

DESENVOLVIMENTO DE OVITRAMPAS IMPREGNADAS COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

**ANDERSON RIBEIRO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO – 2021

DESENVOLVIMENTO DE OVITRAMPAS IMPREGNADAS COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

**ANDERSON RIBEIRO**

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

Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO – 2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

R484

Ribeiro, Anderson.

Desenvolvimento de ovitrampas impregnadas com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* / Anderson Ribeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

120 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientador: Richard Ian Samuels.

Coorientador: Adriano Rodrigues de Paula.

1. Armadilha. 2. Monitoramento. 3. Vetores. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

DESENVOLVIMENTO DE OVITRAMPAS IMPREGNADAS COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

**ANDERSON RIBEIRO**

“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 11 de junho de 2021

Comissão Examinadora



---

Dr. Adriano Rodrigues de Paula (Ph. D., Entomologia) – UENF



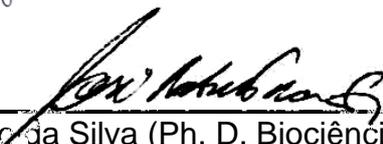
---

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



---

Prof. Dr. Gerson Adriano Silva (Ph. Sc., Fitotecnia) – UENF



---

Prof. José Roberto da Silva (Ph. D. Biociências e Biotecnologia) – UFRJ



---

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

Aos meus pais Helena e Denizá,  
aos meus irmãos Aline e  
Alessandro, aos meus Cunhados  
Tatiana e Allan, aos meus  
sobrinhos Jhonatan, Tatielly e  
Arthur e, em memória da minha  
mãe biológica Marizete dedico  
este trabalho.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTO

Ao professor Dr. Richard Ian Samuels pela orientação e ensinamentos;

Ao Dr. Adriano Rodrigues de Paula pela coorientação e ensinamentos sobre *Aedes aegypti* e fungos entomopatogênicos;

A FAPERJ, CAPES e a UENF pelo financiamento da atual pesquisa;

Ao Professor Dr. Francisco José Alves Lemos, Dr. Gerson Adriano Silva e Dr<sup>a</sup>. José Roberto da Silva pela participação na comissão examinadora deste estudo;

Aos companheiros do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) grupo - Patologia de Insetos: Leila, Joseane, Thaís, Aline, Denise, Raymysson, Patrícia e Carolina;

Aos amigos: Rodrigo; Sônia Guimarães, Vitor Cyrino, Gabriel Quintanilha, Andressa, Julyana Madureira, Danilo Souza; Denis; André;

Aos demais amigos e familiares que contribuíram com a realização desse trabalho.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Características biológicas e morfológicas dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	5
2.2 Distribuição geográfica do mosquito <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	8
2.3 Arboviroses transmitidas pelos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	13
2.4 Monitoramento e indicadores de infestações de mosquitos utilizando armadilhas	16
2.5 Métodos alternativos de controle de mosquitos	18
2.6 Controle utilizando inseticidas sintéticos	19
2.7 Uso do controle biológico (predadores) no controle de mosquitos	21
2.8 Utilização de bactérias para o controle de mosquitos	23
2.9 Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos	24
2.9.1 Infecção de ovos de mosquitos com fungos	27
2.9.2 Infecção de larvas e pupas de mosquitos com fungos	28
2.9.3 Infecção de adultos de mosquitos com fungos	29
2.9.4 Armadilhas impregnadas com fungo para atração e infecção de mosquitos adultos	31
3. HIPÓTESES	35
4. OBJETIVOS GERAIS	35
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 Coleta, criação e manipulação dos mosquitos	36
5.2 Cultivo dos conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	37
5.3 Bioensaio 1 – Avaliação do efeito do óleo de girassol ou óleo vegetal (Natur'l oil®) no crescimento radial e produção de conídios do fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>	38

5.4	Bioensaio 2 – Verificação da preferência de oviposição de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> quando oferecidas armadilhas ovitrampas revestidas com papel camurça de diferentes cores _____	39
5.5	Bioensaio 3 - Sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> , alimentadas com sacarose ou sangue, expostas ao papel camurça impregnado com fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> _____	41
5.6	Bioensaio 4 – Sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> alimentadas com sangue e expostas a superfícies impregnadas com fungo entomopatogênico em armadilhas de oviposição _____	42
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	43
7.	RESULTADOS _____	44
7.1	Bioensaio 1: Avaliação dos efeitos do óleo de girassol ou óleo vegetal (Natur'l oil®) no crescimento radial e produção de conídios do fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> _____	44
7.2..	Bioensaio 2: Preferência de oviposição de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> quando expostas às armadilhas ovitrampas revestidas com papel camurça de diferentes cores _____	52
7.3	Bioensaio 3: Sobrevivência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> , alimentadas com sacarose ou sangue, expostas ao papel camurça impregnado com <i>Metarhizium anisopliae</i> formulado em óleo vegetal _____	53
7.4	Bioensaio 4: Taxa de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> , alimentadas com sacarose ou sangue, expostas a ovitrampa revestida com papel camurça vermelho ou preto impregnado com <i>M. anisopliae</i> formulado em óleo vegetal _____	66
8.	DISCUSSÃO _____	73
9.	CONCLUSÃO _____	79
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	80

## RESUMO

RIBEIRO, A. Ms. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Junho de 2021. DESENVOLVIMENTO DE OVITRAMPAS IMPREGNADAS COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Orientador: Dr. Richard Ian Samuels. Coorientador: Dr. Adriano Rodrigues de Paula.

Os fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para serem utilizados no controle de mosquitos adultos. O presente estudo teve o objetivo de desenvolver uma armadilha ovitrampa impregnada com conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para infectar e matar fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Os testes foram feitos em condições de laboratório e semicampo. Dois isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 818 e LEF 2000) foram utilizados nos bioensaios. O primeiro bioensaio verificou o efeito do óleo de girassol e óleo vegetal (Natur'l oil®) no crescimento radial dos fungos. O segundo bioensaio investigou a preferência de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* em ovitampas revestidas com papel camurça vermelho, amarelo, azul ou branco. Depois foi avaliada a eficiência do papel camurça vermelho ou preto impregnado com fungo para infectar e matar fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue. Os resultados mostraram que o óleo de girassol (1%) não afetou negativamente o crescimento radial do fungo. Foi observado que as

ovitrampas revestidas com papel camurça vermelho apresentaram maior número de ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* (84% e 83%, respectivamente), comparado com outros tipos de papel camurça. Fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sacarose e expostas a um papel camurça vermelho pincelado com o isolado ESALQ 818 ou LEF 2000 formulados com óleo de girassol apresentaram taxa de sobrevivência de aproximadamente 27%, enquanto fêmeas alimentadas com sangue tiveram aproximadamente 36% de sobrevivência. Ao comparar a sobrevivência de fêmeas expostas a ovitrampas revestidas com papel camurça preto ou vermelho impregnado com a formulação dos isolados em óleo de girassol, fêmeas alimentadas com sacarose apresentaram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 23%, enquanto fêmeas alimentadas com sangue tiveram aproximadamente 31% de sobrevivência. A ovitrampa com papel camurça vermelho é a mais indicada para ser utilizada no campo, pois atrai mais fêmeas grávidas para oviposição e a cor do papel permite uma melhor visualização dos ovos, facilitando sua contagem para monitoramento de populações. As ovitrampas impregnadas com fungos entomopatogênicos reduziram a sobrevivência de fêmeas. Ovitrampas com fungos podem ser uma alternativa viável e econômica para ser utilizada por órgãos governamentais no combate de vetores de doenças.

**Palavras-chave:** Armadilha, Monitoramento, Vetores.

## ABSTRACT

RIBEIRO, A. Ms. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. June, 2021. DEVELOPMENT OF OVITRAPS IMPREGNATED WITH THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Metarhizium anisopliae* FOR THE CONTROL OF *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* MOSQUITOES. Advisor: Dr. Richard Ian Samuels. Co-advisor: Dr. Adriano Rodrigues de Paula.

Entomopathogenic fungi are potential candidates for the control of adult mosquitoes. The main objective of the present study was to develop an ovitrap impregnated with conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, to infect and kill females of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. The tests were carried out under laboratory and semi-field conditions. Two *M. anisopliae* isolates (ESALQ 818 and LEF 2000) were used in all fungal tests. The first bioassay verified the effect of sunflower oil and vegetable oil (Natur'l oil®) on the development of the fungus. The second bioassay investigated the oviposition preference of *A. aegypti* and *A. albopictus* females in ovitraps lined with red, yellow, blue, or white suede paper. Then, finally, we evaluated the efficiency of red or black suede paper impregnated with fungus to infect and kill *A. aegypti* and *A. albopictus* females fed with sucrose or blood. The results showed that sunflower oil (1%) did not disturb fungal development. We observed that ovitraps lined with red suede paper had a higher number of *A. aegypti* and *A. albopictus* eggs (84% and 83%, respectively), compared to other types of suede paper. Sucrose-fed females of *A. aegypti* and *A.*

*albopictus* exposed to a red suede paper brushed with either isolate formulated with sunflower oil had a survival rate of approximately 27%, while blood-fed females had approximately 36% chance of survival. When comparing the survival of females exposed to ovitraps lined with black or red suede paper impregnated with the formulation of the isolates in sunflower oil, sucrose-fed females had a survival rate of approximately 23%, while blood-fed females had approximately 31% of survival. This corroborates previous findings that blood-fed females of *Aedes* were less susceptible to the fungus compared to sucrose-fed females. The ovitrap lined with red suede paper is the most suitable for use in the field, as it attracts more pregnant females for oviposition and the paper color allows a better visualization of the eggs, which facilitates counting to monitor populations. Ovitrap impregnated with entomopathogenic fungi also reduced the survival of females looking for resting places. In conclusion, our results show that fungal ovitraps can be a viable and low-cost alternative to be used by government agencies in combating disease vectors.

**Keywords:** Trap, Monitoring, Vectors.

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por mosquitos estão aumentando mundialmente e têm preocupado a população e as autoridades governamentais (Tolle, 2009; WHO 2019). Em todo mundo existem mais de 3.200 espécies de mosquitos, dos quais do ponto de vista epidemiológico, os gêneros mais importantes são *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Becker et al. 2010).

O mosquito *Aedes aegypti* originou-se na África e hoje é considerado um mosquito cosmopolita podendo ser encontrado em todas as regiões das Américas, África e Ásia, sudeste dos Estados Unidos, ilhas do Oceano Índico, e no norte da Austrália (Kraemer et al., 2015, Dickens et al., 2018). As fêmeas de *A. aegypti* colocam seus ovos em recipientes antrópicos descartados de forma indevida ou em reservatórios de armazenamento de água (Consoli & Oliveira, 1998).

O mosquito *Aedes albopictus* foi relatado no Brasil pela primeira vez no ano de 1986. Em 2014, Carvalho e colegas relataram a presença de populações de *A. albopictus* em quase todos os estados Brasileiros. O nicho natural dessa espécie é na região silvestre e periurbana, colocando seus ovos preferencialmente em ocos de árvores e bromélias, no entanto, estudos mostram que essa espécie pode ser encontrada também em ambientes urbanizados (Ayllón et al., 2017).

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* são vetores dos vírus que causam a dengue, Zika, febre amarela urbana, chikungunya e febre Mayaro (Proestos et al., 2015, Dickens, et al., 2018, Kantor, et al., 2019). Apesar de existir vacina contra febre amarela, nem todas as pessoas se vacinam (WHO, 2016; Barret 2017). A vacina aprovada para a dengue apresenta alto custo e só é segura para soropositivos (Ferguson et al., 2016; Wilder-Smith, 2020). Com isso, a redução da população de mosquitos do gênero *Aedes* é o método mais eficaz para diminuir a incidência dessas doenças.

O monitoramento de populações de mosquitos pode ser feito com a utilização de armadilhas do tipo “ovitrampas” feitas de vaso plástico preto com palhetas de Eucatex. As ovitrampas atraem as fêmeas grávidas de *Aedes* a procura de um

local para colocar seus ovos. Essas armadilhas foram desenvolvidas levando-se em conta o comportamento biológico do mosquito em ser atraído pela cor preta e pela presença de água em seu interior (Fay & Eliason, 1966; Hoel et al., 2011; Snetselaar, et al., 2014).

Ao longo do tempo as ovitrampas foram melhoradas, por exemplo, adição de inseticidas sintéticos para se tornarem letais aos mosquitos, ter um cartão adesivo para prender os mosquitos no momento da oviposição ou a inclusão de um atraente de oviposição (Maciel-de-Freitas 2007, Donati e Gomes, 2007, Snetselaar et al., 2014).

Eiras (2002) desenvolveu a armadilha MosquiTRAP™ que contém um cartão adesivo preto para capturar as fêmeas grávidas de *A. aegypti*, que são atraídas pelo odor de um atraente sintético, pela cor escura e a presença de água. A MosquiTRAP™ é usada para monitoramento de populações de mosquitos e faz parte do sistema MI Dengue (Eiras, 2002; Eiras & Resende 2009).

Chadee et al. (1995) verificaram que palhetas de Eucatex em ovitrampas foram altamente eficientes para oviposição de mosquitos. Entretanto, outros substratos também são eficientes em ovitrampas, como papel sulfite, papel filtro, papel manteiga e papel toalha (Gomes et al. 2006).

No Brasil, o governo utiliza as armadilhas ovitrampas simples com palhetas de Eucatex para o levantamento entomológico de populações de mosquitos *Aedes* (Ministério da Saúde, 2021a). O monitoramento de mosquitos é importante para verificar regiões com alta infestação e, possivelmente, com alto risco de transmissão de doenças, direcionando as medidas de controle preventivas para esse vetor.

Controle biológico de mosquitos usando fungos entomopatogênicos possui vantagens em relação a outros microrganismos agentes de controle, por apresentarem maior capacidade de parasitar e matar mosquitos vetores, agindo como inseticidas biológicos (Onofre et al., 2002). A atividade ovicida de várias espécies fúngicas incluindo *Penicillium*, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foi verificada em ovos de *A. aegypti* (Luz et al., 2007; Albernaz et al., 2009; Santos et al., 2009).

Daoust (1982) descreveu a atividade patogênica de *M. anisopliae* na mortalidade de larvas de *Culex*, *Anopheles* e também de *A. aegypti*. Isolados do fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram virulentos contra larvas de *A. aegypti* em condições de laboratório (Pereira et al., 2009). Carolino et al. (2019) demonstraram a alta suscetibilidade de pupas de *A. aegypti* infectadas com blastosporos de *M. anisopliae* resultando em uma alta diminuição da taxa de sobrevivência das pupas.

Paula et al. (2008) mostraram em condições de semicampo que isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram virulentos contra fêmeas de *A. aegypti*. Isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* também foram eficientes em diminuir a sobrevivência de adultos de *A. albopictus* e *Culex pipiens* (Lee et al., 2019; Choi et al., 2020).

Vários trabalhos mostraram que superfícies impregnadas com conídios de fungo foram altamente atrativas e eficientes para infectar mosquitos. Mmbando et al. (2015) pulverizaram conídios de *M. anisopliae* na superfície externa de uma armadilha para infectar fêmeas de *Anopheles arabiensis*. Painéis de barro ou panos pretos impregnados com conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* reduziram a taxa de sobrevivência de *A. gambiae* na Tanzânia (Mnyone et al., 2010).

Uma armadilha denominada de armadilha PET feita de garrafa PET transparente com pano preto impregnado com conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* foi eficiente para reduzir as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* em condições de semicampo (Silva et al., 2017; Paula et al., 2018).

A formulação de conídios de fungo com óleo pode aumentar sua eficiência para matar mosquitos adultos. Farenhorst et al. (2008) aplicaram formulações de conídios de *M. anisopliae* e óleo vegetal dentro de vasos de barro para infectar machos e fêmeas de *A. gambiae* e *Anopheles funestus*. O fungo *M. anisopliae* formulado em óleo mineral aumentou a taxa de mortalidade de mosquitos *A. gambiae* (Mnyone et al., 2009).

Carolino et al. (2014) registraram a eficiência da combinação do fungo *M. anisopliae* com óleo vegetal ou com óleo sintético isoparafina verificando significativa redução na taxa de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*.

Snetselaar et al. (2014) desenvolveram uma armadilha (In2Care®) utilizando concomitantemente um atraente de alimentação, uma superfície de pouso contendo uma mistura de inseticida (pyriproxyfen) e fungo *B. bassiana* e, o mesmo inseticida sintético na água. Fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram contaminadas e ao saírem da armadilha carregam o inseticida para outros criadouros, matando as larvas nesses locais (Snetselaar et al., 2014; Buckner et al., 2017). No entanto, a utilização de inseticidas ainda é um fator de risco para o surgimento de mosquitos resistentes.

Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma armadilha simples e barata para infectar mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* com conídios de *Metarhizium anisopliae* durante o ato de oviposição ou descanso. A armadilha desenvolvida foi uma ovitrampa revestida com papel camurça impregnado com formulações do fungo em óleo vegetal a fim substituir Eucatex e facilitar a contagem dos ovos. Esse tipo de armadilha poderia também reduzir a viabilidade dos ovos postos no papel impregnado com fungo, além de infectar os adultos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características biológicas e morfológicas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são holometábolos, da ordem Díptera, pertencentes à Família Culicidae (Consoli & Oliveira, 1998).

O ciclo biológico completo do mosquito compreende as fases de ovo, larva, pupa e adultos (Figura 1). Foi observado que *A. aegypti* é mais abundante em áreas urbanas, *A. albopictus* em áreas rurais, e ambos coexistem em áreas periurbanas, tanto no Brasil quanto na Flórida (EUA) (Braks et al., 2003; Faraone et al., 2021; Ayllon et al., 2017).

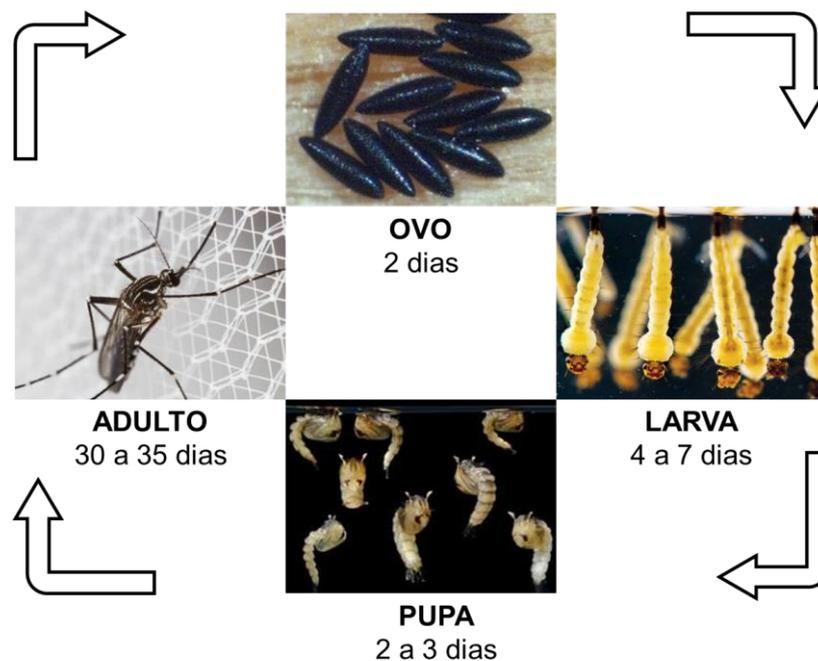


Figura 1 – Ciclo de vida do mosquito *Aedes*. Fonte: Domínio Google ([www.google.com.br](http://www.google.com.br)).

O ovo possui forma alongada, formato fusiforme, coloração variando do marrom a negra. A viabilidade dos ovos em ambientes secos pode se prolongar por mais de um ano (Estrada-Franco & Craig, 1995; Consoli & Oliveira, 1998;

Marcondes, 2001). O nível de melanização da casca de ovo está diretamente associado à viabilidade do ovo fora da água após a formação da cutícula serosa (Farnesi et al., 2017). Os ovos de *A. albopictus* são conhecidos por serem menos resistentes a condições de seca do que os de *A. aegypti* (Juliano et al., 2002).

Os mosquitos usam vários sinais (visual, umidade, olfativo, etc.) para encontrar suas fontes de alimento (hospedeiro vertebrado e/ou néctar) e parceiro de acasalamento, bem como para localizar um local para ovipositar (Wooding et al., 2020).

As fêmeas grávidas de mosquitos avaliam a adequação e acessibilidade dos locais de oviposição por meio de pistas físicas e semioquímicos liberados de larvas, ovos e/ou de origem microbiana (Wooding et al., 2020). Além de estímulos fisiológicos (Clements, 2000), ambientais (Costa et al., 2008; Kearney et al., 2009) e comportamentais (Gomes et al., 2006).

Estudos demonstraram que, geralmente, as fêmeas de *A. aegypti* ovipositam em uma gama de criadouros, preferem locais que contêm ovos e larvas da mesma espécie, mas tentam evitar a superlotação e competição larval por escassez de alimentos, disseminando a população de mosquitos de modo eficaz (Reeves, 2004; Tsunoda et al., 2010).

Qualquer objeto no ambiente natural ou doméstico é potencial criadouro de mosquitos (Donalísio & Glasser, 2002; Forattini, 2002), sendo os ovos colocados na superfície interna desses recipientes (Funasa 2001). Os criadouros preferenciais são aqueles que têm água limpa, sombreados e pobres em matéria orgânica em estado de decomposição (Vianna, 2001; Guagliardo et al., 2014).

O número de ovos por postura depende da quantidade de sangue ingerido pela fêmea na hematofagia. Estudos demonstraram que uma fêmea produz em média 120 ovos por ciclo de ingestão de sangue (Clements 2000; Forattini, 2002). Externamente os ovos são revestidos por uma camada denominada exocório. Após a imersão do ovo em água, a eclosão da larva se dá pelo atrito de uma estrutura quitinosa presente na cabeça da larva contra o córion (Forattini, 1962).

As larvas dos mosquitos são sempre aquáticas, têm aspecto vermiforme e com coloração que varia do esbranquiçado ao enegrecido. A respiração das larvas

ocorre por um sifão respiratório presente no último segmento do corpo do inseto. O corpo é dividido nitidamente em cabeça, tórax e abdome. A cabeça tem um par de antenas e olhos compostos. O aparelho bucal das larvas é do tipo mastigador e se alimentam de micro-organismos como algas e partículas derivadas da deterioração de matéria orgânica na água (Consoli & Oliveira, 1998).

Durante o desenvolvimento, a larva passa por 4 estádios larvais (L1, L2, L3, L4) e depois de 7 dias, surgem as pupas que também são aquáticas, móveis quando perturbadas, porém, se mantêm quase sempre na superfície da água e não se alimentam. O corpo da pupa é formado por cefalotórax e o abdome. No cefalotórax há duas estruturas tubulares chamadas trombetas ou trompas respiratórias e um par de olhos compostos. No final do abdômen existe um par de paletas que auxiliam a pupa na locomoção. Após dois ou três dias de desenvolvimento das pupas emerge o mosquito adulto (Clements, 2000; Becker, 2003, Forattini, 2002).

Os mosquitos adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus* possuem tamanho de 4 a 7 mm de comprimento, o macho pode ser identificado por possuir antenas plumosas, enquanto as fêmeas possuem antenas filiformes. O adulto possui tórax com o mesonoto e as asas recobertas de escamas escuras e, as pernas são escuras com manchas claras nas articulações. No mesonoto (tórax), as escamas do mosquito *A. aegypti* formam um desenho em forma de lira (Figura 2-A), enquanto no *A. albopictus* as escamas formam uma linha branca central (Consoli & Oliveira, 1998) (Figura 2-B).

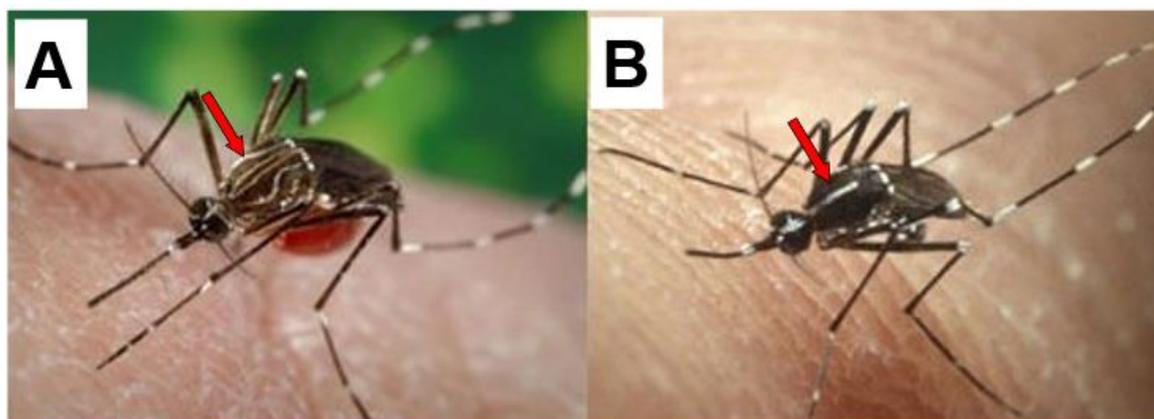


Figura 2 – Diferença morfológica das duas espécies de *Aedes*. Setas vermelhas indicam as diferenças nos mosquitos **A) *Aedes aegypti***. **B) *Aedes albopictus***. (www.cdc.gov).

O raio de voo do mosquito adulto é limitado, em média de 250 metros para fêmeas e 200 para machos de *Aedes* (Juarez et al., 2020). Tanto o macho quanto a fêmea de *A. aegypti* e *A. albopictus* se alimentam de néctar floral, no entanto, as fêmeas precisam fazer ingestão de sangue durante um único ciclo gonadotrófico para desenvolvimento dos ovos. Esse habito hematófago amplia a sua capacidade de se infectar e de transmitir vírus, tornando as duas espécies eficientes vetores de doenças. O repasto sanguíneo é exclusivo das fêmeas. A longevidade das fêmeas é de aproximadamente 45 dias, enquanto os machos vivem menos em comparação à fêmea. (Clements, 1963; Consoli & Oliveira, 1998).

## **2.2 Distribuição geográfica do mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) foi primeiramente descrito no Egito por Linnaeus em 1762. Provavelmente originou-se na África Subsaariana de uma espécie ancestral selvagem e zoofílica chamada *Aedes aegypti formosus* (Brown et al., 2011), e devido à comercialização e movimentação humana, principalmente com o tráfico de escravos nos séculos XVII-XIX, foram introduzidos no Novo Mundo, onde se espalhou para regiões

tropicais e subtropicais, seguido de uma invasão posterior no sudeste da Ásia e no Pacífico (Gubler et al., 1997; Brown et al., 2014).

Conforme avanço da urbanização e a expansão da indústria naval, as cidades portuárias começaram a enfrentar frequentemente surtos de doenças semelhantes à dengue (Gubler, 1998). No século XX, o mosquito *A. aegypti* estava presente em toda a América do Norte e do Sul, provavelmente primeiro infestando cidades portuárias e depois se movendo para o interior (Gubler, 1998; Pan American Health Organization, 1986). Em meados do século 20 (1946-1963), populações do mosquito *A. aegypti* foram drasticamente reduzidas nas Américas como resultado de um programa de controle da febre amarela liderado pela Organização Pan-Americana da Saúde (Schliessman & Calheiros, 1974). O sucesso na redução da febre amarela levou ao declínio dos programas de controle do mosquito e, conseqüentemente, desde a década de 80, *A. aegypti* foi restabelecida em todas as Américas (Gubler, 1989).

*Aedes albopictus* (Skuse, 1984), o mosquito “tigre asiático”, se originou nas florestas do sudeste da Ásia, ilhas do Oceano Índico e do Pacífico ocidental (Delatte et al., 2009; Izri et al., 2011), onde era provavelmente zoofílico. Entretanto, a espécie se adaptou progressivamente às mudanças antropogênicas do meio ambiente, o que proporcionou fontes alternativas de sangue (animais domésticos e homem) e coleções de água para os habitats larvais (Paupy et al., 2009). Ponlawat & Harrington (2005) verificaram que *A. albopictus* causou ameaças públicas ao expandir seu alcance para a África, Europa e Américas por meio de atividades humanas e transportes ativos.

No Brasil, *A. albopictus* foi relatado pela primeira vez no ano de 1986, nos Estados de São Paulo (de Brito et al., 1986), Rio de Janeiro e Minas Gerais (Forattini, 1986; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994) e, 8 anos depois, já havia se espalhado por mais de 600 municípios brasileiros (Pena et al., 2003). Carvalho et al. (2014) relataram a presença de populações de *A. albopictus* em 24 das 27 unidades federativas do Brasil, em regiões urbanas e suburbanas.

Kambhampati et al. (1991) analisaram a composição genética das cepas de *A. albopictus* do Brasil e dos EUA comparando-as com vários países do Pacífico

Ocidental para rastrear a origem geográfica dos mosquitos invasores. As populações dos EUA e do Brasil eram as mais próximas em termos de distância genética das populações japonesas. Com base em análises discriminantes e de distância genética, os autores concluíram que os mosquitos *A. albopictus* encontrados nos Estados Unidos e no Brasil, são originários do Japão.

Os mosquitos *A. aegypti* são considerados cosmopolitas podendo ser encontrados atualmente em todas as regiões das Américas, África e Ásia, sudeste dos Estados Unidos, ilhas do Oceano Índico, e no norte da Austrália (Kraemer et al., 2015, Dickens et al., 2018). O mosquito *A. aegypti* se alimenta durante o dia e tem a população humana como fonte preferencial de alimento, e as áreas urbanas como principais áreas de reprodução e descanso (Brown et al., 2011; Scott & Takken, 2012), embora também possa ser encontrado em áreas rurais (Mgugi et al., 2017).

Os mosquitos *Aedes albopictus* alternativamente se alimentam do sangue de animais e tendem a repousar em ambientes abertos (Paupy et al., 2009), no entanto também demonstraram um comportamento fortemente antropofílico como o mosquito *A. aegypti* (Delatte et al., 2010).

Braks et al. (2003) avaliaram que *A. albopictus* pode ser abundantemente encontrado em áreas urbanas e suburbanas onde recipientes artificiais são comumente acumulados em campos abertos e nos quintais. Em Ubatuba (PR) a densidade populacional de *A. albopictus* foi superior ao de *A. aegypti*, mesmo em centros urbanos (Prophiro et al. 2011).

Embora *A. aegypti* possa depositar seus ovos em orifícios naturais onde há o acúmulo de água, a grande maioria coloca seus ovos em recipientes artificiais descartados ou armazenados de forma incorreta pela população humana, o que pode contribuir para a aproximação destes insetos aos seres humanos (Scott et al., 1993; Harrington et al., 2001; Reiter, 2007).

Recipientes grandes, sem tampa e em locais sombreados mostraram ser os mais procurados por fêmeas de *A. aegypti* para oviposição em bairros do Rio de Janeiro (Maciel-de-Freitas et al., 2007). Colton et al. (2003) descobriram que uma quantidade maior de fêmeas de *A. aegypti* procuraram recipientes com grandes

superfícies de água (177 cm<sup>2</sup>) em comparação a recipientes com pequenas superfícies (57 cm<sup>2</sup>), embora os autores achem que a cor do recipiente (preto) influenciou a seleção mais do que a área de superfície da água.

Hoel et al. (2011) verificaram em estudo de campo, na Flórida, a preferência de oviposição de fêmeas de *A. albopictus* a ovitrampas de diferentes cores. Os valores médios de ovos coletados nas ovitrampas preta (122,53) ou azul (116,7) foram maiores quando comparadas com ovitrampas xadrez (101,8), laranja (97,1), listrada (84,6) ou branca (81,5). Outros autores já fizeram o uso de outros substratos, como papel sulfite, papel filtro, papel manteiga e papel toalha, revelando que os diferentes substratos não impediram as fêmeas de realizar oviposição (Gomes et al., 2006).

Os ovos de *Aedes* são postos preferencialmente em recipientes de cor escura, superfícies ásperas e úmidas e um pouco acima da linha d'água (Gomes et al., 2003). Esses ovos podem, inclusive, já conter os vírus, se forem postos por fêmeas infectadas, evento denominado de transmissão trans-ovariana (Consoli & Oliveira, 1994).

Em geral, os mosquitos são sensíveis a alterações de temperatura e umidade e, frequentemente, espécies que vivem em regiões tropicais e temperadas apresentam maiores variações sazonais de abundância populacional (Samways, 1995). Kraemer et al. (2015) demonstraram que *A. albopictus* possuem a capacidade de tolerar também baixas temperaturas.

Navarro-Silva et al. (2004) avaliaram em condições controladas que o gênero *Aedes* quando submetido a diferentes temperaturas teve a sua fecundidade, longevidade e atividade hematofágica afetadas. Carrington et al. (2013) também observaram na Tailândia que flutuações na temperatura acima de 35°C influenciaram negativamente a procura de sangue de hospedeiros humanos por fêmeas de *A. aegypti* levando, conseqüentemente, a uma menor taxa de oviposição.

A distribuição populacional do mosquito *A. aegypti* e *A. albopictus* tende a aumentar nos períodos com maiores precipitações pluviométricas, o que possibilita um aumento na disponibilidade de recipientes naturais ou artificiais

para a emergência das larvas em centros urbanos e rurais (Mexico, 1993; Edman et al., 1998; Braks et al., 2003). Além disso, Castero et al. (1998) verificaram que a alimentação com sangue humano é benéfica para a reprodução de *A. aegypti*, que pode ser um fator importante quando se trata do aumento do seu contato com hospedeiros humanos e esse comportamento hematófago persiste mesmo em épocas do ano epidemiologicamente diferentes. Portanto, pode influenciar sua capacidade vetorial para vírus da dengue através da alimentação frequente de sangue.

O aumento desses vetores pode acarretar um aumento da transmissão de arboviroses. Na Itália e no sudeste da França em 2017, por exemplo, ocorreu um grande surto de infecções pelo vírus chikungunya adquiridas localmente, e o mosquito *A. albopictus* foi apontado como o vetor potencial desse vírus na região (Venturi et al., 2017; Fortuna et al., 2018).

### **2.3 Arboviroses transmitidas pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***

Os vetores são organismos responsáveis pela transmissão de doenças transmissíveis das faunas para os seres humanos ou entre os seres humanos. O vetor mais conhecido de doenças é o mosquito (Consoli & Oliveira, 1998). Os vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) têm uma longa história quando se trata da infecção em seres humanos, mas durante as últimas décadas se espalharam mais amplamente e afetaram populações maiores. Isso se deve a vários fatores, incluindo o aumento de populações urbanas, transporte de cargas, viagens aéreas, populações descontroladas de mosquitos vetores, entre outros (Jones et al., 2008; Weaver et al., 2010; WHO 2019).

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* são vetores responsáveis pela transmissão de doenças de importância mundial, como dengue, Zika, febre amarela, chikungunya e febre Mayaro (Smith & Francy 1991; Benedict et al., 2007; Proestos et al., 2015; Dickens, et al., 2018; Kantor, et al., 2019; Dieme et al., 2020; Valencia-Marín et al., 2020).

Desde fevereiro de 2020, o Brasil enfrenta uma pandemia da covid-19 e, desde a confirmação dos primeiros casos, observou-se uma diminuição dos registros de casos prováveis e óbitos de dengue e outras arboviroses. Esta diminuição pode ser consequência do receio da população em procurar atendimento em uma unidade de saúde, bem como uma possível subnotificação ou atraso nas notificações das arboviroses, associadas à mobilização das equipes de vigilância e assistência para o enfrentamento da pandemia (Ministério da Saúde, 2021a).

A dengue é uma doença de etiologia viral grave reemergente causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, patogênico aos seres humanos (Simmons et al., 2012). Febre, dores musculares intensas, dor de cabeça e vermelhidão pelo corpo estão entre os principais sintomas desta doença. Todas as faixas etárias são igualmente suscetíveis, porém as pessoas mais velhas têm maior risco de desenvolver dengue grave e outras complicações que podem levar à morte. No ano de 2020

foram notificados 987.173 casos prováveis de dengue no país, destes 826 casos foram de dengue grave e 9.072 casos com sinais de alarme. Dos casos confirmados, 554 vieram à óbito (Ministério da Saúde, 2020). Até a semana epidemiológica 18 (01/01/2021 a 08/05/2021) foram registrados 279.743 casos prováveis de Dengue no Brasil e 72 óbitos. Em comparação com o ano de 2020, houve uma redução de 62,1% de casos registrados para o mesmo período analisado.

A doença chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus da chikungunya, gênero *Alphavirus* (Togaviridae) causando grandes epidemias na África e Ásia desde 2004 (Teixeira et al., 2015; Nunes et al., 2015). Os sintomas desta doença são semelhantes aos da dengue, diferindo pela presença de artralgia persistente (Schilte et al., 2013). No ano de 2020 foram notificados 82.419 casos prováveis, dos quais 30 óbitos foram confirmados (Ministério da Saúde, 2020). Até a Semana Epidemiológica 18 foram confirmados 25.807 casos prováveis e 4 óbitos de Chikungunya no Brasil. Esses números correspondem a uma diminuição de 22,6% dos casos em relação ao ano anterior (Ministério da Saúde, 2021a).

O vírus da Zika é um dos principais vírus teratogênicos, o único exemplo identificado da família *Flaviviridae*, transmitido aos seres humanos pela picada do mosquito *Aedes* (Oehler et al., 2014, Gomard et al., 2020). O vírus foi isolado pela primeira vez de macaco *Rhesus* em 1947 nas florestas da Zika (Uganda), durante um estudo sobre a transmissão da febre amarela silvestre.

Infecções congênitas de Zika foram relatadas durante o surto de 2013 - 2014 na Polinésia Francesa, caracterizada por microcefalia e outras doenças neurológicas, além de uma ampla gama de defeitos auditivos, oculares, cognitivos e anatômicos em aproximadamente 5 a 30% dos bebês nascidos de mulheres infectadas durante a gravidez (WHO, 2015). Em 2020 foram notificados 7.387 casos prováveis de Zika no Brasil (Ministério da Saúde, 2020). Até a Semana Epidemiológica 18 foram confirmados 1.442 de Zika. Em relação a 2020. Os dados representam uma diminuição de 50,5% no número de casos do país. Até o momento não há confirmação da ocorrência de óbito para Zika no país (Ministério da Saúde, 2021a).

Mayaro é um arbovírus da família *Togaviridae* pertencente ao gênero *Alphavirus*. O vírus Mayaro leva o nome do local onde foi relatado pela primeira vez em Trinidad e Tobago em 1954 (Anderson et al., 1957). Esse vírus tem sido relatado na Bolívia, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Venezuela, Peru, entre outros países (Zúñiga & Caro, 2017).

O primeiro surto da doença do vírus Mayaro no Brasil foi descrito em 1955, às margens do rio Guamá, próximo de Belém/PA. Desde então, casos esporádicos e surtos localizados têm sido registrados nas Américas, incluindo a região Amazônica do Brasil, principalmente nos estados das regiões Norte e Centro-Oeste (Forshey et al., 2010; Izurieta et al., 2011). A doença é caracterizada por febre alta e dores articulares intensas, com duração de 3 a 7 dias, causando uma maior morbidade (Ministério da Saúde, 2021b).

A febre amarela é uma doença aguda causada pelo vírus da família *Flaviviridae* que circula enzooticamente em partes da América do Sul e África Subsaariana, transmitida por vetor e que pode ser prevenida por vacina (Barrett, 2017). Apesar de ter um ciclo silvestre envolvendo mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* que se alimentam de primatas não humanos, estudos mostram que tanto *A. aegypti* quanto *A. albopictus* são vetores potenciais na transmissão da febre amarela na população humana (Kamgang et al., 2019).

No Brasil, durante décadas, com os programas de vacinação da população, menos de 100 casos de febre amarela em humanos têm sido relatados anualmente. Contudo, em 2016 - 2018, dois grandes surtos de febre amarela urbana causaram 2.160 casos humanos confirmados na região sudeste do Brasil (Ministério da Saúde, 2018a, 2018b).

A abordagem de controle mais utilizada para essas doenças é sua prevenção e controle através da redução de criadouros, uso de inseticidas sintéticos e biológicos. Como há o risco de mosquitos desenvolverem resistência a inseticidas, um dos focos principais da comunidade científica é encontrar novas maneiras de controlar as populações de mosquitos (Yi et al., 2014).

## 2.4 Monitoramento e indicadores de infestações de mosquitos utilizando armadilhas

A densidade populacional de um vetor é um dos principais determinantes para a intensidade da transmissão de uma doença viral (Thammapalo et al., 2008). A vigilância entomológica constitui o prerequisite indispensável para o controle de arboviroses, uma vez que, a vigilância de mosquitos vetores orienta as intervenções nos ciclos de transmissão dessas enfermidades (Gomes, 1998; Reiter et al., 1991).

O monitoramento do mosquito *Aedes* é geralmente realizado utilizando-se diferentes tipos de armadilhas que podem ser específicas para a fase de ovo, larva ou adulto (Gomes et al., 2008). As ovitrampas foram as pioneiras no monitoramento de mosquitos utilizando a captura de formas imaturas. A utilização de ovitrampas possibilita verificar infestação de mosquitos adultos nas regiões onde essas armadilhas são instaladas, representando um instrumento importante de avaliação e do monitoramento de certas medidas de controle (Braga et al., 2000).

As armadilhas de oviposição são depósitos de plástico geralmente de cor preta com capacidade entre 200 a 500 mL de água, podem conter ou não atraentes e na maioria dos casos palhetas de madeira (Eucatex) prensadas em posição vertical (8 x 3 cm). Os ovos dos mosquitos são depositados na palheta de Eucatex logo acima da superfície da água (Gomes, 1998; Reiter et al., 1991).

A utilização de ovitrampas demonstra ser um método sensível e econômico para fornecer informações sobre a presença do vetor em determinada região (Rawlins et al., 1998). Estudos mostram que a utilização de armadilhas para oviposição foi mais eficiente e econômica quando comparada às armadilhas para larvas (larvitampas) (Braga et al., 2000).

Em Recife (Pernambuco), Xavier et al. (2018) avaliaram o desempenho de armadilhas pegajosas chamadas BR-OVT compostas de uma caixa de polietileno preta com uma abertura central na parte superior e, um recipiente com água dentro da caixa. A água continha *Bacillus thuringiensis israelensis* para matar as

larvas, e uma cola entomológica revestindo as paredes do reservatório de água. Em estudos de campo, verificaram que a armadilha foi eficiente para captura de ovos e adultos de *Culex quinquefasciatus* e observaram também a presença de fêmeas de *A. aegypti*. Concluíram que a armadilha pegajosa BR-OVT tem potencial para uso em programas de vigilância visando *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* concomitantemente com outras estratégias de controle de mosquitos.

Armadilhas para a captura dos mosquitos adultos vêm sendo utilizadas mundialmente (Eiras 2002; Maciel-de-Freitas et al., 2008; Johnson et al. 2012). MosquiTRAP<sup>®</sup>, Adultrap<sup>®</sup> e BG-Sentinel<sup>®</sup> estão entre as armadilhas mais utilizadas para o monitoramento de mosquitos adultos.

A MosquiTRAP<sup>®</sup> é um modelo de armadilha que permite capturar adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus*, principalmente fêmeas grávidas devido à presença de um atraente sintético de oviposição (AtrAedes<sup>®</sup>) no interior da armadilha. O atraente sintético fica preso em um cartão adesivo preto de polietileno que reveste o interior da armadilha. Ao pousarem ou tocarem na parte interna da MosquiTRAP<sup>®</sup> as fêmeas ficam presas no cartão adesivo (Eiras, 2002). Os insetos presos no cartão da MosquiTRAP<sup>®</sup> são identificados e os dados coletados armazenam um banco de dados do sistema de Monitoramento Inteligente da Dengue (MI-Dengue) (Eiras, 2002; Fávaro et al., 2006) e são encaminhados para teste e verificação da presença do vírus (Eiras & Resende, 2009).

A armadilha Adultrap<sup>®</sup>, originalmente projetada para capturar adultos de *A. aegypti*, possui características que permitem a captura de outros insetos, como os dípteros muscoides, apresentando como vantagens sua padronização, baixo custo e possível reutilização. No interior da armadilha há um recipiente contendo água que fica separado das partes internas da armadilha por uma tela, sem qualquer chance de contato direto do mosquito com a água (Donatti & Gomes, 2007). Maciel-de-Freitas et al. (2008) mostraram que, tanto a Adultrap<sup>®</sup> quanto a MosquiTRAP<sup>®</sup>, são promissoras para o monitoramento de populações de *A. aegypti*. No entanto, a MosquiTRAP<sup>®</sup> apresentou um maior número de fêmeas de *A. aegypti* capturadas.

Outra armadilha eficiente para capturar o mosquito do gênero *Aedes* e que também utiliza um atraente sintético é a BG Sentinel™ (Biogents, Biogents AG, Regensburg, Alemanha). Essa armadilha é composta por um atraente sintético BG-Lure™ no seu interior que atrai os mosquitos e, além do estímulo químico, a armadilha possui outros elementos que atraem os mosquitos como um saco coletor de cor preta onde os adultos ficam presos em seu interior (Eiras & Geier, 2002). A armadilha BG-Sentinel foi desenvolvida como uma alternativa segura na vigilância de *A. aegypti* e outros vetores de arboviroses (Kröckel et al. 2006) e foi um dos primeiros dispositivos de amostragem eficazes para capturar mosquitos adultos (Johnson et al. 2012).

## **2.5 Métodos alternativos de controle de mosquitos**

O controle do mosquito *Aedes*, especialmente em países em desenvolvimento, tem se mostrado um importante desafio para as autoridades sanitárias. No Brasil, a partir de 1996, o Ministério da Saúde criou um Plano de Erradicação de *A. aegypti* cujo principal objetivo se concentrava na redução dos casos de dengue hemorrágica. Mas, não obteve muito sucesso, uma vez que houve um aumento no número de casos de dengue e avanço da infestação do *A. aegypti* (Braga et al., 2007; Ministério da Saúde, 2009a).

As estratégias para o controle de mosquitos devem se concentrar no uso de medidas preventivas, em vez de seguir medidas adaptativas. Como medidas preventivas podem-se reduzir os locais de reprodução do mosquito como piscinas com água parada, poços de água desativados, vasos e pneus cheios de água em torno de residências e terrenos; incentivo da conscientização pública e criar ambientes limpos são as melhores medidas preventivas para controlar os mosquitos (Forattine, 1962; Tauil, 2006; Ministério da Saúde, 2009b; Secretaria de Vigilância Sanitária, 2011, Kahamba et al., 2020).

No Brasil, o Ministério da Saúde utiliza armadilhas ovitrampas para o monitoramento de mosquitos juntamente com a inspeção larval nas residências (Braga et al., 2004). No entanto, este método é trabalhoso, não muito sensível e

sujeito a motivação do agente de saúde e permissão do proprietário, podendo resultar em estimativas imprecisas de baixa confiança dos índices de infestação (Focks, 2003).

Em 2021 o Ministério da Saúde lançou uma nova campanha de combate ao mosquito *A. aegypti* com o tema “Combater o mosquito é com você, comigo, com todo mundo” colocando em destaque os agentes de saúde como indispensáveis para informar e orientar a população a combater corretamente os criadouros do mosquito. Dividida em duas fases a ação visa alertar sobre a importância do cuidado aos locais que podem acumular água, e também informar os sintomas e as formas corretas de tratar doenças como dengue, zika e Chikungunya (Ministério da Saúde, 2021a).

Mosquitos transgênicos também estão sendo criados para atuar no controle de vetores. A empresa britânica Oxitec utiliza métodos de redução da transmissão de arboviroses com mosquitos machos transgênicos que, ao cruzar com as fêmeas, geram novos machos transgênicos e larvas fêmeas que não chegam à fase adulta, ou seja, a estratégia é baseada na redução da população de *Aedes* (McGraw & O'Neill, 2013; Evans et al., 2019).

Apesar de apresentar eficácia na diminuição de mosquitos adultos, as estratégias acima citadas são muitas vezes processos caros e há uma dificuldade de produção e liberação em massa desses mosquitos, que acaba limitando o uso desses agentes no campo em larga escala (Consoli et al., 1998; McGregor & Connelly, 2021; Moo-Llanes et al., 2021).

## **2.6 Controle utilizando inseticidas sintéticos**

O uso dos inseticidas sintéticos organofosforados iniciou-se após a constatação do aumento da população de insetos resistentes aos inseticidas clorados como diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Wondji et al., 2008). Desde 1985 o controle de larvas de *A. aegypti* pode ser realizado com os inseticidas fenitrothion e malathion. Nebulizações térmicas e atérmicas têm sido utilizadas

para controlar mosquitos adultos utilizando: propoxur (carbamato), malation (organofosforado) e cipermetrina (piretróide) (Macoris et al., 1999).

Por mais de 30 anos o inseticida organofosforado temephos foi o larvicida usado no Brasil para o controle de *A. aegypti*. Com as epidemias de 1986 seu uso foi amplamente intensificado. Em pouco tempo casos de populações de mosquitos resistentes ao temephos em diversas regiões do Brasil começaram a surgir (Campos & Andrade 2001; Polanczyk et al., 2003; Braga et al., 2004; Braga et al., 2007).

Os inseticidas têm sido empregados como um método para diminuir a densidade do vetor e, assim, resolver uma epidemia ou reduzi-la a níveis gerenciáveis. As principais classes de inseticidas sintéticos utilizados no controle de *Aedes* são: organofosforados, piretroides e carbamatos, onde os mais usados no controle de vetores são os organofosforados (malation e temephos) e piretroides (Bisset, 2002). O malation é usado principalmente para o controle de mosquitos adultos na forma de aerossol e o temephos é utilizado para os estágios larvais de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*.

Estudos mostram que a resistência do *Aedes* às quatro principais classes de inseticidas está sendo detectada globalmente. Moyes et al. (2017) demonstraram alguns mecanismos de resistência bem estabelecidos em populações distintas de mosquitos aos inseticidas das classes organoclorados, carbamatos, mas principalmente a piretroides (Fernando et al., 2020) e organofosforados na América do Norte e do Sul, África e Ásia. No Brasil, a resistência ao larvicida organofosfato, temefós e ao adulticida piretroide deltametrina é generalizada (Montella et al., 2007; Lima et al., 2011).

Foi relatado que a utilização de doses subletais do larvicida e pesticida piriproxifeno reduz a reprodução e a capacidade vetorial em mosquitos (Vasuki, 1999, Mbare et al., 2013) e são consideradas benéficas para a redução do risco de doenças (Unlu et al., 2020), porém é difícil ministrar corretamente uma dose subletal no ambiente podendo correr o risco do desenvolvimento de resistência nas populações de mosquitos (Schaefer e Mulligan, 1991).

Braga et al. (2004) e Lima et al. (2011) observaram que houve uma redução nos níveis de resistência ao temefós em localidades brasileiras onde o uso desse inseticida foi substituído pelo controle biológico por *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). No mesmo estudo, Lima et al. (2011) observaram que em dois outros municípios do estado do Ceará que continuaram com o uso de temefós, houve um aumento nos níveis de resistência. Montella et al. (2007) encontraram uma diminuição na resistência de *A. aegypti* em um município da região metropolitana de Natal (RN), após a substituição de temefós por *Bti* em 2005. Com isso, a eficácia do uso contínuo de inseticidas sintéticos como a única metodologia de controle de vetores vem sendo questionada. Valle et al. (2019) sugerem que é necessário garantir que o monitoramento sustentável da resistência aos inseticidas seja mantido como um componente-chave do manejo integrado de vetores. A utilização contínua de inseticidas sintéticos causa danos ao meio ambiente, animais e inclusive ao homem (Luna et al., 2004; Lima et al., 2011; Hassaan & Nemr, 2020).

## **2.7 Uso do controle biológico (predadores) no controle de mosquitos**

A utilização de inimigos naturais, predadores, parasitas ou patógenos naturais são métodos de controle biológico (biocontrole) empregados para controlar a população de um organismo considerado nocivo. Uma variedade de agentes de controle biológico foi descoberta e empregada contra mosquitos em todo o mundo (Han et al., 2015, Lima et al., 2016; McGregor & Connelly, 2021).

O microsporídeo, *Edhazardia aedes* (Kudo), tem se mostrado promissor como um controle biológico para *A. aegypti*. Este parasita obrigatório demonstrou ser transmitido verticalmente da mãe para a prole e afeta significativamente a quantidade de ovos produzidos pelas fêmeas e as taxas de emergência de *A. aegypti*, quando os ovos foram colocados em água (Becnel et al. 1995). Além disso, embora esse parasita infecte outras espécies de mosquitos, há evidências de que a transmissão vertical é restrita a *A. aegypti* (Becnel & Johnson 1993). Bernard et al. (2007) também verificaram que as fêmeas de *A. aegypti* infectadas

com *E. aedes* ingerem 23% menos sangue e reduzem em 30% o número de ovos produzidos.

Um grupo de artrópodes larvívoros mais bem estudado no controle de *A. aegypti* é o gênero *Toxorhynchites* (Díptera: Culicidae). As larvas de *Toxorhynchites* tipicamente atacam outras larvas de mosquito para obter proteínas necessárias para seu desenvolvimento e para a produção de ovos, uma vez que esses mosquitos não se alimentam de sangue na fase adulta (Consoli & Oliveira, 1998). Todavia, Uejio et al. (2014) verificaram em experimentos de campo que apesar do *Toxorhynchites mectezuma* ter sido eficiente para controlar pupas de mosquitos em pneus, esse controle diminuiu quando as populações de presas cresceram além da sua capacidade predatória.

Alkhaibari et al. (2018) verificaram a interação entre larvas de *Toxorhynchites brevipalpis* e propágulos de *Metarhizium brunneum* no controle de larvas de *A. aegypti*. Em bioensaios baseados em laboratório observaram que o propágulo fúngico blastosporos em baixas concentrações complementou a atuação predatória de *T. brevipalpis* resultando em um maior controle do que se qualquer um dos agentes fosse usado sozinho.

Existem mais de 250 espécies de predadores invertebrados e vertebrados de larvas de mosquitos, destacando-se os peixes larvívoros (*Oreochromis* e *Poecilia reticulata*) e vários nematódeos da família *Mermithidae*. (Consoli & Oliveira, 1998; McGregor & Connelly, 2021).

Alguns desafios limitam o uso desse grupo de artrópodes larvívoros. A criação de colônias de *Toxorhynchites* pode exigir muito trabalho e requer a criação de mosquitos adicionais para atuarem como fontes de alimento para as larvas. Além disso, a distribuição de *Toxorhynchites* para áreas de tratamento pode ser trabalhosa, especialmente se os indivíduos libertados não estão se reproduzindo naturalmente para sustentar a população (Schreiber & Jones 1994; Collins & Blackwell, 2000).

## 2.8 Utilização de bactérias para o controle de mosquitos

Estudos têm mostrado que a utilização de agentes microbianos para o controle de mosquitos vetores pode ser um método barato e promissor. As bactérias *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* foram eficientes para infecção de larvas de mosquitos (Consoli & Oliveira, 1998; Lutinsk et al., 2017), cuja eficácia foi demonstrada em programas de controle de vetores em todo o mundo (Becker, 1997; Flacio et al., 2015).

Os principais ingredientes ativos deste larvicida microbiano são cristais contendo protoxinas que apresentam alta toxicidade para larvas de Díptera de gêneros como *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium* (Lacey, 2007). As principais etapas do modo de ação do *Bti* incluem a ingestão dos cristais pelas larvas, sua solubilização no intestino médio e a liberação das protoxinas que são convertidas proteoliticamente em toxinas. Essas toxinas ativadas interagem com receptores do intestino médio onde se inserem na membrana formando poros que levam à permeabilidade celular e lise osmótica que danificam o epitélio da larva (Vachon et al., 2012).

Há um aumento crescente na utilização do *Bti* no controle do *Aedes* em países tropicais, não apenas para o tratamento convencional de criadouros, mas também para seu uso em associação a novas abordagens como em ovitrampas letais (Regis et al., 2013; Johnson et al., 2017). Esse grupo de bactérias só é eficiente contra larvas de *A. aegypti*, e casos de resistência de larvas a *Bacillus thuringiensis* foram documentados (Paris et al., 2011).

Outro gênero de bactérias que vem ganhando espaço em pesquisas visando o controle de mosquito são as bactérias do gênero *Wolbachia*. Essas bactérias são endossimbióticas intracelulares que alteram a reprodução do hospedeiro (Weeks et al., 2002). Foram relatadas pela primeira vez nos tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* por Hertig e Wolbach em 1924 (Werren, 1997). Até o ano de 2014 acreditava-se que essas bactérias estivessem ausentes nos mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles* (Kittayapong et al., 2000). Estudos recentes relataram

a presença de *Wolbachia* em *A. aegypti* (Bennett et al., 2019), *A. albopictus* (Huang et al., 2020) e *Anopheles* (Ayala et al., 2019) selvagens.

Essas bactérias ocorrem naturalmente em cerca de 60% das espécies de insetos, incluindo alguns mosquitos, mosca da fruta, borboletas e mariposas. *Wolbachia* spp. pode invadir populações de insetos usando incompatibilidade citoplasmática e fornecer novas estratégias para controlar doenças transmitidas por mosquitos, como a dengue, por exemplo (Blagrove et al., 2012). A incompatibilidade citoplasmática causa uma redução significativa na eclosão de larvas e promove a disseminação da infecção *Wolbachia* herdada pela mãe na população hospedeira. As fêmeas infectadas com *Wolbachia* produzem mais ovos, vivem mais e têm taxas de incubação mais altas em cruzamentos compatíveis (Dobson et al., 2002).

Além disso, mosquitos infectados com *Wolbachia* podem se acasalar com a população de mosquitos selvagens até que uma porcentagem maior de mosquitos portadores de *Wolbachia* seja alcançada. Esses mosquitos infectados têm uma capacidade reduzida de transmitir patógenos como Zika, dengue, Chikungunya e vírus da febre amarela para as populações humanas (McLean et al., 2018; Rocha et al., 2019; World Mosquito Program, 2020; Inácio da Silva et al., 2021).

## **2.9 Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos**

Os fungos entomopatogênicos são organismos eucarióticos geralmente multicelulares que podem infectar artrópodes através da ingestão ou do contato externo dos conídios com a cutícula (Alves, 1998; Samuels et al., 2016). Apresentam vantagens em relação aos vírus e às toxinas bacterianas, uma vez, que esses precisam ser ingeridos pelos insetos para que a infecção ocorra (Costa et al., 2010; Bilgo et al., 2018). No inseto, a infecção se inicia com a penetração da cutícula pelo fungo com o auxílio de uma estrutura denominada apressório (Lacey et al. 2015; Samuels et al., 2016).

Uma vez na hemocele, o fungo se multiplica rapidamente. A morte é causada por destruição dos tecidos do hospedeiro e ocasionalmente por toxinas

produzidas pelos fungos. O fungo emerge do corpo dos insetos para produzir esporos, que são dispersos pelo vento, chuva ou contato com outros insetos (Alves, 1998; Gravena, 2000; Samuels et al., 2016). Essa característica confere aos fungos uma grande capacidade de disseminação (Figura 3).

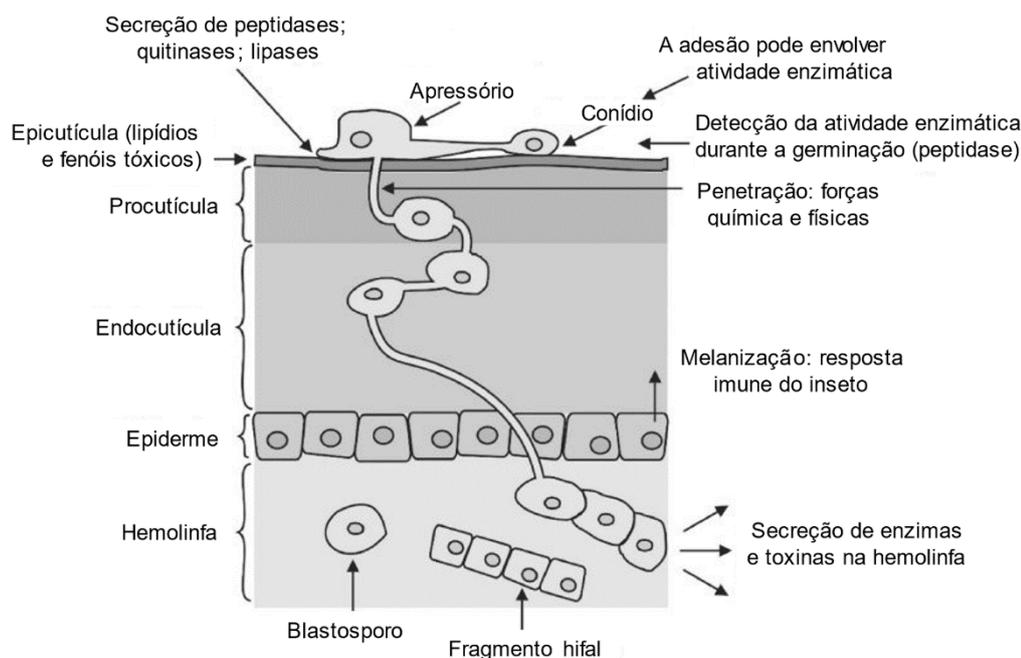


Figura 3 - Resumo dos eventos envolvidos no ciclo de infecção de um fungo entomopatogênico que ataca um inseto hospedeiro. Fonte: Samuels et al., 2016.

Os métodos de controle biológico são mais seguros, menos prejudiciais ao meio ambiente e mais econômicos do que os métodos químicos ou físicos (Huang et al., 2017). Como os fungos entomopatogênicos produzem várias toxinas durante a infecção dos mosquitos, a pressão de seleção para resistência provavelmente será menos intensa quando comparada aos inseticidas de ação rápida, tornando a evolução da resistência a fungos muito mais lenta que a evolução da resistência a inseticidas (French-Constant, 2005).

Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* pertencem atualmente à classe dos Sordariomycetes (Ascomycota) e são encontrados naturalmente nos solos de todo o mundo onde sobrevivem por longos períodos (Alves, 1998; Franceschini et al., 2001). Estão entre os mais

estudados por apresentarem uma maior eficácia para o controle biológico de insetos (Alves, 1998; Faria & Magalhães, 2001).

A atividade entomopatogênica de fungos vem sendo demonstrada em vários estudos, podendo ser eficientes para infectar todas as fases de vida do mosquito, desde o ovo até a fase adulta. Scholte, et al. (2004) em estudos preliminares demonstraram a importância de uma variedade de gêneros fúngicos como *Lagenidium*, *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Culicinomyces*, *Beauveria* e *Metarhizium* para serem usados como agentes de controle biológico de mosquitos, sendo que as espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* têm maior potencial para serem utilizadas no controle de vetores de doenças.

Uma das maiores preocupações na utilização destes entomopatógenos é a capacidade do fungo em manter a persistência e virulência em ambientes estressantes como na presença de radiação ultravioleta e em temperaturas elevadas (Howard et al., 2010). Rangel et al., (2005) mostraram que fatores ambientais como radiação UV, temperatura e umidade interferem na germinação e viabilidade dos conídios os tornando inviáveis no controle de insetos. Para melhorar o desempenho dos fungos diante desses eventos adversos, estudos demonstraram que a utilização de aditivos em formulados de conídios pode auxiliar o fungo a manter sua viabilidade e persistência no ambiente, sem afetar o seu crescimento (Rangel et al., 2005; Carolino et al., 2014; Gomes et al., 2015; Paula et al., 2019).

As formulações de conídios com diferentes tipos de óleo protegem os fungos das radiações ultravioletas, altas temperaturas, baixa umidade e ainda melhoram a interação entre a superfície do conídio e a cutícula hidrofóbica dos insetos, potencializando a adesão e assim criando condições favoráveis para a infecção (Alves & Faria, 2010).

Paula et al. (2019) utilizando uma combinação do fungo *M. anisopliae* com óleo de nim, em simulação de campo, verificaram que a formulação aumentou a meia vida e a virulência do fungo. Além disso, verificaram também que o óleo protegeu o fungo dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta.

### 2.9.1 Infecção de ovos de mosquitos com fungos

Um dos primeiros estudos com ovos, Clark et al. (1968) avaliaram a eficiência do fungo *B. bassiana* em infectar ovos de *Aedes* e *Culex*. Foi verificado que *B. bassiana* não mostrou ser eficiente para infectar ovos das duas espécies quando foram pulverizados com conídios secos do fungo. Os resultados mostraram que 100% das larvas eclodiram após 14 dias de exposição ao fungo.

Diferente de Clark et al. (1968), Russel e colaboradores (2001) obtiveram melhores resultados em experimentos de campo utilizando o fungo *Penicillium citrinum* contra ovos de *A. aegypti*. Eles observaram que houve crescimento somente de *P. citrinum* nos ovos quando esses foram mantidos em ambientes fechados. Sugeriram que as micotoxinas produzidas pelo fungo provavelmente possuem um efeito antibiótico inibindo assim o crescimento de outros micróbios, como bactérias e protozoários, que podem ser patogênicos para os ovos do mosquito e, sugeriram também que o *P. citrinum* poderia ser candidato como possível agente de controle natural de mosquitos.

Luz et al. (2007) verificaram que os fungos *Paecilomyces*, *Isaria*, *Penicillium* e *Metarhizium* apresentaram atividade ovicida em *A. aegypti* após 25 dias de exposição aos fungos quando mantidos em umidade relativa (UR) acima de 70%. Albernaz et al. (2009) também observaram que o fungo *M. anisopliae*, quando formulado em óleo vegetal, foi altamente virulento contra ovos de *A. aegypti* em UR  $\geq$  98%. Em outro estudo, conídios de *M. anisopliae* formulados em água precisaram de longos períodos ( $\geq$  15 dias) para apresentar alta atividade ovicida (Santos et al., 2009).

Leles e colaboradores (2012) demonstraram em laboratório a infecção de ovos de *A. aegypti* em solos contaminados com o isolado IP 46 do fungo *M. anisopliae* em UR  $\geq$  98%. Os resultados deste trabalho mostraram que 53% dos ovos apresentaram desenvolvimento externo de micélios e conídios após 15 dias de incubação. As larvas que eclodiram desses ovos morreram e, eventualmente, a presença do fungo foi observada em seus corpos (Leles et al., 2012).

### 2.9.2 Infecção de larvas e pupas de mosquitos com fungos

A atividade larvicida foi observada em estudos utilizando o fungo *B. bassiana* contra larvas de *Culex tarsalis*, *Culex pipiens*, *Aedes albimanus*, *A. aegypti*, *Aedes sierrensis*, e *Aedes nigromaculis*. Clark et al. (1968) avaliaram que conídios secos de *B. bassiana* pulverizados na superfície da água foram eficientes em matar larvas dessas espécies de mosquitos. Verificaram também que larvas de *Anopheles* e *Culex* foram mais susceptíveis ao fungo do que as larvas de *Aedes* (Clark et al., 1968). Daoust & Roberts (1982) infectaram larvas de *A. aegypti*, *C. pipiens* e *A. stephensi* usando isolados do fungo *M. anisopliae* onde a virulência aumentou significativamente quando as larvas entravam em contato com o fungo por meio do sifão respiratório.

Pereira et al. (2009) avaliaram em laboratório a atividade entomopatogênica de oito isolados de *M. anisopliae* e dois isolados de *B. bassiana* no controle de formas imaturas do mosquito *A. aegypti*. Foi observado que dois isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 818 e CG 144) e um isolado de *B. bassiana* (CG 24) foram mais virulentos apresentando altas taxas de mortalidade em larvas de *A. aegypti*. Observaram também que 20% das larvas expostas à infecção fúngica originaram pupas que não completaram seu ciclo de desenvolvimento.

Conídios dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* formulados com óleo emulsificante (ShellSol T<sup>®</sup>) tiveram uma eficácia aumentada contra larvas de *A. gambiae* e *A. stephensi* resultando em altas taxas de mortalidade. Além disso, as formulações foram mais resistentes em condições de campo no Quênia (Bukhari et al., 2011).

Conídios do fungo *M. anisopliae* aderidos em arroz também foram utilizados em experimentos para controle de larvas de *A. aegypti* em laboratório. Paula et al. (2013a) observaram que a aplicação de 20 grãos de arroz com conídios do fungo *M. anisopliae* em água reduziram significativamente a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (5% de sobrevivência) quando comparado com a aplicação de 10 grãos de arroz do fungo que resultou em 52% de sobrevivência.

Veys-Behbahani et al. (2014) avaliaram a patogenicidade de *B. bassiana* contra estágios larvais de *Anopheles stephensi*. Eles verificaram que não houve diferença significativa da taxa média de mortalidade de larvas de *A. stephensi* expostas a uma suspensão fúngica de *B. bassiana* na concentração de  $1 \times 10^9$  ou  $5 \times 10^8$  resultando em 100% da mortalidade das larvas em 48h. Ong'Wen e colaboradores (2020) observaram em estudos de laboratório que houve uma redução significativa na taxa de sobrevivência de larvas de *Anopheles gambiae* quando expostas simultaneamente a conídios do fungo *B. bassiana* e na presença de ninfas do predador natural de *A. gambiae* (libélula *Pantala flavescens*).

Carolino et al. (2019) demonstraram, pela primeira vez, a infecção de pupas de *A. aegypti* por propágulos do fungo *M. anisopliae*. No estudo foi observado que blastosporos do fungo resultaram em uma diminuição de 100% da taxa de sobrevivência das pupas em 24h de exposição.

### 2.9.3 Infecção de adultos de mosquitos com fungos

Além das formas imaturas, a utilização de fungos entomopatogênicos contra mosquitos adultos vetores de doenças vem sendo estudada como uma alternativa para a diminuição do uso de inseticidas, principalmente em países onde há falta de saneamento básico, o nível de desenvolvimento urbano é lento e que doenças emergentes e reemergentes são constantes (Scholte et al., 2004; Blanford et al., 2005; Farenhorst et al., 2008).

Clark et al. (1968) em testes laboratoriais verificaram que conídios secos de *B. bassiana* causaram 100% de mortalidade em adultos dos mosquitos *C. tarsalis*, *C. pipiens*, *A. aegypti*, *A. sierrensis*, *A. nigromaculis* e *A. albimanusem* em 5 dias após exposição ao fungo.

A virulência de diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi avaliada em laboratório por Paula et al. (2008) contra fêmeas de *A. aegypti*. Os isolados formulados com óleo vegetal foram virulentos contra *A. aegypti* causando entre

70% a 89% de mortalidade com um tempo médio de sobrevivência dos mosquitos entre 3 e 5 dias.

Ensaio de laboratório avaliaram que fêmeas de *A. gambiae* infectadas com o fungo *M. anisopliae* passavam a infecção fúngica para os machos da mesma espécie no momento da cópula. Possivelmente, os machos infectados disseminam o fungo para fêmeas não infectadas (Scholte et al., 2004). García Munguía et al. (2011) também demonstraram que os mosquitos machos de *A. aegypti* infectados com *B. bassiana* transmitem o fungo para as fêmeas durante o comportamento de acasalamento, causando 90% de mortalidade dos mosquitos em 15 dias.

Vários estudos demonstraram que *M. anisopliae* e vários outros fungos entomopatogênicos, além de causar mortalidade significativa dos insetos exibem propriedades que alteram a procura por alimentação sanguínea. Na verdade, as alterações nas taxas de alimentação são um dos primeiros sintomas evidentes em hospedeiros infectados (Hajek e St. Leger, 1994). Essas propriedades são provavelmente devido às chamadas destruxinas, secretadas pelo fungo (Amiri et al., 1999).

Blanford e colaboradores (2005) observaram que formulações à base de óleos minerais (ShellSol T<sup>®</sup> e Ondina EL<sup>®</sup>) do entomopatógeno fúngico *B. bassiana* reduziu significativamente a sobrevivência das fêmeas de *A. stephensi* alimentadas com sangue. Verificaram também que a maturação do protozoário *Plasmodium chaboudi* foi prejudicada e, observaram uma redução no repasto sanguíneo das fêmeas de *Anopheles*. Fêmeas de *A. gambiae* infectadas com conídios do fungo *M. anisopliae* formulados com óleo de girassol também apresentaram uma redução significativa na alimentação de sangue e fecundidade. Fêmeas de *A. gambiae* reduziram pela metade a procura por sangue quando infectadas com fungo na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL<sup>-1</sup>. Além disso, as fêmeas infectadas produziram menos ovos por ciclo gonotrófico e tiveram menor fecundidade durante a vida (Scholte et al., 2006).

Em outro experimento de laboratório, Scholte et al. (2007) avaliaram que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* foi altamente virulento contra machos e

fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Os resultados demonstraram que uma média de 87% de *A. aegypti* e 89% de *A. albopictus* foram infectados com o fungo.

Segundo Paula e colaboradores (2011a), a combinação de *M. anisopliae* com baixa concentração do inseticida imidacloprid (IMI) diminuiu significativamente a sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou com sangue (Paula et al., 2013b). Carolino et al. (2014) registraram a eficiência da combinação do fungo *M. anisopliae* com óleo de girassol ou com óleo sintético isoparafina verificando a redução da taxa de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*.

#### 2.9.4 Armadilhas impregnadas com fungo para atração e infecção de mosquitos adultos

A utilização de patógenos fúngicos para infectar insetos no campo precisa de uma superfície adequada para que somente o inseto alvo seja infectado (Alves, 1998). Os fungos entomopatogênicos têm uma vantagem em que podem ser associados a outras estratégias de controle dos mosquitos vetores.

Vários trabalhos mostraram que superfícies impregnadas com fungo foram atrativas e eficientes para reduzir as taxas de sobrevivência dos mosquitos como panos de algodão, cortinados, potes de barro, entre outros. (Hecht et al., 1963; Mmbando et al., 2015; Scholt et al, 2005; Paula et al 2008; Lwetoijera et al., 2010; Silva et al., 2017).

Scholte et al. (2005) em ensaios de campo de pequena escala utilizaram panos pretos impregnados com *M. anisopliae* fixados em habitações humanas na Tanzânia para o controle de adultos do mosquito *A. gambiae*. Os resultados mostraram que 23% dos mosquitos capturados estavam infectados com o fungo que, conectado a um modelo de transmissão da malária, previu uma redução de 75% na intensidade da transmissão da doença.

Panos pretos impregnados com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* formulados com óleo de girassol e pendurados em gaiolas foram eficientes em atrair os mosquitos e diminuir a taxa de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*.

Foi obtida alta infectividade dos mosquitos, com 70% na redução da sobrevivência (Paula et al., 2008). Formulações do fungo *M. anisopliae* com óleo mineral também foram eficientes em infectar fêmeas de mosquito da espécie *A. gambiae*, resultando em 100% de mortalidade em nove dias de infecção (Mnyone et al., 2009).

Em outro experimento na Tanzânia, Mnyone et al. (2010) testaram os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* formulados com óleo de girassol e aplicados em painéis de barro (simulando paredes de casas tradicionais da Tanzânia) ou em panos pretos de algodão ou telas de poliéster contra o vetor da malária *A. gambiae*. Este grupo verificou que todos os tratamentos com fungos causaram um aumento significativo da mortalidade dos mosquitos expostos, diminuindo com o tempo desde a aplicação do fungo (Mnyone et al., 2010).

Outra estratégia interessante de aplicação do fungo testada no campo por Lwetoijera et al. (2010) foi a utilização de uma caixa de madeira em forma de cabana. Dentro da caixa foi colocado pano preto impregnado com *M. anisopliae* formulado com óleo mineral e um atraente sintético composto por ácidos carboxílicos, amônia e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para atrair e infectar fêmeas de *A. arabiensis*. Os mosquitos que entravam na armadilha pousavam no pano preto e se infectavam com o fungo. O teste resultou em 95% de mortalidade dos mosquitos em 14 dias.

Mnyone et al. (2012) testaram vários métodos intradomiciliares utilizando fungo entomopatogênico na Tanzânia: em telhas revestindo o beiral de residências, pano preto de algodão no beiral, pano preto inclinado no beiral, painel de pano de algodão e tiras de pano preto ao redor da cama do hospedeiro. Estes métodos resultaram em uma redução de 39-57% na sobrevivência dos mosquitos *Anopheles* que pousavam nessas superfícies.

Em experimentos utilizando uma caixa de acrílico, Paula et al. (2013c) verificaram que panos pretos impregnados com o fungo *M. anisopliae* não repeliram mosquitos *A. aegypti*. Este grupo concluiu 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, o que pode ter ocorrido devido à redução da atividade de vôo.

Carolino et al., (2014) testaram a persistência de conídios de *M. anisopliae* formulados com óleo vegetal ou com óleo sintético (isoparafina) impregnados em panos pretos contra fêmeas de *A. aegypti*. Verificaram que os conídios do fungo permaneceram viáveis apresentando de 28 a 60% de sobrevivência dos mosquitos mesmo quando os panos foram mantidos em uma varanda de 2 a 18 dias sob condições naturais.

Outra armadilha impregnada com esporos do fungo *M. anisopliae* também formulado com óleo mineral foi desenvolvida por Mmbando et al. (2015) para infectar fêmeas do mosquito *A. arabiensis* em condições de semicampo. Este experimento resultou em 69% dos mosquitos contaminados com fungo, sendo 43% capturados dentro da armadilha com auxílio de um aspirador e 26% nas paredes da câmara de semicampo. A visualização do crescimento de hifas nos cadáveres dos mosquitos foi utilizada para avaliar a taxa de mosquitos contaminados pelo fungo, sendo monitorados individualmente até a morte.

Silva e colaboradores (2017) desenvolveram uma armadilha feita de garrafa PET transparente e pano preto de algodão impregnado com fungo para infecção de adultos de *A. aegypti*. Nesse estudo foi verificado que exposição dos mosquitos ao pano preto impregnado com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* diminuiu a taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* em condições de laboratório. A associação de um atraente sintético AtrAedes® a armadilha PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* aumentou a eficácia da armadilha com menor sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* quando testada em condições de semicampo (Paula et al., 2018). Panos pretos impregnados com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* são eficientes para serem utilizados em armadilhas para controle de mosquitos adultos (Paula et al., 2013a; Paula et al., 2013b; George et al., 2013; Silva et al., 2017).

Uma armadilha que combina um fungo entomopatogênico, inseticida e atraente está sendo comercializada em mais de 25 países pela “In2Care” (<http://www.in2care.org/>; Holanda). Os mosquitos são atraídos para a armadilha

por um atraente (usando comprimidos de levedura), se infectam com *B. bassiana* e se contaminam com um larvicida sintético (piriproxifeno), sendo altamente eficiente para redução de larvas e adultos de *A. aegypti* (Snetselaar et al., 2014).

Buckner et al. (2017) concluíram que a presença da atraente de oviposição na armadilha In2Care foi eficiente para as fêmeas grávidas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* e, as larvas que eclodiram na armadilha foram mortas com piriproxifeno. No entanto, como visto anteriormente, a utilização de inseticidas pode levar ao surgimento de mosquitos resistentes (Schaefer e Mulligan, 1991).

A literatura é carente quando se trata de armadilhas de oviposição que controle mais de uma fase de vida de mosquitos vetores de doenças. Portanto, este trabalho investiga a associação de fungos entomopatogênicos em ovitrampas para infectar as fêmeas no ato de oviposição ou descanso e reduzir as taxas de sobrevivência de mosquitos. As ovitrampas também podem ser usadas para avaliar as infestações de *Aedes* sp. e talvez o fungo poderia reduzir a viabilidade dos ovos postos no papel impregnado com fungo.

### 3. HIPÓTESES

Armadilhas ovitrampas forradas com papel camurça impregnado com fungo são eficientes para infectar fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* durante o ato de oviposição ou descanso.

### 4. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver uma armadilha para infectar fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* quando pousam em superfícies impregnadas com fungo para ovipositar ou descansar.

#### 4.1 Objetivos específicos

- Avaliar se o óleo de girassol ou óleo vegetal interferem no crescimento radial e produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*;
- Verificar a preferência de oviposição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas ovitrampas revestidas com papel camurça de diferentes cores (vermelho, amarelo e azul) e papel camurça branco;
- Observar a taxa de sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, alimentadas com sacarose ou sangue, expostas ao papel camurça impregnado com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* formulado em óleo de girassol;
- Avaliar se papel camurça impregnado com fungo entomopatogênico em armadilhas de oviposição diminui a taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sangue.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram realizados no insetário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense (LEF/CCTA/UENF).

### 5.1 Coleta, criação e manipulação dos mosquitos

A coleta dos ovos dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* foi realizada utilizando ovitrampas (feitas de um vaso de plástico preto de 12 x 12 x 11 com capacidade para 700 ml, com quatro palhetas de eucatex de 3 x 12 cm e 300ml de água de torneira). As ovitrampas foram colocadas por 5 dias no campus da UENF, em lugares sombreados, embaixo de árvores e arbustos.

Posteriormente, as palhetas foram levadas para o laboratório e postas sobre a bancada para secar por 48 horas à temperatura ambiente. Com o auxílio de uma Lupa (marca Labomed) as palhetas foram verificadas quanto à presença de ovos. As palhetas com ovos foram imersas em bandejas de 500ml com 300ml de água + 0,5g de ração do camundongo (marca: Nuvilab) para alimentação das larvas pós-eclosão.

As pupas foram transferidas para um copo descartável contendo água e colocadas dentro de um pote de plástico de 30 x 20 x 20 cm, recoberto com tecido organza branco, mantido à temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 75% de umidade relativa (UR) e 12 h de fotoperíodo até a emergência dos mosquitos adultos.

Os adultos foram alimentados utilizando um alimentador artificial com sacarose 10%. Um aquecedor (Britânia AB 1500) foi usado para manter uma temperatura ideal (máxima:  $31^{\circ}\text{C}$ , mínima:  $22.5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa máx.: 90.2% min.: 30.8%) na sala de criação dos mosquitos.

Para manipulação dos mosquitos, fêmeas de 2 a 3 dias de idade foram adormecidas por 30 segundos com uma corrente de  $\text{CO}_2$  e transferidas com auxílio de uma pinça para um gerbox (11 x 11 x 3.5 cm) colocado em cima de uma placa fria (53 x 33.5 x 6 cm) com área de resfriamento de (49 x 29,2 cm).

As fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram identificadas através da observação visual de características morfológicas de cada espécie com o auxílio de uma lupa de mesa com iluminação LED (Estek®) conforme Alves, (1998).

## 5.2 Cultivo dos conídios de *Metarhizium anisopliae*

Dois isolados de *Metarhizium anisopliae* foram utilizados nos testes. O isolado ESALQ 818 foi obtido da coleção da ESALQ em Piracicaba (São Paulo), onde a alta virulência contra a fase larval e fase adulta de *A. aegypti* já havia sido demonstrada por Pereira et al. (2009).

O isolado LEF 2000 foi obtido de uma amostra de solo em Campos dos Goytacazes – RJ e, é mantido na coleção de fungos do Setor de Patologia de Insetos da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Sua virulência contra pupas de *A. aegypti* foi demonstrada por Carolino et al. (2019).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido BDA (batata, dextrose, ágar) e, armazenado por duas semanas a 27°C em câmara climatizada marca EletroLab (BOD). Para a produção em massa dos isolados, Erlemeyers de 250ml contendo 25g de arroz parboilizado cru + 10ml de água destilada foram fechados com algodão, autoclavados durante 20 minutos a 1 atm (121°C), deixados à temperatura ambiente por 12 horas e depois semeados com conídios do fungo.

Os Erlemeyers com arroz e fungo foram mantidos a 27°C em BOD por 15 dias para desenvolvimento do fungo. Posteriormente, os conídios foram separados dos grãos do arroz usando uma máquina separadora de esporos (Mycoharvester®).

A concentração dos conídios secos para ser utilizado em cada teste foi estimada em hemocitômetro (câmara de Neubauer). As suspensões fúngicas foram preparadas utilizando 0,05% de Tween 80 (TW) (com 99,95% de água destilada v/v) e vigorosamente misturadas usando um vórtex antes de serem usadas nos bioensaios.

### **5.3 Bioensaio 1 – Avaliação do efeito do óleo de girassol ou óleo vegetal (Natur'l oil®) no crescimento radial e produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***

Nesse experimento conídios dos Isolados ESALQ 818 e LEF 2000 na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  foram formulados em óleos de girassol (Sinhá) e óleo vegetal (Natur'l óleo®; Stoller Ltda; com 93,0% v/v de óleo vegetal) nas concentrações de 1, 5 e 10% v/v. O tratamento controle foi feito com fungo + TW.

As suspensões dos isolados com ou sem óleo foram mantidas à temperatura ambiente por até 30 dias na ausência de luz (máxima 31°C e mínima 23°C). Decorridos 0, 3, 15 e 30 dias, as suspensões foram vigorosamente agitadas usando um vórtex e foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cada suspensão. As alíquotas foram adicionadas em placas de Petri contendo meio sólido BDA previamente autoclavado a 121° C, por 20 minutos a 1 atm.

As placas foram incubadas em câmara climatizada a 27°C e  $70 \pm 10\%$  UR. Foram utilizadas três placas para cada tratamento, totalizando três parcelas. Diariamente, com auxílio de uma régua, foi avaliado o crescimento radial (mm) do fungo durante o período de 10 dias.

Para avaliar a produção de conídios, ao final do décimo dia do crescimento radial, três discos medindo 5 mm de raio com esporos do fungo foram retirados aleatoriamente de cada placa (colônia), colocados em Eppendorf com 1 mL de TW e vigorosamente misturados com auxílio de um vórtex até que todos os esporos se desprendessem do meio sólido e obtivesse, ao final do processo, uma suspensão fúngica. A concentração dos conídios suspensos foi avaliada utilizando câmara de Neubauer.

A concentração do óleo que não influenciou negativamente o crescimento radial e a produção de conídios foi utilizada nos ensaios seguintes.

#### **5.4 Bioensaio 2 – Verificação da preferência de oviposição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* quando oferecidas armadilhas ovitrampas revestidas com papel camurça de diferentes cores**

Nesse experimento, as fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram alimentadas com sangue de camundongo da espécie Balb/c, preso em uma malha de arame e exposto aos insetos por 1 hora conforme aprovação do comitê de Ética da UENF (Protocolo CEUA 248). Foram utilizadas nos experimentos somente fêmeas com o abdome estendido cheio de sangue. As fêmeas foram alimentadas uma vez com sangue e depois diariamente com sacarose 10%. Foram mantidas dentro de gaiolas cobertas com tecido organza branco por 48 h antes do início dos testes.

Após 48 h da digestão sanguínea as fêmeas foram separadas e utilizadas no teste para avaliar a preferência aos locais de oviposição com diferentes cores. Quatro cores do papel camurça foram utilizadas como superfície para oviposição (vermelho, amarelo, azul e branco).

Ovitrampas com 300 ml de água em seu interior foram preparadas para este experimento. Cada ovitrampa foi internamente forrada na parte superior com papel camurça medindo 10 x 35 cm (Figura 4-A). O papel camurça foi esterilizado em autoclave durante 20 min a 1 atm (121°C). O experimento foi realizado dentro de duas caixas de acrílico, medindo 100 x 51 x 61 cm (Figura 4-B).

As caixas de acrílico permaneceram em uma sala com uma janela (120 x 40 cm), sob luz natural de aproximadamente 6:00 h às 17:00 h, com temperatura e UR monitoradas com um aparelho Termo-higrômetro (máxima 31°C, mínima 23°C e UR máx.: 90.4% mín.: 30.8%).

As partes frontais e superiores das caixas são feitas de acrílico transparente onde, a parte superior foi revestida com um pano de forma que a luz incidisse de forma indireta em seu interior. Nas laterais da caixa de acrílico há uma abertura de 30 cm<sup>2</sup> revestida por uma tela por onde passa uma corrente de ar (Figura 4-B).

Um total de 10 fêmeas, 48 h pós-alimentação sanguínea, foram liberadas em cada uma das caixas de acrílico. Os mosquitos ficaram expostos ao mesmo tempo às quatro ovitrampas com papel camurça de diferentes cores por 7 dias.

As ovitrampas foram espalhadas nos quatro cantos da caixa de forma aleatória por sorteio em cada repetição. Três repetições para o tratamento foram realizadas. Durante todo o experimento, os mosquitos vivos se alimentaram com sacarose a 10% em um alimentador artificial.

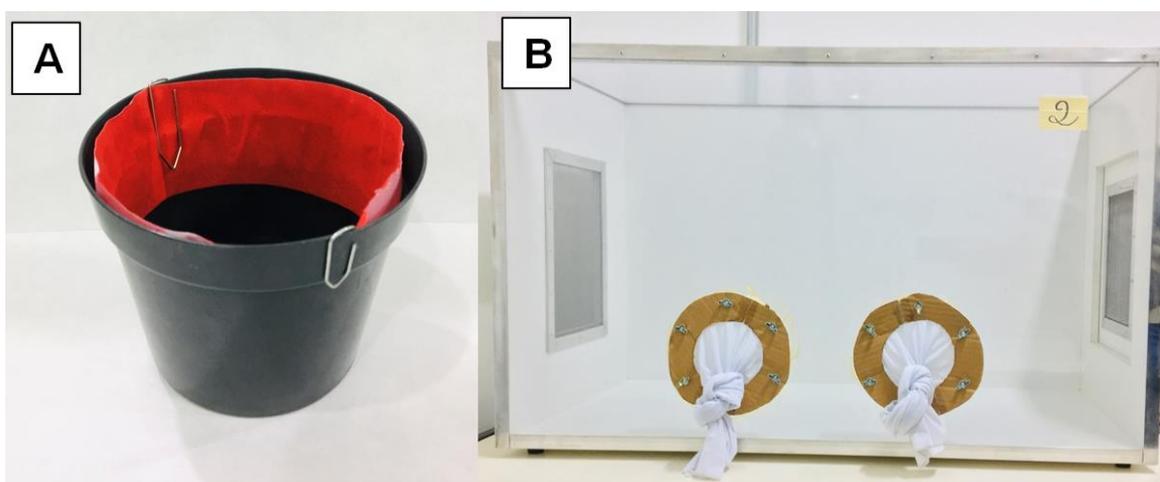


Figura 4 – A) Papel camurça vermelho revestindo a parede interna da ovitrampa. B) Caixa de acrílico (100 x 51 x 61 cm) utilizada nos experimentos.

Após o sétimo dia do experimento as ovitrampas foram retiradas das caixas de acrílico e o papel foi colocado para secar. Com o papel seco os ovos foram contabilizados com o auxílio de uma lupa (marca Labomed).

A presença de ovos de mosquitos nas ovitrampas foi utilizada para determinar qual a cor do papel camurça atraiu mais as fêmeas de mosquitos para ovipositar. A cor do papel camurça na ovitrampa que apresentou a maior porcentagem de ovos contabilizados foi utilizada nos Bioensaios 3 e 4.

### **5.5 Bioensaio 3 – Sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, alimentadas com sacarose ou sangue, expostas ao papel camurça impregnado com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***

No teste anterior, por apresentar maior número de ovos de *Aedes*, o papel camurça vermelho foi selecionado para dar continuidade aos testes. No presente experimento o papel camurça vermelho foi impregnado com os isolados ESALQ 818 ou LEF 2000, com ou sem 1% de óleo de girassol.

Dois métodos de aplicação da formulação do fungo com ou sem óleo de girassol foram testados: pulverizando a formulação no papel via torre de Potter (Burkart Ltd. UK) ou pincelando a formulação com pincel (Condor ½ polegada) diretamente no papel.

Papel camurça vermelho medindo 7 cm<sup>2</sup> de diâmetro foi esterilizado em autoclave durante 20 min a 1 atm (121°C) e, em seguida pulverizado ou pincelado com 2 mL da suspensão de *M. anisopliae* de cada um dos dois lados separadamente (isolados ESALQ 818 e LEF 2000) na concentração de 1x10<sup>9</sup> conídios mL<sup>-1</sup> formulados com ou sem o óleo de girassol.

A concentração final de conídios dos isolados nos papéis foi em média 1,5 x 10<sup>8</sup> conídios/cm<sup>2</sup> (pincelado com ou sem óleo) e 2,3 x 10<sup>6</sup> conídios/cm<sup>2</sup> (pulverizado com ou sem óleo). Isso foi estimado removendo 1 cm<sup>2</sup> do papel e ressuspendendo os conídios em Tween 80 e a concentração de conídios foi então determinada usando um hemocitômetro.

Posteriormente, o papel camurça foi pendurado em um varal de chão para secar e mantido em uma sala do insetário em condições ambientais por 16 h. Após esse período de tempo, o papel foi colocado no sentido vertical dentro de um pote de plástico transparente de 12 x 7 cm, coberto com tecido organza branco.

Dez fêmeas de *A. aegypti* ou *A. albopictus* foram colocadas em cada pote de plástico com camurça + fungo. Três potes de plástico com camurça + fungo (isolado ESALQ 818 ou LEF 2000) formulados com ou sem óleo de girassol foram

preparados totalizando 30 fêmeas alimentadas com sacarose ou sangue por repetição, para cada espécie. Três repetições de cada tratamento foram realizadas totalizando 90 mosquitos por grupo de tratamento.

O tratamento controle foi feito utilizando papel camurça com ou sem óleo de girassol, mas sem a presença do fungo. A alimentação dos mosquitos durante o experimento ocorreu através de um papel filtro sobre o tecido organza umedecido diariamente com sacarose a 10%.

Os mosquitos permaneceram expostos ao papel camurça + fungo por 48 h. Após esse período o papel foi retirado do pote. A avaliação de sobrevivência foi realizada diariamente por 7 dias após o início do teste.

#### **5.6 Bioensaio 4 – Sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* alimentadas com sangue e expostas a superfícies impregnadas com fungo entomopatogênico em armadilhas de oviposição**

Esse experimento seguiu a metodologia do preparo das ovitrampas utilizadas no item 5.4 e avaliou se fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue e expostas a ovitrampas revestidas de papel camurça impregnado com fungo apresentaram menores taxas de sobrevivência comparado com testes controle.

Tiras de papel camurça vermelho ou preto medindo 10 x 35 cm foram esterilizadas em autoclave durante 20 min a 1 atm (121°C) e, em seguida, cada tira de papel foi pincelada com 8 ml da suspensão de *M. anisopliae* na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios mL<sup>-1</sup> formulado com ou sem o óleo de girassol na concentração de 1%, para cada isolado (ESALQ 818 ou LEF 2000).

Posteriormente, o papel camurça foi pendurado em um varal de chão para secar e mantido em uma sala em condição ambiente por 16 h. Após o tempo de secagem o papel camurça foi colocado de forma a revestir a parede interna da ovitrampa, servindo como uma superfície para oviposição (Figura 4-A).

O experimento foi realizado utilizando-se duas caixas de acrílico (100 x 51 x 61 cm) com duas ovitrampas revestidas igualmente com o papel camurça das cores

vermelho ou preto, dispostas separadamente, em seu interior. No total 30 fêmeas de *A. aegypti* ou *A. albopictus*, manipuladas conforme item 5.1, foram utilizadas em cada tratamento (tratamentos utilizando o fungo ou tratamento controle sem a utilização do fungo).

Fêmeas de ambas as espécies foram alimentadas com sangue de camundongo Balb/c 48 h antes do início do experimento. As fêmeas que não foram alimentadas com sangue antes do início dos experimentos foram utilizadas para os testes com sacarose.

Após o início dos testes, as fêmeas na caixa de acrílico foram alimentadas com sacarose 10% em um alimentador artificial. Três repetições para cada tratamento foram realizadas. As fêmeas de ambas as espécies foram expostas às ovitrampas com papel camurça por 48 h. A avaliação da sobrevivência das fêmeas foi feita diariamente por 7 dias após o início do teste.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes de crescimento radial e produção de conídios foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan. A homogeneidade dos testes foi feita usando o teste de Log-Rank (Elandt-Johnson et al, 1980). Aos resultados dos testes de preferência de oviposição foram agrupados em porcentagem no Excel e comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan. As comparações das médias de sobrevivência dos mosquitos foram calculadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan. O tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) foi calculado pelo método de Kaplan-Meier (Blanford et al., 2005). As curvas de sobrevivência foram comparadas utilizando o teste de Log-Rank. Os resultados foram agrupados para análise da curva de sobrevivência, percentual da sobrevivência e desvio padrão. A análise de variância foi realizada no software IBM SPSS® statistics 27 e as curvas de sobrevivência foram feitas no software GraphPad Prism® 8.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Bioensaio 1: Avaliação dos efeitos do óleo de girassol ou óleo vegetal (Natur'l oil®) no crescimento radial e produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

Os isolados ESALQ 818 e LEF 2000 foram formulados em 1%, 5% e 10% do óleo de girassol e óleo vegetal para avaliar se haveria influência no crescimento radial das colônias e na produção de conídios quando comparados com os tratamentos controle (dos isolados formulados somente com Tween). Além disso, foi verificado se as mesmas formulações permaneceriam viáveis por até 30 dias na bancada.

#### 7.1.1 Crescimento radial do isolado ESALQ 818 formulado em óleo de girassol e óleo vegetal

Nos testes em que as suspensões de conídios + TW ou conídios + óleo de girassol foram preparadas e testadas imediatamente (dia zero), os conídios do isolado ESALQ 818 formulados em 1% do óleo de girassol apresentaram um crescimento radial maior que o tratamento controle, 34 mm e 31 mm, respectivamente. A formulação do mesmo isolado com 5% ou 10% de óleo de Girassol apresenta valores de crescimento radial de 29 mm e 29 mm, respectivamente, significativamente menor comparado com o valor do crescimento radial do tratamento controle (conídios sem óleo vegetal) que apresentou 31 mm [ $F_{(3,11)} = 50,222$ ;  $P < 0,001$ ; Tabela 1].

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações do óleo de girassol e óleo vegetal no crescimento radial (mm)  $\pm$  Desvio Padrão do fungo *Metarhizium anisopliae*, isolados ESALQ 818 no décimo dia de avaliação do teste.

		Dias Após o Preparo			
Tratamento		0 Dias	3 Dias	15 Dias	30 Dias
Girassol	<b>Controle</b>	31 $\pm$ 1,3a	33 $\pm$ 1,4a	28 $\pm$ 1,2a	29 $\pm$ 1,3a
	1%	34 $\pm$ 1,4b	34 $\pm$ 1,4a	33 $\pm$ 1,4b	29 $\pm$ 1,3a
	5%	29 $\pm$ 1,3c	30 $\pm$ 1,3b	28 $\pm$ 1,3a	27 $\pm$ 1,2b
	10%	29 $\pm$ 1,3c	28 $\pm$ 1,2c	28 $\pm$ 1,2a	26 $\pm$ 1,2b
Natur'l Oil	<b>Controle</b>	31 $\pm$ 1,3a	33 $\pm$ 1,4a	28 $\pm$ 1,2a	29 $\pm$ 1,3a
	1%	31 $\pm$ 1,4a	30 $\pm$ 1,3b	30 $\pm$ 1,3b	27 $\pm$ 1,2b
	5%	31 $\pm$ 1,3a	30 $\pm$ 1,3b	29 $\pm$ 1,3a	25 $\pm$ 1,2c
	10%	32 $\pm$ 1,3a	30 $\pm$ 1,3b	29 $\pm$ 1,4a	25 $\pm$ 1,1c

Estatística feita em coluna separadamente para cada óleo. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade).

Quando as formulações do ESALQ 818 com ou sem óleo de girassol permaneceram na bancada por 3 dias, o crescimento radial do fungo formulado em 1% do óleo foi estatisticamente igual ao controle sem óleo (34 mm e 33 mm, respectivamente;  $p > 0,01$ ). Quando o mesmo isolado foi formulado em 5% e 10% do óleo de girassol, o crescimento radial do fungo foi menor (30 mm e 28 mm, respectivamente) e estatisticamente diferente do controle (33 mm) [ $F_{(3,11)} = 80,889$ ;  $P < 0,001$ ; Tabela 1].

Quando as formulações ficaram na bancada por 15 dias o crescimento radial do ESALQ 818 com óleo de girassol não foi prejudicado. O crescimento radial da formulação do fungo com 1% do óleo foi maior (33 mm) que o controle (28 mm). As concentrações de 5% e 10% do óleo de girassol formulado com o mesmo isolado apresentou valores do crescimento radial de 28 mm e 28 mm, respectivamente, estatisticamente iguais ao controle [ $F_{(3,11)} = 66,222$ ;  $P < 0,001$ ; Tabela 1].

Quando as formulações permaneceram na bancada por 30 dias, a concentração de 1% do óleo de Girassol formulado com ESALQ 818 apresentou um valor de crescimento radial estatisticamente igual ao controle sem o óleo (29 mm e 29 mm, respectivamente) ( $p>0,01$ ). O crescimento radial do fungo nas concentrações de 5% e 10% do óleo depois de 30 dias nessas condições foi significativamente menor (27 mm e 26 mm, respectivamente) que o controle (29 mm) [ $F_{(3,11)} = 38,222$ ;  $P<0,001$ ; Tabela 1].

A influência do óleo vegetal no crescimento radial do isolado ESALQ 818 nas concentrações de 1%, 5% e 10%, também foi verificada. A Tabela 1 demonstra que as formulações que foram preparadas e testadas imediatamente (zero dias) apresentaram crescimento radial (formulado em 1%, 5% ou 10% do óleo vegetal) estatisticamente igual (31 mm, 31 mm e 32 mm, respectivamente) quando comparado com o controle (31 mm;  $p>0,01$ ).

Quando a formulação do ESALQ 818 com Óleo vegetal permaneceu na bancada por 3 dias, independente da concentração usada do óleo, houve uma interferência negativa no crescimento radial do fungo apresentando valores menores e estatisticamente diferentes quando comparados com o controle sem a presença do óleo [ $F_{(3,11)} = 34,222$ ;  $p<0,01$ ; Tabela 1].

Após 15 dias na bancada, ESALQ 818 na formulação com Óleo vegetal, o crescimento radial do fungo não foi prejudicado. A formulação do fungo com 1% do óleo vegetal teve um crescimento radial maior (30 mm) que o controle (28 mm). As formulações do fungo com 5% e 10% do óleo apresentou um crescimento radial estatisticamente igual do controle sem óleo (29mm, 29mm e 28mm, respectivamente) [ $F_{(3,11)} = 11,889$ ;  $p<0,01$ ; Tabela 1].

Quando as formulações ficaram na bancada por 30 dias, independente da concentração do óleo vegetal (1%, 5% ou 10%), o crescimento radial do isolado ESALQ 818 foi menor (27 mm, 25 mm e 25 mm, respectivamente) e estatisticamente diferente do controle (29 mm) [ $F_{(3,11)} = 129,00$ ;  $p<0,01$ ; Tabela 1].

### **7.1.2 Crescimento Radial do isolado LEF 2000 formulado em óleo de girassol e óleo vegetal**

Nos testes em que as suspensões de conídios + TW ou conídios + óleo de girassol foram testadas logo após a preparação (dia zero), o crescimento radial do isolado LEF 2000 formulado em 1% do óleo de Girassol apresentou valor estatisticamente igual ao controle sem óleo (33 mm e 33 mm, respectivamente) ( $p > 0,01$ ; Tabela 2). Os conídios do fungo formulados em 5% ou 10% de óleo de girassol apresentaram valores menores (31 mm e 31 mm, respectivamente) e estatisticamente diferentes quando comparados com o tratamento controle (33 mm) [ $F_{(3,11)} = 25,333$ ;  $P < 0,001$ ; Tabela 2].

Quando a formulação permaneceu na bancada por 3 dias, os conídios do LEF 2000 suspensos na concentração de 1% do óleo de girassol apresentaram um crescimento radial estatisticamente igual ao tratamento controle (32 mm e 32 mm, respectivamente) ( $p > 0,01$ ). As concentrações de 5% e 10% do óleo foram estatisticamente diferentes do controle apresentando crescimento radial menor (30 mm e 30 mm, respectivamente) e estatisticamente diferente do controle sem óleo (32 mm) [ $F_{(3,11)} = 33,33$ ;  $P < 0,001$ ; Tabela 2].

A permanência na bancada da formulação do LEF 2000 com 1%, 5% e 10% do óleo de girassol por 15 dias não afetou o crescimento radial do fungo. Mesmo sendo estatisticamente diferente pelo teste de Duncan, o crescimento radial do fungo com o óleo nessas concentrações foi maior (32 mm, 29 mm e 28 mm, respectivamente) quando comparado com o controle, que apresentou 26 mm de crescimento radial [ $F_{(3,11)} = 70,250$ ;  $P < 0,001$ ; Tabela 2].

Após 30 dias na bancada o isolado LEF 2000 formulado em 1% do óleo de girassol apresentou crescimento radial estatisticamente igual ao controle (27 mm e 28 mm, respectivamente) ( $p > 0,01$ ). As concentrações de 5% e 10% apresentaram crescimento radial menor (26 mm e 26 mm, respectivamente) e estatisticamente diferentes do controle sem a presença do óleo (28 mm) [ $F_{(3,11)} = 10,250$ ;  $P < 0,004$ ; Tabela 2].

A influência do óleo vegetal no crescimento radial do isolados LEF 2000 nas mesmas condições experimentais do óleo anterior também foi verificada. A Tabela 2 mostra que as formulações do isolado LEF 2000 com 1%, 5% e 10% do óleo vegetal assim que foram preparadas (dia zero) apresentaram crescimento radial do fungo menores e estatisticamente diferentes (31 mm, 30 mm e 30 mm, respectivamente) quando comparadas com o tratamento controle, sem o óleo (33 mm) [ $F_{(3,11)} = 17,222$ ;  $p < 0,01$ ; Tabela 2].

O óleo vegetal também influenciou no crescimento radial do fungo quando a formulação permaneceu na bancada por 3 dias. Os resultados mostram que os valores do crescimento radial do LEF 2000 formulado em 1%, 5% e 10% foram menores e estatisticamente diferentes (30 mm, 30 mm e 28 mm, respectivamente) do seu respectivo controle sem óleo (32 mm) [ $F_{(3,11)} = 25,00$ ;  $p < 0,01$ ; Tabela 2].

O tempo de permanência das formulações na bancada por 15 dias, independente da concentração utilizada do óleo vegetal promoveu o crescimento radial do fungo. O crescimento radial da formulação com 1%, 5% e 10% do óleo vegetal foi maior (31 mm, 31 mm e 30 mm, respectivamente) que o tratamento controle sem o fungo que apresentou 26 mm de diâmetro da colônia [ $F_{(3,11)}=81,222$ ;  $p < 0,01$ ; Tabela 2].

O maior tempo de permanência na bancada da formulação do isolado com 1%, 5% e 10% do óleo vegetal (30 dias) apresentou valores de crescimento radial menores e estatisticamente diferentes (26 mm, 25 mm e 25 mm, respectivamente) quando comparados com o tratamento controle sem óleo (28 mm) [ $F_{(3,11)}=11,333$ ;  $p < 0,003$ ; Tabela 2].

Tabela 2 – Efeito de diferentes concentrações do óleo de girassol e óleo vegetal no crescimento radial (mm)  $\pm$  Desvio Padrão do fungo *Metarhizium anisopliae*, isolados LEF 2000 no décimo dia de avaliação do teste.

	Tratamento	Dias Após o Preparo			
		0 Dias	3 Dias	15 Dias	30 Dias
Girassol	<b>Controle</b>	33 $\pm$ 1,4a	32 $\pm$ 1,5a	26 $\pm$ 1,4a	28 $\pm$ 1,2a
	<b>1%</b>	33 $\pm$ 1,6a	32 $\pm$ 1,5a	32 $\pm$ 1,4b	27 $\pm$ 1,2a
	<b>5%</b>	31 $\pm$ 1,4b	30 $\pm$ 1,3b	29 $\pm$ 1,4c	26 $\pm$ 1,3b
	<b>10%</b>	31 $\pm$ 1,4b	30 $\pm$ 1,3b	28 $\pm$ 1,5c	26 $\pm$ 1,1b
Natur'l oil	<b>Controle</b>	33 $\pm$ 1,4a	32 $\pm$ 1,5a	26 $\pm$ 1,4a	28 $\pm$ 1,2a
	<b>1%</b>	31 $\pm$ 1,3b	30 $\pm$ 1,3b	31 $\pm$ 1,5b	26 $\pm$ 1,2b
	<b>5%</b>	30 $\pm$ 1,3b	30 $\pm$ 1,3b	31 $\pm$ 1,6b	25 $\pm$ 1,1b
	<b>10%</b>	30 $\pm$ 1,3b	28 $\pm$ 1,2c	30 $\pm$ 1,6b	25 $\pm$ 1,1b

Estatística feita em coluna separadamente para cada óleo. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade).

### **7.1.3 Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* formulado com óleo**

Como verificado anteriormente a formulação dos isolados ESALQ 818 e LEF 2000 com uma concentração de 1% do óleo de Girassol (Tabela 1 e 2) foi a que mais apresentou semelhanças estatísticas do crescimento radial com seus respectivos controles sem o óleo, mostrando que essa concentração de óleo não afetou o crescimento radial dos isolados e poderia ser utilizada nos experimentos com papel camurça.

Um teste concomitante foi feito para verificar se a presença da concentração de 1% do óleo de girassol iria afetar também na produção de conídios de cada isolado.

A Figura 5 mostra a produção estimada de conídios quando o isolado ESALQ 818 e LEF 2000 foi formulado em óleo de girassol. Pode-se verificar que a formulação do isolado ESALQ 818 com 1% do óleo de girassol apresentou uma produção de conídios maior que o controle em todos os tempos em que a formulação permaneceu na bancada (Figura 5-A).

Quando o isolado LEF 2000 foi formulado em 1% do óleo de girassol os tratamentos apresentaram uma variação na produção estimada de conídios nos diferentes tempos em que o fungo permaneceu na bancada, quando comparados com o tratamento controle. A formulação que permaneceu na bancada por 0, 3 e 15 dias após o preparo apresentou valores de produção de conídios maiores ou próximos ao controle. Com 30 dias na bancada, a produção de conídios da formulação do fungo com óleo foi menor ( $8,53 \times 10^6$  conídios/mL<sup>-1</sup>) que a do controle ( $1,2 \times 10^7$  conídios/mL<sup>-1</sup>; Figura 5-B).

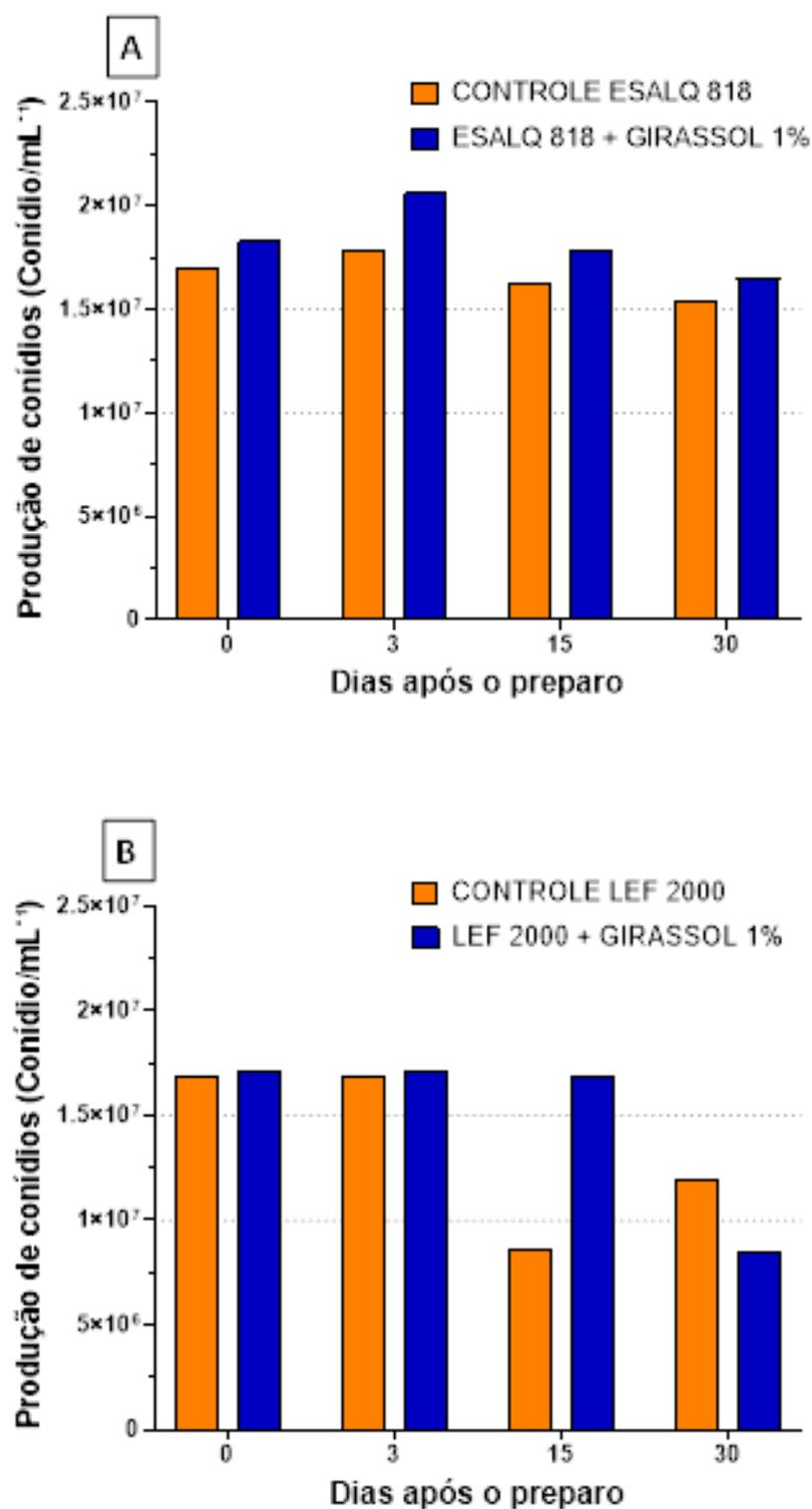


Figura 5 – Produção de conídios dos isolados ESALQ 818 e LEF 2000 do fungo *Metarhizium anisopliae* formulados em 1% do óleo de girassol. A) Produção de conídios do ESALQ 818 formulado em óleo de girassol; B) Produção de conídios do isolado LEF 2000 formulado em óleo de girassol.

## 7.2 Bioensaio 2: Preferência de oviposição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* quando expostas às armadilhas ovitrampas revestidas com papel camurça de diferentes cores

Este teste teve a finalidade de avaliar a preferência de oviposição das fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* utilizando ovitrampas revestidas com papel camurça de diferentes cores (vermelho, amarelo e azul) e um papel camurça branco. Um total de 1.727 ovos de *A. aegypti* e 2.200 ovos de *A. albopictus* foi coletado em todo o experimento.

Ovitrampas revestidas com papel camurça vermelho apresentaram taxa de coletas de ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* (83,8% e 83,2%, respectivamente) significativamente maiores [ $F_{(7,23)} = 96,72$ ;  $P < 0,001$ ], comparado com a taxa de coleta de ovos de mosquitos nas ovitrampas revestidas com papel camurça amarelo, azul e branco: 10,6%, 4,2% e 1,3% de ovos para *A. aegypti* e 10,5%, 4,5% e 1,8% para *A. albopictus*, respectivamente (Figura 6).

Por apresentarem significativamente maiores números de ovos, o papel camurça vermelho foi utilizado nos demais testes.

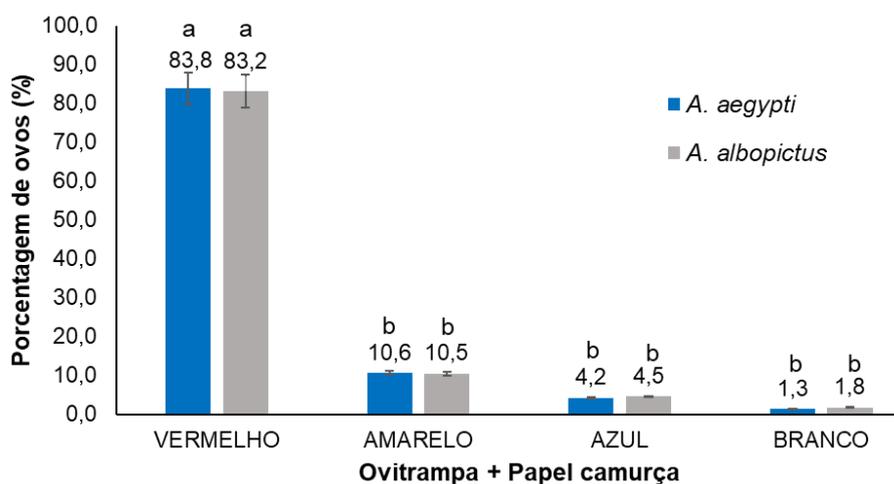


Figura 6 – Distribuição de ovos colocados por fêmeas de *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* quando oferecidas ovitrampas de três cores diferentes e o papel camurça branco. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade).

### **7.3 Bioensaio 3: Sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, alimentadas com sacarose ou sangue, expostas ao papel camurça impregnado com *Metarhizium anisopliae* formulado em óleo vegetal**

Neste experimento foi observada a eficiência do papel camurça vermelho impregnado com o fungo *M. anisopliae* isolado ESALQ 818 e LEF 2000 (formulado com óleo) para infectar e matar fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Duas formas de aplicação do fungo no papel foram realizadas, via pulverização direta e utilizando um pincel (pincelado).

#### *7.3.1. Patogenicidade e virulência do isolado ESALQ 818 contra fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* expostas ao papel camurça vermelho impregnado com fungo*

Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose expostas por 48 horas ao papel camurça pulverizado com ESALQ 818 + óleo de girassol apresentaram significativamente [ $F_{(3,11)}=469,833$ ] menor taxa de sobrevivência (51%), comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no papel camurça, entretanto sem uso de óleo (62% de sobrevivência dos mosquitos) (Tabela 3).

Quando as fêmeas de *A. aegypti* foram alimentadas com sangue e expostas ao papel camurça pulverizado com ESALQ 818 + óleo de girassol apresentaram taxa de sobrevivência de 58%, valor significativamente menor comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no papel camurça sem óleo de girassol (67%) (Tabela 3).

Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose expostas por 48 horas a papel camurça pincelado com ESALQ 818 + óleo de girassol na concentração de 1% apresentaram significativamente menor taxa de sobrevivência (27%), comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no papel camurça, entretanto sem óleo (30% de sobrevivência dos mosquitos) [ $F_{(3,11)}=469,83$ ;  $P<0,001$ ;Tabela 3].

Quando as fêmeas de *A. aegypti* receberam alimentação sanguínea e foram expostas ao papel camurça pincelado com fungo + óleo de girassol, apresentaram significativamente menor taxa de sobrevivência (36%), comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no papel camurça, entretanto sem óleo (40% de sobrevivência dos mosquitos) [ $F_{(3,11)}=349,33$ ;  $P<0,001$ ; Tabela 3].

Os tratamentos controles com e sem óleo de girassol apresentaram taxas de sobrevivência maiores que 92% (Tabela 3).

Tabela 3 – Sobrevivência final (%  $\pm$  DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas ao fungo *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818) impregnado via pulverização direta ou utilizando um pincel no papel camurça

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$
Controle sem óleo	93 $\pm$ 1.1 a	ND	96 $\pm$ 0.8 a	ND
Controle + óleo	92 $\pm$ 1.0 a	ND	93 $\pm$ 1.2 a	ND
ESALQ 818 Pulverizado	62 $\pm$ 2.3 b	ND	67 $\pm$ 1.4 b	ND
ESALQ 818 + óleo Pulverizado	51 $\pm$ 2.8 c	ND	58 $\pm$ 2.0 c	ND
ESALQ 818 Pincelado	30 $\pm$ 6.7 d	3	40 $\pm$ 5.5 d	4
ESALQ 818 + óleo Pincelado	27 $\pm$ 9.4 e	2	36 $\pm$ 6.9 e	3

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

As comparações das curvas de sobrevivência usando o teste de Log-Rank confirmam que houve diferença significativa entre os tratamentos com fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue e expostas por 48 horas ao papel camurça vermelho impregnado via pulverização ou pincelado com o fungo *M. anisopliae* isolado ESALQ 818 ( $p<0,05$ ; Figura 7).

Pode-se observar que no 7º dia de avaliação do teste fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose expostas ao papel camurça pincelado com fungo + óleo apresentaram um menor tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) que foi de 2 dias comparado com a mesma forma de aplicação do fungo sem óleo que foi de 3

dias. Nos demais tratamentos o valor de  $S_{50}$  não foi determinado ( $\chi^2=46.19$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 7-A).

Observa-se também que no 7º dia de avaliação do teste fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue expostas por 48 horas ao camurça pincelado com fungo + óleo apresentaram o menor valor de  $S_{50}$  de 3 dias, comparado com a mesma forma de aplicação do fungo sem o óleo que apresentou o  $S_{50}$  de 4 dias. Os demais tratamentos com fêmeas alimentadas com sangue o tempo médio de sobrevivência não foi determinado ( $\chi^2=31.08$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 7-B).

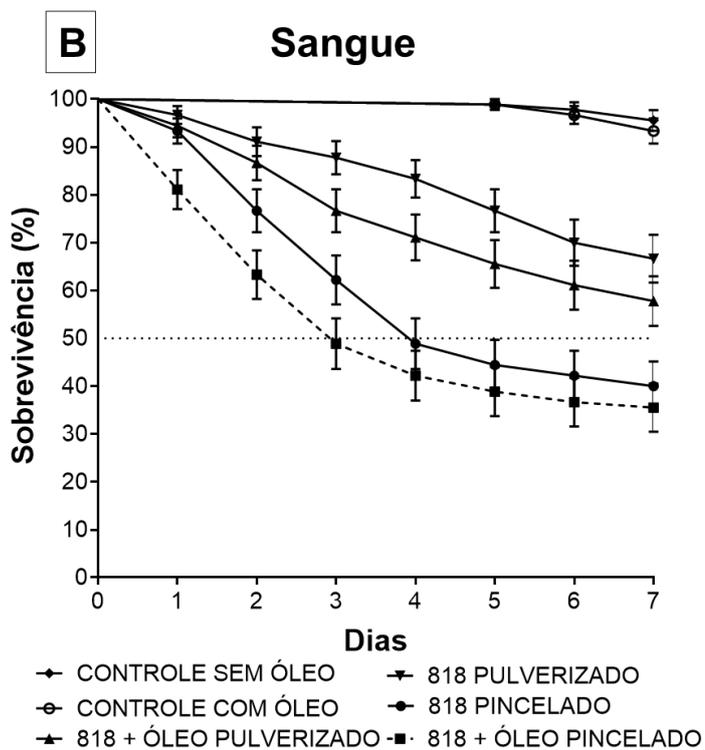
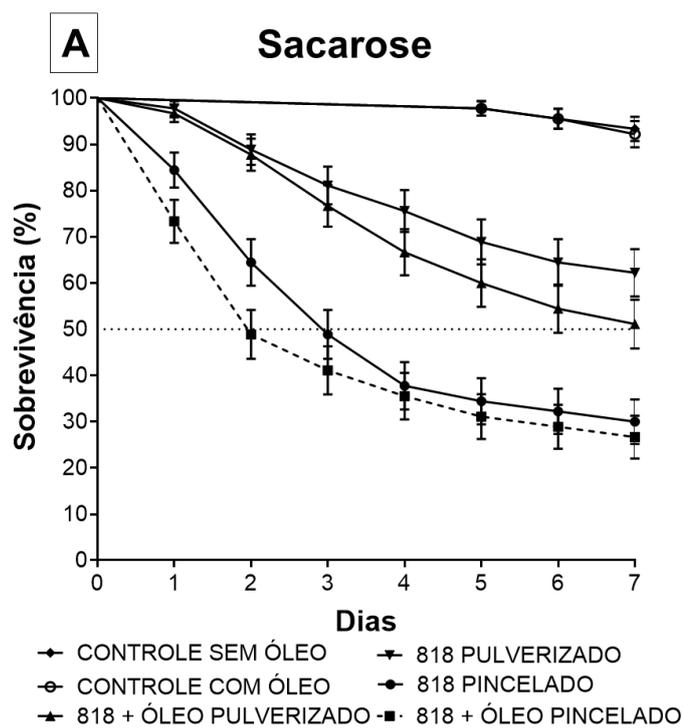


Figura 7 – Curvas de sobrevivência diária de fêmeas de *A. aegypti* expostas por 48 horas ao papel camurça vermelho impregnado (via pulverização ou utilizando

um pincel) com o isolado ESALQ 818 na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . A) Fêmeas alimentadas com sacarose. B) Fêmeas alimentadas com sangue.

Resultados semelhantes ao *A. aegypti* foram encontrados quando utilizadas fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue e expostas ao papel camurça vermelho impregnado com conídios do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* isolado ESALQ 818 na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  por 48 horas, utilizando as mesmas formas de aplicação (pulverizado e pincelado).

Quando as fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose foram expostas ao papel camurça vermelho pincelado com formulações do fungo + óleo de Girassol a 1% observou-se a menor taxa de sobrevivência quando, no sétimo dia de avaliação do teste, 28% das fêmeas estavam vivas, valor significativamente diferente quando comparado com a mesma aplicação do fungo no papel, entretanto, sem o óleo (31%) [ $F_{(3,11)}=268,88$ ;  $p<0,01$ ; Tabela 4].

Fêmeas de *A. albopictus* alimentadas somente com sacarose e expostas ao papel camurça vermelho impregnado com o isolado ESALQ 818 + óleo de Girassol via pulverização direta, apresentaram ao final da avaliação do teste uma taxa de sobrevivência de 52%, valor estatisticamente diferente quando utilizado o fungo sem o óleo aplicado da mesma forma no camurça vermelho (60%) [ $F_{(3,11)}=268,88$ ;  $p<0,01$ ; Tabela 4].

Fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sangue expostas ao ESALQ 818 formulado em óleo de girassol pincelado no papel camurça vermelho apresentaram menor taxa de sobrevivência (37%) e estatisticamente diferentes, quando comparado com a mesma forma de aplicação do fungo, no entanto sem o óleo (40%) [ $F_{(3,11)} = 383,16$ ;  $p<0,01$ ; Tabela 4].

Quando as fêmeas de *A. albopictus*, alimentadas com sangue, foram expostas ao papel camurça pulverizado com ESALQ 818 formulado em óleo, a taxa de sobrevivência foi estatisticamente diferente quando comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no papel sem a presença do óleo (61% e 68%, respectivamente) ( $p<0,01$ ).

Os tratamentos-controle com ou sem óleo apresentaram taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. albopictus* variando de 89% a 96% de sobrevivência no sétimo dia de avaliação (Tabela 4).

Tabela 4 – Taxa de sobrevivência final (%  $\pm$  DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *A. albopictus* expostas ao fungo *M. anisopliae* (ESALQ 818) impregnado via pulverização direta ou utilizando um pincel no papel camurça

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$
Controle sem óleo	89 $\pm$ 1.4 a	ND	91 $\pm$ 1.5 a	ND
Controle + óleo	94 $\pm$ 0.8 a	ND	96 $\pm$ 0.8 b	ND
ESALQ 818 Pulverizado	60 $\pm$ 2.2 b	ND	68 $\pm$ 1.3 c	ND
ESALQ 818 + óleo Pulverizado	52 $\pm$ 2.5 c	ND	61 $\pm$ 1.7 d	ND
ESALQ 818 Pincelado	31 $\pm$ 6.4 d	3	40 $\pm$ 5.5 e	4
ESALQ 818 + óleo Pincelado	28 $\pm$ 9.8 e	2	37 $\pm$ 4.7 f	4

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

Fêmeas alimentadas com sacarose expostas ao papel camurça pincelado com o ESALQ 818 formulado em óleo de girassol apresentaram um tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de 2 dias e, sem a presença do óleo o valor de  $S_{50}$  foi de 3 dias (Figura 8-A). Nos demais tratamentos o  $S_{50}$  não foi determinado.

Quando as fêmeas foram alimentadas com sangue e expostas ao papel camurça pincelado com o isolado formulado com ou sem o óleo de girassol apresentaram um valor de  $S_{50}$  de 4 dias. Nos demais tratamentos não foi determinado o tempo médio de sobrevivência por apresentarem taxas de sobrevivência acima de 50% (Figura 8-B).

As curvas de sobrevivência dos tratamentos apresentaram diferença significativa pelo teste de Log-Rank para fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose ( $\chi^2=43.99$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ) e para fêmeas alimentadas com sangue ( $\chi^2=32.42$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 8).

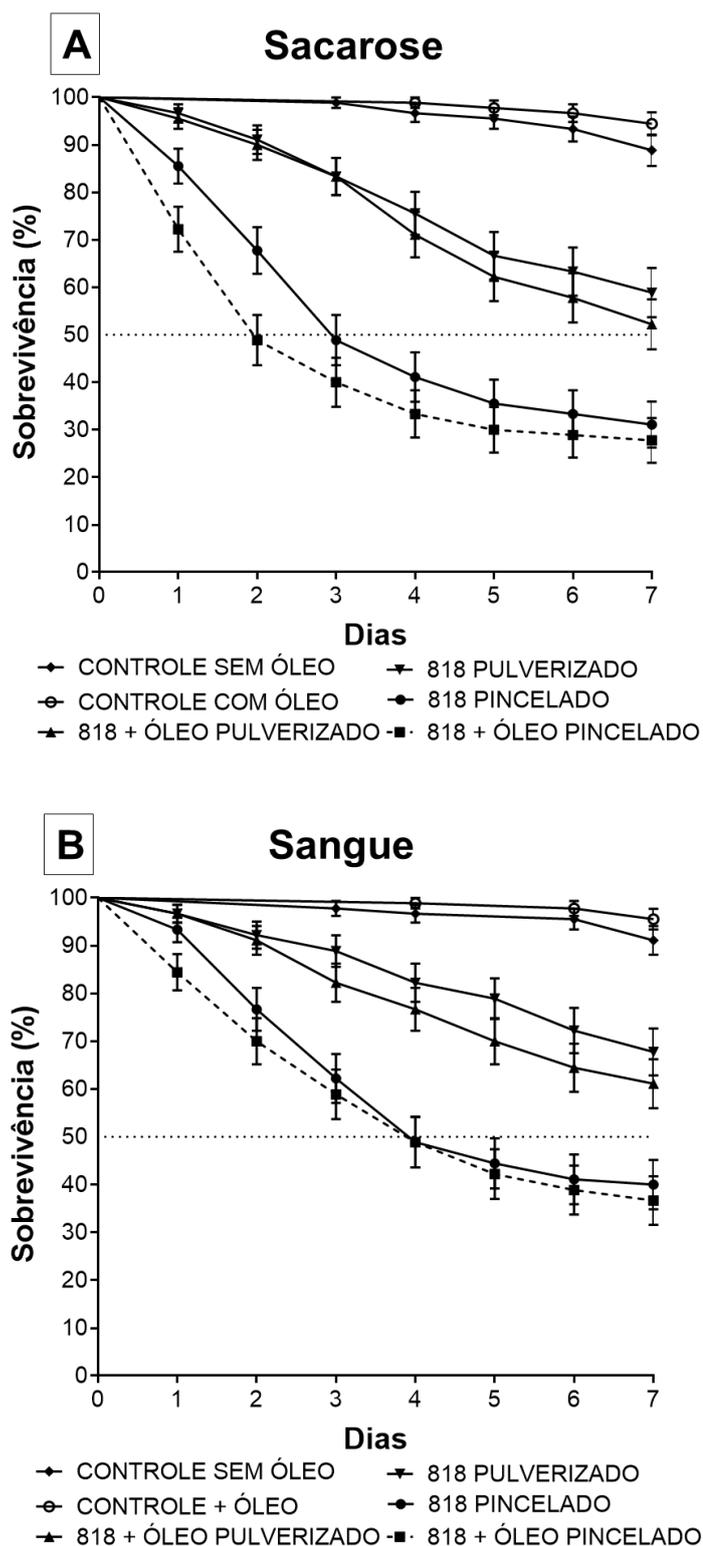


Figura 8 – Fêmeas de *Aedes albopictus* expostas por 48 horas ao papel camurça vermelho impregnado com ESALQ 818. A) Fêmeas alimentadas com sacarose. B) Fêmeas alimentadas com sangue.

### 7.3.2. Patogenicidade e virulência do isolado LEF 2000 contra fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* expostas ao papel camurça vermelho impregnado com fungo

Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose expostas a um papel camurça pulverizado com LEF 2000 + óleo de Girassol apresentaram 52% de sobrevivência, no sétimo dia de avaliação do teste, valor significativamente menor comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no papel camurça, entretanto sem óleo (60% de sobrevivência dos mosquitos) ( $p < 0,01$ ; Tabela 5).

As fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose expostas ao camurça pincelado com LEF 2000 + óleo apresentaram significativamente menor taxa de sobrevivência (28%), comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no camurça, entretanto sem óleo (33% de sobrevivência dos mosquitos) [ $F_{(3,11)}=150,93$ ;  $p < 0,01$ ; Tabela 5].

Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue expostas a um papel camurça pulverizado com LEF 2000 + óleo apresentaram taxa de sobrevivência de 59%, valor significativamente diferente comparado com a mesma forma de aplicação do fungo no camurça sem o óleo (69%) ( $p < 0,01$ ; Tabela 5).

Quando as fêmeas de *A. aegypti* foram alimentadas com sangue e expostas ao papel camurça pincelado com fungo + óleo de girassol apresentaram significativamente menor taxa de sobrevivência (36%), comparado com mesma forma de aplicação do fungo no camurça, entretanto sem óleo (41% de sobrevivência dos mosquitos) [ $F_{(3,11)}=194$ ;  $p < 0,01$ ; Tabela 5].

Os tratamentos controle com e sem óleo de girassol apresentaram taxas de sobrevivência maiores que 89% (Tabela 5).

Tabela 5 – Taxas de sobrevivência final (%  $\pm$  DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *A. aegypti* expostas ao fungo *M. anisopliae* (LEF 2000) impregnado via pulverização ou utilizando um pincel no papel camurça vermelho

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$
Controle sem óleo	89 $\pm$ 1.9 a	ND	90 $\pm$ 1.9 a	ND
Controle + óleo	92 $\pm$ 1.3 a	ND	92 $\pm$ 1.4 a	ND
LEF 2000 Pulverizado	60 $\pm$ 3.0 b	ND	69 $\pm$ 1.0 b	ND
LEF 2000 + óleo Pulverizado	52 $\pm$ 2.1 c	ND	59 $\pm$ 2.2 c	ND
LEF 2000 Pincelado	33 $\pm$ 6.7 d	3	41 $\pm$ 5.8 d	4
LEF 2000 + óleo Pincelado	28 $\pm$ 9.6 e	2	36 $\pm$ 5.8 e	4

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

A Figura 9 mostra as curvas de sobrevivência diárias de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue e expostas ao papel camurça vermelho impregnado via pulverização ou pincelado com o fungo *M. anisopliae* isolado LEF 2000.

Após sete dias de avaliação dos testes, pode-se observar que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose expostas ao papel camurça pincelado com fungo + óleo apresentaram o menor valor de  $S_{50}$  2 dias, comparado com demais tratamentos ( $\chi^2=40.92$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 9).

Observa-se também que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue expostas ao papel camurça pincelado com fungo + óleo apresentaram um tempo médio de sobrevivência de 4 dias ( $\chi^2=29,13$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 9).

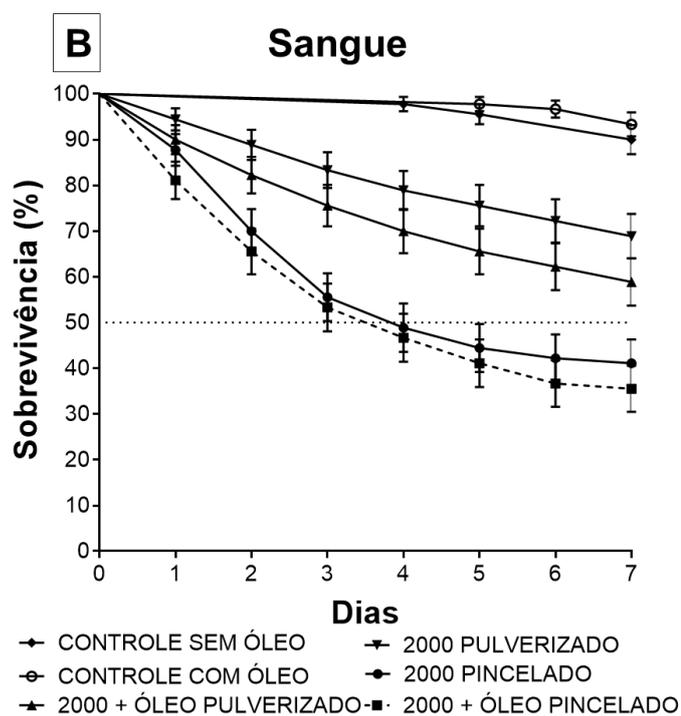
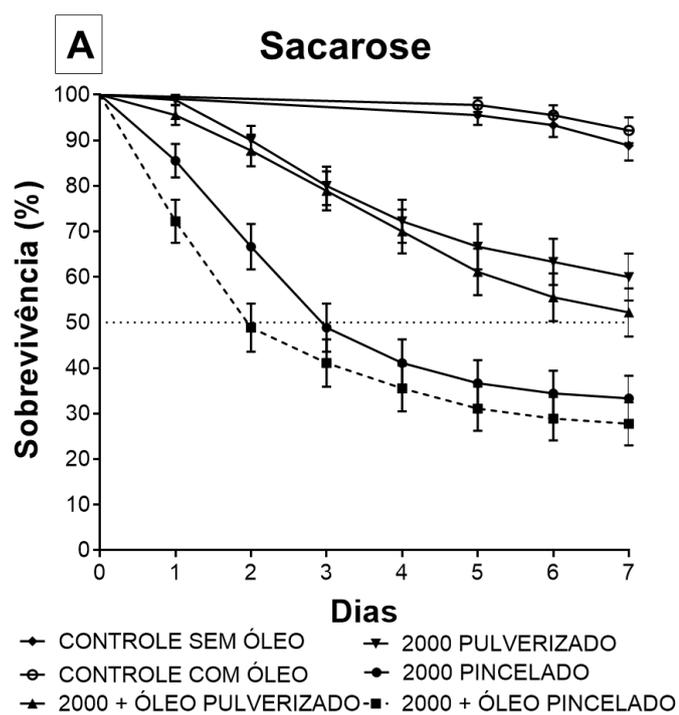


Figura 9 – Fêmeas de *Aedes aegypti* expostas por 48 horas ao papel camurça vermelho impregnado com LEF 2000. A) Fêmeas alimentadas com sacarose. B) Fêmeas alimentadas com sangue.

Quando foram utilizadas fêmeas de *A. albopictus*, alimentadas com sacarose ou sangue expostas ao papel camurça vermelho impregnado com conídios do isolado LEF 2000 do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , pôde-se verificar resultados próximos dos encontrados com fêmeas da espécie *A. aegypti*.

A Tabela mostra que o papel camurça vermelho pincelado com suspensão do fungo + óleo de girassol causou uma taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose de 30%, com valor do tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de 2 dias no sétimo dia de avaliação do teste, valor significativamente menor quando comparado com a mesma aplicação do fungo sem o óleo (33%) [ $F_{(3,11)} = 313,33$ ;  $p < 0,01$ ; Tabela 6].

Fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sangue e expostas ao papel camurça pincelado com formulação do fungo + óleo, apresentaram, no sétimo dia de avaliação dos testes, 36% de sobrevivência e o  $S_{50}$  foi de 4 dias, valor significativamente diferente à mesma forma de aplicação do fungo, entretanto sem o óleo de girassol (40%) [ $F_{(3,11)} = 455,16$ ;  $p < 0,01$ ; Tabela 6].

Os tratamentos controle, com ou sem óleo, variaram de 89% a 94% de sobrevivência no sétimo dia de avaliação dos testes (Tabela 6).

Tabela 6 – Taxa de sobrevivência final (% ± DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *A. albopictus* expostas ao fungo *M. anisopliae* (LEF 2000) impregnado via pulverização direta ou utilizando um pincel no papel camurça

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) ± DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) ± DP	$S_{50}$
Controle sem óleo	91 ± 0.9 a	ND	89 ± 1.6 a	ND
Controle + óleo	94 ± 0.8 b	ND	92 ± 1.4 a	ND
LEF 2000 Pulverizado	59 ± 1.7 c	ND	70 ± 0.7 b	ND
LEF 2000 + óleo Pulverizado	51 ± 2.1 d	ND	62 ± 1.6 c	ND
LEF 2000 Pincelado	33 ± 6.7 e	3	40 ± 5.0 d	4
LEF 2000 + óleo Pincelado	30 ± 9.8 f	2	36 ± 3.7 e	4

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

As curvas de sobrevivência dos tratamentos apresentaram diferença significativa pelo teste de Log-Rank para fêmeas alimentadas com sacarose ( $\chi^2=31.47$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ) e para fêmeas alimentadas com sangue ( $\chi^2=34.07$ ;  $df=3$ ;  $P<0.0001$ ) ao longo de sete dias de avaliação (Figura 10).

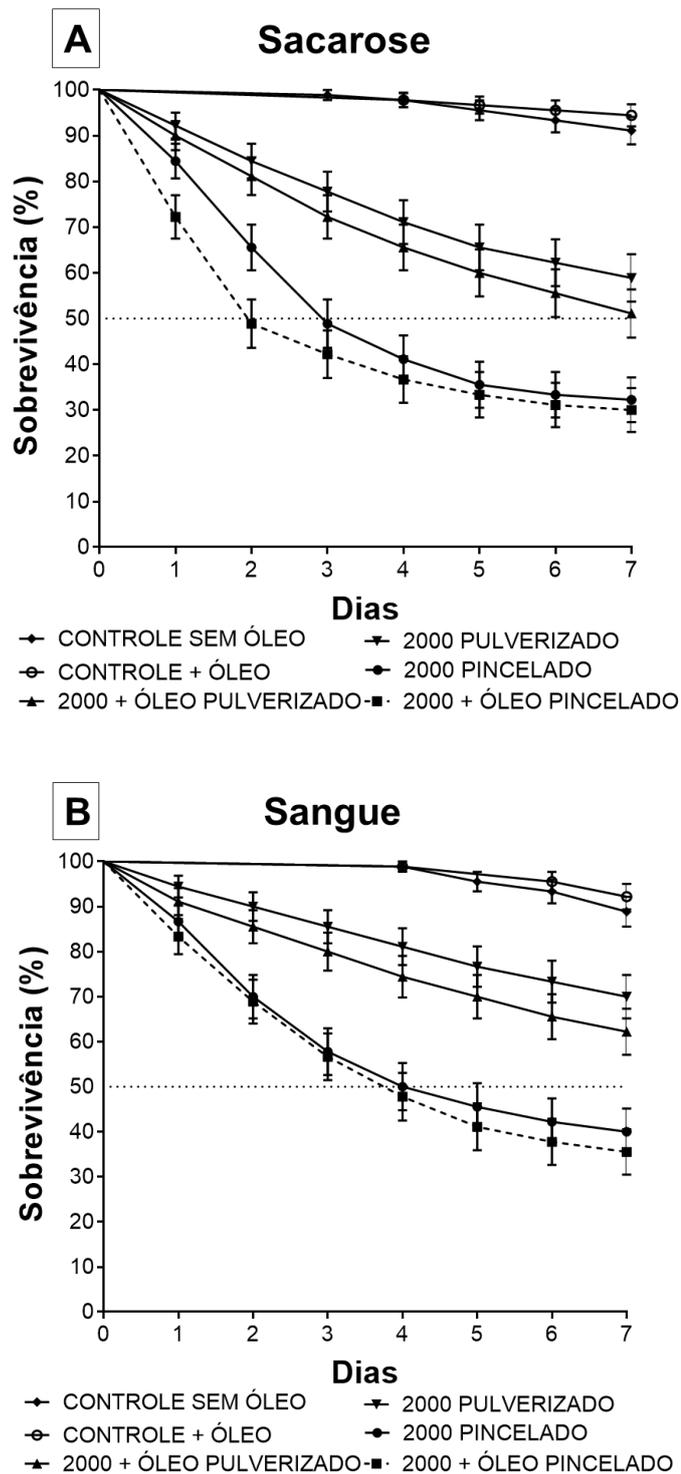


Figura 10 – Fêmeas de *Aedes albopictus* expostas por 48 horas ao papel camurça vermelho impregnado com LEF 2000. A) Fêmeas alimentadas com sacarose. B) Fêmeas alimentadas com sangue.

#### **7.4 Bioensaio 4: Taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, alimentadas com sacarose ou sangue, expostas a ovitrampa revestida com papel camurça vermelho ou preto impregnado com *M. anisopliae* formulado em óleo vegetal**

Neste experimento foi observada a eficiência de ovitrapas revestidas com papel camurça vermelho ou preto impregnados com o isolado ESALQ 818 e LEF 2000 do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* para infectar e matar fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sangue ou sacarose.

##### *7.4.1. Uso de ovitrapas revestidas com papel camurça vermelho ou preto impregnados com ESALQ 818*

A Tabela 7 mostra que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose e expostas a ovitrapas com papel camurça vermelho ou preto impregnado com ESALQ 818 não apresentaram diferenças estatísticas em suas taxas de sobrevivência, resultando no sétimo dia de avaliação do teste, respectivamente, 24% e 23% de mosquitos vivos ( $p = 0,374$ ).

Quando fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue foram expostas a ovitrapas com papel camurça vermelho ou preto com ESALQ 818 também não apresentaram diferença estatística nas suas taxas de sobrevivência independente da cor do papel camurça utilizado (32% e 31%, respectivamente) ( $p = 0,519$ ; Tabela 7).

Os tratamentos controle, utilizando papel camurça impregnado com óleo sem a presença do fungo, apresentaram em média 92% de sobrevivência para fêmeas alimentadas com sacarose e 97,5% de sobrevivência para fêmeas alimentadas com sangue (Tabela 7).

Tabela 7 – Taxa de sobrevivência (%  $\pm$  DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue expostas a ovitampa revestida com papel camurça impregnado com o isolado ESALQ 818 formulado em óleo de girassol

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$
Papel camurça Vermelho + óleo	93 $\pm$ 0.7 a	ND	99 $\pm$ 0.4 a	ND
Papel camurça preto + óleo	91 $\pm$ 1,1 b	ND	96 $\pm$ 0.8 a	ND
Papel camurça vermelho + fungo + óleo	24 $\pm$ 9.6 b	2	32 $\pm$ 7.5 b	3
Papel camurça preto + fungo + óleo	23 $\pm$ 9.6 b	2	31 $\pm$ 7.9 b	3

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

Do mesmo modo, quando fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose foram expostas a ovitampas revestidas com papel camurça vermelho ou preto pincelado com a formulação do isolado ESALQ 818 + óleo de Girassol não apresentaram diferenças estatísticas entre as taxas de sobrevivência, apresentando no sétimo dia de avaliação do teste 25% e 24% de sobrevivência respectivamente ( $p = 0,519$ ; Tabela 8).

A Tabela 8 mostra que fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sangue expostas também a ovitampas revestidas com papel camurça vermelho ou preto impregnados com a formulação do fungo + óleo, apresentaram taxas de sobrevivência iguais estatisticamente (33% e 32%, respectivamente) independente da cor do papel camurça utilizado ( $p = 0,374$ ).

Os tratamentos controle, com papel camurça impregnado somente com o óleo sem a presença do fungo, apresentaram em média 93,5% de sobrevivência das fêmeas alimentadas com sacarose e 97,5% das fêmeas alimentadas com sangue (Tabela 8).

Tabela 8 – Taxa de sobrevivência (%)  $\pm$  Desvio Padrão ( $\pm$  DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue expostas a ovitrampa revestida com papel camurça impregnado com o isolado ESALQ 818 formulado em óleo de girassol

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$
Papel Camurça vermelho + óleo	96 $\pm$ 0.8 a	ND	97 $\pm$ 0.5 a	ND
Papel camurça Preto + óleo	91 $\pm$ 0.9 b	ND	98 $\pm$ 0.5 a	ND
Papel camurça vermelho + fungo + óleo	25 $\pm$ 9.7 c	2	33 $\pm$ 7.1 b	3
Papel camurça preto + fungo + óleo	24 $\pm$ 9.4 c	2	32 $\pm$ 6.5 b	3

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

A Figura 11 mostra as curvas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue e expostas a ovitrapas com papel camurça vermelho ou preto impregnados com fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.

As curvas de sobrevivência dos tratamentos apresentaram diferença significativa pelo teste de Log-Rank para fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue ( $\chi^2=215.9$ ;  $df=5$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 11-A) e para fêmeas de *A. albopictus* alimentadas também com sacarose ou sangue ( $\chi^2=208.1$ ;  $df=5$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 11-B) ao longo de sete dias de avaliação do teste.

O valor de  $S_{50}$  para fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sacarose independente se a ovitrampa foi revestida com papel camurça vermelho ou preto foi de 2 dias. Para fêmeas de ambas as espécies alimentadas com sangue independente da cor do papel camurça que revestia a ovitrampa o  $S_{50}$  apresentou um valor de 3 dias (Figura 11).

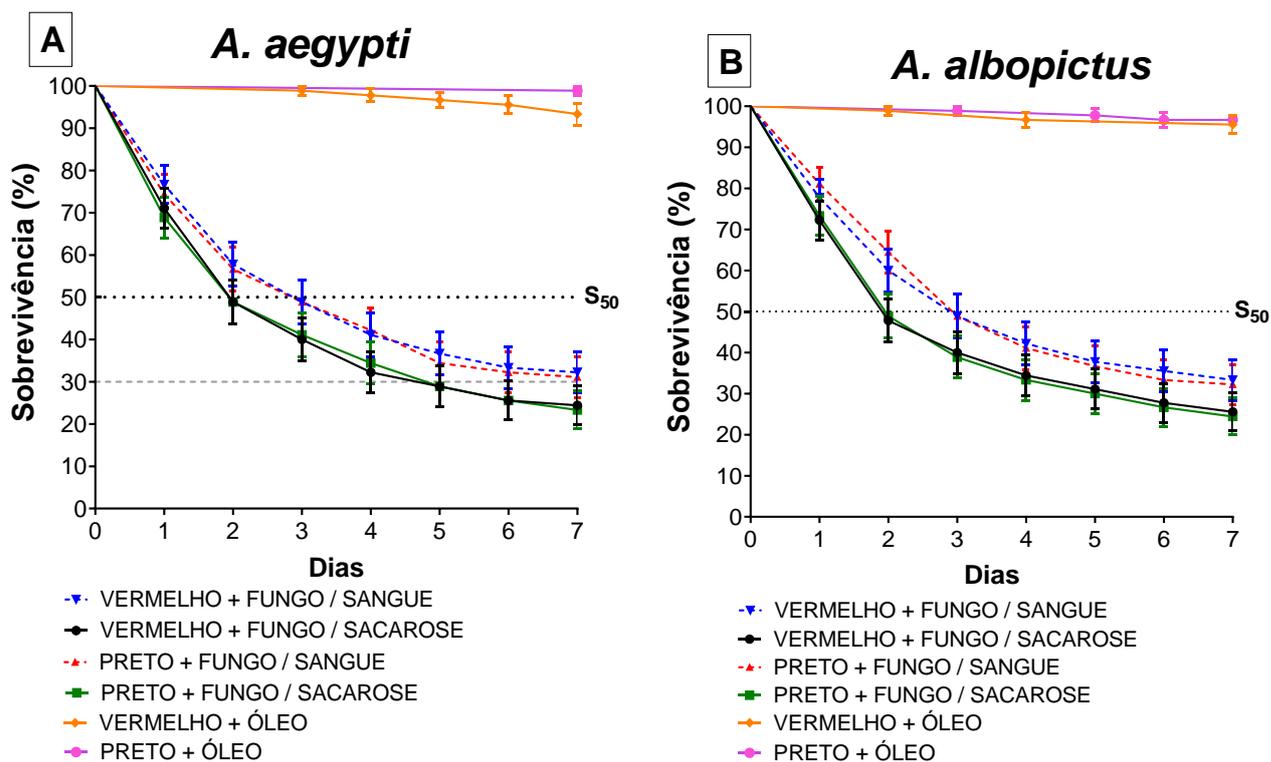


Figura 11 – Fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue expostas por 48 horas a ovitrampa revestida com papel camurça vermelho ou preto impregnado com ESALQ 818 formulado em 1% de óleo de Girassol. A) Fêmeas de *Aedes aegypti*. B) Fêmeas de *Aedes albopictus*.

#### 7.4.2. Uso de ovitrampas revestidas com papel camurça vermelho ou preto impregnados com LEF 2000

A Tabela 9 mostra que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose e expostas a ovitrampas com papel camurça vermelho ou preto impregnado com LEF 2000 não apresentaram diferenças estatísticas em suas taxas de sobrevivência, resultando no sétimo dia de avaliação do teste, respectivamente, 26% e 24% de mosquitos vivos ( $p = 0,519$ ).

Quando as fêmeas foram alimentadas com sangue e expostas a ovitrampas com fungo, apresentaram valores de sobrevivência maiores quando comparados com fêmeas alimentadas com sacarose. No entanto, fêmeas alimentadas com sangue também apresentaram taxas de sobrevivência iguais estatisticamente

entre si quando expostas a ovitrampas com camurça vermelho ou preto impregnados com fungo (31% e 31%, respectivamente) ( $p = 1$ ; Tabela 9).

Os tratamentos controle, com fêmeas alimentadas com sangue ou sacarose expostas a ovitrampas com papel camurça impregnado somente com óleo, apresentaram taxas de sobrevivência acima de 89% (Tabela 9).

Tabela 9 – Taxa de sobrevivência (%)  $\pm$  Desvio Padrão ( $\pm$  DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue expostas a ovitrampa revestida com papel camurça impregnado com o isolado LEF 2000 formulado em óleo de girassol

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$
Papel Camurça vermelho + óleo	89 $\pm$ 1.0 a	ND	98 $\pm$ 0.5 a	ND
Papel camurça Preto + óleo	90 $\pm$ 1.0 a	ND	96 $\pm$ 0.8 a	ND
Papel camurça vermelho + fungo + óleo	26 $\pm$ 9.7 b	2	31 $\pm$ 6.7 b	3
Papel camurça preto + fungo + óleo	24 $\pm$ 9.5 b	2	31 $\pm$ 6.8 b	3

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

Ovitrampas revestidas com papel camurça impregnados com o isolado LEF 2000 também foram eficientes em diminuir as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. albopictus*.

A Tabela 10 mostra que fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose apresentaram taxas de sobrevivência estatisticamente iguais quando expostas a ovitrampas revestidas com papel camurça vermelho ou preto impregnados com formulações do LEF 2000 + óleo. No sétimo dia de avaliação do teste, fêmeas de *A. albopictus* expostas a ovitrampas com papel camurça vermelho ou preto apresentaram 26% e 25% de sobrevivência, respectivamente ( $p = 1$ ; Tabela 10).

Do mesmo modo, fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sangue expostas a ovitrampas revestidas com papel camurça vermelho ou preto impregnados com LEF 2000 + óleo apresentaram taxas de sobrevivência iguais estatisticamente

entre si (31% e 32%, respectivamente) no último dia de avaliação do teste, independente da cor do papel camurça utilizado ( $p = 0,519$ ; Tabela 10).

Os tratamentos controle, sem a presença do fungo apresentaram taxas de sobrevivência variando de 90% a 99% para fêmeas alimentadas com sangue ou sacarose (Tabela 10).

Tabela 10 – Taxa de sobrevivência (%)  $\pm$  Desvio Padrão ( $\pm$  DP) e Tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de fêmeas de *Aedes albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue expostas a ovitrampa revestida com papel camurça impregnado com o isolado LEF 2000 formulado em óleo de girassol

Tratamentos	SACAROSE		SANGUE	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	$S_{50}$
Papel Camurça vermelho + óleo	93 $\pm$ 0.7 a	ND	99 $\pm$ 0.4 a	ND
Papel camurça Preto + óleo	90 $\pm$ 1.1 a	ND	97 $\pm$ 0.5 a	ND
Papel camurça vermelho + fungo + óleo	26 $\pm$ 9.5 b	2	31 $\pm$ 6.8 b	3
Papel camurça preto + fungo + óleo	25 $\pm$ 9.5 b	2	32 $\pm$ 7.4 b	3

Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND).

As curvas de sobrevivência dos tratamentos apresentaram diferença significativa pelo teste de Log-Rank para fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue ( $\chi^2=198.2$ ;  $df=5$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 12-A) e para fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue ( $\chi^2=214.7$ ;  $df=5$ ;  $P<0.0001$ ; Figura 12-B) ao longo de sete dias de avaliação do teste.

O valor de  $S_{50}$  para fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sacarose independente se a ovitrampa foi revestida com papel camurça vermelho ou preto foi de 2 dias. Para fêmeas de ambas as espécies alimentadas com sangue independente da cor do papel camurça que revestia a ovitrampa o  $S_{50}$  apresentou um valor de 3 dias (Figura 12).

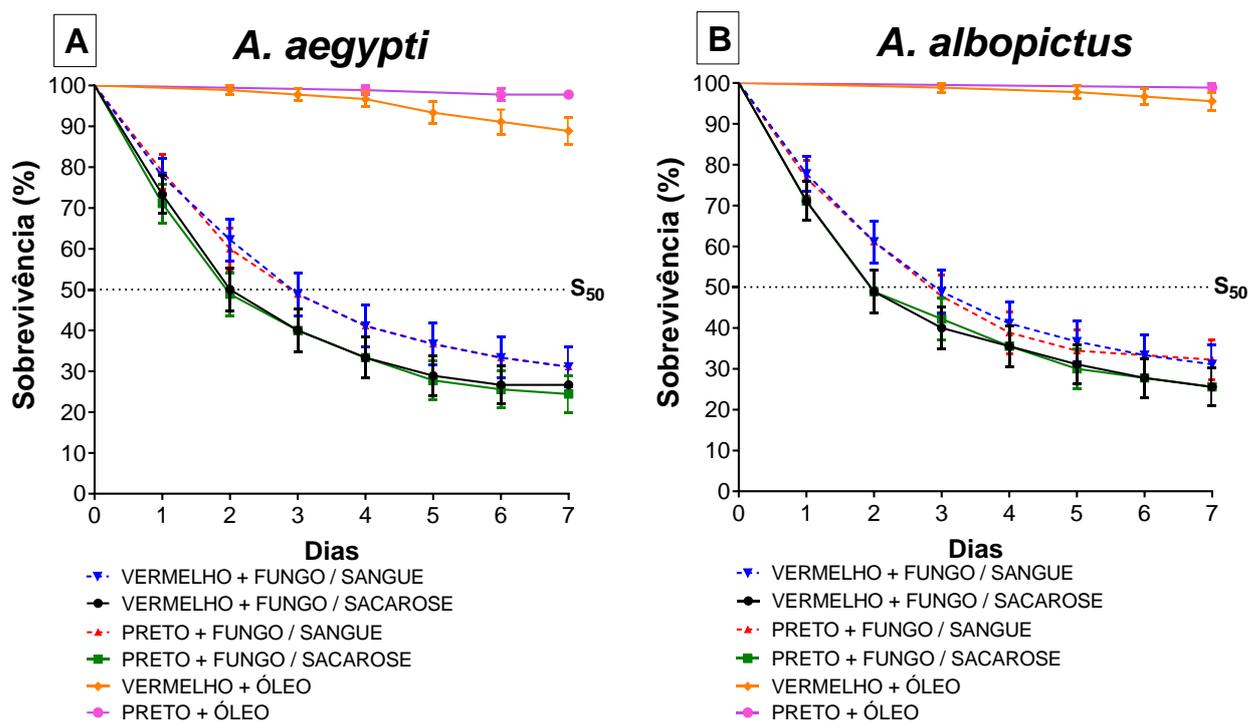


Figura 12 – Fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* alimentadas com sacarose ou sangue expostas por 48 horas a ovitrampa revestida com papel camurça vermelho ou preto impregnado com LEF 2000 formulado em 1% de óleo de girassol. A) Fêmeas de *Aedes aegypti*. B) Fêmeas de *Aedes albopictus*.

## 8. DISCUSSÃO

Os fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para serem utilizados no manejo integrado de vetores.

No experimento inicial foram avaliados os possíveis efeitos no desenvolvimento do fungo depois de ser formulado em dois tipos de óleos. Foi verificado que ambos os isolados formulados em 1% do óleo de girassol, independente do tempo que permaneceram na bancada (0, 3, 15 e 30 dias), apresentaram valores do crescimento radial das colônias iguais ou maiores que seus respectivos tratamentos controle (Tabelas 1 e 2). Além disso, os isolados formulados com o mesmo óleo apresentaram uma produção de conídios igual ou maior que o controle, sem a presença do óleo, em todos os tempos de permanência das formulações na bancada.

A utilização de óleo nas formulações de fungos pode conferir uma proteção contra as radiações ultravioletas (UV), baixa umidade, altas temperaturas e ainda melhoram a interação entre a superfície do conídio e a cutícula hidrofóbica dos insetos, potencializando a adesão e assim criando condições favoráveis para a infecção (Alves & Faria, 2010). Segundo Braga et al. (2001), a radiação UV reduz a eficiência do fungo no campo, principalmente a radiação UV-B, que tem efeito prejudicial aos propágulos de fungos. Se o ambiente onde o agente de controle microbiano for aplicado apresentar altas intensidades de luz, como em condições tropicais, a utilização de formulações para proteger os conídios da radiação ultravioleta poderá ser benéfica.

Alves et al. (1998) em experimentos controlados em laboratório verificaram que conídios de *M. anisopliae* formulados com diferentes tipos de óleo apresentaram um aumento significativo na tolerância dos conídios contra luz UV por até 6h de exposição. Paula et al. (2019) também verificaram que uma combinação de *M. anisopliae* com baixa concentração de óleo de nim protegeu o fungo dos efeitos nocivos da radiação UV, além de aumentar a virulência do fungo.

Além da proteção UV mencionada anteriormente, Gomes et al. (2015) verificaram que a utilização do óleo de nim em formulações de *M. anisopliae* não

afetou a germinação ou crescimento do fungo. O fungo *B. bassiana* também não teve seu crescimento afetado pelo óleo de nim puro (sem emulsificante) conforme relatado por Quintela et al. (2002). Já Malsam et al. (2002) avaliaram que, formulações do fungo *M. anisopliae* com óleo de girassol apresentaram um efeito sinérgico atingindo quase 100% de controle contra moscas-brancas, além disso resultou em uma distribuição mais uniforme dos conídios do fungo nos insetos.

Diferente do óleo de girassol e do óleo de nim anteriormente mencionados, a formulação do fungo *M. anisopliae* em diferentes concentrações do óleo vegetal (1%, 5% e 10%) testadas neste trabalho mostrou que este óleo surfactante influenciou no crescimento radial da colônia quando as formulações permaneceram na bandada por até 30 dias.

Os resultados aqui mostraram que no bioensaio 2 as ovitrampas revestidas com papel camurça vermelho apresentaram um maior número de ovos postos por ambas as espécies onde, 83,8% dos ovos de *A. aegypti* e 83,2% de *A. albopictus* foram postos no papel camurça vermelho (Figura 6). Esses resultados refletem achados anteriores onde mostram uma baixa sensibilidade na retina, na maioria das espécies de mosquitos, aos comprimentos de onda na região vermelha do espectro de cores fazendo com que o inseto enxergue a cor vermelha como um local escuro (Allan, 1994; Hu et al., 2014).

Diferentes estímulos visuais, químicos e táteis podem influenciar fêmeas de *Aedes* à procura por locais para oviposição como, por exemplo, a temperatura, umidade e a composição do substrato de oviposição (Vianna, 2001; Clements 2000; Wong et al. 2011). A resposta a esses estímulos foi amplamente documentada em fêmeas de *A. aegypti* (Muir et al., 1992a; Wong et al., 2011).

As fêmeas de *A. aegypti* demonstraram ter a capacidade fisiológica de detectar tanto a intensidade quanto a composição espectral da luz (Muir et al. 1992b). A atração de fêmeas de *A. aegypti* a diferentes substratos está relacionada principalmente ao fato de perceberem superfícies escuras (Spiegel & Brown, 1953). Beckel (1955) e Hawley (1988) verificaram que superfícies pretas foram consideradas mais atraentes na seleção do local de oviposição pelas fêmeas de *Aedes*. Outros autores documentaram a atração por fêmeas de *Aedes* pelo

contraste branco com preto (Sppel & Brown, 1953; Hoel et al., 2011). Muir et al. (1992b) sugeriram que fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* preferem ovipositar em superfícies vermelhas e pretas, enquanto cores como azul, amarelo e branco não são atraentes. Esses achados são consistentes com os resultados do atual estudo.

Chadee et al. (1995) testaram diferentes tipos de substratos de oviposição em três recipientes diferentes para aumentar a quantidade de ovos de mosquitos postos nas armadilhas. Este grupo verificou que as palhetas de madeira apresentaram a maior porcentagem de ovos de *Aedes* independente do recipiente testado. Outros autores já fizeram o uso de outros substratos, como papel sulfite, papel filtro, papel manteiga e papel toalha, onde revelaram que os diferentes substratos não impediram as fêmeas de *Aedes* de realizarem oviposição (Gomes et al. 2006).

Verificamos em nosso trabalho que o contraste vermelho-preto da ovitrampa revestida com papel camurça resultou em uma maior coleta de ovos de *Aedes* do que as outras cores de papel camurça testadas. No entanto, mesmo sendo evidente que as fêmeas preferiram esse contraste de cor, nenhuma armadilha atualmente no mercado usa essa característica em seu design, por exemplo as armadilhas In2Care, MosquiTRAP™ e Adultrap são completamente pretas (Donatti & Gomes, 2007; Gama et al., 2007; Snetselaar et al., 2014). Portanto, a armadilha apresentada neste trabalho pode ser a primeira a usar uma combinação vermelho-preto, sendo considerada eficiente para a coleta de ovos dos mosquitos *Aedes* à procura de um local para oviposição.

No bioensaio 3, os resultados demonstraram que a aplicação da formulação do fungo no papel camurça via pulverização foi menos eficiente em diminuir as taxas de sobrevivência das fêmeas de *Aedes*, apresentando valores de sobrevivência acima de 50%. O papel camurça possui propriedades físicas que confere às vilosidades presentes em sua superfície uma força eletrostática específica. Segundo Rennie et al. (1998), a força de atração de uma partícula líquida em superfícies de papeis com vilosidades pode ser reduzida ou até mesmo eliminada. Possivelmente os esporos do fungo, presente nas partículas líquidas pulverizadas

sobre o papel, sofreram uma determinada repelência no momento da aplicação, não permitindo uma adesão eficiente dos conídios no papel, o que levou a uma diminuição na taxa de infecção dos mosquitos.

A utilização de um pincel para impregnar a formulação fúngica no papel apresentou eficiência maior em diminuir as taxas de sobrevivência dos mosquitos. O isolado ESALQ 818 formulado em óleo de girassol pincelado no papel camurça vermelho, reduziu a taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue para 27% e 36%, respectivamente (Tabela 3). Quando fêmeas de *A. albopictus* foram expostas ao mesmo isolado e nas mesmas condições de aplicação do fungo, apresentaram taxas de sobrevivência de 28% para fêmeas alimentadas com sacarose e 37% para fêmeas alimentadas com sangue (Tabela 4).

O isolado LEF 2000 formulado em 1% do óleo de Girassol e também pincelado no papel camurça vermelho resultou em valores de sobrevivência próximos ao observado para isolado ESALQ 818. Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose apresentaram uma taxa de sobrevivência de 28%, enquanto as fêmeas alimentadas com sangue apresentaram 36% de sobrevivência (Tabela 5). Quando foram utilizadas fêmeas de *A. albopictus* expostas ao papel camurça vermelho pincelado com LEF 2000 + óleo a taxa de sobrevivência foi de 30% para fêmeas alimentadas com sacarose e 36% para fêmeas alimentadas com sangue (Tabela 6).

Os resultados demonstraram que fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sangue e expostas aos isolados, apresentaram uma taxa de sobrevivência maior que fêmeas alimentadas com sacarose ( $p < 0,01$ ; Tabela 4-6). Tal observação está de acordo com trabalhos de outros autores que mostram que mosquitos alimentados com sangue foram menos suscetíveis ao fungo do que os mosquitos alimentados com sacarose (Mnyone et al., 2011). Paula et al. (2011) também verificaram que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose eram mais suscetíveis à infecção fúngica do que mosquitos alimentados com sangue. Cabral et al. (2020) confirmaram que a alimentação sanguínea em fêmeas de *A. aegypti* pode tornar o organismo do inseto mais eficiente em desencadear uma

resposta imune efetiva contra patógenos, como, por exemplo a ativação das vias TOLL (REL1) e IMD, tornando o mosquito menos susceptível à infecção fúngica do que fêmeas alimentadas com sacarose.

Outras superfícies impregnadas com fungo entomopatogênico foram utilizadas para infectar e reduzir as taxas de sobrevivência dos mosquitos vetores de doenças. Panos pretos impregnados com fungo foram altamente eficientes para diminuir as taxas de sobrevivência de *Anopheles* e *Aedes* (Scholte et al., 2005; Paula et al., 2013b). Uma armadilha que utiliza atraente + fungo + inseticida sintético foi utilizada por Snetselaar et al. (2014) para reduzir a taxa de sobrevivência de *A. aegypti*. Ao pousarem na superfície de pouso para ovipositar, as fêmeas se contaminavam com o fungo *B. bassiana* e com um larvicida sintético (pyroxyfen). As larvas que vieram a emergir morreram pela ação do inseticida na água (100% de mortalidade). Ao saírem da armadilha, as fêmeas contaminadas carregavam o inseticida para criadouros adjacentes, matando mais de 90% das larvas nesses locais. A morte das fêmeas adultas ocorria pela ação do fungo.

As armadilhas de oviposição constituem uma ferramenta importante para estimar o número de fêmeas de mosquitos em uma área através do número de ovos recolhidos. Além disso, as ovitrampas são ferramentas de vigilância seguras, econômicas e favoráveis ao meio ambiente (Ritche, 2005; Paula et al., 2017). Armadilhas ovitrampas que atraem fêmeas grávidas de mosquitos que buscam um ambiente ideal para a postura dos ovos são desenvolvidas levando-se em conta o comportamento biológico do mosquito como, por exemplo, a percepção visual em relação à armadilha utilizada (Williams, 1962; Fay & Eliason, 1966; Hoel et al., 2011; Snetselaar, et al., 2014). Diante disso, uma armadilha ovitrampa com uma superfície de oviposição impregnada com um fungo entomopatogênico poderia ser eficiente não só para o monitoramento mas, ao mesmo tempo, para o controle do vetor por meio da infecção tanto das fêmeas quanto dos ovos de mosquitos pela ação do fungo.

O bioensaio 4 foi realizado utilizando ovitrampas escuras revestidas com camurça vermelho ou preto impregnados com isolados do fungo *M. anisopliae* formulados em óleo de girassol. A presença de ovos nas armadilhas confirmou

que as fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sangue procuraram as ovitrampas revestidas com papel camurça preto ou vermelho para ovipositar.

Não houve diferença estatística na taxa de sobrevivência entre as fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue e expostas a ovitrampas com papel camurça vermelho (32% de sobrevivência) ou preto (31% de sobrevivência) impregnados com conídios de ESALQ 818 ( $p>0,01$ ). Do mesmo modo, fêmeas de *A. albopictus* também alimentadas com sangue não apresentaram diferença estatística nas taxas de sobrevivência quando expostas a ovitrampas com camurça vermelho ou preto impregnado com ESALQ 818 (33% e 32% de sobrevivência, respectivamente) ( $p>0,01$ ).

O isolado LEF 2000 também foi eficiente em diminuir as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sangue. Ovitrampas revestidas com papel camurça vermelho impregnado com LEF 2000 apresentaram 31% de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue, valor estatisticamente igual quando comparado com fêmeas de *A. aegypti* que foram expostas a ovitrampas com camurça preto (31% de sobrevivência). As fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com sangue apresentaram valores estatisticamente iguais independente se a ovitrampa foi revestida com camurça vermelho ou preto impregnado com LEF 2000 (31% e 32% de sobrevivência, respectivamente) ( $p>0,01$ ).

Sabe-se na literatura que as fêmeas de mosquitos ao realizarem o repasto sanguíneo, importante para o desenvolvimento completo dos ovos e sua maturação nos ovários, possuem uma maior atividade de busca por locais para oviposição do que fêmeas alimentadas somente com seiva (Martínez, 2005, Clements, 2000). No entanto, quando foram usadas fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas somente com sacarose e expostas a ovitrampas com fungo, pode-se observar neste estudo que também houve uma diminuição nas taxas de sobrevivência. Provavelmente, as fêmeas de ambas as espécies alimentadas com sacarose procuraram as ovitrampas como um local de descanso.

Outra observação nos resultados deste bioensaio foi que fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sangue procuraram as ovitrampas para ovipositar, independente se o substrato de oviposição era o papel camurça vermelho ou preto, indicando que ambos poderiam ser utilizados no campo. Esse resultado confirma dados anteriormente publicados pelo nosso grupo de pesquisa onde, superfícies escuras são eficientes em atrair fêmeas de mosquitos (Paula et al., 2008; Silva et al., 2017). No entanto, visando uma aplicação prática da armadilha no campo, a ovitrampa com papel camurça vermelho seria mais indicada uma vez que, a cor do papel permite uma melhor visualização da presença de ovos e facilita a contagem.

Diferentes armadilhas podem ser utilizadas no campo como indicadores da presença de vetores em diferentes estádios de desenvolvimento, onde associados a índices epidemiológicos são capazes de estimar a presença e a quantidade de insetos em uma determinada área geograficamente delimitada. Um Sistema de Monitoramento Inteligente (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 (UFMG), onde associa a armadilha MosquiTrap<sup>®</sup> com um sistema de informações rápidas, no qual os dados de campo são documentados e dispostos na internet em tempo real em um banco de dados e visualizados em mapas georreferenciados (Eiras, 2002; Fávaro et al., 2006; Eiras & Resende 2009). A utilização no campo da armadilha ovitrampa aqui desenvolvida poderia ser integrada também a um sistema de monitoramento utilizando um aplicativo onde a contagem dos ovos pode ser feita mais rapidamente pelo agente de controle no momento da manutenção da armadilha.

Os resultados mostrados nesse trabalho indicam que o fungo *M. anisopliae* formulado em óleo de girassol não teve seu crescimento radial ou produção de conídios prejudicados por até 30 dias após o preparo da formulação. Além disso, trabalhos já mostraram que formulações de conídios aplicados em superfícies podem permanecer viáveis por até 18 dias no campo (Carolino et al., 2014). Portanto, visando manter a permanência no campo da ovitrampa com

entomopatígeno aqui desenvolvida, o uso de larvicidas biológicos pode ser associado a essas ovitrampas, evitando que se transformem em criadouros (Melo-Santos et al., 2001). Melo-Santos *et al.* (2003) mostraram que larvicidas a base de *Bti* não interferem na escolha da ovitrampa por fêmeas grávidas de *A. aegypti*, indicando que a presença do produto não altera a atratividade da armadilha. Além disso, há evidências de que o *Bti* atua como estimulante da oviposição de *A. aegypti* e *A. albopictus*, melhorando a eficiência das ovitrampas (Santos et al., 2003; Stoops, 2005).

Desde que a aquisição de patógenos pelas fêmeas de mosquitos vetores normalmente requer a realização de pelo menos um repasto sanguíneo e, para que a transmissão da doença ocorra, um ciclo de oviposição pode ser realizado antes que a transferência do patógeno possa ocorrer no repasto sanguíneo subsequente, a utilização de armadilhas ovitrampas, particularmente, aquelas com superfícies impregnadas com entomopatígeno, é uma excelente alternativa para o controle e o monitoramento de mosquitos hematófagos e de vetores de doenças tropicais no campo.

## 9. CONCLUSÃO

O crescimento radial dos isolados ESALQ 818 e LEF 2000 do fungo *Metarhizium anisopliae* formulados em 1% do óleo de girassol foi significativamente igual ou maior, comparado com o crescimento radial dos tratamentos controles utilizando estes mesmos isolados, entretanto sem formulação em óleo de girassol.

Os isolados ESALQ 818 e LEF 2000 do fungo *Metarhizium anisopliae* formulados em 5% e 10% do óleo de girassol ou 1%, 5% e 10% do Natur'l oil® apresentaram valores de crescimento radial menores que seus respectivos tratamentos controle, sem óleo, em quase todos os tempos de permanência das formulações na bancada.

Ovitampas revestidas com papel camurça vermelho tiveram maior porcentagem de ovos dos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, comparado com taxa de ovos nas ovitampas com papel camurça amarelo, azul e branco.

Formulações dos isolados ESALQ 818 e LEF 2000 do fungo *Metarhizium anisopliae* em 1% do óleo de girassol pincelados no papel camurça foi mais eficiente em diminuir as taxas de sobrevivência de ambas as espécies de mosquitos comparados com o tratamento em que o papel camurça foi pulverizado com a formulação do fungo via torre de Potter.

Fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sacarose e expostas ao papel camurça vermelho impregnado com fungo formulado com 1% de óleo de girassol foram menos susceptíveis à infecção fúngica do que fêmeas alimentadas com sangue.

Ovitampas revestidas com papel camurça vermelho ou preto impregnado com o fungo *Metarhizium anisopliae* foram eficientes em reduzir significativamente as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* alimentadas com sangue e com sacarose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albernaz, D. A. S., Tai, M. H. H., & Luz, C. (2009). Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 23 (2): 141-147.

Alkhaibari, A. M., Lord, A. M., Maffeis, T., Bull, J. C., Olivares, F. L., Samuels, R. I., & Butt, T. M. (2018). Highly specific host-pathogen interactions influence *Metarhizium brunneum* blastospore virulence against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Virulence*, 9 (1): 1449-1467.

Allan, S. A. (1994). Physics of mosquito vision--an overview. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10 (2 Pt 2): 266-271.

Alves, R. T., & Faria, M. (2010). Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. *Planaltina (DF), Embrapa Cerrados*, 26-31.

Alves, S. B. (1998). Controle microbiano de insetos. *Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz*: 1163.

Amiri, B., Ibrahim, L., & Butt, T. M. (1999). Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology*, 9 (4): 487-498.

Anderson, C. B., Downs, W. G., Wattlby, G. H., Ahin, N. W., & Beesb, A. A. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, BWI. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6 (6): 1012-1016.

Ayala, D., Akone-Ella, O., Rahola, N., Kengne, P., Ngangue, M. F., Mezeme, F., Boris K. Makanga, Nigg, N., Costantini, C., Simard, F., Prugnonle, F., Roche, B., Duron, O., & Paupy, C. (2019). Natural *Wolbachia* infections are common in the major malaria vectors in Central Africa. *Evolutionary applications*, 12 (8): 1583-1594.

Ayllón, T., de Mendonça Campos, R., Brasil, P., Morone, F. C., Câmara, D. C. P., Meira, G. L. S., Tannich, Ed., Yamamoto, K. A., Carvalho, M. S., Saraiva, R., Pedro, Schmidt-Chanasit, J., Cadar, D., Ferreira, D. F., & Honório, N. A. (2017). Early evidence for Zika virus circulation among *Aedes aegypti* mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 23 (8): 1411.

Barrett, A. D. (2017). Yellow fever live attenuated vaccine: a very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*, 35 (44): 5951-5955.

Beckel, W. E. (1955). Oviposition site preference of *Aedes* mosquitoes (Culicidae) in the laboratory. *Mosquito News*, 15 (4): 224-228.

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control*. Springer Science & Business Media.

Becker, N. (1997). Microbial control of mosquitoes: management of the Upper Rhine mosquito population as a model programme. *Parasitology Today*, 13 (12): 485-487.

Becker, N. (2003). Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae--a new application technique. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19 (1): 63-66.

Becnel, J. J., & Johnson, M. A. (1993). Mosquito host range and specificity of *Ethazardia aedis* (Microspora: Culicosporidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9 (3): 269-274.

Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A., & Lounibos, L. P. (2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-borne and zoonotic Diseases*, 7 (1): 76-85.

Bennett, K. L., Gómez-Martínez, C., Chin, Y., Saltonstall, K., McMillan, W. O., Rovira, J. R., & Loaiza, J. R. (2019). Dynamics and diversity of bacteria associated with the disease vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Scientific reports*, 9 (1): 1-12.

Bilgo, E., Lovett, B., Leger, R. J. S., Sanon, A., Dabiré, R. K., & Diabaté, A. (2018). Native entomopathogenic *Metarhizium* spp. from Burkina Faso and their

virulence against the malaria vector *Anopheles coluzzii* and non-target insects. *Parasites & vectors*, 11 (1): 1-6.

Bisset, J. A. (2002). Correct use of insecticides: management of resistance. *Revista cubana de medicina tropical*, 54 (3): 202-219.

Blagrove, M. S., Arias-Goeta, C., Failloux, A. B., & Sinkins, S. P. (2012). *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (1): 255-260.

Blanford, S., Chan, B. H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R. J., Read, A. F., & Thomas, M. B. (2005). Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 308 (5728): 1638-1641.

Braga, I. A., de Castro Gomes, A., Nelson, M., Rita de Cassia, G. M., Bergamaschi, D. P., & de 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): 347-363.

Braga, G. U., Flint, S. D., Messias, C. L., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2001). Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery. *Photochemistry and Photobiology*, 73 (2): 140-146.

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

Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e serviços de saúde*, 16 (2): 113-118.

Braks, M. A., Honório, N. A., Lourenço-De-Oliveira, R., Juliano, S. A., & Lounibos, L. P. (2003). Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *Journal of medical entomology*, 40 (6): 785-794.

Brasil, P., Pereira Jr, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., Valderramos, S. G., Halai, U. A.,

Salles, T. S., Zin, A. A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Raja Gabaglia, C., Carvalho de Sequeira, P., Pilotto, J. H., Medialdea-Carrera, R., Cotrim da Cunha, D., Abreu de Carvalho, L. M., Pone, M., Machado Siqueira, A., Calvet G. A., Rodrigues Baião, A. E., Neves, E. S., Carvalho, P. R. N., Hasue, R. H., Marschik, P. B., Einspieler, C., Janzen, C., Cherry, J. D., Filippis, A. M. B & Nielsen-Saines, K. (2016). Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 375 (24): 2321-2334.

Brown, J. E., McBride, C. S., Johnson, P., Ritchie, S., Paupy, C., Bossin, H., Lutomiah, J., Fernandez-Salas, I., Ponlawat, A., Cornel, A. J., C. Black, W. C., Gorrochotegui-Escalante, N., Urdaneta-Marquez, L., Sylla, M., Slotman, M., Murray, K. O., Walker, C. & Powell, J. R. (2011). Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278 (1717): 2446-2454.

Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A. & Powell, J. R. (2014). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, 68 (2): 514-525.

Buckner, E. A., Williams, K. F., Marsicano, A. L., Latham, M. D., & Lesser, C. R. (2017). Evaluating the vector control potential of the In2Care® mosquito trap against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* under semifield conditions in Manatee County, Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33 (3): 193-199.

Bukhari, T., Takken, W., & Koenraadt, C. J. (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & vectors*, 4 (1): 1-14.

Cabral, S., De Paula, A., Samuels, R., Da Fonseca, R., Gomes, S., Silva, J. R., & Mury, F. (2020). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) immune responses with different feeding regimes following infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Insects*, 11 (2): 95.

Campos, J., & Andrade, C. F. (2001). Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, 35: 232-236.

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* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 7 (1): 1-7.

Carolino, A. T., Gomes, S. A., Pontes Teodoro, T. B., Mattoso, T. C., & Samuels, R. I. (2019). *Aedes aegypti* pupae are highly susceptible to infection by *Metarhizium anisopliae* blastospores. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 13 (3): 1629-1634.

Carrington, L. B., Seifert, S. N., Willits, N. H., Lambrechts, L., & Scott, T. W. (2013). Large diurnal temperature fluctuations negatively influence *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) life-history traits. *Journal of medical entomology*, 50 (1): 43-51.

Lourenço-de-Oliveira, R., & Braga, I. A. (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109: 787-796.

Costero, A., Edman, J. D., Clark, G. G., & Scott, T. W. (1998). Life table study of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Puerto Rico fed only human blood versus blood plus sugar. *Journal of Medical Entomology*, 35 (5): 809-813.

Chadee, D. D., Corbet, P. S., & Talbot, H. (1995). Proportions of eggs laid by *Aedes aegypti* on different substrates within an ovitrap in Trinidad, West Indies. *Medical and veterinary entomology*, 9 (1): 66-70.

Choi, C. J., Lee, J. Y., Woo, R. M., Shin, T. Y., Gwak, W. S., & Woo, S. D. (2020). An effective entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23 (2): 585-590.

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

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

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

Collins, L. E., & Blackwell, A. (2000). The biology of Toxorhynchites mosquitoes and their potential as biocontrol agents. *Biocontrol News and Information*, 21 (4): 105N-116N.

Colton, Y. M., Chadee, D. D., & Severson, D. W. (2003). Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. *Medical and veterinary entomology*, 17 (2): 195-204.

Consoli, R. A., & Oliveira, R. L. D. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz. 1: 228.

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

Costa, F. S., Silva, J. J. D., Souza, C. M. D., & Mendes, J. (2008). Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41: 309-312.

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

Daoust, R. A., & Roberts, D. W. (1982). Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate pathology*, 40 (1): 107-117.

Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A., & Fontenille, D. (2009). Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *Journal of medical entomology*, 46 (1): 33-41.

Delatte, H., Desvars, A., Bouétard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G., & Fontenille, D. (2010). Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of

Chikungunya on La Réunion. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10 (3): 249-258.

Dickens, B. L., Sun, H., Jit, M., Cook, A. R., & Carrasco, L. R. (2018). Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global distribution of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *BMJ global health*, 3 (4): e000801.

Donalísio, M. R., & Glasser, C. M. (2002). Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 5: 259-279.

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

Edman, J. D., Scott, T. W., Costero, A., Morrison, A. C., Harrington, L. C., & Clark, G. G. (1998). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. *Journal of Medical Entomology*, 35 (4): 578-583.

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

Eiras, Á. E., & Resende, M. C. (2009). Preliminary evaluation of the " Dengue-MI" technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Cadernos de Saúde Pública*, 25: S45-S58.

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

Estrada-Franco, J. G., & Craig, G. B. (1995). Biología, relaciones con enfermedades y control de *Aedes albopictus*. *Biología, relaciones con enfermedades y control de Aedes albopictus*: 51-51.

Evans, B. R., Kotsakiozi, P., Costa-da-Silva, A. L., Ioshino, R. S., Garziera, L., Pedrosa, M. C., Malavasi, A., Virginio, J. F., Capurro, M. L. & Powell, J. R. (2019). Transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes transfer genes into a natural population. *Scientific reports*, 9 (1): 1-6.

Faraone, J., Fischer, S., Aponte, C. A., Etchepare, E., Stechina, O. S., & Stein, M. (2021). Hatching pattern and coexistence of *Aedes aegypti* and *Aedes*

*albopictus* (Culicidae) in a subtropical city, Argentina, after three decades of coexistence. *Acta Tropica*, 218: 105885.

Farenhorst, M., Farina, D., Scholte, E. J., Takken, W., Hunt, R. H., Coetzee, M., & Knols, B. G. (2008). African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* ss and *Anopheles funestus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78 (6): 910-916.

Faria, M. D., & Magalhães, B. P. (2001). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 22 (1): 18-21.

Farnesi, L. C., Vargas, H. C., Valle, D., & Rezende, G. L. (2017). Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS neglected tropical diseases*, 11 (10): e0006063.

Fávaro, E. A., Dibo, M. R., Mondini, A., Ferreira, A. C., Barbosa, A. A., Eiras, Á. E., Barata, E. A. M. F. & Chiaravalloti-Neto, F. (2006). Physiological state of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs™ in Mirassol, São Paulo, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 31 (2)> 285-291.

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

Ferguson, N. M., Rodríguez-Barraquer, I., Dorigatti, I., Mier-y-Teran-Romero, L., Laydon, D. J., & Cummings, D. A. (2016). Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science*, 353 (6303): 1033-1036.

Fernando, H. S. D., Saavedra-Rodriguez, K., Perera, R., Black, W. C., & De Silva, B. N. K. (2020). Resistance to commonly used insecticides and underlying mechanisms of resistance in *Aedes aegypti* (L.) from Sri Lanka. *Parasites & Vectors*, 13 (1): 1-14.

Ffrench-Constant, R. H. (2005). Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control?. *Trends in ecology & evolution*, 20 (11): 577-579.

Flacio, E., Engeler, L., Tonolla, M., Lüthy, P., & Patocchi, N. (2015). Strategies of a thirteen year surveillance programme on *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*) in southern Switzerland. *Parasites & vectors*, 8 (1): 1-18.

Focks, D. A. & UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. (2004). A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. *World Health Organization*.

Forattini, O. P. (1962). Entomologia médica: parte geral, Diptera, Anophelini. *São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo*, 1: 662.

Forattini, O. P. (2002). Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia. *EDUSP*, 2: 864.

Forshey, B. M., Guevara, C., Laguna-Torres, V. A., Cespedes, M., Vargas, J., Gianella, A., Vallejo, E., Madrid, C., Aguayo, N., Gotuzzo, E., Suarez, V., Morales, A. M., Beingolea, L., Reyes, N., Perez, J., Negrete, M., Rocha, R., Morrison, A. C., Russell, K. L., Blair, P. J., Olson, J. G., Kochel T. J., & NMRCDFebriLe Surveillance Working Group. (2010). Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007. *PLoS neglected tropical diseases*, 4 (8): e787.

Fortuna, C., Toma, L., Remoli, M.E., Amendola, A., Severini, F., Boccolini, D., Romi, R., Venturi, G., Rezza, G., Di Luca, M. (2018). Vector competence of *Aedes albopictus* for the Indian Ocean lineage (IOL) chikungunya viruses of the 2007 and 2017 outbreaks in Italy: a comparison between strains with and without the E1:A226V mutation. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles. European communicable disease bulletin*, 23: 1800246.

Franceschini, M., Guimarães, A. P., Camassola, M., Frazzon, A. P., Baratto, C. M., Kogler, V., M.V., Dutra, V., Nakazato, L., Castro, L., Santi, L., Vainstein, M.H. & Schrank, A. (2001). Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 31: 32-37.

FUNASA. 2001. Fundação Nacional de Saúde. Dengue–Instruções para pessoal de combate ao vetor. Brasília. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man\\_dengue.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf). Acesso em 16/05/2021.

Gama, R. A., Silva, E. M., Silva, I. M., Resende, M. C., & Eiras, Á. E. (2007). Evaluation of the sticky MosquiTRAP™ for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) during the dry season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology*, 36 (2): 294-302.

García-Munguía, A. M., Garza-Hernández, J. A., Rebollar-Tellez, E. A., Rodríguez-Pérez, M. A., & Reyes-Villanueva, F. (2011). Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & vectors*, 4 (1): 1-6.

George, J., Jenkins, N. E., Blanford, S., Thomas, M. B., & Baker, T. C. (2013). Malaria mosquitoes attracted by fatal fungus. *PLoS One*, 8 (5): e62632.

Gomard, Y., Lebon, C., Mavingui, P., & Atyame, C. M. (2020). Contrasted transmission efficiency of Zika virus strains by mosquito species *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Reunion Island. *Parasites & Vectors*, 13 (1): 1-9.

Gomes, A. C., Silva, N. N., Marques, G. R., & Brito, M. (2003). Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley region, State of São Paulo, Brazil. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 28 (1): 74-78.

Gomes, A. D. S., Sciavico, C. J., & Eiras, Á. E. (2006). Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39: 327-332.

Gomes, A. D. C., Silva, N. N. D., Bernal, R. T. I., & Souza, A. D. (2008). Estimação da infestação predial por *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) por meio da armadilha Adultrap. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 17 (4): 293-300.

Gomes, S. A., Paula, A. R., Ribeiro, A., Moraes, C. O., Santos, J. W., Silva, C. P., & Samuels, R. I. (2015). Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasites & vectors*, 8 (1): 1-8.

Gomes, A. D. C. (1998). Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* em programa de vigilância entomológica. *Informe epidemiológico do SUS*, 7 (3): 49-57.

Guagliardo, S. A., Barboza, J. L., Morrison, A. C., Astete, H., Vazquez-Prokopec, G., & Kitron, U. (2014). Patterns of geographic expansion of *Aedes aegypti* in the Peruvian Amazon. *PLoS neglected tropical diseases*, 8 (8): e3033.

Gubler, D. J. (1997). Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*: 1-22.

Gubler, D. J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 40 (6): 571-578.

Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*, 11 (3): 480-496.

Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39 (1): 293-322.

Han, W. W., Lazaro, A., McCall, P. J., George, L., Runge-Ranzinger, S., Toledo, J., & Horstick, O. (2015). Efficacy and community effectiveness of larvivorous fish for dengue vector control. *Tropical Medicine & International Health*, 20 (9): 1239-1256.

Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood?. *Journal of medical entomology*, 38 (3): 411-422.

Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46 (3): 207-220

Hawley, W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, 1: 1-39.

Hecht, O., Hernandez Corzo, J. (1963) On the visual orientation of mosquitoes in their search of resting places. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 6 (1): 63-74.

Hoel, D. F., Obenauer, P. J., Clark, M., Smith, R., Hughes, T. H., Larson, R. T., DiClaro, J. W. & Allan, S. A. (2011). Efficacy of Ovitrap Colors and Patterns for Attracting *Aedes albopictus* at Suburban Field Sites in North-Central Florida<sup>1</sup>. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27 (3): 245-251.

Howard, A. F. (2010). V, N'Guessan R, Koenraadt CJM, Asidi A, Farenhorst M, Akogbéto M, et al. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. *Parasit Vectors*, 3: 87-98

Hu, X., Leming, M. T., Whaley, M. A., & O'Tousa, J. E. (2014). Rhodopsin coexpression in UV photoreceptors of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Journal of Experimental Biology*, 217 (6): 1003-1008.

Huang, Y. J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2017). Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. *Insects*, 8 (1): 21.

Huang, E. Y., Wong, A. Y., Lee, I. H., Qu, Z., Yip, H. Y., Leung, C. W., Uin, S. & Hui, J. H. (2020). Infection patterns of dengue, Zika and endosymbiont *Wolbachia* in the mosquito *Aedes albopictus* in Hong Kong. *Parasites & vectors*, 13 (1): 1-10.

Inácio da Silva, L. M., Dezordi, F. Z., Paiva, M. H. S., & Wallau, G. L. (2021). Systematic review of *Wolbachia* symbiont detection in mosquitoes: An entangled topic about methodological power and true symbiosis. *Pathogens*, 10 (1): 39.

Izri, A., Bitam, I., & Charrel, R. N. (2011). First entomological documentation of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria. *Clinical Microbiology and Infection*, 17 (7): 1116-1118.

Izurietta, R. O., Macaluso, M., Watts, D. M., Tesh, R. B., Guerra, B., Cruz, L. M., Galwankar S. & Vermund, S. H. (2011). Hunting in the rainforest and Mayaro virus infection: an emerging alphavirus in Ecuador. *Journal of global infectious diseases*, 3 (4): 317.

Johnson, P. H., Spitzauer, V., & Ritchie, S. A. (2012). Field sampling rate of BG-sentinel traps for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in suburban Cairns, Australia. *Journal of medical entomology*, 49 (1): 29-34.

Johnson, B. J., Ritchie, S. A., & Fonseca, D. M. (2017). The state of the art of lethal oviposition trap-based mass interventions for arboviral control. *Insects*, 8 (1): 5.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451 (7181): 990-993.

Juarez, J. G., Garcia-Luna, S., Chaves, L. F., Carbajal, E., Valdez, E., Avila, C., Tang, W., Martin E., Barrera, R., Hemme, R. R., Mutebi, J., Vuong, N., Roark, E. B., Maupin, C. R., Badillo-Vargas, I. E. & Hamer, G. L. (2020). Dispersal of female and male *Aedes aegypti* from discarded container habitats using a stable isotope mark-capture study design in South Texas. *Scientific reports*, 10 (1): 1-12.

Juliano, S. A., O'Meara, G. F., Morrill, J. R., & Cutwa, M. M. (2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*, 130 (3): 458-469.

Kahamba, N. F., Limwagu, A. J., Mapua, S. A., Msugupakulya, B. J., Msaky, D. S., Kaindoa, E. W., Ngowo, H. S. & Okumu, F. O. (2020). Habitat characteristics and insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* in the Ifakara area, south-eastern Tanzania. *Parasites & vectors*, 13 (1): 1-15.

Kambhampati, S., Black, W. C., & Rai, K. S. (1991). Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity*, 67 (1): 85-94.

Kamgang, B., Vazeille, M., Yougang, A. P., Tedjou, A. N., Wilson-Bahun, T. A., Mousson, L., Wondji, C. S. & Failloux, A. B. (2019). Potential of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to transmit yellow fever virus in urban areas in Central Africa. *Emerging microbes & infections*, 8 (1): 1636-1641.

Kantor, A. M., Lin, J., Wang, A., Thompson, D. C., & Franz, A. W. (2019). Infection pattern of Mayaro Virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and transmission potential of the virus in mixed infections with Chikungunya Virus. *Journal of medical entomology*, 56 (3): 832-843.

Kearney, M., Porter, W. P., Williams, C., Ritchie, S., & Hoffmann, A. A. (2009). Integrating biophysical models and evolutionary theory to predict climatic impacts

on species' ranges: the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Australia. *Functional Ecology*, 23 (3): 528-538.

Kittayapong, P., Baisley, K. J., Baimai, V., & O'Neill, S. L. (2000). Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 37 (3): 340-345.

Kraemer M.U., Sinka M.E., Duda K.A., Mylne A.Q., Shearer F.M., Barker C.M., Moore C.G., Carvalho R.G., Coelho G.E., Van Bortel W., Hendrickx G., Schaffner F., Elyazar I.R., Teng H.J., Brady O.J., Messina J.P., Pigott D.M., Scott T.W., Smith D.L., Wint G.R., Hay S.I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4: e08347.

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. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22 (2): 229-238.

Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. *Biological control*, 116: 36-45.

Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23: 133-163.

Lee, J. Y., Woo, R. M., Choi, C. J., Shin, T. Y., Gwak, W. S., & Woo, S. D. (2019). *Beauveria bassiana* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults shows high conidia persistence and productivity. *AMB Express*, 9 (1): 1-9.

Leles, R. N., D'Alessandro, W. B., & Luz, C. (2012). Effects of *Metarhizium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. *Parasitology research*, 110 (4): 1579-1582.

Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, É. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., Santana, A. E. G., Barbosa, C. N., Neto, C. C. P., Goulart, M. O. F., Wilding, C. S., Ayres, C. F. J. & de Melo Santos, M. A. V. (2011). Insecticide

resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & vectors*, 4 (1): 1-12.

Lima, A., Lovin, D. D., Hickner, P. V., & Severson, D. W. (2016). Evidence for an overwintering population of *Aedes aegypti* in Capitol Hill neighborhood, Washington, DC. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94 (1): 231.

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

Lutinski, J. A., Kuczmainski, A. G., de Quadros, S., Busato, M. A., Weirich, C. M. M., Malmgueiro, A., & Garcia, F. R. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* var. israelensis como alternativa para o controle populacional de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae). *Ciência e Natura*, 39 (2): 211-220.

Luz, C., Tai, M. H. H., Santos, A. H., Rocha, L. F. N., Albernaz, D. A. S., & Silva, H. H. G. (2007). Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of medical entomology*, 44 (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 (1): 1-6.

Maciel-de-Freitas, R., Marques, W. A., Peres, R. C., Cunha, S. P., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2007). Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district of Rio de Janeiro during dry and wet seasons. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 489-496.

Maciel-de-Freitas, R., Peres, R. C., Alves, F., & Brandolini, M. B. (2008). Mosquito traps designed to capture *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females: preliminary comparison of Adultrap, MosquiTRAP and backpack aspirator efficiency in a dengue-endemic area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 602-605.

Macoris, M. D. L. G., Andrighetti, M. T. M., Takaku, L., Glasser, 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.

Marcondes, C. B. (2001). Entomologia médica. *Atheneu*: 432.

Martines, R. B., Bhatnagar, J., de Oliveira Ramos, A. M., Davi, H. P. F., Iglesias, S. D. A., Kanamura, C. T., Keating, K, Hale, G., Silva-Flannery, L., Muehlenbachs, A., Ritter, J., Gary, J. Rollin, D., Goldsmith, C. S., Reagan-Steiner, S. S., Ermias, Y., Suzuki, T., Luz, K. G., Oliveira, K. W., Lanciotti, R., Lambert, A., Shieh, W., Zaki, S. R. & Zaki, S. R. (2016). Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *The Lancet*, 388(10047), 898-904.

Martínez Torres, E. (2005). Dengue. *Dengue*: 343-343.

Mbare, O., Lindsay, S. W., & Fillinger, U. (2013). Dose–response tests and semi-field evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv® 0.5 G) for the control of the malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu lato. *Malaria journal*, 12 (1): 1-12.

McGraw, E. A., & O'Neill, S. L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (3): 181-193.

McGregor, B. L., & Connelly, C. R. (2021). A review of the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the continental United States. *Journal of Medical Entomology*, 58 (1): 10-25.

McLean, B. J., Dainty, K. R., Flores, H. A., & O'Neill, S. L. (2019). Differential suppression of persistent insect specific viruses in trans-infected wMel and wMelPop-CLA *Aedes*-derived mosquito lines. *Virology*, 527: 141-145.

Melo-Santos, M. A. V. D., Sanches, E. G., Jesus, F. J. D., & Regis, L. (2001). Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (6): 859-860.

Melo-Santos, M. A.V. (2003) Avaliação do controle integrado de *Aedes aegypti* em uma cidade de Pernambuco. *VIII SICONBIOL*.

Ministério da Saúde (2009a). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. *Ministério da Saúde*.

Ministério da Saúde (2009b). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. *Ministério da Saúde*. (Série A. Normas e Manuais Técnicos.)

Ministério da Saúde (2018a) Saúde atualiza casos de febre amarela no Brasil. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42916-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais-5>. Acesso em 01/05/2021.

Ministério da Saúde (2018b). Relatório nº 27 - Monitoramento do Período Sazonal de Fevereiro Amarela Brasil - 2017/2018. Brasil; 4 de outubro. Relatório nº 27. Português

Ministério da Saúde (2020) Informe epidemiológico da dengue. 21p. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-05-2020.pdf>. Acesso em 18/05/2021.

Ministério da Saúde (2021a) Campanha de combate ao *Aedes aegypti*. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2020-11/ministerio-da-saude-lanca-campanha-de-combate-ao-aedes-aegypti>. Acesso em 08/05/2021.

Ministério da Saúde (2021b) O que é Febre do Mayaro?. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/f/febre-do-mayaro>. Acesso em 07/05/2021.

Mmbando, A. S., Okumu, F. O., Mgando, J. P., Sumaye, R. D., Matowo, N. S., Madumla, E., Kaindoa, E., Kiware, S. S., & Lwetoijera, D. W. (2015). Effects of a new outdoor mosquito control device, the mosquito landing box, on densities and survival of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, inside controlled semi-field settings. *Malaria journal*, 14 (1): 1-13.

Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Lwetoijera, D. W., Mpingwa, M. W., Knols, B. G., 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 (1): 1-12.

Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Lwetoijera, D. W., Mpingwa, M. W., Simfukwe, E. T., Knols, B. G., 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 (1): 1-7.

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. (2012). Exploiting the behaviour of wild malaria vectors to achieve high infection with fungal biocontrol agents. *Malaria journal*, 11 (1): 1-11.

Montella, I. R., Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B. P., Braga, I. A., & Valle, D. (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77 (3): 467-477.

Moo-Llanes, D. A., López-Ordóñez, T., Torres-Monzón, J. A., Mosso-González, C., Casas-Martínez, M., & Samy, A. M. (2021). Assessing the potential distributions of the invasive mosquito vector *Aedes albopictus* and its natural *Wolbachia* infections in Mexico. *Insects*, 12 (2): 143.

Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J. & Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11 (7): e0005625.

Muir, L. E., Thorne, M. J., & Kay, B. H. (1992). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vision: spectral sensitivity and other perceptual parameters of the female eye. *Journal of medical Entomology*, 29 (2): 278-281.

Muir, L. E., Kay, B. H., & Thorne, M. J. (1992). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vision: response to stimuli from the optical environment. *Journal of medical entomology*, 29 (3): 445-450.

Nunes, M. R. T., Faria, N. R., de Vasconcelos, J. M., Golding, N., Kraemer, M. U., de Oliveira, L. F., Azevedo, R. S. S., Silva, D. E. A., Silva, E. V. P., Silva, S. P.,

Carvalho, V. L., Coelho, G. E., Cruz, A. C. R., Rodrigues, S. G., Vianez Jr, J. L. S. G., Nunes, B. T. D., Cardoso, J. F., Tesh, R. B., Hay, S. I., Pybus, O. G. & Costa Vasconcelos, P. F. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine*, 13 (1): 1-11.

Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H. P., Musso, D. & Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, 19 (9): 20720.

Ong'wen, F., Onyango, P. O., & Bukhari, T. (2020). Direct and indirect effects of predation and parasitism on the *Anopheles gambiae* mosquito. *Parasites & vectors*, 13 (1): 1-11.

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. *Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria, EDUCS, Caxias do Sul*: 295-317.

Panamerican Health Organization (1986). *Aedes aegypti*: biology and ecology. Nelson, M. J., editor. Washington, PNSP/86-64: 50.

Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., & David, J. P. (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest management science*, 67 (1): 122-128.

Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera, M. P., & Samuels, R. I. (2008). Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*, 18 (10): 1017-1025.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Paula, C. O., & Samuels, R. I. (2011). 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 (1): 1-8.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., & Samuels, R. I. (2011). Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus

*Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites & vectors*, 4 (1): 1-7.

Paula, A.R., Ribeiro, A., Morais, C.O.P., Dias, R.S.B., Gomes, C.R.P., Samuels, R.I., (2013a). 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., Silva, C. P., & Samuels, R. I. (2013). Efficiency of fungus-impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Letters in applied microbiology*, 57 (2): 157-163.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Pereira, C. R., & Samuels, R. I. (2013). Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. *Parasites & vectors*, 6 (1): 1-6.

Paula, A.R., Ribeiro, A., Imad Silva, L.E., Samuels, R.I. (2017) Monitoramento de *Aedes* e ações educacionais integrando a comunidade de São João da Barra-RJ. *Revista de extensão UENF*, 3 (1): 17-25.

Paula, A. R., Silva, L. E., Ribeiro, A., Butt, T. M., Silva, C. P., & Samuels, R. I. (2018). Improving the delivery and efficiency of fungus-impregnated cloths for control of adult *Aedes aegypti* using a synthetic attractive lure. *Parasites & vectors*, 11 (1): 1-9.

Paula, A.R.; Ribeiro, A.; Imad-Silva, L.E.; Paula, E.R.; Samuels, R.I. (2019) Biological Sciences Foundations: Controle biológico e monitoramento do mosquito *Aedes* no campo. *Ponta Grossa (PR), Atena Editora*: 37-45.

Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and infection*, 11 (14-15): 1177-1185.

Pena, C. J., Gonzalvez, G., & Chadee, D. D. (2003). Seasonal prevalence and container preferences of *Aedes albopictus* in Santo Domingo City, Dominican Republic. *Journal of vector ecology*, 28: 208-212.

Pereira, C. R., de Paula, A. R., Gomes, S. A., Pedra Jr, P. C. O., & Samuels, R. I. (2009). The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates

for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 19 (8): 881-886.

Polanczyk, R. A., Garcia, M. D. O., & Alves, S. B. (2003). Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de saúde pública*, 37: 813-816.

Ponlawat, A., & Harrington, L. C. (2005). Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of medical entomology*, 42 (5): 844-849.

Proestos, Y., Christophides, G. K., Ergüler, K., Tanarhte, M., Waldock, J., & Lelieveld, J. (2015). Present and future projections of habitat suitability of the Asian tiger mosquito, a vector of viral pathogens, from global climate simulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370 (1665): 20130554.

Prophiro, J. S., Silva, O. S., Luna, J. E. D., Piccoli, C. F., Kanis, L. A., & Silva, M. A. N. D. (2011). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44: 300-305.

Quintela E.D. (2002) Controle de pragas do feijoeiro com o nim indiano e outras plantas. V Curso sobre produção e utilização do Nim (*Azadirachta indica*) na agropecuária Jaboticabal. *Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias*: 1-10

Rangel, D. E., Braga, G. U., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of invertebrate pathology*, 88 (2): 116-125.

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 (2): 131-136.

Reeves, W. K. (2004). Oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in relation to conspecific larvae infected with internal symbiotes. *Journal of Vector Ecology*, 29: 159-163.

Regis, L. N., Acioli, R. V., Silveira Jr, J. C., Melo-Santos, M. A. V., Souza, W. V., Ribeiro, C. M. N., Serafim, J. C., (2013). Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. *PLoS One*, 8 (7): e67682.

Reiter, P., & Colon, M. A. A. A. N. (1991). Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7 (1): 52-55.

Reiter, P. (2007). Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7 (2): 261-273.

Ritchie, S. A. (2005). Evolution of dengue control strategies in north Queensland, Australia. *Arbovirus Research in Australia*, 9: 324-330.

Rocha M.N., Duarte M.M., Mansur S.B., Silva B.D.M.E., Pereira T.N., Adelino T.É.R., Giovanetti M., Alcantara L.C.J., Santos F.M., Costa V.R. de M.; Mauro Martins Teixeira, M. M., Iani, F. C. M., Costa, V. V. & Moreira, L. A. (2019) Pluripotency of *Wolbachia* against Arboviruses: The case of yellow fever. *Gates Open Research*, 3: 161.

Russell, B. M., Kay, B. H., & Shipton, W. (2001). Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs in surface and subterranean breeding sites during the northern Queensland dry season. *Journal of medical entomology*, 38 (3): 441-445.

Samuels, R. I., Paula, A. R., Carolino, A. T., Gomes, S. A., Paula, C. O., Cypriano, M. B., Silva, L. E. I., Ribeiro, A., Santos, J. W. A. B. & Silva, C. P. (2016). Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control. *Open Access Insect Physiology*, 6: 25-31.

Samways, M. J. (1995) Insect Conservation Biology. *Springer Netherlands*, 1: 358.

Santos, A. H., Tai, M. H. H., Rocha, L. F. N., Silva, H. H. G., & Luz, C. (2009). Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. *Biological Control*, 50 (1): 37-42.

Santos, S. R. A., Melo-Santos, M. A. V., Regis, L., & Albuquerque, C. M. R. (2003). Field evaluation of ovitraps consociated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to determine oviposition rates of *Aedes aegypti*. *Dengue Bulletin*, 27: 156-162

Schaefer, C. H., & Mulligan III, F. S. (1991). Potential for resistance to pyriproxyfen: a promising new mosquito larvicide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7 (3): 409-411.

Schilte, C., Staikovsky, F., Couderc, T., Madec, Y., Carpentier, F., Kassab, S., Albert, M.L., Lecuit, M. & Michault, A. (2013). Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases*, 7 (3): e2137.

Schliessman, D. J. (1974). A review of the status of yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in the Americas. *Mosquito News*, 34: 1-9.

Scholte, E. J., Knols, B. G., Samson, R. A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of insect science*, 4 (1): 19.

Scholte, E. J., Knols, B. G., & Takken, W. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of invertebrate pathology*, 91 (1): 43-49.

Scholte, E. J., Ng'Habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Killeen, G. F. & Knols, B. G. (2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308 (5728): 1641-1642.

Scholte, E. J., Takken, W., & Knols, B. G. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta tropica*, 102 (3): 151-158.

Schreiber, E. T., & Jones, C. J. (1994). Evaluation of inoculative releases of *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae) in urban environments in Florida. *Environmental entomology*, 23 (3): 770-777.

Scott, T. W., & Takken, W. (2012). Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in parasitology*, 28 (3): 114-121.

Scott, T. W., Chow, E., Strickman, D., Kittayapong, P., Wirtz, R. A., Lorenz, L. H., & Edman, J. D. (1993). Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *Journal of medical entomology*, 30 (5): 922-927.

Secretaria de Vigilância Sanitária (2011). Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_contr\\_ole\\_dengue.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_contr_ole_dengue.pdf). Acesso em 18/05/2021.

Silva, L. E. I., Paula, A. R., Ribeiro, A., Butt, T. M., Silva, C. P., & Samuels, R. I. (2018). A new method of deploying entomopathogenic fungi to control adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of applied entomology*, 142 (1-2): 59-66.

Simmons, C. P., Farrar, J. J., van Vinh Chau, N., & Wills, B. (2012). Dengue. *New England Journal of Medicine*, 366 (15): 1423-1432.

Smith, G. C., & Francly, D. B. (1991). Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7 (1): 89-93.

Snetselaar, J., Andriessen, R., Suer, R. A., Osinga, A. J., Knols, B. G., & Farenhorst, M. (2014). Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, 7 (1): 1-10.

Sippell, W. L., & Brown, A. W. A. (1953). Studies of the responses of the female *Aedes* mosquito. *Bulletin of Entomological Research*, 43: 567-574.

Stoops, C. A. (2005). Influence of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 30 (1): 41-44.

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., Andrade, A. M., Maria da Conceição, N. C., Castro, J. S., Oliveira, F. L., Goes, C. S., Maia, M., Santana, E. B., Nunes, B. T. D. & Vasconcelos, P. F. (2015). East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerging infectious diseases*, 21 (5): 906-908.

Thammapalo, S., Nagao, Y., Sakamoto, W., Saengtharatip, S., Tsujitani, M., Nakamura, Y., Coleman, P. G. & Davies, C. (2008). Relationship between transmission intensity and incidence of dengue hemorrhagic fever in Thailand. *PLoS neglected tropical diseases*, 2 (7): e263.

Tolle, M. A. (2009). Mosquito-borne diseases. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 39 (4): 97-140.

Tsunoda, T., Fukuchi, A., Nanbara, S., & 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 (1): 56-60.

Uejio, C. K., Hayden, M. H., Zielinski-Gutierrez, E., Lopez, J. L. R., Barrera, R., Amador, M., Thompson, S. G. & Waterman, S. H. (2014). Biological control of mosquitoes in scrap tires in Brownsville, Texas, USA and Matamoros, Tamaulipas, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 30 (2): 130-135.

Unlu, I., Rochlin, I., Suman, D. S., Wang, Y., Chandel, K., & Gaugler, R. (2020). Large-scale operational pyriproxyfen autodissemination deployment to suppress the immature Asian tiger mosquito (Diptera: Culicidae) populations. *Journal of medical entomology*, 57 (4): 1120-1130.

Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of invertebrate pathology*, 111 (1): 1-12.

Valencia-Marín, B. S., Gandica, I. D., & Aguirre-Obando, O. A. (2020). The Mayaro virus and its potential epidemiological consequences in Colombia: an exploratory biomathematics analysis. *Parasites & Vectors*, 13 (1): 1-16.

Valle, D., Bellinato, D. F., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B. P., & Martins, A. D. J. (2019). Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114: e180544.

Vasuki, V. (1999). Influence of IGR treatment on oviposition of three species of vector mosquitos at sublethal concentrations. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 30 (1): 200-203.

Venturi, G., Di Luca, M., Fortuna, C., Remoli, M. E., Riccardo, F., Severini, F., Toma, L., Del Manso, M., Liberato, C., Giammattei, R., Romi, R., Pezzotti, P., Rezza, G. & Rizzo, C. (2017). Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Eurosurveillance*, 22 (39): 17-00646.

Veys-Behbahani, R., Sharififard, M., Dinparast-Djadid, N., Shamsi, J., & Fakoorziba, M. R. (2014). Laboratory evolution of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against *Anopheles stephensi* larvae (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4: S799-S802.

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

Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85 (2): 328-345.

Weeks, A. R., Reynolds, K. T., & Hoffmann, A. A. (2002). *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated?. *Trends in Ecology & Evolution*, 17 (6): 257-262.

Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual review of entomology*, 42 (1): 587-609.

Wilder-Smith, A. (2020). Dengue vaccine development: status and future. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 63 (1): 40-44.

Williams R.E. (1962) Effect of Coloring Oviposition Media with Regard to the Mosquito *Aedes triseriatus* (Say). *The Journal of Parasitology*, 48 (6): 919-925.

Wondji, C. S., Priyanka De Silva, W. A. P., Hemingway, J., Ranson, H., & Parakrama Karunaratne, S. H. P. (2008). Characterization of knockdown resistance in DDT-and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Tropical Medicine & International Health*, 13 (4): 548-555.

Wong, J., Stoddard, S. T., Astete, H., Morrison, A. C., & Scott, T. W. (2011). Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. *PLoS neglected tropical diseases*, 5 (4): e1015.

Wooding, M., Naudé, Y., Rohwer, E., & Bouwer, M. (2020). Controlling mosquitoes with semiochemicals: a review. *Parasites & vectors*, 13 (1): 1-20.

World Health Organization (2019) Zika disease. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>. Acesso em 01/06/2021.

World Health Organization (WHO) (2016) Dengue prevention and control. Disponível em: [www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB109/eeb10916](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB109/eeb10916). Acesso em 18/05/2021.

World Mosquito Program Mosquito-borne diseases are a growing threat to local communities in Mexico (2020). Disponível em: <https://www.worldmosquitoprogram.org/en/global-progress/mexico>. Acesso em 18/05/2021.

Xavier, M. D. N., Santos, E. M. D. M., Silva, A. P. A. D., Gomes, P. P., Barbosa, R. M. R., & Oliveira, C. M. F. D. (2018). Field evaluation of sticky BR-OVT traps to collect culicids eggs and adult mosquitoes inside houses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51: 297-303.

Yi, H., Devkota, B. R., Yu, J. S., Oh, K. C., Kim, J., & Kim, H. J. (2014). Effects of global warming on mosquitoes & mosquito-borne diseases and the new strategies for mosquito control. *Entomological Research*, 44 (6): 215-235.

Zúñiga I. R. Z., & Lozano, J. C. (2017). Virus Mayaro: una nueva amenaza para el continente Americano. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30 (1): 12-14.