archer, S.A., Butt, T.M. (2000). Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research*. 104: 653-661.
- Kaur, J.S., Lai, Y.L., Giger, A.D. (2003). Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 457–460.
- Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Knols, B.G.J., Koekemoer, L.L., Farenhorst, M., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Coetzee, M. (2010). The infectivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to insecticide-resistant and susceptible *Anopheles arabiensis* mosquitoes at two different temperatures. *Malaria Journal*, 9: 71.
- Kroeger, A., Horstick, O., Riedl, C., Kaiser, A., Beckeff, N. (1995). The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropica*, 60: 47-57.
- Lambrechts, L., P. Paaijmans, K., Fansiria, T., Carrington, L.B., Kramere, L.D., Thomas, M.B., Scott, T.W. (2011). Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Early Edition*, 1-6.
- Lanza, L.M., Monteiro A.C., Malheiros, E.B. (2009). Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. *Ciência Rural*, 39: 6-12.
- Leite, M.S.P., Iede, E. T., Pentead, S. R.C., Zaleski, S.R.M., Camargo, J.M.M., Ribeiro, R.D. (2011). *Floresta*, 41: 619-628.
- Lekimme, M., Focant, C., Farnir, F., Mignon, B., Losson, B. (2008). Pathogenicity and thermotolerance of entomopathogenic fungi for the control of the scab mite, *Psoroptes ovis*. *Experimental and applied acarology*, 46: 95–104.
- Lenterena, J.C., Godfray, H.C.J. (2004). European science in the Enlightenment and the discovery of the insect parasitoid life cycle in The Netherlands and Great Britain. *Biological Control*, 32: 12–24.
- Leucona, R.E., Edelstein, J.D., Berretta, M.F., Rossa, F.R.L., Arcas, J.A. (2001). Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potential Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 38: 172-179.

- Lima, E.P., Paiva, M.H.S., Araújo, A.P., Silva, E.V.G., Silva, U.M., Oliveira, L.N., Santana, A.E.G., Barbosa, C.N., Neto, C.C.P., Goulart, M., Wilding, C.S., Ayres, C.F.J., Santos, M.A.V.M. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*, 4:5.
- Lima, J.B..P., Melo, N.V., Valle, D. (2005). Persistence of vectobac wdg and metoprag s-2g against *Aedes aegypti* larvae using a semi-field bioassay in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 47: 7-12.
- Lima, V.I.C., Figueiredo, L.T.M., Correa, H.R., Leita, O.F., Rangel, O., Vido, A.A., Oliveira, S.S., Owa, M.A., Carlucci, R.H. (1999). Dengue: inquérito sorológico pós-epidêmico em zona urbana do estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, 33: 566-74.
- Lima-Camara, T.N. (2010). Activity Patterns Of *Aedes aegypti* And *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Under Natural and Artificial Conditions. *Oecologia Australis*, 14: 737-744.
- Lindblade, K.A., Dotson, E., Hawley, W.A., Bayoh, N., Williamson, J., Mount, D., Olang, G., Vulule, J., Slutsker, L., Gimnig, J. (2005). Evaluation of long-lasting insecticidal nets after 2 years of household use. *Tropical Medicine and International Health*, 10: 1141–1150.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M., Parker, B.L. (2003). Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 139–147.
- Luna, J.E.D., Martins, M.F., Anjos, A.F., Kuwabara, E.F., Navarro-Silva, M.A. (2004). Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Revista de saúde pública*, 38: 1-2.
- Luz, C., Assis, V.C., Silva, H.H.G. (2001). Efeito de Biolarvicidas à Base de Bactérias sobre *Aedes* spp. *Informe epidemiológico do SUS*, 10: 47-48.
- Luz, C., Batagin, I. (2005). Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia*, 160: 51–62.
- Luz, C., Tai, M.H.H., Santos, A.H., Rocha, L.F.N., Albernaz, D.A.S., Silva, H.H G (2007). Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44:799-804.
- 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.

- Lwetoijera, D. W., Sumaye, R. D., Madumla, E. P., Kavishe, D. R., Mnyone, L. L., Russell, T. L., Okumu, F. O. (2010). An extra-domiciliary method of delivering entomopathogenic fungus, *Metharizium anisopliae* for controlling adult populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *Parasites & Vectors*, 3: 2-6.
- Mabaso, M. L., Sharp, B., Lingeler, C. (2004). *Tropical Medicine Health*. Vol. 9. 846p.
- Maciel-de-Freitas, R., Marques, W.A., Peres, R.C., Cunha, S.P., Oliveira, R.L. (2007). Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district of Rio de Janeiro during dry and wet seasons. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 489-496.
- Marques. G.R.A.M., Serpa. L.N., Brito. (2011) *Aedes aegypti* –Laboratório de Culicídeos - SUCEN. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br>. Acessado em: 20/01/2012.
- Mendonça, H.F.M.S., Ferreira, A.L., Santos, C.B., Rezende, H.R., Ferreira, G.E.M., Leite, G.R., Falqueto, A. (2011). Criadouros de *Aedes aegypti* em terrenos baldios na região metropolitana da Grande Vitória, Estado do Espírito Santo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44: 243-246.
- Ministério da Saúde (2010). Informe Epidemiológico da Dengue. 28p. Disponível em: http://www.dengue.org.br/informe_da_dengue_2010.pdf. Acessado em: 20/02/2012.
- Ministério da Saúde (2011). Informe Epidemiológico da Dengue. 12p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_janeiro_e_marco_13_04.pdf. Acessado em: 20/02/2012.
- Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Lwetoijera. D.W., Mpingwa, M.W., Knols, B. G. J., Takken, W., Russel, T. L (2009). Infection of malaria mosquito, *Anopheles gambiae* with two species of entomopathogenic fungi: effects os concentration co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*, 8: 309.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Lwetoijera, D.W., Mpingwa, M.W., Simfukwe, E.T., Knols, B.G.J., Takken, W., Russell, T.L. (2010). Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malaria Journal*, 9:246.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Mpingwa, M.W., Lwetoijera, D.W., Knols, B.G.J., Takken, W., Koenraad, C.J.M., Russell, T.L. (2011). Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitology Research*, 108: 317–322.
- Natal, D. (2002). Bioecologia do *Aedes Aegypti*. *Biológico*, 64: 205-207.
- Neto, A L. R., Oliveira, C. M. (1985). Controle biológico de culicídeos e simúlídeos inseticidas bacterianos. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 37: 67-75.

- 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 and vectors*, 4:8.
- Paula, A. R., Carolino, A. T ., Silva, C. P., Samuels, R. I (2011b). Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites and Vectors*, 4:91.
- Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera. M. P., Samuels, R. I (2008). Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*, 18: 1017-1025.
- Peña, G., Miranda-Rios, J., de la Riva, G., Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A (2006). A *Bacillus thuringiensis* S-Layer Protein Involved in Toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 353–360.
- 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* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 1-6.
- Pinto, L.M.N., Berlitz, D.L., Castilhos-Fortes, R., Fiuza, L.M. (2010). Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 38: 24-31.
- Polanczyk, R.A., Garcia, M.O., Alves, S.B. (2003). Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*, 37: 813-6.
- Pontes, R.J.S., Regazzi, A.C.F., Lima, J.W.O., Kerr-Pontes, L.R.S. (2005). Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38: 316-321.
- Porcar, M., Gómez, F., Gruppe, A., Gómez-Pajuelo, A., Segura, I., Schroder, R. (2008). Hymenopteran specificity of *Bacillus thuringiensis* strain. *Biological Control*, 45: 427-432.
- Portal da Saúde - Programa Nacional de Controle da Dengue. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23614. Acessado em: 13/03/12.

- Praça, L.B.; Batista, A.C.; Martins, E.S.; Siqueira, C.B.; Dias, D.G.S.; Gomes, A.C.M.M.; Falcão, R.; Monnerat, R.G. (2004). Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. 39: 11-16.
- Prophiro, J.S., Silva, O.S., Luna, J.E.D., Piccoli, C.F., Kanis, L.A., Silva, M.A.N. (2011). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44: 300-305.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88:116–125.
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H., Hemingway, J. (2001). *Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 359: 295-304.
- Regis, L., Monteiro, A.M., Melo-Santos, M.A.V., Silveira Jr J.C., Furtado, A.F., Acioli, R.V., Santos, G.M., Nakazawa, Carvalho, M.M.S., Ribeiro Jr, P.J., Souza, W.V. (2008). Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 50-59.
- Reyes-Villanueva, F., Garza-Hernandez, J.A., Garcia-Munguia, A.M., Tamez-Guerra, P., Howard, A.F.V., Rodriguez-Perez, M.A. (2011). Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 4: 1-7.
- Rothman, A. L. (2004) Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 113: 946-951.
- Santos, C.B., Leite, G.R., Falqueto, A. (2011). Does Native Bromeliads Represent Important Breeding Sites for *Aedes aegypti*? (L.) (Diptera: Culicidae) in Urbanized Areas?
- Scholte, E., 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. *Neotropical Entomology*, 40: 278-281.
- Scholte, E., Knols, B.G.J., Takken, W. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91 43–49.
- Scholte, E., Knols, B.G.J., Samson, R.A., and Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4:19.

- Scholte, E., Njiru, B.N., Smallegange, R.C., Takken, W., Knols, B.G.J. (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*, 2: 29.
- Secretaria de vigilância Sanitária (2011). Dengue. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_dengue_controle.pdf. Acessado em: 20/06/2011.
- Serpa, L.L.N., Arduino, M.B., Marques, G.R.A.M., Ramos, D.G. (2010). Prevenção da dengue: implicações do uso de tela no controle de *Aedes aegypti* em reservatórios de água para consumo humano. *Bepa*, 7: 4-9.
- Silva, L.J., Richtmann, R. (2006). Vaccines under development: group B streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, 82: 115-24.
- Silva, R.O., Silva, H.G., Luz, C. (2004). Effect of *Metarhizium anisopliae* isolates from soil samples of the central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Revista de Patologia Tropical*, 33: 207-216.
- Silva, R.Z., Neves, P.M.O.J., Santoro, P.H., Cavaguchi, S.A. (2006). Efeito de Agroquímicos à base de óleo Mineral e Vegetal sobre a viabilidade dos Fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. *BioAssay*, 1: 1-5.
- Silva, S.F., Dias, D.G.S., Martins, E.S., Soares, C.M.S., Dias, J. M.C.S., Monnerat, R.G.; (2002). *Prospecção de Estirpes de Bacillus sphaericus tóxicas contra Aedes aegypti e Culex quinquefasciatus*. Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1ª edição. 24pp.
- Siqueira, J.B., Martteli, C.T., Maciel, I.J., Oliveira, O.M., Ribeiro, M.G., Amorim, F.P., Moreira, B.C., Cardoso, D.D.P., Souza, W.V., Andrade, A.A.S.S (2004). Household Survey of dengue infection in central Brazil: Spatial Point Pattern Analysis and Risk Factors Assessment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71: 646-651.
- Tauil, P.L. (2002). Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 18: 867-871.
- Tauil, P.L. (2006). Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39: 275-277.
- Teixeira, M.G., Barreto, M.L., Costa, M.C.N., Ferreira, L.D.A., Vasconcelos, P.F.C., Cairncross, S. (2002). Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Tropical Medicine and International Health*, 7: 757-762.
- Thomas, M.B., Read, A.F. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*, 5: 377-383.

- Tsunoda, T., Fukuchi, A., Nanbara, S. e Takagi, M. (2010). Effect of body size and sugar meals on oviposition of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 35: 56-60.
- Varejão, J.B. M., Santos, C.B., Rezende, H.R., Bevilacqua, L.C. e Falqueto, A. (2005). Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38: 238-240.
- Vatandoost, H., Shamspour, S., Abai, M.R. (2006). Relative Efficacy of Different Synthetic Pyrethroids Impregnated Fabrics (ITNs) Against *Anopheles stephensi* in Iran. *Pakistan Journal of Biological Science*, 9: 503-506.
- Vilarinhos, P. T. R., Dias, J. M. C. S., Andrade, C. F. S., Araújo-Coutinho, C. J. P. C. (1998). *Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos*. In: Alves, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 447p.
- Wang, C., e St. Leger, R.J. (2007). The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 21110–21115.
- WHO. (2009). *Dengue Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. New Edition. França. 160p.
- Wondji, C.S., Silva, W.A.P.P., Hemingway, J., Ranson, H., Karunaratne, S.H.P.P. (2008). Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Tropical Medicine and International Health*, 13: 548–555.
- Wright, C., Brooks, A., Wall, R (2004). Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pest Management Science*, 60:639–644.