

**NOVO MÉTODO DE CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*
UTILIZANDO UMA ARMADILHA COM PANO PRETO
IMPREGNADO COM FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium
anisopliae* ASSOCIADO A UM ATRAENTE SINTÉTICO**

LEILA EID IMAD DA SILVA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL - 2015**

**NOVO MÉTODO DE CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*
UTILIZANDO UMA ARMADILHA COM PANO PRETO
IMPREGNADO COM FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium
anisopliae* ASSOCIADO A UM ATRAENTE SINTÉTICO**

LEILA EID IMAD DA SILVA

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: Richard Ian Samuels
Coorientador: Adriano Rodrigues de Paula

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 204/2015

Silva, Leila Eid Imad da

Novo método de controle do mosquito *Aedes aegypti* utilizando uma armadilha com pano preto impregnado com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* associado a um atraente sintético / Leila Eid Imad da Silva. – 2015.

72 f. : il.

Orientador: Richard Ian Smuels

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 54 – 72.

1. *Aedes aegypti* 2. Fungo entomopatogênico 3. *Metarhizium anisopliae* 4. Testes de semicampo 5. Atraente I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 614.571
632.9

**NOVO MÉTODO DE CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*
UTILIZANDO UMA ARMADILHA COM PANO PRETO
IMPREGNADO COM FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium
anisopliae* ASSOCIADO A UM ATRAENTE SINTÉTICO**

LEILA EID IMAD DA SILVA

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 10 de abril de 2015

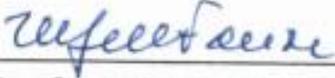
Comissão Examinadora:



Prof. Francisco José Alves Lemos (Ph.D., Ciências Biológicas – Bioquímica)
UENF



Prof.ª Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc., Produção Vegetal – Entomologia)
UENF



Prof.ª Maria das Graças Machado Freire (D.Sc., Biologia Funcional e Molecular)
ISECENSA



Prof. Adriano Rodrigues de Paula (Dr., Produção Vegetal- Entomologia)
UENF - Coorientador



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

“A vida é um grande espetáculo. Só não consegue homenageá-la quem nunca penetrou dentro de seu próprio ser e percebeu como é fantástica a construção da sua inteligência”.

(Augusto Cury).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir pelas águas do “Nilo” colocando anjos em meu caminho para me darem a mão e me orientarem nesta trajetória científica...vencemos juntos!

Agradeço ao meu orientador e “pai científico” Richard Ian Samuels por ter confiado em mim mesmo sendo de outra área...vou levar comigo esse seu jeito tranquilo de transmitir tanta sabedoria!

Agradeço ao meu coorientador Adriano Rodrigues de Paula por ter sido tão presente, me emprestando sua criatividade, acreditando que eu seria capaz de cumprir esta missão e tornando tão prazerosa a minha pesquisa a ponto de me dizerem:” por que você não leva um colchonete e já fica direto no insetário”!

Meus agradecimentos e muita admiração pelos professores da Comissão Examinadora: Dr. Francisco José Alves Lemos, Dr.^a Denise Dolores Oliveira Moreira, Dr.^a Maria das Graças Machado Freire;

Meus agradecimentos em especial ao Prof. Dr. Victor Haber por ser o primeiro do CCTA a dizer que eu seria capaz de percorrer este caminho e que mesmo sendo de outra área, se eu tivesse o desejo eu iria conseguir. Fiz minhas estas palavras;

Agradeço a toda equipe do laboratório de Entomologia e Fitopatologia e em especial, a equipe da dengue e do projeto de São João da Barra- RJ, pela amizade e ajuda nos experimentos. Agradeço pelos elogios e críticas e confesso que foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico;

Agradeço a UENF pela oportunidade e a FAPERJ pela bolsa concedida para que eu pudesse me dedicar à pesquisa em tempo integral;

Agradeço de maneira grandiosa meus pais Joseph Eid e Iraci Moutinho a quem eu rogo todas as noites pela minha existência. E que além de tudo, formaram os fundamentos do meu caráter e me apontaram uma vida eterna. Sei que estão felizes pela minha conquista!

Agradeço minha Ledinha “Chalata” que é tudo pra mim, irmã, amiga, companheira de todas as horas e com um sorriso que me alenta. Agradeço minha irmã caçulinha Léia tão sentimental e guerreira ao mesmo tempo, que nunca diz “não” e está sempre pronta para ajudar. Meu irmão Samuel que sempre está pronto para “dar um jeito” sem medir esforços, desde sempre. Também com meu coração consternado agradeço meu eterno irmão Daniel que tanto “torcia” por mim. Quantas vezes eu saía da UENF ao entardecer e me deparava com aquele sol tão grande quase “se pondo” e me perguntava: Oh, Dani, sua irmã está aqui, e você, onde está? Tenho certeza que se estivesse entre nós estaria comemorando comigo este momento. Amo vocês!!!!

Agradeço a Samyra que me deu tanta força no momento que parecia que tudo tinha chegado ao fim, tamanha foi a minha perda, incentivando-me a voltar a UENF e reatar meus experimentos e dizendo-me: se ficar em casa vai sofrer de depressão, vamos de moto comigo, mamãe!! e a Layle, essa caçula bandida, mas que do jeito dela sempre me ajuda. Vocês são muito importantes para mim...filhotas...Amo vocês!!!

Agradeço os abraços espontâneos e tão necessários do meu amado esposo Merialdo, especialmente nos momentos mais difíceis da minha vida... sempre me desejando o melhor;

Agradeço aos meus irmãos da Congregação Cristã no Brasil, pois foi nesse meio que aprendi o valor da minha fé que vai além da ciência...enfim...fica aqui um muito obrigada a todos esses anjos que contribuíram para tornar possível a conclusão desta dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 - Dados biológicos e morfológicos do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	5
2.2 - Distribuição geográfica de <i>Aedes aegypti</i> e dados epidemiológicos de doenças causadas por esse vetor	8
2.3 – Armadilhas utilizadas na vigilância entomológica do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	10
2.4 - Métodos de controle de mosquitos vetores de doenças.....	13
2.5 - Controle biológico de mosquitos	14
2.6 - Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos....	16
2.7 - Pesquisas de semicampo e campo utilizando fungos entomopatogênicos no controle de mosquitos.....	19

2.8 - Atraentes utilizados para mosquitos.....	20
3 - OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 - Criação e manipulação dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> coletados no campo.....	25
4.2 - Cultivo do fungo entomopatogênico.....	26
4.3 - Preparo do pano preto e confecção da armadilha PET.....	28
4.4 – Ensaio de sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas à armadilha confeccionada de garrafa PET com pano preto impregnado com <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
4.4.1 - Testes realizados na câmara de observação.....	29
4.4.2 - Teste realizados nas salas de semicampo.....	30
4.5 - Avaliação de um filme adesivo revestindo o pano preto para a captura de mosquitos.....	32
4.5.1 - Testes realizados na câmara de observação.....	32
4.5.2 - Testes utilizando salas de semicampo.....	32
4.6 - Comparação da sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a diferentes procedimentos : pano preto + <i>Metarhizium anisopliae</i> fixado em móveis residenciais e armadilha PET com pano preto + <i>Metarhizium anisopliae</i>	33

4.7 – Comparação das armadilhas feitas com garrafas PET com filme adesivo + pano preto + atraente sintético e com filme adesivo + pano preto sem o atraente para captura de mosquitos.....	345
4.8 – Comparação da sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> a pano preto impregnado com <i>Metarhizium anisopliae</i> associado a um atraente sintético e pano preto com <i>Metarhizium anisopliae</i> sem o atraente sintético.....	36
5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6 - RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.39
6.1 – Efeito de uma armadilha confeccionada de garrafa PET com pano preto impregnado com <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre a sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	39
6.1.1 Resultados dos testes feitos utilizando câmara de observação	39
6.1.2 – Experimentos realizados nas salas simulando condições de campo	40
6.2 – Avaliação de um filme adesivo que reveste um pano preto na captura de mosquitos	41
6.2.1 - Testes realizados na câmara de observação	41
6.2.2 - Testes realizados nas salas de semicampo	42
6.3 - Sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a pano preto + <i>Metarhizium anisopliae</i> fixado em móveis residenciais comparada com armadilhas PET contendo um pano preto + <i>Metarhizium anisopliae</i>	43
6.4 – Comparação de captura de mosquitos usando armadilhas PET com pano preto envolvido por filme adesivo + atraente sintético e filme adesivo + pano preto sem o atraente.....	44
6.5 - Sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a um pano preto impregnado com <i>Metarhizium anisopliae</i> associado a um atraente	

sintético comparada com pano preto e <i>Metarhizium anisopliae</i> sem o atraente sintético.....	45
7- DISCUSSÃO.....	46
8 - CONCLUSÃO.....	53
9 - REFERÊNCIAS	54

RESUMO

IMAD, L.E.S. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2015. Novo método de controle do mosquito *Aedes aegypti* utilizando uma armadilha com pano preto impregnado com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* associado a um atraente sintético. Orientador: Dr. Richard Ian Samuels. Coorientador: Dr. Adriano Rodrigues de Paula.

Fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para serem usados no controle do mosquito vetor da dengue *Aedes aegypti*. O atual estudo foi feito em condições de semicampo utilizando uma câmara de observação feita de acrílico (100 x 51 x 61 cm) e salas de 6 m² simulando um cômodo residencial. Somente fêmeas de *A. aegypti* foram utilizadas nos experimentos. Os objetivos do atual estudo foram: (1) testar a eficiência de uma armadilha feita de garrafa PET com pano preto + *M. anisopliae* para infecção de *A. aegypti*, (2) comparar a taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos ao pano preto + *M. anisopliae* fixado em móveis residenciais com a porcentagem de sobrevivência de mosquitos expostos à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae*, investigar se o pano preto + *M. anisopliae* + atraente sintético reduziria significativamente a sobrevivência do mosquito *A. aegypti*. A armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* foi eficiente para infecção de fêmeas *A. aegypti* utilizando câmara de observação (14,4% de sobrevivência \pm 8,35) e sala simulando um cômodo residencial (22,6% de

sobrevivência $\pm 2,08$). Utilizando a câmara de observação expondo os insetos por 24h a garrafa PET com filme adesivo + pano preto resultou em maior taxa de mosquitos presos (38,6%) comparado com o controle (6%). Expondo os insetos por 48h a garrafa PET com filme adesivo + pano preto resultou em maior taxa de mosquitos presos (68%) comparado com controle (12,6%). Na simulação de um cômodo residencial expondo os insetos por 24h a PET com filme adesivo + pano preto resultou em 22% de mosquitos presos, enquanto o controle teve 3,33% e depois de 48h, a garrafa PET com filme adesivo + pano preto resultou em 38,6% de mosquitos presos, enquanto controle teve 10%. Também na simulação de um cômodo residencial os mosquitos expostos aos três panos pretos + fungo fixados em móveis residências apresentaram taxa de sobrevivência (26,6%) significativamente igual à porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos a três armadilhas PET com pano + fungo (24%). Os mosquitos expostos ao filme adesivo + pano preto + atraente nas salas por 24h tiveram maior número de insetos presos (31,3%) comparado com os outros tratamentos: filme adesivo + pano preto (17,3%), filme adesivo + atraente (10,6%) e só filme adesivo (3,33%). Depois de 48h os mosquitos expostos ao filme adesivo + pano preto + atraente também tiveram maior número de insetos presos (66,6%) comparado com os outros ensaios: filme adesivo + pano preto (36%), filme adesivo + atraente (22,6%) e filme adesivo (6,66%). Associar o atraente sintético ao pano preto + *M. anisopliae* na simulação de um cômodo residencial resultou em 32,6% de sobrevivência, enquanto os outros tratamentos com pano preto + *M. anisopliae*, pano preto + atraente e pano preto + TW resultaram em 48%, 80% e 82% de mosquitos vivos respectivamente. Panos pretos impregnados com fungo associados a atraentes sintéticos servem como uma ferramenta promissora para diminuir a sobrevivência do mosquito da dengue *A. aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, fungo entomopatogênico, *Metarhizium anisopliae*, testes de semicampo, atraente.

ABSTRACT

IMAD, L.E.S. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2015. A new control method for *Aedes aegypti* using a trap with a black cloth impregnated with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, associated with an attractive bait. Advisor: Prof. Richard Ian Samuels. Co-advisor: Adriano Rodrigues de Paula.

Entomopathogenic fungi are potential candidates for use against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. The current study was done in semi-field conditions using an acrylic observation chamber (100 x 51 x 61cm) and 6m² rooms simulating human residences. Only *A. aegypti* females were used in the experiments. The objectives of this study were to (1) test the efficiency of a trap made from a PET bottle with black cotton cloth + *M. anisopliae* for infection of *A. aegypti*, (2) compare the survival rate of mosquitoes exposed to a black cloth + *M. anisopliae* fixed to items of furniture with the survival of mosquitoes exposed to a PET bottle trap with black cloth + *M. anisopliae*, (3) investigate if the black cloths + *M. anisopliae* + attractive synthetic baits significantly reduced the survival of *A. aegypti*. The PET trap with black cloth + *M. anisopliae* was effective at infecting female *A. aegypti* as confirmed by using an observation chamber (14.4% survival \pm 8.35) and a room simulating a residence (22.6% survival \pm 2.08). Using the observation chamber and exposing the insects for 24 hours to the PET bottle with adhesive film + black cloth resulted in higher rates of trapped mosquitoes (38.6%)

when compared to controls (6%). Exposure the insects for 48h to the PET bottle with adhesive film + black cloth resulted in higher rates of mosquitoes caught (68%) compared with controls (12.6%). In the experiment simulating a residential room, exposing the insects for 24 hours to the PET trap with adhesive film + black cloth resulted in 22% trapped mosquitoes, while the control was only 3%. At 48 hours, the PET bottle with adhesive film + black cloth captured 38.6% of the mosquitoes, while controls captured only 10%. Also in experiments using the simulated residential room, mosquitoes exposed to three black cloths + fungus fixed to furniture had survival rates (26.6%), similar to the percentage of survival of mosquitoes exposed to three PET traps with cloth + fungus (24%). Mosquitoes exposed to adhesive film + black cloths + attractive baits in test rooms for 24 hours resulted in a higher number of captured insects (31.3%) compared to the other treatments: black cloth + adhesive film (17.3%), adhesive film + attractive bait (10.6%) and adhesive film only (3.33%). After 48 hours, the highest number of captured insects (66.6%) was seen with adhesive film + black cloths + attractive baits compared to black cloth + adhesive film (36%) and adhesive film + attractive bait (22.6%) or just adhesive film (6.66%). Associating attractive synthetic baits to black cloth + *M. anisopliae* in a simulation of a residential room resulted in 32.6% survival, while other treatments, black cloth + *M. anisopliae*, black cloth + attractive bait and TW + black cloth resulted in 48%, 80% and 82% survival respectively. Black cloths impregnated with fungus associated with synthetic attractive baits are promising and economical tools for the reduction of the dengue mosquito *A. aegypti* population.

Keywords: *Aedes aegypti*, entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, semi-field testing, attractive baits.

1 - INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti*, espécie tropical e subtropical originário da África, é um dos principais vetores de doenças que se constitui um grande problema de saúde pública, já que sua distribuição se expande muito rápido. As fêmeas infectadas, além de provocarem grande desconforto ao hospedeiro devido à picada, podem transmitir vários patógenos ao homem e a outros animais, principalmente viroses como a dengue, a febre amarela (Forattini, 2002) e a febre Chikungunya que vem se espalhando por toda a Ásia, África e partes da Europa nos últimos tempos (Enserink, 2008). Estudos realizados em uma maternidade na ilha de La Réunion (França), mostram que a transmissão do vírus Chikungunya muitas vezes leva a infecção neonatal grave e deve ser levado em conta pelos médicos e autoridades de saúde pública em caso de surtos (Gérardin et al., 2008).

A dengue é uma doença febril aguda de etiologia viral, de evolução benigna na forma clássica e grave quando se apresenta na forma hemorrágica. Representa uma ameaça de pandemia, infectando cerca de 50 milhões de pessoas em todos os continentes (WHO, 2014).

O vírus da dengue é um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui quatro tipos imunológicos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. O vírus é causador da doença dengue, que pode se apresentar com os seguintes quadros clínicos: dengue clássica, assintomática, hemorrágica, dengue com complicações e síndrome do choque da dengue. Esta última é a apresentação mais grave da

doença, se caracterizando com queda da pressão arterial, palidez e perda da consciência (Linha-Guia de Atenção à Saúde, 2009). A disseminação rápida da doença é atribuída à distribuição do mosquito e à ausência de imunidade na população, ou seja, até o momento não há tratamento antiviral específico contra o vírus da dengue e Chikungunya, portanto, o controle do vetor para reduzir a transmissão da doença é a maneira mais eficaz (Tauil, 2002; Teixeira et al., 2002; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b).

As dificuldades para o controle de insetos vetores se intensificam com o aumento da população urbana desordenada, pneus e vasos de cemitérios acumulando água, depósitos de ferro velho a céu aberto retendo água de chuva, terrenos baldios não cuidados, caixas d'água descobertas, coleta de lixo deficiente e saneamento básico inadequado (Tauil, 2002). Com isso, sabe-se que métodos convencionais para o controle de *A. aegypti* não estão conseguindo prevenir as epidemias de dengue e novas alternativas são urgentemente necessárias.

Já foi observado que o constante uso de inseticidas químicos causa a resistência de vetores importantes como o mosquito *Anopheles gambiae* (Koekemoer et al., 2011; Koffi et al., 2012), *Culex pipiens* (Labbe et al., 2007; Liu et al., 2011), e *A. aegypti* (Dusfour et al., 2011; Lima et al., 2011) para as quatro classes de inseticidas (carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretroides). Isso já foi relatado para *A. aegypti* em muitas regiões do Brasil (Ranson et al., 2010). Além dos problemas com populações de insetos resistentes, os inseticidas químicos podem ser tóxicos ao homem, ambiente e animais (Polanczyk et al., 2003; Luna et al., 2004). A resistência de *A. aegypti* aos inseticidas químicos organofosforados e piretroides tem sido mostrada em vários estudos (da-Cunha et al., 2005; Montella et al., 2007; Lima et al., 2011) e portanto, novos métodos para controle de mosquitos necessitam ser investigados.

O controle biológico de vetores parece promissor. Um dos agentes de controle biológico de mosquitos são as bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, porém são somente eficientes na fase larval do mosquito, não controlando outras fases (Consoli et al., 1998). Vários estudos têm demonstrado a virulência dos fungos entomopatogênicos para a infecção do mosquito *A. aegypti* (Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Pereira et al., 2009; Santos et al., 2009; Darbro et al., 2011). Vieira e colaboradores (2013) mostraram imagens do

processo de infecção do fungo em larvas e adultos do mosquito da dengue. Entretanto, um dos principais desafios para o uso de fungos contra vetores no campo é o desenvolvimento de métodos eficientes para infectar os insetos.

Estudos mostram que o fungo pode penetrar através da cutícula dos insetos permitindo sua aplicação diretamente sobre esses vetores. Entretanto, para o controle dos mosquitos seria interessante a aplicação de suspensões de fungos em superfícies de pouso (Farenhorst & Knols, 2010). Scholte e colegas (2005) observaram significativa diminuição da população de *A. gambiae* em um vilarejo da Tanzânia na África após fixar panos pretos impregnados com *M. anisopliae* em habitações humanas. O uso de reservatórios de água impregnados com *M. anisopliae* foi eficaz para redução da sobrevivência de *A. gambiae* e *Anopheles funestus* (Farenhorst et al., 2008). Mnyone e colegas (2009) observaram em condições de laboratório que *M. anisopliae* ou *Beauveria bassiana* impregnados em painéis de barro ou panos pretos foram virulentos contra *A. gambiae*. Outra estratégia interessante foi o uso de uma caixa confeccionada de madeira, revestida externamente de tela e internamente com panos pretos com *M. anisopliae* contra *Anopheles arabiensis* (Lwetoijera et al., 2010). Nosso grupo observou em condições de semicampo, usando uma gaiola grande, que um pano preto impregnado com *M. anisopliae* resultou na diminuição da sobrevivência de *A. aegypti* (Paula et al., 2008). Dabro e colegas (2012) observaram, utilizando uma sala grande, a virulência do fungo *B. bassiana* contra fêmeas de *A. aegypti*. Porém, as fêmeas foram infectadas com o fungo no laboratório e depois liberadas no semicampo.

Paula e colaboradores (2013a) verificaram que panos pretos com *M. anisopliae* fixados em móveis residenciais em uma simulação de um cômodo residencial resultaram em significativa redução das taxas de sobrevivência do mosquito *A. aegypti*. Paula e colaboradores (2013b) observaram (utilizando uma gaiola grande feita de madeira revestida com tela branca, em condições de temperatura e luz natural), redução da sobrevivência de mosquitos expostos por 12 horas a um pano preto (20x10 cm) impregnado com *M. anisopliae*. Estudos mostram que conídios extraídos de pano preto mantido em uma varanda de 2 a 18 dias permaneceram virulentos apresentando de 28 a 60% de sobrevivência de *A. aegypti* e que a combinação do fungo + óleo vegetal e óleo isoparafina (50:50) aumentou a persistência do fungo (Carolino et al. 2014). Além disso, foi

observado que pano preto atrai os mosquitos *A. aegypti* alimentados com sacarose ou sangue e que pano preto com *M. anisopliae* não age como repelente para o pouso de *A. aegypti* nestes panos (Paula et al., 2013a).

Atraentes de mosquitos são muito utilizados em armadilhas de oviposição ou captura. A armadilha denominada MosquiTRAP® é composta por um atraente de oviposição sintético (AtrAedes®) que libera um odor atraindo os mosquitos para um recipiente preto com água (Eiras, 2002; Gama et al., 2007; Fávares et al., 2008). A armadilha BG-Sentinel™ (Biogents Ltd) é utilizada com uma substância química baseada em ácido láctico que atrai os mosquitos (atraente - BG Lure™; Biogents Ltd.) e uma ventoinha suga os insetos adultos que ficam presos em um saco coletor (Ball e Ritchie (2010). Os mosquitos morrem dentro da armadilha (Observação pessoal). Atraentes também poderiam ser associados a superfícies impregnadas com fungo entomopatogênico para infecção de mosquitos.

Panos pretos impregnados com *M. anisopliae* foram eficientes para infectar o mosquito da dengue *A. aegypti* (Paula et al., 2013a; Paula et al., 2013b). Todavia, em um ensaio preliminar feito em residências do município de São João da Barra (SJB), foi observado que fixar um pano preto impregnado com fungo utilizando uma fita adesiva causava danos aos móveis, além da rejeição dos moradores quanto à frequente entrada dos pesquisadores nas residências para substituição dos panos pretos. Esta situação motivou o presente trabalho, como uma necessidade em confeccionar um suporte para o pano preto com fungo. Sendo assim, o atual estudo foi realizado para desenvolver uma nova metodologia de aplicação de fungos e pesquisou o uso de atraentes para aumentar a eficiência das armadilhas.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Dados biológicos e morfológicos do mosquito *Aedes aegypti*

Os mosquitos da espécie *A. aegypti* são holometábolos, pertencentes ao Filo Arthropoda, à Classe Insecta, à Ordem Díptera, à Família Culicidae, à Subfamília Culicinae e ao Gênero *Aedes*. A família Culicidae é formada por várias tribos, entre elas a Aedini que reúne os mosquitos do gênero *Aedes*, de grande importância epidemiológica (Consoli et al., 1998). O ciclo de vida do mosquito *A. aegypti*, principal vetor da dengue, passa por uma metamorfose completa compreendendo as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os ovos são colocados na superfície interna da parede dos criadouros, preferencialmente, em locais úmidos e superfícies rugosas. Qualquer lugar que possa acumular água, tanto em ambiente natural quanto doméstico, são potenciais criadouros (Donalísio & Glasser, 2002; Forattini, 2002). O número de ovos por postura depende da quantidade de sangue ingerido durante o repasto, mas estudos mostram que uma fêmea produz em média 120 ovos que são depositados em mais de um criadouro (Forattini, 2002). A eclosão das larvas ocorre assim que completam o seu desenvolvimento embrionário, entre 2 a 3 dias. Externamente, os ovos são revestidos por uma camada denominada exocório (casca) (Consoli et al., 1998; Marcondes, 2001). A resistência dos ovos em ambientes secos pode se prolongar por mais de um ano. Nessas condições, o embrião entra em uma fase de dormência, conhecida como quiescência ou diapausa. A eclosão das larvas é

suspensa temporariamente diante de condições ambientais adversas, possibilitando a manutenção e sobrevivência das populações em locais com grandes períodos de seca (Consoli et al., 1998; Clements, 2000; Vianna, 2001; Becker et al., 2003). A eclosão larvária é auxiliada pelo atrito de um "dente" quitinoso situado dorsalmente na cabeça da larva de 1º estágio contra a casca do ovo, e ainda o ingurgitamento da larva juntamente com os seus movimentos pulsáteis (Bates, 1949; Christophers, 1960; Forattini, 1962).

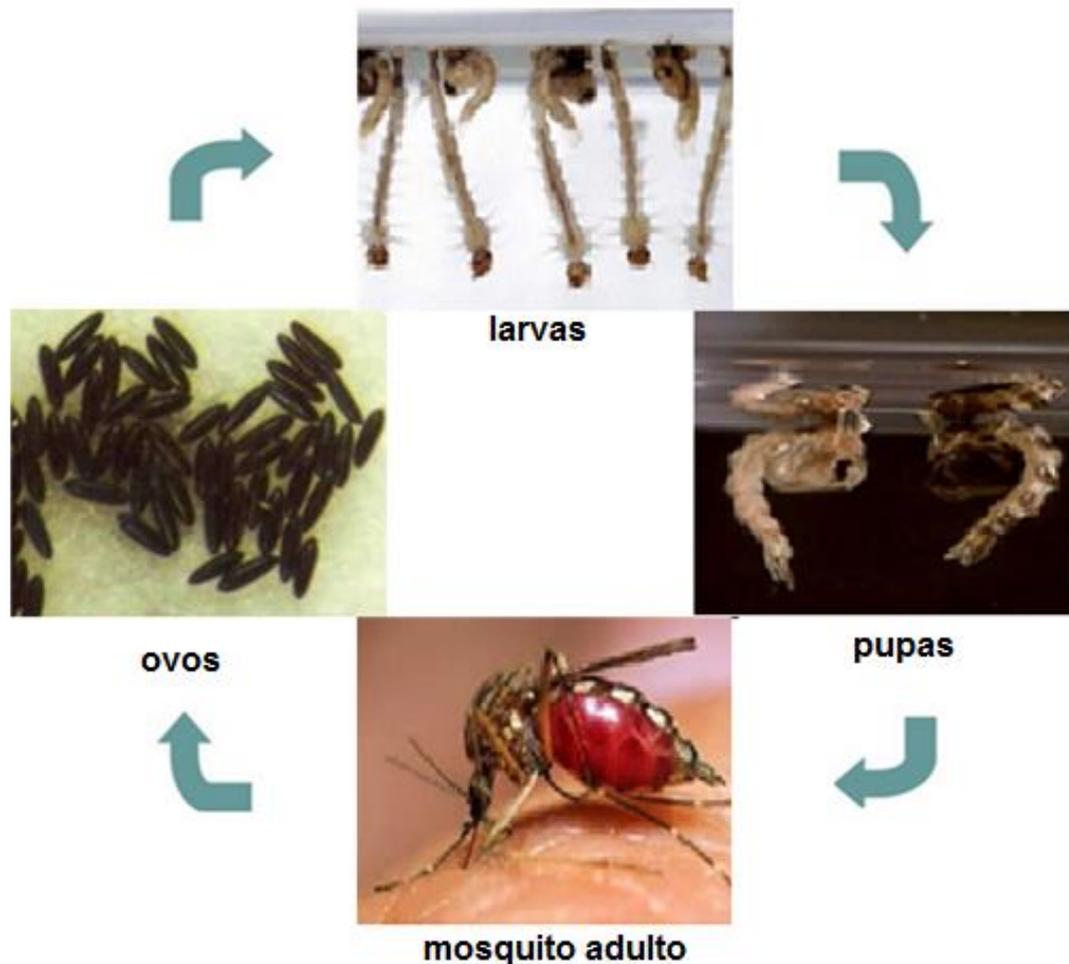


Figura 1: Ciclo Biológico do vetor da dengue, *Aedes aegypti*:

Fonte: Center for Disease Control and Prevention.

As larvas de *A. aegypti* respiram utilizando um sifão respiratório e para isso necessitam chegar à superfície da água. Durante o desenvolvimento, as larvas sofrem um processo de muda passando por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) (Consoli et al., 1998). Possuem aspecto vermiforme, coloração variada e o corpo encontra-se dividido em cabeça, tórax e abdômen. A alimentação das

larvas se dá pela ingestão de micro-organismos: algas e partículas derivadas da deterioração de matéria orgânica presente na água (Consoli & Oliveira, 1998; Clements, 2000; Becker et al., 2003).

Após os 4 estádios larvais, em um período entre 4 a 7 dias, os mosquitos entram na fase de pupa. As pupas também são móveis, entretanto não se alimentam. O corpo da pupa é formado por cefalotórax (cabeça + tórax) e o abdômen. É neste momento que acontece o processo de metamorfose que vai culminar na emergência do mosquito adulto (Becker et al., 2003). O mosquito emerge de uma fenda em T situada na parte dorsal do cefalotórax da pupa. A fase de pupa é fortemente regulada por hormônios e sofre pouca influência das variações ambientais de temperatura e/ou fotoperíodo, durando de 2 a 3 dias (Clements, 2000).

Os mosquitos adultos são alados e colonizam o ambiente terrestre (Clements, 2000). São caracterizados por possuir um corpo alongado dividido em cabeça, tórax e abdômen, pernas longas, asas anteriores funcionais e posteriores reduzidas a pequenas protuberâncias recebendo o nome de halteres, relacionada ao equilíbrio e à orientação durante o voo (Consoli et al., 1998; Marcondes, 2001).

Aedes aegypti caracteriza-se por ser antropofílico e possuir hábito diurno. Alimenta-se e oviposita ao amanhecer, com pico matutino (6:00 às 8:00) e vespertino (16:00 às 18:00) (Gomes et al., 2006). Morfologicamente, *A. aegypti* caracteriza-se por ser um mosquito de cor escura, medindo aproximadamente 4,5 milímetros, ornamentado com manchas brancas na cabeça, nas pernas e abdômen (Forattini, 1962; Consoli & Oliveira, 1998; Huang, 2004; Becker et al., 2010). O metabolismo energético dos mosquitos, machos e fêmeas, depende da ingestão de carboidratos, glicose, sacarose, maltose e frutose, provenientes principalmente do néctar das flores e seiva vegetal como fonte de energia (Nayar & Sauerman, 1973).

Somente as fêmeas são hematófagas. O repasto sanguíneo das fêmeas está relacionado primordialmente ao desenvolvimento de ovos contribuindo também para aumentar a longevidade das fêmeas (Clements, 1963; Nayar & Sauerman, 1975; Consoli, 1982; Barata et al., 2001). A localização de um hospedeiro para a realização do repasto sanguíneo baseia-se em estímulos olfativos (comunicação química), visuais e térmicos. Nas antenas existem receptores que respondem a determinados odores do hospedeiro, tais como

dióxido de carbono, ácido láctico e acetona (Becker et al., 2003). Os mosquitos adquirem o vírus da dengue enquanto se alimentam de sangue de pessoas infectadas. Depois de incubado por 8-10 dias, a fêmea infectada é capaz, durante a alimentação sanguínea, de transmitir o vírus a indivíduos suscetíveis. Podendo também transmitir o vírus a sua prole através da transmissão transovariana (Cruz, 2006). Vários fatores extrínsecos, como fotoperiodicidade, temperatura, cor do recipiente, porosidade, textura, a presença de microrganismos, influenciam no momento da oviposição (Vianna, 2001). As fêmeas do *A. aegypti* possuem estratégias para ovipositar em diferentes criadouros evitando a superlotação e competição larval por escassez de alimentos (Tsunoda et al., 2010).

2.2 - Distribuição geográfica de *Aedes aegypti* e dados epidemiológicos de doenças causadas por esse vetor

Os principais vetores da dengue são mosquitos das espécies *A. aegypti* e *Aedes albopictus* (Consoli et al., 1998). O vírus da dengue, transmitido principalmente pelo mosquito *A. aegypti*, provavelmente se originou de vírus que circulavam em primatas nas proximidades da península da Malásia. O crescimento populacional humano aproximou as habitações da região à selva, e assim, os mosquitos transmitiram vírus ancestrais de primatas a seres humanos que após mutações, originaram os quatro diferentes tipos de vírus da dengue atuais (Ujvari, 2008).

O primeiro registro de um provável caso de dengue foi publicado em uma enciclopédia médica chinesa da época da dinastia Chin (265-420 a.C.). Os chineses se referiam à doença como "veneno da água" e sabiam que havia alguma associação com insetos voadores (Gubler, 1998). O principal vetor, o mosquito *A. aegypti*, acompanhou o homem em sua migração durante os séculos XV ao XIX, em parte devido ao aumento do comércio de escravos (Simmons et al., 2012). Houve relatos de epidemias no século XVII, mas os primeiros registros mais plausíveis de dengue datam de 1779 e 1780, quando uma epidemia varreu a Ásia, África e América do Norte. Dessa época até 1940, epidemias de dengue se tornaram frequentes (Gubler, 1998).

A acentuada propagação da dengue durante e após a Segunda Guerra Mundial tem sido atribuída a perturbações ecológicas. O aumento das

concentrações humanas, as alterações ambientais provocadas pelo homem permitindo mudanças climáticas e o acúmulo de detritos propiciaram o crescimento da população de mosquitos favorecendo algumas espécies vetoriais oferecendo abrigos e criadouros, bem como a disponibilidade de hospedeiros (Borges, 2001). Foram estas mesmas tendências ecológicas que levaram à disseminação de diferentes sorotipos da doença dengue para novas áreas causando sintomas mais graves como a febre hemorrágica da dengue. Esta forma grave da doença foi relatada pela primeira vez em 1953, nas Filipinas. Na década de 70, a forma grave da doença tornou-se uma das principais causas de mortalidade infantil e apareceu também na região do Pacífico e na América (Gubler, 1998). A síndrome do choque da dengue foi observada pela primeira vez na América do Sul e Central em 1981 (Gould & Solomon, 2008).

Historicamente, no Brasil, existem registros de epidemias de dengue no estado de São Paulo, que ocorreram entre os anos de 1851 e 1853 e em 1916. No Rio de Janeiro, o primeiro registro de dengue epidêmica ocorreu em 1923. Em seguida, até a década de 60 a doença foi praticamente eliminada do país, em virtude do combate ao vetor *A. aegypti*. Observou-se uma nova infestação desse vetor em 1967, provavelmente originada pela falta de controle sustentável a partir dos países vizinhos que não obtiveram êxito em sua erradicação (Fraiha, 1968). A partir de 1980 foram registrados novos casos de dengue comprovada em laboratório: 1981 e 1982 em Boa Vista (RR); 1986 e 1987 no Rio de Janeiro (RJ); 1986 Alagoas e Ceará; 1987 Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e São Paulo; 1990 no Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro; 1991 Tocantins e, em 1992, no estado de Mato Grosso (Pontes & Ruffino, 1994). De acordo com a epidemiologia da dengue no Brasil, em 2008 foram registrados mais de 800 mil casos, se tornando o ano com maior número de pessoas infectadas por dengue (Siqueira Jr., et al., 2010). O número de óbitos em 2010 (592 mortes) superou os registros da grande epidemia que ocorreu no Brasil em 2008, onde foram contabilizados 478 óbitos. (Ministério da Saúde, 2011). Segundo os dados, até 16 de fevereiro de 2013, foram notificados 204.650 casos no país com 33 óbitos. Comparando esses resultados com igual período de 2012, houve um aumento de 190% nos casos notificados (Organização Pan-Americana de Saúde, 2013). As cidades de São Paulo e Campinas sofreram com numerosos casos de dengue. Nos quatro primeiros meses de 2014 a capital registrou 3.730 casos, enquanto

que Campinas viveu a maior epidemia de dengue de sua história com 17.100 pessoas infectadas (Folha de São Paulo, 2014).

Após análise de amostras colhidas na Ásia, os dados apontam o tipo 5 da doença. A descoberta se deu quando cientistas da Universidade do Texas receberam amostras de sangue de uma epidemia de dengue ocorrida em 2007 na Malásia. A literatura aponta que o tipo 5 está circulando entre macacos de florestas da Malásia e teria detectado apenas um caso em seres humanos. Logo é necessário manter a vigilância laboratorial e o controle do vetor (Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, SBMT, 2013).

Outro vírus transmitido pelo *A. aegypti* é o arbovirus Chikungunya, da família *Alphavirus*. Dentre os sintomas da febre Chikungunya, o que predomina são as dores articulares debilitantes, que podem perdurar por vários meses (Queyriaux et al., 2008). O vírus foi isolado inicialmente na Tanzânia por volta de 1952 e desde então, há relatos de surtos em vários países do mundo, inclusive, nas Américas. No final de 2004 nas Ilhas do sudoeste do Oceano Índico foram notificados mais de 5.000 casos entre janeiro a março de 2005. Quando iniciou a estação das chuvas ocorreu um pico de incidência atingindo até a quinta semana de 2006, mais de 45.000 casos (Gérardin et al., 2008). De acordo com a OMS, desde 2004 o vírus havia sido identificado em 19 países, porém, a partir do final de 2013, foi registrada transmissão autóctone (dentro do mesmo território) em vários países do Caribe. Em março de 2014, na República Dominicana e Haiti, sendo que, até então, só África e Ásia tinham circulação do vírus. No Brasil, até o dia 25 de outubro de 2014, o Ministério da Saúde registrou 824 casos de Febre Chikungunya. Para evitar a transmissão do vírus, é fundamental que as pessoas reforcem as ações de eliminação dos criadouros dos mosquitos. As medidas são exatamente as mesmas para a prevenção da dengue (Ministério da Saúde, 2014).

2.3 – Armadilhas utilizadas na vigilância entomológica do mosquito *Aedes aegypti*

Estudos recentes têm mostrado a eficiência de armadilhas para o monitoramento do mosquito *A. aegypti*, podendo ser usadas para as fases de ovos, larvas e adultos (Gomes et al. 2008). As armadilhas para ovos (ovitampas) constituem uma ferramenta importante para verificar a dispersão do vetor e

também para desenvolver estudos biológicos em laboratórios (Honório et al., 2003). A armadilha é constituída de um recipiente de cor preta e fosca. Em seu interior é fixado verticalmente um substrato de oviposição (palheta de eucatex), com superfície rugosa exposta para facilitar a postura dos ovos. Água de torneira é adicionada no interior da armadilha (Fay & Eliason, 1966). A utilização de ovitrampas demonstra ser um método sensível e econômico para fornecer informações sobre a presença do vetor (Rawlins et al., 1998). Foi constatado que o uso de armadilhas para ovos foi mais eficiente e econômico para verificação da presença do vetor em relação às armadilhas para larvas (larvitrapas) (Marques et al., 1993; Rawlins et al., 1998; Braga et al., 2000). Lenhart et al., 2005, afirmaram ainda que as armadilhas modificadas feitas com copo azul foram mais eficientes que as ovitrampas de vasos pretos. Já Areia e colaboradores (2012) demonstraram que experimentos realizados com ovitrampas feitas com vasos plásticos pretos com quatro palhetas de eucatex foram mais eficientes em relação a outro modelo de ovitrampas confeccionado de um copo azul com um pano de algodão branco. Foi verificada a presença de ovos somente nas armadilhas de vaso preto.

As larvitrapas são depósitos feitos de pneus usados contendo água. Estas armadilhas são instaladas a uma altura aproximada de 80 cm do solo, em locais considerados focos do vetor adulto. A finalidade básica das larvitrapas é a detecção precoce de infestações (FUNASA, 2001). No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue recomenda que as larvitrapas sejam usadas em áreas onde o fluxo de pessoas é intenso como aeroportos, terminais rodoviários, portos fluviais e marítimos para verificação da entrada do mosquito. Entretanto, esses dois tipos de armadilhas são ineficazes para quantificar o número de fêmeas no local e também para capturar os mosquitos adultos (Lima et al., 1989). Sobressalta-se a importância da verificação diária das armadilhas ovitrampas e larvitrapas para que não se tornem um criadouro.

Vários autores constataram a utilização de armadilhas para monitorar a densidade populacional do mosquito *A. aegypti* adulto (Favaro et al., 2006; Sant'ana et al., 2006; Gama et al., 2007). Donatti & Gomes (2007) apresentaram a eficiência da Adultrap, uma armadilha de forma cilíndrica e cor escura formada por três compartimentos: um para a entrada do mosquito (extremidade superior), um para colocar o atraente visual como a água ou outra isca atrativa (extremidade

inferior) e outro para retê-lo dentro da armadilha. Uma vez atraído pela água, o inseto tem acesso ao segundo compartimento. O terceiro compartimento da armadilha é revestido por tela fina e é alcançado após o mosquito ultrapassar o orifício contido em cada um dos quatro cones transparentes voltados para parte lateral da armadilha onde os insetos ficam retidos neste espaço. O recipiente para a água é separado das partes internas da armadilha por uma tela, sem qualquer chance de contato direto do mosquito com a água usada.

O sistema de Monitoramento Inteligente da Dengue (MI-Dengue) é uma ferramenta informatizada criada com base em pesquisas realizadas pelo Laboratório de Culicídeos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Eiras, 2002; Fávaro et al., 2006). A MosquiTRAP[®] é um modelo de armadilha que permite capturar mosquitos adultos de *A. aegypti* ou *A. albopictus*, principalmente fêmeas grávidas devido à presença de um atraente de oviposição (AtrAedes[®]) preso a um cartão adesivo de polietileno de cor preta no interior da armadilha. Ao pousarem ou tocarem na parte interna da MosquiTRAP[®] as fêmeas ficam presas no cartão adesivo. A identificação do inseto capturado ocorre no momento da inspeção da armadilha no campo permitindo agilizar a obtenção de dados (Eiras, 2002). As informações coletadas, como por exemplo, a presença e a quantidade de insetos são enviadas em tempo real via celular, para um site onde são feitas atualizações, controles e análises gerando planilhas e mapas, para estimar a população de adultos. Os insetos capturados são encaminhados para testes para verificação da presença do vírus (Eiras & Resende, 2009).

Outra armadilha eficiente para capturar o vetor da dengue é a BG Sentinel[™] desenvolvida por pesquisadores alemães da Universidade de Regensburg em parceria com o Laboratório de Culicídeos (UFMG) (Eiras & Geier, 2002). É composta de um atraente sintético BG-Lure[™], que é colocado no interior da armadilha. Além do estímulo químico (BG-Lure[™]), a armadilha possui outros elementos que atraem as fêmeas como o estímulo visual (contraste entre as cores preto e branco) e correntes de ar que mimetizam correntes de convecção criadas pelo corpo humano que atrai o mosquito para um saco coletor onde ficam presos sem chances de retornarem ao ambiente (Eiras, 2002). Ball e Ritchie (2010) investigaram a eficácia da armadilha BG Sentinel[™] em capturar os mosquitos *A. aegypti* em um ambiente visivelmente competitivo, ou seja, lugares

escuras de refúgio para os insetos, fornecendo importantes considerações e interpretações de amostras do mosquito *A. aegypti*, sendo considerada uma ferramenta promissora contra vetores.

2.4 - Métodos de controle de mosquitos vetores de doenças

São várias as estratégias desenvolvidas para o controle vetorial, como melhoria de saneamento básico, atividades de rotina com função principal em reduzir criadouros do mosquito, realizadas através de visitas domiciliares e mutirões de limpezas. Tais atividades contribuem para a redução da infestação dos mosquitos evitando a reintrodução em outras áreas, principalmente em períodos de circulação endêmica (Forattine, 1962; Ministério da Saúde, 2005; Tauil, 2006; Secretaria de Vigilância Sanitária, 2011). Na maioria das vezes, esse processo é acompanhado pelo uso de inseticidas químicos, sobretudo em casos de epidemias (Marcondes, 2001).

Os inseticidas químicos são classificados em quatro principais grupos: organofosforados, piretroides, carbamatos e organoclorados, sendo que os mais usados atualmente no controle de vetores são os organofosforados e piretroides (Bisset, 2002). Desde 1920, estas substâncias químicas se tornaram importantes para o controle de mosquitos. Em 1939, Muller descobriu as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT), se tornando um fator primordial para a saúde pública no controle de vetores. Porém, em 1946 surgiram os primeiros problemas relacionados à resistência aos inseticidas clorados, reduzindo a eficiência do produto. Devido aos malefícios causados ao ambiente, animais e seres humanos, os inseticidas dessa classe foram proibidos em vários países (Becker et al., 2010).

O grupo dos organofosforados, malathion e temephos, constitui uma das alternativas ao uso do DDT por serem biodegradáveis e não se acumularem no tecido dos animais, apresentando baixa toxicidade (Braga & Valle, 2007). O malation é usado principalmente para o controle de mosquitos adultos na forma de aerossol para pragas urbanas e na agricultura (Becker et al., 2003; Becker et al., 2010). O temefós é eficaz para todos os estágios larvais de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* com grande potencialidade para reduzir populações de *A. aegypti* (Becker et al., 2010).

Os inseticidas piretroides, apesar de apresentarem baixa toxicidade para mamíferos são tóxicos para os peixes. Foram muito usados no controle de mosquitos adultos, principalmente no controle da malária, ou como larvicidas (Hemingway & Ranson, 2005; Braga & Valle, 2007; Becker et al., 2010). Outros grupos de inseticidas de nova geração são os reguladores do crescimento de insetos (IGR). Braga e colaboradores (2005a) investigaram em condições de laboratório, a eficácia do methoprene. Nesta perspectiva, pode-se citar também o pyriproxifem (Slama et al., 1974). Ambos são recomendados pela OMS para o controle de *Aedes sp.* em água potável (Estrada & Mulla, 1986; Chavasse & Yap, 1997). Existem outros compostos conhecidos como diflubenzuron e triflumuron que agem pela inibição da síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto, reduzindo significativamente as taxas de sobrevivência das larvas tratadas (Mulla, 1995; Martins et al., 2004; Borges et al., 2004).

Apesar das dificuldades enfrentadas no uso de inseticidas químicos, principalmente quanto à resistência dos insetos ao produto, em vários países da África ainda é a medida de controle mais eficiente para redução do vetor da malária (Mabaso et al., 2004). O problema da resistência dos insetos também foi observado nos produtos utilizados no controle de *A. aegypti* no Brasil (Marcoris et al., 1999) e no exterior (World Health Organization, 1992). Sendo assim, foi necessária a busca de alternativas para o controle de mosquitos com diferentes modos de ação. Os agentes biológicos têm demonstrado alta potencialidade como alternativas na luta contra vetores de doenças (Debach & Rosen, 1991; Polanczyk et al., 2003; Scholte et al., 2004; Paula et al., 2011a).

2.5 - Controle biológico de mosquitos

Com o objetivo de desenvolver estratégias de controle biológico os cientistas têm investigado métodos que empregam diferentes micro-organismos entomopatogênicos divididos em três grupos principais como vírus, bactérias e fungos. Parasitas e predadores também são utilizados contra a população de insetos praga e vetores (Lenteren & Godfray, 2004). Existem mais de 250 predadores invertebrados e vertebrados de larvas de mosquitos. No que se refere à utilização de espécies larvófagos no controle de insetos vetores de doenças, tais como malária, febre amarela e dengue, os peixes vêm sendo

utilizados no mundo principalmente nos criadouros naturais destes insetos (Consoli et al., 1998).

A infecção de larvas através de vírus culmina na morte do inseto. Segundo Becnel e colaboradores (2001), os baculovirus (CuniNPV) são patogênicos com alta infectividade para todos os estádios das larvas de *Culex nigripalpus* e *Culex quinquefasciatus*.

Bacillus thuringiensis (Bti) e *Bacillus sphaericus (Bs)* são bactérias Gram-positivas que possuem efeito inseticida. Estas duas espécies produzem endotoxinas proteicas, as quais quando ingeridas pelas larvas, atacam e destroem as células epiteliais no intestino médio levando-as a morte (Neto et al., 1985; Polanczyk et al., 2003; Costa et al., 2010). São bactérias produtoras de endósporos, extremamente resistentes a condições ambientais adversas, se tornando desta forma um importante bioinseticida (Costa et al., 2010). A bactéria entomopatogênica *Bs* mostra boa persistência nos habitats aquáticos poluídos típicos da espécie *Culex* e boa eficácia contra algumas espécies de *Anopheles*, enquanto *Bti* é usado principalmente para controlar *Simulium* e *Aedes* (Vilarinhos et al., 1998; Regis et al., 2001; Espindola et al., 2008; Ritchie et al., 2010). Entre diversas vantagens, a *Bti* tem se destacado por não ser tóxica a humanos, uma característica muito importante já que são geralmente aplicados em áreas urbanas (Becker, 2000). Outro fator importante é a possibilidade de *Bti* ser usada juntamente com produtos químicos para aumentar a eficiência do controle (Chui et al., 1995), como por exemplo, a combinação com organofosforados (Polanczyk et al., 2003). É comercializada em larga escala para o controle de mosquitos e borrachudos. Um grande número de produtos eficientes está disponível no mercado. Esta bactéria foi usada em campanhas intensivas realizadas nos EUA e Alemanha para o controle de pernilongos e na África para o controle de simúlideos vetores da Oncocercose (Glare & O'Callaghan, 2000). Os tabletes de *Bti* são preparados especificamente para uso em programas de controle e são facilmente distribuídos (Vilarinhos et al., 1998).

Turley e colaboradores (2009) sugerem que a infecção com *Wolbachia pipientis* (gênero de bactérias que infectam artrópodes) provoca danos nos tecidos dos mosquitos reduzindo o sucesso de se alimentar com sangue e diminuindo o tempo de vida de *A. aegypti*.

Entre os micro-organismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico destacam-se os fungos entomopatogênicos, que se constituem no maior grupo de patógenos de insetos (Messias, 1989; Onofre et al., 2002), apresentando vantagens em relação aos vírus e às bactérias produtoras de toxinas, que têm que ser ingeridas para infectar insetos (Costa et al., 2010).

2.6 - Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos

Os fungos entomopatogênicos podem infectar os mosquitos através de ingestão ou contato externo dos conídios com a cutícula (Alves, 1998). A entomopatogenicidade é definida como a capacidade de produzir doenças em insetos e depende da germinação, penetração, colonização, exteriorização das estruturas fúngicas e produção de esporos sobre o corpo do hospedeiro (St. Leger et al., 1991; Alves, 1998). Os conídios dos fungos possuem alta capacidade de disseminação horizontal, podendo ser levados pelos diferentes agentes de disseminação, como o vento, para locais muito distantes (Alves, 1998). Estima-se mais de 750 espécies com potencial de controle de insetos e outras pragas de artrópodes (Messias, 1989). A produção em massa de fungo é geralmente constituída de produtos vegetais ricos em amidos como batata, arroz, aveia, milho e feijão (Jackson, 1997).

Dentre os gêneros bem-sucedidos para o controle biológico destacam-se o *Metarhizium* e *Beauveria* (Faria & Magalhães, 2001). Ambos pertencem à classe dos deuteromicetos e estão amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados facilmente no solo onde sobrevivem por longos períodos (Alves, 1998). O fungo *M. anisoplie*, é caracterizado por um conjunto filamentosos de micélio, hifas, com paredes constituídas quimicamente de quitina e/ou celulose além de outros açúcares (Alves, 1998).

Os sintomas iniciais da doença em insetos podem aparecer como manchas escuras nas pernas, regiões intersegmentais ou distribuídas por todo o tegumento (Alves, 1998). O inseto cessa a alimentação tornando-se fraco, apresenta sintoma de paralisia, perde a coordenação dos movimentos permanecendo desorientado e morre. Quando atacados tornam-se duros e cobertos com uma camada pulverulenta de conídios. No final da conidiogênese o cadáver pode mostrar tons

de verdes. A doença é conhecida como muscardine verde, contrastando com a muscardine branca provocada por *B. bassiana* (Alves, 1998).

No Brasil, os primeiros resultados favoráveis à utilização de *M. anisopliae* para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar datam de 1923. Nos anos seguintes o *M. anisopliae* recebeu mais atenção, sendo utilizado inicialmente para o controle da cigarrinha *Tomaspis liturata* (Faria & Magalhães, 2001). Atualmente, encontra na literatura diversos estudos focados na utilização desses entomopatógenos, causadores de epizootias naturais contra diversas espécies de mosquitos (Scholte et al., 2005; Scholte et al., 2007; Farenhorst et al., 2008; Paula et al., 2008; Pereira et al., 2009; Lwetoijera et al., 2010; Mnyone et al., 2010; Paula et al., 2011ab; Paula et al., 2013ab; Carolino et al., 2014).

Luz e colaboradores (2007) afirmam que houve uma forte atividade ovicida de *A. aegypti* infectados com *M. anisopliae*, eclodindo apenas 11% dos ovos infectados. Santos e colaboradores (2009) descrevem que ovos infectados com *M. anisopliae* IP 46 em HR > 98% e incubados a 25C° imersos em água tiveram redução significativa da eclosão em larvas.

Quanto ao controle larvário, o fungo *B. bassiana* avaliado por Clark e colaboradores (1968) foi virulento em larvas de *Culex pipiens*, *Anopheles albimanus* e *A. aegypti*. Daoust (1982) descreveu a atividade patogênica contra larvas de *A. aegypti*, *C. pipiens*, *Anopheles stephensi* usando o fungo *M. anisopliae*. Bioensaios foram realizados utilizando oito isolados do fungo *M. anisopliae* e dois de *B. bassiana* no controle de formas imaturas de *A. aegypti*. Entre os fungos avaliados, o *M. anisopliae* (CG 144 e ESALQ 818) e *B. bassiana* (CG 24) foram os mais virulentos apresentando altas taxas de mortalidade. Das larvas expostas à infecção fúngica, 20% não completaram seu ciclo de vida (Pereira et al., 2009). Bukhari e colegas (2010) investigaram diferentes espécies e concentrações de fungos utilizados para infecção de larvas. *B. bassiana* e *M. anisopliae* causaram alta mortalidade em larvas de *A. gambiae* e *A. stephensi*, sendo que as larvas mais velhas foram menos suscetíveis do que as larvas mais jovens. Paula e colaboradores (2013c) descreveram um novo método de aplicação de fungo *M. anisopliae* aderido em grão de arroz colocado na água contra larvas de *A. aegypti*, observando a persistência do fungo ao longo do tempo. Vieira e colaboradores (2013) registraram imagens do processo de

infecção do fungo *M. anisopliae* em larvas e também adultos do mosquito da dengue *A. aegypti*, enfatizando o tempo de adesão e germinação dos conídios.

Sendo assim, estudos têm demonstrado que esses entomopatógenos também são virulentos para o controle de mosquitos adultos (Scholte et al., 2004; Blanford et al., 2005; Scholte et al., 2005; Paula et al., 2011ab; Paula et al., 2013ab). Em um trabalho realizado em condições de laboratório Scholte e colaboradores (2004) analisaram a autodisseminação do *M. anisopliae* contra o vetor da malária, *A. gambiae*, transmitindo o patógeno durante a cópula. Foi constatado que fêmeas de *A. stephensi* inoculadas com *Plasmodium chaboudi* reduziram o repasto sanguíneo durante a infecção (Blanford et al., 2005). Farenhorst e colaboradores (2008) mostraram que vasos de barro utilizados para armazenamento de água foram adequados para aplicação de fungo *M. anisopliae* contra machos e fêmeas de mosquitos *A. gambiae* e *A. funestus*, sendo promissor para utilização no campo. Esta abordagem é interessante, pois os vasos de barro impregnados com fungo podem ser usados em locais intra e extradomiciliares. Estudos apontam que as fêmeas de *A. gambiae* alimentadas com sangue foram menos suscetíveis aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* do que as fêmeas alimentadas com sacarose (Mnyone et al., 2011). Neste contexto, Paula e colaboradores (2011b) observaram que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue foram menos suscetíveis ao *M. anisopliae* comparado com fêmeas alimentadas com sacarose, sugerindo que o estado nutricional pode estar influenciando a virulência do fungo. Recentemente foi publicado um estudo sobre a redução da competência vetorial de *A. aegypti* coinfestado com *M. anisopliae* e alimentado com sangue infectado com o vírus DEN-2 para testar se o fungo impede a disseminação do vírus. Os resultados mostraram que a taxa de infecção viral dos mosquitos coinfestados (fungo e sangue com o vírus DEN-2) foi de 76%, sendo que infectados ou não, 78% morreram no sexto dia pós-infecção. A taxa de infecção mais elevada foi observada em mosquitos infectados somente com o vírus resultando em 84%, mas a mortalidade foi apenas 6% após seis dias de infecção (Hernández et al., 2013).

Diante destes resultados, os fungos entomopatogênicos se mostram promissores para os processos de infecção e têm potencial para serem utilizados no campo contra os vetores da dengue.

2.7 - Pesquisas de semicampo e campo utilizando fungos entomopatogênicos no controle de mosquitos

O desenvolvimento de métodos para utilização do fungo no campo contra vetores ainda é um dos principais desafios e requer mais investigações.

No que se refere aos trabalhos realizados em semicampo, Paula e colaboradores (2008) utilizando uma gaiola grande (115 x 60 x 75cm) testaram a eficácia de *M. anisopliae* impregnado em pano de algodão preto para o controle do vetor da dengue *A. aegypti*. Foi obtida alta infectividade dos mosquitos com 70% na redução da sobrevivência. O mesmo grupo observou em uma simulação de um cômodo residencial que fêmeas de *A. aegypti* expostas a 5 panos pretos impregnados com fungo *M. anisopliae* durante 7 dias apresentaram apenas 44% de sobrevivência enquanto controle teve 76% de mosquitos vivos. Quando combinados com doses subletais de inseticida Imidacloprid, a redução foi ainda maior de sobrevivência (Paula et al., 2013ab). Em teste feito com gaiola grande, Paula e colaboradores (2013b) observaram a redução da sobrevivência quando o pano preto impregnado com fungo foi deixado na gaiola por apenas 12h causando 53% de mortalidade dos mosquitos. Tempos de exposição mais longos resultaram em maiores reduções da sobrevivência.

Foram realizadas pesquisas na África, em situação de campo, demonstrando a eficiência de tecidos pretos impregnados com fungo *M. anisopliae* contra a população de *Anopheles* resultando na infecção de 23% dos mosquitos. Os tecidos foram colocados no teto de habitações humanas, servindo como atrativo visual para este vetor e reduzindo em 75% na intensidade da transmissão da doença da malária (Scholte et al., 2005). Howard e colaboradores (2011) avaliaram a infecção dos mosquitos *A. gambiae* resistentes a inseticida piretroides, com fungo *B. bassiana* sobre condições de campo. Os ensaios resultaram em um aumento significativo da mortalidade de mosquitos expostos ao fungo comparados aos mosquitos controles.

Em ensaios realizados em condições naturais na Austrália, Darbro e colaboradores (2012) avaliaram o efeito do fungo *B. bassiana* em relação à sobrevivência, comportamento de alimentação sanguínea e fecundidade contra as fêmeas do mosquito *A. aegypti* em gaiolas grandes (5 x 7 x 4m). Os resultados

foram promissores mostrando uma redução de 80% na realização do repasto sanguíneo e 59-95% na sobrevivência do mosquito.

Estudos recentes têm mostrado a eficácia de panos pretos impregnados com *M. anisopliae* para o controle de *A. arabiensis* resultando em mais de 80% de mosquitos infectados (Lwetoijera et al., 2010). Foram testados na Tanzânia vários métodos intradomiciliares utilizando fungo entomopatogênico em telhas revestindo o beiral de residências, pano preto de algodão no beiral, painel de pano de algodão, pano de algodão no beiral inclinado e tiras de algodão ao redor da cama do hospedeiro. Estes métodos resultaram em uma redução de 39-57% na sobrevivência dos mosquitos *Anopheles* (Mnyone et al., 2012). Com o objetivo de reduzir ainda mais a sobrevivência das fêmeas do mosquito *A. aegypti* o presente estudo visa utilizar um o pano preto + fungo associado a um atraente sintético buscando atrair mais mosquitos a armadilha, aumentando a taxa de infecção dos insetos e conseqüentemente, a diminuição da doença dengue.

2.8 - Atraentes utilizados para mosquitos

Várias classes de estímulos emitidos por hospedeiros produzidos principalmente na pele são usadas pelos insetos para localização da fonte sanguínea (Cooper et al., 2004). Aqueles que possuem propriedades voláteis são carregados pelo ar e são detectados a certas distâncias pelos mosquitos. Um exemplo é o dióxido de carbono (CO₂), que combinado com corrente de ar quente e úmida age como atraente exercendo grande influência no inseto, pois é produzido em grande quantidade comparado com outros estímulos e é interpretado como a presença de hospedeiro (Cooper et al., 2004). Outros compostos como o ácido láctico e amônia presentes no suor humano também têm sido confirmados como fatores atraentes para fêmeas de mosquitos (Braks et al., 2001). Esses atrativos formam plumas de odores que se dispersam no ambiente direcionando o inseto até a fonte de alimento (Qiu et al., 2004). A interrupção das plumas de odores, como por exemplo, o vento pode modificar as respostas do inseto ao sinal olfativo (Roque & Eiras, 2008).

Trabalhos realizados com mosquitos transmissores da malária demonstraram que as fêmeas de *A. gambiae* infectadas com *Pasmodium*

falciiparum (parasita transmitido pelo mosquito *Anopheles*) foram mais atraídas a odores humanos do que as não infectadas (Smallegange et al., 2013). Estes conhecimentos têm contribuído para o desenvolvimento de novas metodologias de controle. De acordo com Silva e colaboradores (2005), misturas sintéticas de substâncias químicas que compõem voláteis liberados pelo corpo humano são eficazes para atrair o mosquito *A. aegypti* em condições controladas. Andrade e colaboradores (2008) avaliaram o efeito de cairomônios (odores sintéticos de hospedeiros) na atratividade de flebotomíneos em armadilha luminosa no campo (Varzelândia, MG) visando aumentar o potencial das armadilhas luminosas. O cairomônio BG Mesh Lure® sozinho e associado ao octenol (5mg/h) foi avaliado e mostrou eficiência na captura de várias espécies de flebotomíneos, quando comparado às armadilhas controle (somente a luz). Sant'ana e colaboradores (2006) observaram que ovitrampas com infusão de gramíneas no campo servem como atraentes para oviposição de mosquitos *A. aegypti*. Nesta armadilha, desenvolvida através de estudos comportamentais de oviposição, pode-se observar maior quantidade de ovos do mosquito *A. aegypti* em área urbana. Pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais desenvolveram uma armadilha adesiva chamada MosquiTRAP® com objetivo de atrair e capturar fêmeas de *A. aegypti* devido à presença de um atraente de oviposição sintético (AtrAedes®), que libera um odor que atrai o inseto deixando-os presos em um cartão adesivo colocado na parede da armadilha (Eiras, 2002; Gama et al., 2007; Fávaro et al., 2008). Este produto sintético originário da Alemanha passou a ser produzido no Brasil com o custo reduzido cerca de 100 vezes (Jornal da FundeP. 2011).

Outra armadilha considerada uma ferramenta promissora para atrair os mosquitos adultos em massa utilizando atraentes é a BG-Sentinel™ (Degener et al., 2014). Os mosquitos são atraídos para a armadilha através do sinal olfativo induzido pelo atraente BG-Lure™ (BGL) (BioGents GmbH) simulando odor de um corpo humano (Krockel et al., 2006; Williams et al., 2006).

Paula et al. (2013a) utilizando uma câmara de observação, mostraram que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue foram atraídas para um pano preto (20x10cm) impregnado com fungo. Os números mais baixos de mosquitos observados no pano preto ocorreram no tempo 0 (8h da manhã), momento em que os mosquitos foram liberados na câmara de observação. Com o

passar do tempo maior quantidade de mosquitos alimentados com sacarose foi observado no pano preto comparado com número de mosquitos alimentados com sangue. Ao meio dia (12h) havia significativamente mais mosquitos alimentados com sacarose no pano preto, comparado com a quantidade de mosquitos alimentados com sangue. À meia noite (escuro) (24h) números mais baixos de mosquitos alimentados com sangue ou sacarose foram observados no pano preto. Com isso, foi concluído que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue tiveram menor frequência de pouso em pano preto, comparado com fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose. Atrantes de mosquitos poderiam ser associados ao pano preto impregnado com fungo atraindo e aumentando a taxa de infecção dos insetos.

3 – OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar se a utilização de uma armadilha feita de garrafa PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* associado a um atraente sintético resultaria em significativa diminuição da sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* comparado com testes feitos utilizando pano preto + *M. anisopliae* sem o atraente sintético.

3.2 Objetivos específicos

Investigar se a armadilha confeccionada de garrafa PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* reduziria a sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti*;

Avaliar se um filme adesivo revestindo um pano preto capturaria mosquitos *A. aegypti* eficientemente;

Comparar a sobrevivência (%) de fêmeas de *A. aegypti* expostas ao pano preto + *M. anisopliae* fixado em móveis residenciais (cadeiras e mesas) com a sobrevivência (%) de fêmeas de *A. aegypti* expostas à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae*;

Avaliar se um filme adesivo revestindo um pano preto associado a um atraente sintético capturaria mosquitos *A. aegypti*;

Investigar se um pano preto impregnado com *M. anisopliae* associado a um atraente sintético reduziria significativamente a sobrevivência (%) de fêmeas de *A. aegypti*, comparando com testes feitos com pano preto + *M. anisopliae* sem o atraente sintético.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 - Criação e manipulação dos mosquitos *Aedes aegypti* coletados no campo

No campus da UENF, as coletas de ovos do mosquito foram realizadas usando armadilhas de oviposição denominadas “ovitrapas”. As ovitrapas foram confeccionadas de um vaso plástico preto de 500 ml com quatro palhetas de madeira Eucatex (3 x 12 cm) presas na borda do vaso com elástico (Figura 2A). Dentro do vaso foram adicionados 250 ml de água de torneira. As ovitrapas foram colocadas por 5 dias no campus da UENF em pontos estratégicos. Em seguida foram retiradas do campo e as palhetas com ovos (Figura 2B) foram colocadas em bandejas para secarem por 48h à temperatura ambiente. A eclosão das larvas foi estimulada por imersão total das palhetas em bandejas de 500ml com 100 ml de água (Figura 2C). Foram adicionados nas bandejas 0,5g de ração de camundongo triturada e autoclavada para a alimentação das larvas. Após a eclosão das larvas as palhetas foram lavadas com água corrente, ensacadas e autoclavadas durante 15 minutos a 1 atm (121° C). As pupas foram transferidas para um copo plástico com água e colocadas dentro de gaiolas de plástico (Figura

2D). Os mosquitos adultos foram alimentados com uma solução de sacarose (10%) e somente as fêmeas foram usadas nos ensaios. Para a manipulação dos mosquitos *A. aegypti* foi utilizada uma corrente de dióxido de carbono durante 30 segundos para adormecê-los. Com auxílio de uma pinça fina, as fêmeas foram selecionadas, quantificadas e colocadas em placas de Petri para serem transferidas às salas de semicampo e câmaras de observação.



Figura 2: A- Armadilha ovitrampa para coleta de ovos de *A. aegypti*, B- Ovos do mosquito da dengue em palhetas de Eucatex, C- Palhetas imersas na água para eclosão das larvas, D- Mosquitos *A. aegypti* em gaiolas.

4.2 - Cultivo do fungo entomopatogênico

O fungo *M. anisopliae* (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 água destilada 1L) e mantido por duas semanas a 27°C em câmara climatizada (marca: FANEM) e em seguida, armazenado a 4°C. Erlemeyers de 250ml contendo 25g de arroz parboilizado cru + 10 ml de água destilada foram tampados com algodão e autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121°C). Com o auxílio de uma colher estéril os conídios foram retirados da placa de Petri e

misturados no arroz através de movimentos circulares até obter uma distribuição uniforme dos conídios entre os grãos de arroz (Figura 3B). Os Erlemeyers foram mantidos em câmara climatizada a 27°C e a concentração dos conídios foi avaliada utilizando uma câmara de Neubauer. Todo o processo de coleta de conídios foi realizado em câmara de fluxo previamente desinfetada com álcool 70% e 15 minutos de exposição à UV. Para o preparo da formulação do fungo entomopatogênico foram utilizados esporos secos (Figura 3C) submetidos à secagem (BOD de secagem- marca: Nova Ética) e com auxílio de uma máquina separadora de esporos (Mycoharvester, Inglaterra) (Figura 3A), os conídios foram separados do arroz. Em seguida foi realizada diluição dos conídios usando 0,05% de Tween 80 (TW) até a obtenção da concentração requisitada. Para todos os testes, a concentração do fungo no pano preto foi de 1×10^8 conídios ml^{-1} .

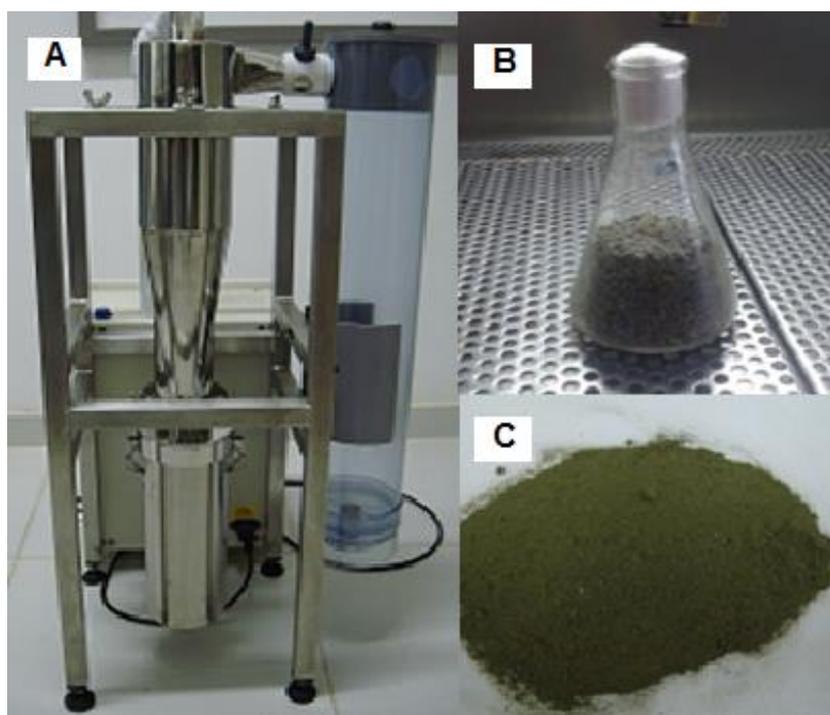


Figura 3: A- Máquina separadora de esporos, B- Fungo entomopatogênico. *M. anisopliae* cultivado em arroz, C- Esporo seco de *M. anisopliae*.

4.3 - Preparo do pano preto e confecção da armadilha PET

Panos pretos de algodão (100%) no tamanho de (16 x 7 cm) foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121° C) e imersos em uma suspensão de 200 ml da formulação do fungo *M. anisopliae* com 0,05% de Tween 80 (TW) (Figura 4A). A concentração final do fungo foi de 1×10^8 conídios mL^{-1} . Todos os controles foram realizados da mesma forma, porém o pano preto foi impregnando apenas com TW. O pano preto impregnado com suspensão do fungo foi mantido em varal de chão para secagem por 16 horas em uma sala do insetário LEF/UENF com temperatura média de 26 °C, $71 \pm 7\%$ (Figura 4B). O pano preto foi pendurado com auxílio de um arame na parte superior da armadilha feita de garrafa PET de 2 litros, transparente, com um corte lateral de (17 x 8 cm). Para maior estabilidade da armadilha, foi adicionado gesso no fundo da garrafa PET (Figura 4 C).

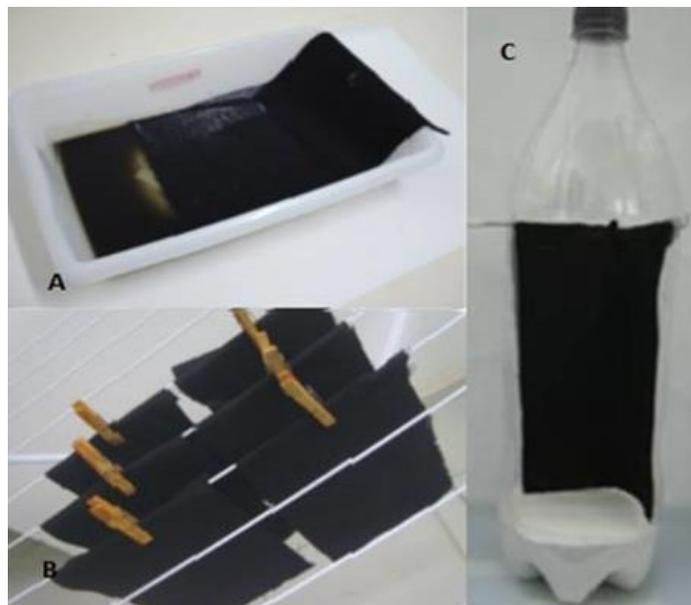


Figura 4: **A-** Pano preto banhado na formulação do fungo *M. anisopliae*, **B-** Panos pretos secando em varal de chão, **C-** Armadilha de garrafa PET de 2L com pano preto impregnado com fungo.

4.4 – Ensaio de sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à armadilha confeccionada de garrafa PET com pano preto impregnado com *Metarhizium anisopliae*

4.4.1 - Testes realizados na câmara de observação

A câmara de observação (100 x 51 x 61 cm) utilizada nos experimentos (Figura 5) possui o fundo e as laterais feitos de madeira branca (compensado) e a parte superior e a frontal feita de acrílico transparente. A câmara possui uma porta (25 x 20 cm).

Duas câmaras de observação foram utilizadas nesse teste. As câmaras foram colocadas dentro de uma sala de 6m² com paredes de alvenaria pintada na cor branca. A sala possui uma janela (120 x 40 cm) e uma porta. Os experimentos foram realizados em temperatura e luminosidade ambiente. As câmaras foram desinfetadas com álcool (70%) e permaneceram abertas por 24h. Dentro de uma câmara de observação foi colocado uma armadilha PET com pano preto + fungo *M. anisopliae*. Na outra foi colocado a garrafa PET com pano preto + TW (controle). Dois alimentadores de 30ml contendo sacarose (10%) foram colocados e 50 fêmeas de *A. aegypti* foram liberadas em cada câmara. Os mosquitos foram adormecidos com CO₂ e selecionadas somente as fêmeas para serem utilizadas nos experimentos. Foi avaliado diariamente durante 7 dias, o número de mosquitos vivos expostos às armadilhas com PET + Pano preto + fungo e PET + pano preto + TW. Foram realizadas 3 repetições desse experimento.



Figura 5: Câmara de observação utilizada nos experimentos.

4.4.2 – Testes realizados nas salas de semicampo

Para realização dos experimentos foram utilizadas salas de semicampo simulando cômodos residenciais. As salas foram construídas em uma área do campus da UENF uma ao lado da outra. O teto das salas foi feito de telha Eternit e forrado com gesso. A porta de cada sala possui tela fina para evitar a fuga dos mosquitos. Nenhuma sala possui janela, no entanto, existe um exaustor em seu interior para circulação do ar. O exaustor foi coberto com organza branca e preso com fita adesiva para impedir que os mosquitos escapassem. Um toldo de policarbonato foi instalado na parte externa das salas protegendo-as da chuva. Foram colocadas no interior das salas mesas e cadeiras simulando móveis residenciais. As salas foram lavadas com água de torneira, detergente neutro, água sanitária, antibactericida, enxaguadas com água, esterilizadas com álcool (70%) e mantidas abertas para secagem por 24h. A temperatura e umidade das salas foram registradas por um aparelho denominado Datalogger (ESCORT RH iLog) variando entre 25,1° C a 28,2° C. As salas experimentais foram utilizadas em todos os experimentos realizados no semicampo, sendo sorteadas para

montagem dos tratamentos a fim de aumentar a fidedignidade dos resultados por causa de possíveis variáveis entre salas.

Foram utilizadas duas salas nos primeiros testes simulando um cômodo residencial (Figura 6). Em uma sala foram colocadas três garrafas PET com pano preto + fungo e na outra sala três garrafas PET com pano preto + TW (controle). As armadilhas foram colocadas no chão embaixo de mesas e cadeiras. Dentro de cada sala foram colocados três alimentadores (30ml) contendo sacarose (10%). Cinquenta mosquitos (fêmeas) foram liberados e em seguida as salas foram totalmente vedadas. Os mosquitos utilizados nos experimentos foram adormecidos com CO₂ para serem manipulados e transferidos às salas de semicampo. Cinco dias após a liberação das fêmeas de *A. aegypti* expostas aos tratamentos, uma armadilha para a captura de mosquitos vivos (BG-Sentinel™; Biogents Ltd.) com um atraente (BG Lure™; Biogents Ltd.) foi instalada por 24 horas em cada sala, atraindo e prendendo os mosquitos em um saco coletor. Em seguida, o número de mosquitos capturados foi quantificado. Uma inspeção minuciosa foi feita em cada sala à procura de mosquitos vivos não capturados. Foram utilizados 50 insetos em cada repetição e 3 repetições feitas, totalizando 150 mosquitos/tratamento.



Figura 6: Salas de semicampo utilizadas nos testes.

4.5 - Avaliação de um filme adesivo revestindo o pano preto para a captura de mosquitos

4.5.1 - Testes realizados na câmara de observação

Nesse ensaio foi avaliado se um filme adesivo revestindo um pano preto medindo (16 x 7 cm) capturaria maior quantidade de mosquitos comparado com a quantidade de mosquitos presos em um filme adesivo sem o pano preto. O filme adesivo foi cedido pelo Prof. Dr. Tariq Butt (Universidade de Swansea – País de Gales). Este teste foi realizado em duas câmaras de observação. Na primeira câmara foi colocada uma armadilha PET com filme adesivo envolvendo o pano preto e na outra câmara, uma armadilha PET com filme adesivo sem o pano preto. O filme é adesivo dos dois lados. Dois alimentadores (30 ml) contendo sacarose (10%) foram colocados nas câmaras. Os mosquitos foram adormecidos com CO₂ e somente fêmeas foram selecionadas e 50 insetos colocados em placa de Petri para em seguida serem liberadas em cada câmara de observação. Dois tratamentos foram avaliados: a quantidade de fêmeas presas no filme adesivo que reveste o pano preto foi quantificada em 24 horas. No segundo teste, a quantidade de fêmeas presas no filme adesivo que reveste o pano preto foi quantificada em 48 horas. Três repetições de cada tratamento foram feitas, totalizando 150 mosquitos/tratamento.

4.5.2 - Teste utilizando salas de semicampo

Após verificações realizadas nas câmaras de observação, o experimento foi avaliado em duas salas de semicampo contendo mesas e cadeiras simulando cômodos residenciais. As salas experimentais foram lavadas, desinfetadas com álcool 70% e sorteadas ao acaso para montagem dos experimentos, sendo todos os procedimentos realizados de acordo com o item 4.4.2. Também foram verificadas a temperatura e umidade através do Datalogger (ESCORT RH iLog). Em uma sala de semicampo foi colocada uma armadilha PET com filme adesivo revestindo o pano preto (Figura 7A). Em uma outra sala foi colocada uma armadilha PET com o filme adesivo sem o pano preto (Figura 7B). Cinquenta fêmeas foram liberadas em cada sala. Três alimentadores de vidro (30 ml)

contendo sacarose em 10% foram expostos para as fêmeas. Foi adicionado talco em placas de Petri abertas para colocação dos alimentadores contendo sacarose (10%) para evitar o acesso de formigas. Primeiro o ensaio foi avaliado 24h após liberação das fêmeas nas salas experimentais. Em seguida, foi preparado novo teste que foi avaliado 48h após liberação das fêmeas. Três repetições de cada tratamento foram realizadas, totalizando 150 mosquitos/tratamento.

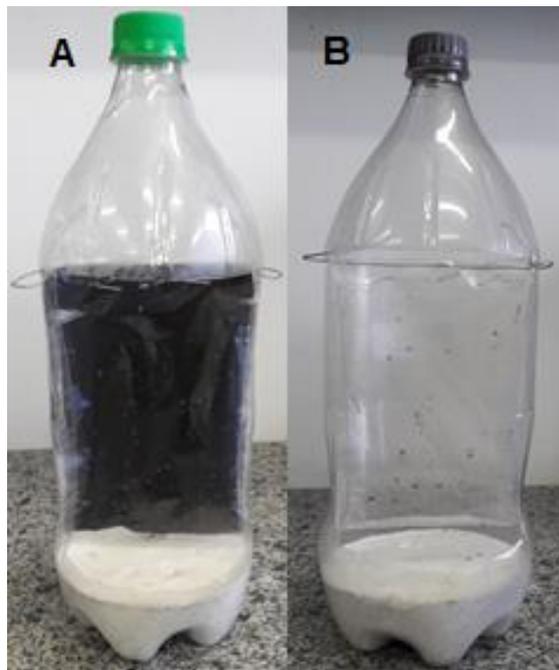


Figura 7: A- Armadilha PET com pano preto envolvido por um filme adesivo, B- Somente com o filme adesivo pendurado no arame.

4.6 - Comparação da sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas a diferentes procedimentos: pano preto + *Metarhizium anisopliae* fixado em móveis residenciais e à armadilha PET com pano preto + *Metarhizium anisopliae*

Esse ensaio foi conduzido comparando a taxa de sobrevivência das fêmeas expostas ao pano preto + *M. anisopliae* fixado em mesas e cadeiras com a taxa de sobrevivência de fêmeas expostas às armadilhas PET com pano preto +

M. anisopliae utilizando quatro salas de semicampo. As salas foram lavadas, preparadas e sorteadas para montagem dos experimentos. Em uma sala foram colocados três panos pretos + fungo fixados com fita adesiva da marca Scotch 3M embaixo de cadeiras e mesas. Na outra sala três panos pretos + TW fixados com fita adesiva (Figura 8A) (tratamento controle). Em uma outra sala foram colocadas três PET com pano preto + fungo no chão embaixo de mesas e cadeiras. Na última sala, três PET com pano preto + TW (tratamento controle) foram colocadas (Figura 8 B).

Cinquenta fêmeas de *A. aegypti* foram adormecidas com CO₂ e liberadas nas salas experimentais. A limpeza e a organização das salas seguiram a mesma metodologia dos tratamentos acima. Três alimentadores artificiais contendo sacarose (10%) foram colocados em cada sala e após a liberação das fêmeas as respectivas portas foram fechadas e lacradas com fita adesiva Silver Tape 3M. No quinto dia do experimento foi instalada no interior de cada sala uma armadilha para capturar os mosquitos vivos (BG-Sentinel), para quantificar o número de mosquitos vivos. Foram realizadas três repetições, somando um total de 150 mosquitos utilizados em cada tratamento.



Figura 8: **A** - Sala de semicampo com pano preto impregnado com fungo fixado em móveis, **B** - Sala de semicampo com armadilha PET com pano preto impregnado com fungo.

4.7 – Comparação das armadilhas feitas com garrafa PET com filme adesivo + pano preto + atraente sintético e com filme adesivo + pano preto sem o atraente para captura de mosquitos

Esse ensaio foi feito para quantificar o número de fêmeas presas no filme adesivo que reveste um pano preto associado ao atraente sintético medindo 1cm (Figura 9C) cedido pelo Prof. Dr. Tariq Butt (Universidade de Swansea – País de Gales). Foram utilizadas neste ensaio quatro salas de semicampo. As salas, bem como a manipulação destas foram as mesmas já citadas para montagem dos experimentos anteriores. Em uma sala foi colocada uma garrafa PET com filme adesivo revestindo o pano preto + atraente sintético. Em uma outra sala foi colocada uma PET com filme adesivo + pano preto. Na terceira sala foi colocada uma PET com filme adesivo + atraente e na última, uma PET + filme adesivo. O atraente foi fixado na base inferior do filme adesivo como mostra a Figura 9A e B. As armadilhas PET foram colocadas no chão embaixo de mesas e cadeiras. Os mosquitos foram adormecidos de acordo com a metodologia já mencionada e liberados (50 fêmeas de *A. aegypti* / sala). Após 24h a armadilha BG-Sentinel foi colocada para captura dos mosquitos vivos. Também foram feitos testes deixando os mosquitos expostos por 48h aos tratamentos para posterior captura com BG-Sentinel™ e contabilização dos mosquitos. Três repetições de cada tratamento foram feitas. Totalizando 150 mosquitos utilizados nos tratamentos.

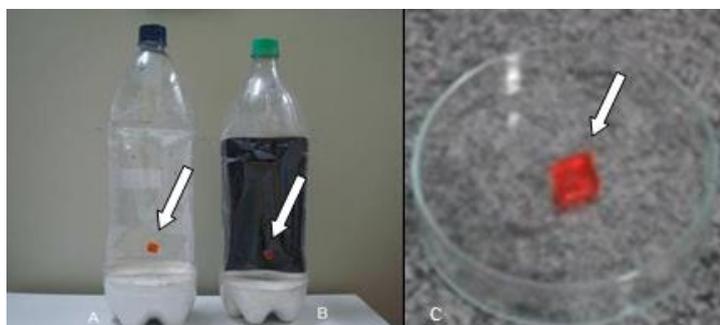


Figura 9: **A** - Armadilha PET com filme adesivo pendurado no arame associado a um atraente sintético, **B** - Armadilha PET com pano preto revestido com filme adesivo associado a um atraente sintético, **C**- Atraente sintético. Setas brancas indicando o atraente.

4.8 – Comparação da sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* a pano preto impregnado com *Metarhizium anisopliae* associado a um atraente sintético e pano preto com *Metarhizium anisopliae* sem o atraente sintético

Utilizando quatro salas de semicampo foi observado se o pano preto impregnado com *M. anisopliae* associado a um atraente sintético reduziria significativamente a taxa de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti* comparado com testes feitos com pano preto e *M. anisopliae* sem o atraente sintético. As salas de semicampo utilizadas foram as mesmas descritas nos testes anteriores, assim como o preparo das salas e a manipulação dos mosquitos. Os panos pretos foram impregnados com a suspensão de *M. anisopliae* e após a secagem (16h) foram pendurados na parte superior da armadilha PET com auxílio de um arame. A base do pano foi dobrada e presa com grampos formando uma bolsa para colocação do atraente (Figura 10). Em seguida, as armadilhas PET foram colocadas nas salas simulando cômodos residenciais. Em cada repetição as salas foram sorteadas aleatoriamente para a montagem dos tratamentos. Em uma sala de semicampo foi colocada uma armadilha PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* associado a um atraente sintético. Em outra sala foi colocada uma PET com pano preto e *M. anisopliae* sem o atraente. Na próxima sala, uma armadilha PET com pano preto e atraente e por fim uma PET com pano preto mais TW (controle). Foram feitas 3 repetições deste experimento com 50 fêmeas em cada sala, totalizando 150 fêmeas por tratamento. Os mosquitos foram alimentados com sacarose 10% e após cinco dias, foram recolhidos através da armadilha BG-Sentinel e os insetos vivos foram quantificados.

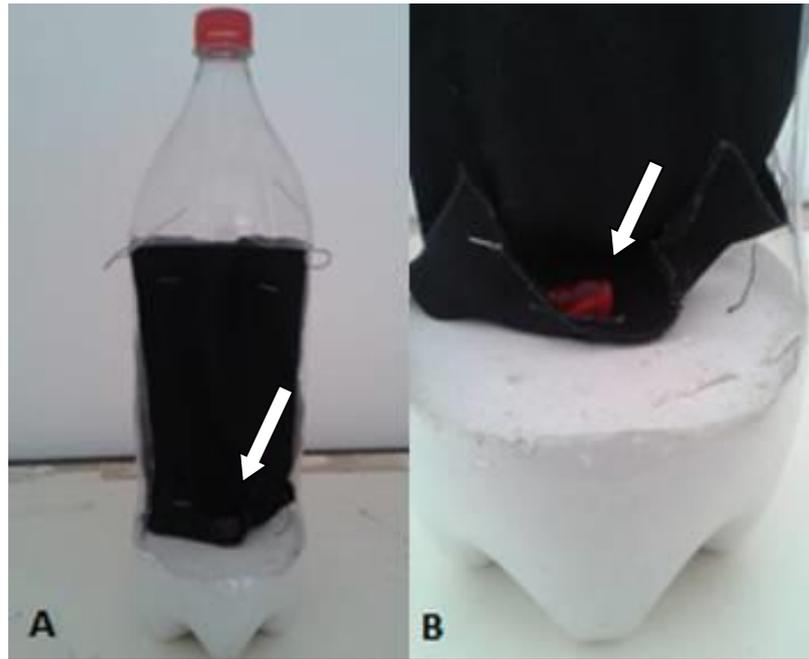


Figura 10: **A** - Armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* com atraente sintético (na base do pano), **B** - Dobra do pano preto (bolsa) para colocação do atraente. Setas brancas indicando o atraente.

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tres repetições foram realizadas em todos os testes. A confirmação da homogeneidade dos testes foi feita usando o teste de Log-Rank (Elandt-Johnson et al, 1980) em nível de 95% de significância. Os resultados foram agrupados para análise da curva de sobrevivência, média de sobrevivência e desvio padrão. O tempo médio de sobrevivência (S_{50}) foi calculado pelo método de Kaplan-Meier (Blanford et al., 2005). As porcentagens de sobrevivência foram calculadas utilizando o Excel. As comparações das médias de sobrevivência dos mosquitos foram calculadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan.

6 – RESULTADOS

6.1 - Efeito de uma armadilha confeccionada de garrafa PET com pano preto impregnado com *Metarhizium anisopliae* sobre a sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti*

6.1.1 Resultados dos testes feitos utilizando câmara de observação

Nesse teste foi avaliada a eficiência da armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* para a redução da sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti*. Os ensaios foram realizados em duas câmaras de observação onde foram avaliadas diariamente as taxas de sobrevivência. A Figura 11 mostra que a taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos a PET com pano preto e *M. anisopliae* no sétimo dia da avaliação foi $14,4\% \pm 8,35$, significativamente diferente quando comparado com a porcentagem de sobrevivência de fêmeas expostas a PET com pano preto + TW (controle) $77,7\% \pm 2,19$ ($F_{1,5} = 649,80$; $P < 0,01$). O tempo médio de sobrevivência (S50) do tratamento realizado com fungo foi de 4 dias.

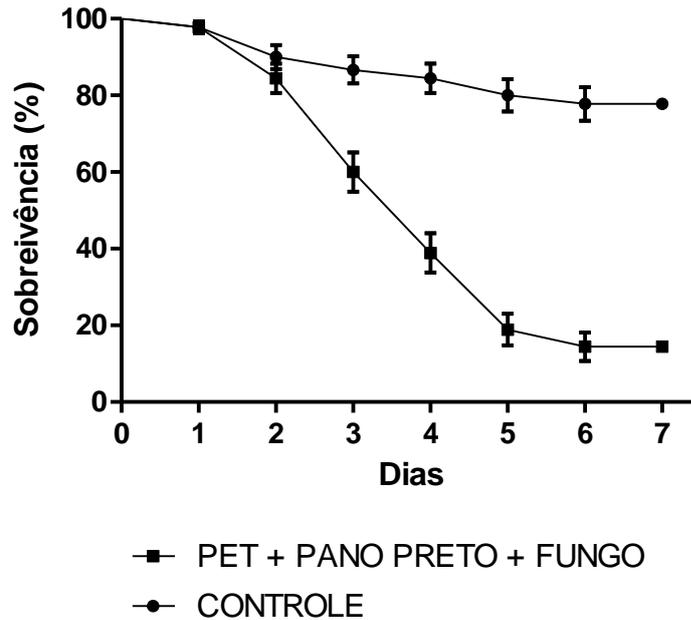


Figura 11: Sobrevivência diária de fêmeas de *A. aegypti* expostas a uma armadilha PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* utilizando uma câmara de observação.

6.1.2 - Experimentos realizados nas salas simulando condições de campo

Estes testes foram feitos em duas salas simulando cômodos residenciais avaliando se as fêmeas de *A. aegypti* expostas a três armadilhas PET com pano preto + *M. anisopliae* apresentariam menor taxa de sobrevivência quando comparadas com a sobrevivência (%) de fêmeas expostas a três armadilhas PET com pano preto + TW (controle). As fêmeas expostas a três PET com pano preto + *M. anisopliae* apresentaram valor de taxa de sobrevivência $22,6\% \pm 2,08$ significativamente menor comparado com a porcentagem de sobrevivência dos mosquitos no tratamento controle $81,3\% \pm 1,52$ ($F_{1,5} = 336,20$ $P < 0,01$).

6.2 – Avaliação de um filme adesivo que reveste um pano preto na captura de mosquitos

6.2.1 - Testes realizados na câmara de observação

Este ensaio foi realizado utilizando duas câmaras de observação. Os mosquitos foram expostos a uma armadilha feita de garrafa PET com filme adesivo revestindo o pano preto. O número de mosquitos presos no filme adesivo foi quantificado em dois períodos, 24h e 48h.

Os mosquitos expostos por 24h a PET com filme adesivo + pano preto apresentaram maior taxa de mosquitos presos 38,6% ($\pm 4,16$) comparado com os ensaios controle PET com somente filme adesivo 6% (± 1) ($F_{1,5} = 43,65$ $P < 0,01$).

Os ensaios realizados com mosquitos expostos por 48h à armadilha PET com filme adesivo + pano preto apresentaram maior taxa de mosquitos presos 68% ($\pm 4,58$) comparado com os ensaios realizados com PET + filme adesivo 12,6% ($\pm 1,52$) ($F_{1,5} = 98,41$ $P < 0,01$).

A Tabela 1 mostra a porcentagem de mosquitos capturados nos tratamentos realizados.

Tabela 1 - Porcentagem de mosquitos presos no filme adesivo aderido ao pano preto e somente no filme adesivo. Testes realizados utilizando duas câmaras de observação.

Ensaio	Filme adesivo + Pano Preto		Filme adesivo	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Horas pós-início testes				
Mosquitos presos (%)	38,6 \pm 4,16a	68 \pm 4,58b	6 \pm 1	12,6 \pm 1,52

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

6.2.2 - Testes realizados nas salas de semicampo

Nesse ensaio feito utilizando salas simulando cômodos residenciais, os mosquitos foram expostos por 24h e depois por 48h a uma armadilha feita de garrafa PET com filme adesivo + pano preto. O segundo tratamento foi feito utilizando PET somente com filme adesivo. O número de mosquitos presos no filme adesivo foi quantificado.

Os experimentos realizados com mosquitos expostos por 24h à armadilha PET com filme adesivo + pano preto apresentaram uma taxa de mosquitos presos de 22% (± 2) comparado com os ensaios utilizando a armadilha PET com somente filme adesivo 3,33% ($\pm 1,52$) ($F_{1,5} = 41,26$ $P < 0,01$).

Os testes feitos com mosquitos expostos por 48h à armadilha PET com filme adesivo + pano preto apresentaram uma taxa de mosquitos presos 38,6% ($\pm 3,05$) comparado com os ensaios utilizando a armadilha PET com somente filme adesivo que foi 10% (± 1) ($F_{1,5} = 59,64$ $P < 0,01$).

A Tabela 2 mostra a porcentagem de mosquitos capturados pelo filme adesivo que reveste o pano preto pendurado na garrafa PET.

Tabela 2 - Porcentagem de mosquitos presos no filme adesivo que reveste o pano preto pendurado na armadilha PET. Testes realizados nas salas de semicampo.

Ensaio	Filme adesivo + Pano Preto		Filme adesivo	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Horas pós-início testes				
Mosquitos presos (%)	22 \pm 2	38,6 \pm 3,05	3,33 \pm 1,52	10 \pm 1

6.3 - Sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas a pano preto + *Metarhizium anisopliae* fixado em móveis residenciais comparada com armadilhas PET contendo um pano preto + *Metarhizium anisopliae*

Esse teste foi feito em salas simulando cômodos residenciais comparando a taxa de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti* expostas a três panos pretos + *M. anisopliae* fixado em mesas e cadeiras com a porcentagem de sobrevivência de fêmeas expostas a três armadilhas PET com pano preto + *M. anisopliae*.

Os mosquitos expostos aos três panos + fungo fixados em móveis residenciais apresentaram taxa de sobrevivência de 26,6% ($\pm 1,52$), valor estatisticamente igual à porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos a três armadilhas PET com pano + fungo (24% $\pm 1,23$; $P > 0,01$). Os tratamentos controle tiveram a taxa de sobrevivência acima de 70%.

A Tabela 3 mostra que os resultados dos testes utilizando *M. anisopliae* foram significativamente diferentes dos resultados dos ensaios controle ($F_{3,11} = 329,02$ $P < 0,01$).

Tabela 3 - Comparação das taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas a três panos + fungo (P+F) fixados em móveis residenciais com fêmeas expostas a três armadilhas PET com pano preto + fungo (PET+P+F). No controle foi utilizado pano preto + Tween (TW).

Tratamento	P+F	P+TW	PET+P+F	PET+P+TW
% Sobrev.	26,6% a	80% b	24% a	77,3% b
Desvio Padrão	1,52	1,73	1,23	1,52

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

6.4 - Comparação de captura de mosquitos usando armadilhas PET com pano preto envolvido por filme adesivo + atraente sintético e filme adesivo + pano preto sem o atraente

Neste teste foi verificado se o filme adesivo revestindo um pano preto associado a um atraente sintético teria maior número de mosquitos presos comparado com testes feitos com (1) filme adesivo + pano preto, (2) somente filme adesivo + atraente e (3) somente filme adesivo. Os mosquitos foram expostos às armadilhas por 24h e posteriormente por 48h.

Os mosquitos expostos ao filme adesivo + pano preto + atraente por 24h de exposição apresentaram significativamente maior número de insetos presos (31,3%) comparado com os outros ensaios: filme adesivo + pano preto (17,3%), filme adesivo + atraente (10,6%) e somente filme adesivo (3,33%) ($F_{3,11} = 22,00$; $P < 0,01$).

Os mosquitos expostos ao filme adesivo + pano preto + atraente por 48h apresentaram significativamente maior número de insetos presos (66,6%) comparado com os outros ensaios: filme adesivo + pano preto (36%), filme adesivo + atraente (22,6%) e somente filme adesivo (6,66%) ($F_{3,11} = 69,38$; $P < 0,01$).

A Tabela 4 mostra a porcentagem de mosquitos presos nos tratamentos utilizando filme adesivo + pano preto + atraente e controles.

Tabela 4 - Porcentagem de fêmeas de *A. aegypti* presas no filme adesivo revestindo o pano preto associado a um atraente sintético.

% Mosquitos presos / Tratamentos	24 h pós-liberação dos mosquitos	48 h pós-liberação dos mosquitos
Filme adesivo + pano preto + atraente	31,3 ± 3,05a	66,6 ± 1,52a
Filme adesivo + pano preto	17,3 ± 1,57b	36 ± 3,60b
Filme adesivo + Atraente	10,6 ± 2,51bc	22,6 ± 3,21c
Filme adesivo	3,33 ± 1,54c	6,66 ± 1,52d

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

6.5 - Sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas a um pano preto impregnado com *Metarhizium anisopliae* associado a um atraente sintético comparada com pano preto e *Metarhizium anisopliae* sem o atraente sintético

Este experimento utilizando quatro salas de semicampo teve como objetivo investigar se a armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* associado a um atraente sintético reduziria significativamente a sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*, comparado com testes feitos com PET com pano preto + *M. anisopliae* sem o atraente sintético.

A Tabela 5 mostra que os mosquitos expostos a uma armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* + atraente apresentaram significativamente menor taxa de sobrevivência (32,6%) comparada com a sobrevivência dos demais ensaios: insetos expostos a uma armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* (48%), pano preto + atraente (80%) e pano preto + TW (82%) ($F_{3,11} = 64,87$; $P < 0,01$).

Tabela 5 - Taxa de sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* expostos por cinco dias a armadilhas PET com pano preto + fungo associado a um atraente sintético.

Tratamentos	Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão
Pano preto + Fungo + Atraente	32,6 \pm 1,15a
Pano preto + Fungo	48 \pm 3,60b
Pano preto + Atraente	80 \pm 2,08c
Pano preto + TW	82 \pm 2,08c

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

7 - DISCUSSÃO

Os fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para o controle do mosquito adulto *A. aegypti*. Vários estudos têm demonstrado a virulência do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* contra mosquitos vetores de doenças, por exemplo, *A. gambiae* vetor de malária (Scholte et al., 2005) e *Aedes aegypti* vetor de dengue (Paula et al., 2008; Pereira et al., 2009; Paula et al., 2011 a b; Paula et al., 2013 a b; Carolino et al., 2014).

Neste estudo, em primeiro lugar foi avaliada a eficiência de uma armadilha feita de garrafa PET com um pano preto impregnado com fungo entomopatogênico *M. anisopliae* para a infecção de fêmeas de *A. aegypti*. Os resultados realizados nas câmaras de observação e salas de semicampo foram promissores. Utilizando a câmara, foi observado que os mosquitos expostos à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* apresentaram 14% de sobrevivência valor significativamente menor do que a sobrevivência dos mosquitos no tratamento controle (77%). Nos testes feitos em salas simulando cômodos residenciais foi verificado que 22% dos mosquitos sobreviveram quando expostos à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae*, enquanto foram observados 81% de mosquitos vivos no tratamento controle. Várias abordagens e técnicas para redução da sobrevivência do mosquito *A. aegypti* utilizando fungos entomopatogênicos já foram realizadas. Carolino et al. (2014) fixaram panos

pretos impregnados com fungo em móveis residenciais, com auxílio de uma fita adesiva, em uma simulação de um cômodo residencial. Estes experimentos resultaram em significativa redução da sobrevivência dos mosquitos. Entretanto, essa técnica não poderia ser levada para dentro das habitações humanas, visto que a fixação do pano preto causa danos aos móveis residenciais (observação pessoal). Com isso, a nova armadilha feita de PET com pano preto + fungo torna-se uma alternativa interessante para o controle de vetores nas residências.

Várias estratégias para expor os mosquitos a superfícies impregnadas com fungo já foram utilizadas. Panos pretos impregnados com fungo foram utilizados em habitações humanas em um vilarejo da Tanzânia na África para o controle de *A. gambiae* (Scholte et al., 2005). Reservatórios de água impregnados com *M. anisopliae* foram eficazes para redução da população de *A. gambiae* e *A. funestus* (Farenhorst et al., 2008). Mnyone et al. 2012 testaram cinco técnicas diferentes utilizando panos pretos impregnados com fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae* em rede de beiral, painel de pano preto, pano preto no beiral, pano preto inclinado no beiral e panos pretos ao redor da cama de hospedeiros humanos, afirmando que estes entomopatógenos representam uma alternativa viável para o controle do mosquito da malária, *A. gambiae*.

O pano preto em si pode servir como atraente visual para os mosquitos. No presente estudo, para avaliar essa atração, os mosquitos foram expostos a um pano preto revestido por um filme adesivo e subsequentemente foi contabilizado o número de mosquitos capturados. Esses testes foram feitos utilizando câmara de observação e uma simulação de um cômodo residencial. O número de mosquitos presos no filme adesivo foi quantificado depois de 24h e 48h do início dos testes.

No experimento utilizando a câmara de observação, os mosquitos expostos por 24h a PET com filme adesivo + pano preto apresentaram maior taxa de mosquitos presos (38%) comparado com os ensaios controle (6%). E quando os mosquitos foram expostos por 48h a PET com filme adesivo + pano preto, tinham 68% de mosquitos presos, valor significativamente maior do que o tratamento controle (12%).

Na simulação de um cômodo residencial, os testes realizados com mosquitos expostos por 24h a PET com filme adesivo + pano preto colocado no chão de cada sala apresentaram maior taxa de mosquitos presos (22%) comparado com os ensaios controle (3%). Os testes feitos com mosquitos

expostos por 48h a PET com filme adesivo + pano preto também apresentaram maior taxa de mosquitos presos (38%) comparado com o teste controle (10%). Observa-se que ao expor os insetos por mais tempo ao filme adesivo + pano preto (48 horas) resultou em maior quantidade de mosquitos presos. A utilização do filme adesivo pode ser interessante porque os mosquitos presos morrem reduzindo o incômodo da picada, o repasto sanguíneo e, portanto a transmissão do vírus da dengue.

Outros estudos também utilizaram filmes adesivos para capturar mosquitos *A. aegypti*. Pesquisas mostram que a armadilha MosquiTRAP® confeccionada de um material plástico preto composta de um cartão adesivo preto prende os mosquitos (Eiras, 2002; Gama et al., 2007). O uso de um filme adesivo foi importante no atual estudo para confirmar a atração das armadilhas PET e a combinação do pano preto + atraente sintético para aumentar o número de mosquitos pousando nos panos.

Entretanto, a importância da utilização de fungos entomopatogênicos sobressalta-se quando aborda a possibilidade da autodisseminação do patógeno na população do inseto com consequente redução da sobrevivência dos vetores. Em condições de laboratório, a autodisseminação dos conídios de *M. anisopliae* ou *Beauveria bassiana* durante a cópula foi observada de fêmeas para machos de *Anopheles gambiae* (Scholte et al., 2004) e de machos para fêmeas de *A. aegypti* (Garcia-Munguía et al., 2011; Reyes-Villanueva et al., 2011).

Pode-se observar neste estudo que uma baixa quantidade de mosquitos ficou presa no filme adesivo sem o pano preto, indicando que a cor escura serve como atraente visual para os mosquitos. Paula et al. (2013a) verificaram através de observação visual que mosquitos *A. aegypti* foram atraídos para um pano preto, avaliando a frequência de pouso desses mosquitos no pano. Utilizando uma caixa de acrílico, verificaram que nas primeiras 24h as fêmeas de *A. aegypti* ingurgitadas tiveram menores taxas de pouso no pano preto, comparado com fêmeas alimentadas com sacarose. Isto pode ter ocorrido devido à atividade de voo reduzida. Somente (4-5%) dos mosquitos pousaram nos panos pretos durante as horas de escuridão. E também a taxa de pouso dos mosquitos alimentados com sacarose em panos não-tratados e tratados com fungo foi similar. Mas, Paula et al. (2011b) afirmam que 96h pós-alimentação sanguínea, a frequência de pouso de fêmeas ingurgitadas foi significativamente igual à

frequência de pouso das fêmeas alimentadas somente com sacarose. Portanto, independente do estado nutricional as fêmeas de *A. aegypti* foram atraídas para o pano preto. No entanto, a diferença antes de 96h pós-alimentação sanguínea provavelmente foi devido à redução na locomoção. Foi interessante notar que poucos mosquitos foram encontrados pousando nos panos nos horários de fotoperíodo escuro, indicando que há uma vantagem para os mosquitos em permanecer nos panos pretos nas horas de claridade dificultando que o predador encontre a presa.

No presente trabalho foi comparado, utilizando salas simulando cômodo residencial, os resultados das taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas a panos pretos + *M. anisopliae* fixados com fita adesiva em mesas e cadeiras com a porcentagem de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas aos panos pretos + *M. anisopliae* pendurados em uma armadilha suporte feita de garrafa PET afim de testar a viabilidade da PET. Os mosquitos expostos aos três panos + fungo fixados em móveis residenciais apresentaram taxa de sobrevivência estatisticamente igual (26%) à porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos a três armadilhas PET com pano + fungo (24%). A armadilha PET com pano preto + fungo foi eficiente e essa técnica pode ser utilizada no campo dentro de habitações humanas. Esses resultados também mostraram que apenas 3 panos pretos fixados nos móveis resultaram em significativa redução da sobrevivência de *A. aegypti* (26%) diferente do observado por Paula e colaboradores (2013a), na qual tiveram que utilizar 5 panos pretos + fungo fixados em móveis residenciais para resultar em 44% de sobrevivência. Entretanto, fixar o pano preto + fungo utilizando uma fita adesiva não seria viável dentro de habitações humanas já que causa danos nos móveis das residências (observação pessoal) e também pendurar os panos pretos de 3m² no teto das casas como testado por Scholte colaboradores (2005) na África também não seria adequado e provavelmente muitos voluntários rejeitariam essa ideia. Para ser usado no ambiente intradomiciliar o pano deve ser cortado em um tamanho que não incomode o morador. Os panos pretos deste estudo têm o tamanho de (16 x 7cm), o que seria mais viável para utilização em residências.

Embora nosso grupo de pesquisa do laboratório de Entomologia da UENF tenha observado significativa diminuição da sobrevivência de *A. aegypti* expostos a panos pretos impregnados com *M. anisopliae*, ainda restam mosquitos vivos

nos experimentos. De acordo com Paula et al. (2008), o experimento realizado em gaiolas grandes (115 x 60 x 75cm) mostrou que após 7 dias (período de avaliação do experimento) os mosquitos expostos a um pano preto de 30 x 20 cm tratado com *M. anisopliae* (isolado LPP133) resultou em 30% de mosquitos vivos. Paula et al. (2013a) impregnaram cinco panos pretos com *M. anisopliae* (ESALQ 818) e fixaram com fita adesiva em móveis residenciais na sala de semicampo (6m²) registrando no sétimo dia da avaliação do experimento 44% de mosquitos vivos. Carolino et al. (2014) verificaram que a combinação do *M. anisopliae* com 50% de óleo vegetal e 50% de óleo isoparafina reduziu significativamente a sobrevivência das fêmeas alimentadas com sacarose resultando em 32,6% de sobrevivência, enquanto os testes feitos com *M. anisopliae* + óleo vegetal ou somente com *M. anisopliae* resultaram em 36,6% e 38% de mosquitos vivos respectivamente.

O presente trabalho visou diminuir ainda mais a sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti*. Para isso foi utilizado um atraente sintético de mosquitos cedido pelo Prof. Dr. Tariq Butt da Universidade de Swansea (País de Gales) associado ao pano preto envolvido com o filme adesivo e também pano preto impregnado com o fungo entomopatogênico.

Foi observado que os mosquitos expostos ao filme adesivo + pano preto + atraente por 24h apresentaram significativamente maior número de insetos presos (31%) comparado com os outros tratamentos: filme adesivo + pano preto (17%), filme adesivo + atraente (10%) e somente filme adesivo (3%). Os mosquitos expostos ao filme adesivo + pano preto + atraente por 48h tiveram significativamente maior número de insetos presos (66%) comparado com os outros ensaios: filme adesivo + pano preto (36%), filme adesivo + atraente (22%) e filme adesivo (6%). Outros estudos mostraram que mosquitos respondem a estímulos por atraentes sintéticos. As armadilhas MosquiTRAP[®] possuem um atraente de oviposição sintético que libera um odor atraindo as fêmeas grávidas para dentro da armadilha onde ficam presas em um cartão adesivo colocado na parede da armadilha (Eiras, 2002; Gama et al., 2007). A utilização de atraentes de mosquito em condição de campo é importante para direcionar o mosquito ao pano preto + fungo associado ao atraente sintético.

O presente estudo feito em uma simulação de um cômodo residencial mostrou que os mosquitos expostos a uma armadilha PET com pano preto + *M.*

anisopliae + atraente sintético apresentaram significativamente menor taxa de sobrevivência (32%) comparada com a sobrevivência dos demais tratamentos: insetos expostos a uma PET com pano preto + *M. anisopliae* (48%), pano preto + atraente (80%) e pano preto + TW (82%). Importante ressaltar que enquanto Paula e colaboradores (2013a) e Carolino e colaboradores (2014) necessitaram utilizar 5 panos pretos impregnados com somente o isolado ESALQ colocados em salas simulando cômodos residenciais para apresentarem 44% e 38% de mosquitos vivos respectivamente, o atual estudo utilizou apenas uma armadilha PET com pano preto + fungo + atraente sintético, o que resultou em 32% de mosquitos vivos. Cabe ressaltar que a maioria dos estudos do nosso grupo de Pesquisa de Entomologia da UENF é realizada com o isolado ESALQ 818 por ser fácil o cultivo em condições de laboratório, mas outros isolados podem ser testados usando a mesma armadilha.

Paula e colaboradores (2008) utilizando apenas um pano preto + fungo observaram 30% de mosquitos vivos em condições de semicampo, entretanto o isolado de *M. anisopliae* utilizado por esse grupo foi o LPP133 altamente virulento contra fêmeas de *A. aegypti*, entretanto de difícil cultivo em laboratório.

De acordo com Cooper e colaboradores (2004), os insetos utilizam os estímulos produzidos pela pele do hospedeiro, como o dióxido de carbono (CO₂), para se direcionar até a fonte de alimentação sanguínea. Ácido láctico e amônia também têm sido confirmados como atraentes para as fêmeas de mosquitos (Braks et al., 2001). Além dos compostos voláteis que são produzidos e emanados pelo hospedeiro, outros estímulos são importantes para atração de mosquitos. Fêmeas conseguem detectar o calor e a umidade que somados aos estímulos anteriores, fazem com que elas encontrem o hospedeiro específico (Cooper et al., 2004). Esses atrativos formam plumas de odores que se dispersam no ambiente. Os mosquitos detectam e respondem a mudanças na frequência e na concentração do odor aproximando-se da fonte de alimentação (Qiu et al., 2004). Eiras & Jepson (1991) encontraram evidências de que fêmeas de *A. aegypti* foram excitadas a voar quando CO₂ combinado com ácido láctico foi liberado em um túnel de vento. Esses autores também demonstraram que altas concentrações de CO₂ associadas a baixas concentrações de ácido láctico levaram a resposta de pouso das fêmeas da mesma espécie sobre a fonte atrativa. O mesmo não ocorre com *A. gambiae*, o qual apesar de ter respondido a

estímulos voláteis do suor humano, não respondeu da mesma maneira que *A. aegypti* para o ácido láctico em condições de olfatômetro (Braks et al.,2001).

Lwetoijera et al., 2010 mostraram em seus estudos a eficiência de uma armadilha feita com caixa de madeira contendo panos pretos impregnados *M. anisopliae* associados a atraente (CO₂ orgânico), feito a partir de uma mistura de fermento e açúcar, podendo atrair e infectar o vetor da malária, *A. arabiensis*. A armadilha BG- Sentinel™ utiliza um atraente químico baseado em ácido láctico, imitando odores da pele humana, com o objetivo de atrair as fêmeas do mosquito. O inseto entra em um funil de tecido telado e fica preso em um saco coletor sem chances de retornar ao ambiente (Ball et al., 2010). Andrade et al. (2008) avaliaram o efeito de cairomônios (odores sintéticos de hospedeiros) BG Mesh Lure® em armadilha luminosa em campo, aumentando o potencial das armadilhas na captura de espécies de flebotomíneos, do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) quando comparado à armadilha somente à luz.

A armadilha PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* + atraente sintético reduziu a sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* mais eficientemente do que armadilhas iguais sem o atraente. No campo essa armadilha poderá ser colocada no chão dentro das habitações humanas embaixo de móveis residenciais sem incomodar o morador. A associação do atraente no pano preto + fungo provavelmente possibilitará que essa armadilha seja melhor utilizada fora das residências, em varandas abertas, quintais ou no meio de vegetações locais onde os mosquitos têm o hábito de se esconder. O atraente provavelmente direcionará o mosquito para o pano preto + fungo infectando-os e evitando que os mosquitos entrem nas residências. Armadilha PET com pano preto + fungo + atraente sintético demonstrou nos experimentos, ser interessante para o controle do mosquito *A. aegypti*. Portanto, é necessário priorizar programas de educação, esclarecendo a população do benefício do controle biológico, garantindo a aceitação de novas estratégias para controle de vetores.

8 – CONCLUSÕES

A armadilha confeccionada de garrafa PET com pano preto + *M. anisopliae* reduziu significativamente a sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti*.

O filme adesivo + pano preto prendeu maior quantidade de mosquitos comparado com testes utilizando somente o filme adesivo, demonstrando a atração dos mosquitos ao pano.

A sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas ao pano preto + *M. anisopliae* fixado em móveis residenciais foi igual à sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae*.

A armadilha PET com filme adesivo + pano preto + atraente sintético resultou em maior número de mosquitos capturados comparado com ensaios feitos com filme adesivo + pano preto sem o atraente.

O pano preto + *M. anisopliae* + atraente sintético reduziu significativamente a fêmeas de *A. aegypti*, comparando com testes feitos com pano preto + *M. anisopliae*, demonstrando o potencial da nova armadilha para o controle biológico do vetor de dengue.

9 – REFERÊNCIAS

Alves, S. B. (1998) Controle Microbiano de Insetos. 2 ed. Piracicaba. 1163p

Andrade, A. J., Andrade, M.R., Dias, E.S., Pinto, M.C., Eiras, A.E. (2008) Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. vol.103, n.4, pp. 337-343. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000400004>.

Areia P.A.V.,Paula A.R., Cypriano M.B.C., Samuels R.I. (2013) Comparação de armadilhas ovitrampas e monitoramento do mosquito *Aedes aegypti* em Campos dos Goytacazes – RJ. Encontro Latino Americano de Iniciação Científica- INIC

Ball, T. S., Ritchie, S. R. (2010) Evaluation of BG-sentinel trap trapping efficacy for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in a visually competitive environment. *Journal of Medical Entomology*. 47(4): 657-63.

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.

Bates, M. (1949). The natural history of mosquitoes. The Macmillan Company, NY, 379

Becker, N. (2010) Mosquitoes and their control. 2.ed. New Yourk: Springer-Verlag.

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.

Becker, N. (2000) Bacterial control of vector mosquitoes and black flies. *In*: Charles J.F., Delécluse A., Leroux C.N., Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.45: 383-398.

Becnel, J.J., White, S.E., Moser, B.A., Fukuda, T., Rotstein, M.J., Undeen, A.H., Cockburn, A. (2001) Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* e *C. quinquefasciatus*. Journal of General Virology. 82,275-282.

Bisset, J. A. (2002) Correct use of insecticides: management of resistance. Revista Cubana Medicina Tropical, Habana. 54: 202-219.

Blanford, S., Chan, B. H. K., Jenkins, N. Sim, D. Turner, 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.; Silva, H.H.G.; Martins, F.(2004) Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do Diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti*. Revista de Patologia Tropical. 33: 91-104.

Borges S.M. A. A. (2001). [Importância epidemiológica do *Aedes Albopictus* nas Américas \(PDF\)](#)

Braks, M.A.H., Meijerink, J., Takken, W. (2001) The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and L-lactic acid, in an olfactometer. *Physiological Entomology*. 26:142-148.

Braga, I. A., Valle, D.(2007) *Aedes aegypti*: histórico de controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Rio de Janeiro. 16:113-118.

Braga, I.A., Mello, C.B., Peixoto, A.A., Valle, D. (2005a) Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Díptera:Culicidae) development in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, R.J. 100:435-440.

Braga, I.A., Gomes, A.C., Nelson, M.M., Mello, R.C.G., Bergamaschi, D.P., Souza, J.M.P. (2000) Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor populations of *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33 (4): 347-353.

Bukhari, T., Middelman, A., Koenraadt, C. J. M., Takken, W. Knols, B. G. L. (2010) Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal*. 9 (22) 2-15.

Carolino, A.T., Paula, A.R., Silva, C.P., Butt, T.M., Samuels, R.I (2014). Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated Field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Díptera : Culicidae). *Parasitas & Vetores*, 7:198.

Chavasse, D. C.; Yap, H. H. (1997) Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization. WHO/CTD/WHOPES/97.2.

Christophers, S.R. (1960) *Aedes aegypti* (L.). The yellow fever mosquito - its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, London, 739 pp.

Chui, V.W.D., Wong, K.W., Tsoi, K.W. (1995) Control of mosquito larva (Diptera: Culicidae) using Bti and teflubenzuron: laboratory evaluation and semi-field test. *Environ Int* 21:433-40.

Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., Lindegren. (1968) Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to tree genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*.11: 1-7.

Clements, A. N. (2000) *The biology of Mosquitoes, Development, Nutrition and Reproduction*. London: CABI Publishing.

Clements, A. N. (1963) *The physiology of mosquitoes*. International series of monographs on pure and applied biology. The Macmillan Company–NY. 393p.

Consoli, R. A.G. B. (1982). Longevidade dos adultos de *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) quando submetidos a diversas dietas de carboidratos e de sangue (Diptera: Culicidae). *Rev. Brasil. Biol*, 42:303-310.

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

Cooper, R.D.; Frances, S.P.; Popat, S.; Waterson, D.G.E. (2004) The effectiveness of light, 1-octen-3-ol, and carbon dioxide as attractants for anopheline mosquitoes in Madang Province, Papua New Guinea. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20: 239- 242.

Costa, J. R. V., Rossi, J. R., Marucci, S. C., Alves, E. C., Volpe, H. X. L., Ferraudo, A. S., Lemos, M. V. F., Desiderio, J. A. (2010) Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. 39 (5): 757-766.

Cruz, C. R. (2006) Comitê Infectologia Sociedade Paranaense de Pediatria. <http://www.spp.org.br/dengue.asp>. Acessado: 24/05/2014.

Da-Cunha, M. P., Lima, J.B., Brogdon, W.G., Moya, G.E., Valle, D. (2005) Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100: 441-444.

Daoust, R. A., Roberts, D. W. (1982) Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larva. *Journal of Invertebrate Pathology*. 40: 107-117.

Darbro, J.M., Johnson, P.H., Thomas, M.B., Ritchie, S.A., Kay, B.H., Ryan, P.A. (2012) Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-Field conditions *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86: 656-664.

Darbro, J.M., Robert, I.G., Brian, H.K., Peter, A.R., Matthew, B.T. (2011) Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Biocontrol Science and Technology*, 21:9,1027-1047

Debach, P., Rosen, D. (1991) *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Doak, D. F. (1992) Lifetime impacts of herbivory for a perennial plant. *Ecology* 73:2086-2099.

Degener, C. M.; Roque, R. A.; Eiras, A. E.; Ázara, T. M. F.; Rösner, S. ; Codeço, C. T. ; Nobre, A. A. ; Rocha, E. S. O. ; Kroon, E. G. ; Ohly, J. J. ; Geier, M. . Evaluation of the effectiveness of mass trapping with BG-Sentinel traps for dengue vector control: a cluster randomized controlled trial in Manaus, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. v. 51, p. 408-420, 2014.

Donatti J. E., Gomes A.C.(2007) Adultrap: Descrição de armadilha para adulto de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 51(2): 255-256.

Donalísio, M.R. Glasser, C. M. (2002) Vigilância entomológica e controle de vetores da Dengue. *Rev. Bras. Epidemiol.* 5 (3): 259-72.

Dusfour, I., Thalmensy, V., Gaborit, P., Issaly, J., Carinci, R., Girod, R. (2011) Multiple insecticide resistance in *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106: 346–352.

Eiras, A.E. (2002) Armadilha para a captura de insetos. Depósito de patente no Brasil: PI0203907-9. Data 05/09/2002.

Eiras, A.E.; Geier, M. (2002) Composition for attracting blood sucking arthropods. USA. Patente N.º 60/ 386,582.

Eiras, A.E.; Jepson, P.C. (1991) Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bulletin of Entomological Research*, v. 81, p. 151-160.

Eiras, A. E.; Resende, M.C. (2009) Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro.* 1: 45-58.

Elandt-Johnson, R.C., and Johnson, N.L. (1980). *Survival Models and Data Analysis*. Wiley, New York, Chapter 10.

Enserink M. (2008) Entomology. A mosquito goes global. *Science* 320: 864–866.

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(1): 10-13.

Estrada, J.G., Mulla, M.S., (1986) Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc:* 2: 57-60.

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) 1-13.

Farenhorst, M., Farina, D., Scholte, E. J., Takken, W., Hunt, R. H., Coetzen, 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 (6): 910–916.

Faria, M. R., Magalhães, B. P. (2001) O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento*. Brasília. 2: 18-21.

Fávaro, E.A., Mondini, A., Dibo, M.R., Barbosa, A.A.C., Eiras, A.E. (2008) Assessment of entomological indicators of *Aedes aegypti* (L.) from adult and egg collections in São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol*. 33:8-16.

Fávaro, E. A., Dibo, M. R., Mondini, A., Ferreira, A. C., Barbosa, A. A. C., Eiras, A. E., Barata, E.A.M.F. & Chiaravalloti-Neto, F. (2006) Physiological state of *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs® in Mirrasol, São Paulo, Brazil. *J. Vector Ecol*. 31:285-291.

Fay, R.W.&Eliaison, D.A. (1966) A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq. News* 26: 531-535.

Folha de São Paulo (2014). Campinas registra mais de 17 mil casos de dengue em quatro meses. Disponível: <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2014/04/1447022> Acessado: 20/06/2014.

Forattini, O. P.(2002) Culicidologia médica. São Paulo: Edusp. 2, 864 p.

Forattini, O. P.(1962) Entomologia médica. São Paulo: EDUSP, v. 1.

Fraiha, H. (1968) Reinfestação do Brasil pelo *Aedes aegypti*. Considerações sobre o risco de urbanização do vírus da febre amarela silvestre na região reinfestada. Rev Inst Med Trop São Paulo; 10(5): 289-94.

Funasa: Fundação Nacional de Saúde (2001). Dengue – Instrução para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. – 3a ed., rev. Brasília: Ministério da Saúde 84p.

Gama, R. A., Silva, E. M., Silva, I. M., Resende, M. C. & Eiras, A. E. (2007) Evaluation of the sticky MosquiTRAP® for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus)* (Diptera:Culicidae) in the dry season in the district of Itapõa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Neotrop. entomol. 36:294-302.

García-Munguía, A. M., Hernández, J. A. G., Tellez, E. A. R., , Pérez, M. A. R., Filiberto Reyes-Villanueva, F. R. (2011) Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitões. Parasites & Vectors, 4:24. doi:10.1186/1756-3305-4-24

Gérardin, P., Barau, G., Michault A., Bintner, M., Randrianaivo, H., Choker, G., Lenglet, Y., Touret, Y., Bouveret, A., Grivard, P., Roux, K.L., Blanc, S., Schuffenecker, I., Couderc, T., Arenzana-Seisdedos, F., Lecuit, M., Pierre-Yves Robillard, P.Y (2008) Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. PLoS Med 5(3): e 60. doi:10.1371/journal.pmed.0050060

Glare, T.R., O'Callaghan, M. (2000) *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley and Sons. p. 350.

Gould, E.A., Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. [*The Lancet*](#) 371 (9611): 500–9.

Gomes, A. C., Silva, N. N., Bernal, R. T. I. (2008) Estimação da infestação predial por *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) por meio da armadilha Adultrap. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 17: 293-300.

Gomes, A.S., Sciavico, C.J., Eiras, A.E. (2006) Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Rev. Soc. Bras.Med. Trop.*, 39 (4): 327-32.

Gubler, D.J., (1998) [Dengue and dengue hemorrhagic fever](#). *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, 11: 480–496.

Hemingway, J., Ranson, H. (2005) Chemical Control of Vectors and Mechanisms of Resistance. In: Marquardt, W. C. et al (Ed.). *Biology of Disease Vectors*. Fort Collins: Elsevier, cap.41.

Hernández, J.A.G., Pérez, M.A.R., Salazar, M.I., Russell, T.L., Adeleke, M.A., Santillana, E.J.L., Villanueva, F.R. (2013) Vectorial Capacity of *Aedes aegypti* for Dengue Virus type 2 is Reduced with Co-infection of *Metarhizium anisopliae*. *PLoS Negl Trop Dis*7(3): doi:10.1371/journal.pntd.0002013.

Honório, N. A., Silva, W. C., Leite, P. J., Gonçalves, J. M., Lounibos, L. P. & Lourenço-de-Oliveira, R. (2003) Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the urban endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 98:91-8.

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., N'Guessan, R., Koenraadt, C.J.M., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbéto, M., Thomas, M.B., Knols, B.G.J., Takken, W. (2010) The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors*. 3:2-11.

Huang, Y. M. (2004) The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the Afrotropical Region with keys to the species. San Diego: Magnolia.

Jackson, M.A. (1997) Optimizaing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19:180-187.

Jornal da FundeP (2011) Sistema de Monitoramento da dengue nascido na UFMG é aliado no controle da doença.

Koekemoer, L.L., Spillings, B.L., Christian, R.N., LO, T.C., Kaiser, M.L., Norton, R.A., Oliver, S.V., Choi, K.S., Brooke, B.D., Hunt, R.H. (2011) Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from pointe Noire, Republic of the Congo. *Vector Borne Zoonotic*. 11:1193–1200.

Koffi, A.A., Alou, L.P., Adja, M., Kone, M., Chandre, F., N'Guessan, R.(2012) Update on resistance status of *Anopheles gambiae* s.s. to conventional insecticides at a previous WHOPES field site “Yaokoffikro”, 6 years after the political crisis in Cote d' Ivoire. *Parasites & Vectors*. 5:2-7.

Kröckel, U., Rose, A., Eiras, A. E., Geier, M. (2006) New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 229-238.

Labbe, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T., Weill, M (2007) Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol.* 24:1056–1067.

Leles, R. N., Sousa, N. A., Rocha, L. F. N., Santos, A. H., Silva, H. H. G., Luz, C. (2010) Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 107: 1271-1274.

Lenhart, A.E.,Walle, M., Cedillo, H., Kroeger, A. (2005) Building a better ovitrap for detecting *Aedes aegypti* oviposition. *Acta Tropica* 96: 56–59

Lenteren, 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.

Linha Guia de Atenção à Saúde (2009) Belo Horizonte, 1ª edição.

Lima, E.P., Paiva, M. H., DE Araujo, A.P., Silva, E.V., Silva, U.M., Oliveira, L.N., Santana, A.E., Barbosa., C.N., Paiva., Natto, C.C., Goulart, M.O. (2011) Insecticide resistance in *A. aegypti* populations from Ceara Brazil. *Parasites & Vectors*. 4:2-12.

Lima, M. M., Amaral, R. S., Aragão, M. B. (1989) Estudo comparativo da eficácia de armadilhas para *Aedes aegypti*. *Caderno de Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 5: 143 –150.

Liu, Y., Zhang, H., Qiao, C., Lu, X., Cui, F.(2011) Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipens* complex from China. *Parasites & Vectors*. 4, n.236, p.2-7.

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

Luz, C., Tai, M. H. H., Santos, A. H., Rocha, L. F. M., Albernaz, D. A. Z., Silva, H. H. G (2007) Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*. 44 (5) 799-804

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* IP 46 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. 846p.

Maciel-De-Freitas, R., Brocki Neto, R., Gonçalves, J.M., Codeço, C.T., Lourenço-de Oliveira, R. (2006) Movement of dengue vectors between the human modified environment and urban forest in Rio de Janeiro. Journal of Medical Entomology 43: 1112-1120

Marcondes, C.B. (2001) Entomologia médica. Rio de Janeiro, Atheneu, 432 p.

Macoris M. L. G., Andrighetti M. T. M., Takaku L., Classer C. M., Garbeloto V. C., Cirino V. C. (1999) Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública. 33: 521-522.

Marques C. C. A., Marques G. R. A. M. M., Brito M., Neto L. G. S., Ishobashi V. C., Gomes F. A. (1993) Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. Revista de Saúde Pública. 27: 237-41.

Martins F., Silva I. G. (2004) Avaliação da atividade inibidora do Diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, 37: 135-138.

Messias, C. L., (1989) Fungos: sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. Instituto Oswaldo Cruz, 84: 57-59.

Ministério da Saúde (2014) Dados sobre casos de dengue. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/11/ministerio-da-saude-atualiza-dados-sobre-casos-de-dengue>. Acessado em 06/02/2015.

Ministério da Saúde (2011) Informe epidemiológico da dengue. 28p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_janeiro_e_marco_13_04.pdf. Acessado em 01/07/2014

Ministério da Saúde (2005) Avaliação da eficácia de análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina no controle de *Aedes aegypti*.

Mnyone L.L., Lyimo I.N., Lwetoijera D.W., Mpingwa M.W., Nchimbi N., Hancock P.A., Russell T.L., Kirby M.J., Takken W., Koenraadt C.J.M. (2012) Exploiting the behavior of wild malaria vectors to achieve high infection with fungal biocontrol agents. *Malaria Journal* 11:87.

Mnyone L. L., Kirby M. J., Mpingwa M. W., Lwetoijera D. W., Knols B. G. J., Takken W., Koenraadt C. J. M., Russell T. L. (2011) Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol Ver.*108: 317–322.

Mnyone L. L., Kirby M. J., Lwetoijera D. W., Mpingwa M. W., 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: 2-46.

Mnyone L. L., Kirby M. J., Lwetoijera D. W., Mpingwa M. W., Knols B. G. J., Takken W., Russell T. L. (2009) Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*. 8: 309-320.

Montella, I. R., Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B., Braga, I. A., Valle, D. (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77: 467-477.

Morley-Davis J, Moore D, Prior C: (1995) Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycology*. 100: 31-38.

Mulla, M. S. (1995) The future of insect growth regulators in vector control. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v.11, n. 2, p. 269-273.

Nayar, J.K., Sauermann, Jr. D.M. (1973) A comparative study of flight performance and fuel utilization as a function of age in females of Florida mosquitoes. /. Insect. Physiol, 19:1977-1988.

Nayar, J.K., Sauermann, Jr. D.M. (1975). The effects of nutrition on the survival and fecundity in Florida mosquitoes II. Utilization of a blood-meal for survival. /. Med. Entomol, 12: 99-10.

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.

Onofre, S.B., Vargas, L.R.B., Rossato, M., Barros, N.M., Boldo, J.T., Nunes, A.R.F., Azevedo, J.L. (2002) Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: Serafini, L.A., Barros, N.M., Azevedo, J.L. (Org). Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS. 295-328.

Organização Pan-Americana de Saúde: Dados da dengue no Brasil, (2013). Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1. Acessado em: 05/07/2014.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R.I. (2013a) Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *A. aegypti* under natural conditions. Parasites and vectors.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R.I. (2013b) Efficiency of fungus-impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *A. aegypti* (Diptera: Culicidae). Lerrers in Applied Microbiology. 57:1–7.

Paula, A.R., Ribeiro, A.,Morais ,C.O.P.,Dias, R.S.B., Gomes, C.R.P., Samuels, R.I., (2013c). Utilização de grãos de arroz com *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti* em condição de semicampo. Encontro Latino Americano de Iniciação Científica – INIC

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 *A. aegypti* (Diptera : Culicidae). Parasites & vectors. V.4, n.8.

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

Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera. M. P., Samuels, R. I (2008) Susceptibility of adult *A. aegypti* (Díptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. Biocontrol Science and Technology.18:1017-1025.

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

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

Pontes, R.J.S., Ruffino, N.A. (1994) [Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos](#). Rev Saúde Pública, 28: 218-27.

Qiu, Y.T.; Smallegance, R.C.; Hoppe, S.; Vanloon, J.J.A.; Bakker, E.J.; Takken, W. (2004) Behavioural and electrophysiological responses of the malaria mosquito

Anopheles gambiae Giles sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human skin emanations. *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 429-438.

Queyriaux, B., Simon, F., Grandadam, M., Michel, R., Tolou, H., et al. (2008) Clinical burden of chikungunya virus infection. *Lancet Infect Dis* 8: 2–3.

Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., Black, W.C. (2010) Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal*. 1: 1 – 12.

Rawlins, S.C., Martinez, R., Wiltshire, R., Legall, G. (1998) Comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14: 131-136.

Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F. (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol*, 17:377-80.

Reyes-Villanueva, F., Hernandez, J. A. G., Garcia-Munguía, A. M., Tamez-Guerra, P., Howard, A. F. V., Perez, M. A. R.(2011) Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 4:171 doi: 10.1186 /1756-3305-4-171

Ritchie, S. A., Ropley, L. P., Benjamin, S. (2010) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) Provides Residual Control of *Aedes aegypti* in Small Containers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82: 1053-1059.

Roque, R.A., Eiras, A.E. (2008) Calibration and Evaluation of Field Cage for Oviposition Study with *Aedes (Stegomyia) aegypti* Female (Díptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 37:478-485.

Sant 'Ana, A. L., Roque, R. A., Eiras, A. E. (2006) Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes (Stegomyia)* (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol*. 43: 214-220.

Santos, A. H., Tai, M. H., Rocha, L. F. N., Silva, H. H. G., Luz, C. (2009) Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *A. aegypti*. Biol Control. 50: 37–42.

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

Scholte, E., NG`Habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G.F., Knols, B.G.J.(2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. Science. 308:1641– 642.

Scholte, E., Knols, B. G., Takken, W. (2004) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the Malaria vector *Anopheles gambiae*. Malaria Journal. 3: 1-6.

Secretaria de Vigilância Sanitária, (2011). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_dengue_controle.pdf. Acessado em: 04/07/2014.

Silva, I.M., Eiras, A.E., Kline, D.L., Bernier, U.R. (2005) Laboratory evaluation of mosquito traps baited with a synthetic human odor blend to capture *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association, 21:229–233.

Simmons, C. P.; Farrar J.J.; Nguyen v.V.; Wills B.; (2012). Dengue. New Engl. J. Med. 366: 14231432.

Siqueira, J.B., Vinhal, L.C., Said, R.F.C., Hoffman, J.L., Martins, J., Barbirato, S.B., Coelho, G.E. (2010) Dengue no Brasil: Tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. Secretaria de Vigilância em Saúde, MS. 15p.

Slama, K., Romanuk, M., Sorm, F. (1974) Insect Hormones and Bioanalogues. New York: Springer Verlag.

Smallegange, R.C., Gemert, G.J., Bolmer, M.V., Gezan, S., Takken, W., Saverwein, R. W., Logan, J.G. (2013) Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor. Rev.PLOS ONE, Jornal.pone 0063602.

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, (2013). Disponível em: http://sbmt.org.br/site/corpo_texto/2557 Acessado em 05/07/2014.

St. Leger, R.J., Goettel, M., Roberts, D.W., Staples, R.C. (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *M. anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 58: 168-179.

Tauil, P. L. (2002) Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Caderno de Saúde Pública. 18 (3): 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., Ferreira, L. D. A, Vasconcelos, P. F. C. (2002) Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. Revista Brasileira de epidemiologia. 5: 109-115.

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.

Turley, A. P.; et al. (2009) *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. Austrália, 15:9.

Ujvari, S.C. (2008) A história da humanidade contada pelos vírus" - Editora Contexto. Etymologia: dengue (pdf). Emerg. Infec.12:893

Vianna, M. S. R. (2001) A transmissão urbana da febre amarela e dengue. Saúde Rio. Rio de Janeiro. 5p.

Vieira, L.P., Paula, A.R., Paula, C.O., Da Matta, R.A., Samuels, R.I.(2013). Infection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and Adults by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. British Microbiology Research Journal 3(3): 309-317.

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.

Williams, C. R., Long, S.A., Russell, R.C., Ritchie, S.A. (2006) Field efficacy of the BG-sentinel compared with CDC backpack aspirators and CO₂-baited EVS traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22: 296 -300.

World Health Organization (1992) Technical Report Series. Vector Resistance to Pesticides.

World Health Organization (WHO): Disponível em: <http://www.paho.org>. Acessado em: 27/04/2014.