

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

RENAN NUNES LELES

Efeito de fungos entomopatogênicos na
mortalidade de adultos, oviposição e eclosão de
larvas de *Aedes aegypti*

Orientador:
Prof. Dr. Wolf Christian Luz

Co-orientadora:
Prof^a. Dr^a. Adelair Helena dos Santos

Dissertação de Mestrado

Goiânia - Goiás
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Folha reservada para a ata de defesa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

RENAN NUNES LELES

Efeito de fungos entomopatogênicos na
mortalidade de adultos, oviposição e eclosão de
larvas de *Aedes aegypti*

Orientador:
Prof. Dr. Wolf Christian Luz

Co-orientadora:
Prof^a. Dr^a. Adelair Helena dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical - Área de Concentração – Parasitologia.

Goiânia-GO, 2009

“Os sete pecados capitais responsáveis pelas injustiças sociais são: riqueza sem trabalho; prazeres sem escrúpulos; conhecimento sem sabedoria; comércio sem moral; política sem idealismo; religião sem sacrifício e ciência sem humanismo”

Mahatma Gandhi

“Só é inabalável a fé que pode enfrentar a razão face a face, em todas as épocas da Humanidade.”

Allan Kardec

Dedico este trabalho aos meus pais Ginaldo Rossi Leles e Lúcia Maria Nunes Leles, meus irmãos Rodrigo e Raphael pelo companheirismo e carinho em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela graça da vida e do intelecto. Pela possibilidade de interagir com a natureza e de aprender com ela a ser um homem melhor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Wolf Christian Luz e a Prof^a. Dr^a. Adelair Helena dos Santos pela orientação e conhecimento que com muito trabalho e paciência me transmitiram e que, juntamente com o Luiz, a Luciana e a Marina me receberam com muito carinho dentro do laboratório, me auxiliando e apoiando na realização desse projeto, bem como a Nathalia que também tem dado seu apoio na realização dos experimentos.

A CAPES pelo auxílio financeiro que me permitiu o prosseguimento dos meus estudos e o meu avanço acadêmico.

A toda equipe do Laboratório de Biologia, Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico, em especial ao Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva e Prof^a. Dr^a. Heloísa Helena Garcia da Silva, juntamente com as técnicas Carmeci Natalina Elias e Taísia Izabel Vieira pelo auxílio na realização desse trabalho.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, por disponibilizar diversos isolados fúngicos para a pesquisa.

Aos meus pais, Ginaldo e Lúcia. Eternos exemplos de amor incondicional, carinho, afeto e retidão de caráter que eu poderia ter.

Aos meus familiares, em especial aos meus irmãos Rodrigo e Raphael, pela consideração e amizade não apenas no decorrer do curso de mestrado, mas em toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Fernando de Freitas Fernandes pelo engrandecimento acadêmico, apoio e carinho prestado em anos de trabalho em conjunto e toda a equipe do Laboratório de Artropodologia Médica e Veterinária: Walmirton, Ly e Edméia, companheiros com os quais dei os meus primeiros passos neste mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. - Antes de Cristo

ANOVA - Análise de variância

BDA - Batata Dextrose Agar

Bti - *Bacillus thuringiensis israelensis*

CDC - Centers for Disease Control

CG - Cenargen – Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (hoje: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

d - Dias

DDT - Dicloro – Difenil – Tricloroetano

FAS - Febre Amarela Silvestre

FAU - Febre Amarela Urbana

FHD - Febre Hemorrágica do Dengue

h - Horas

IP - Isolado fúngico armazenado no IPTSP

IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

min - Minutos

OMS - Organização Mundial da Saúde

PNCD - Programa Nacional de Controle do Dengue

p.t. - pós-tratamento

SNK - Comparação múltipla de Student – Newman – Keuls

UBV - Ultra Baixo Volume

UR - Umidade Relativa

RESUMO

O interesse em fungos entomopatogênicos para controle integrado de mosquitos é grande. Entretanto pouco se sabe sobre o efeito de fungos em adultos e transmissão de micoses em *Aedes aegypti*. No presente trabalho, estudaram-se, em condições de laboratório, a atividade adulticida e a propagação da infecção para ovos postos por fêmeas tratadas com três isolados de *Paecilomyces* spp, dois *Isaria* spp, um *Penicillium* sp e um *Metarhizium anisopliae*. Foram realizados dois experimentos: Com conídios secos de *M. anisopliae* IP 46 a 5×10^4 conídios/cm³ (Teste 1) e com conídios dos outros fungos formulados em óleo-água, a 10% do óleo, a 10^6 conídios/cm² (Teste 2). As fêmeas foram alimentadas com sangue de camundongo em dias alternados e, para ambos os sexos, solução açucarada (5%) foi ofertada *ad libitum*. Os adultos foram mantidos a 25°C, umidade relativa (UR) de 70% e fotofase de 12 h até 10 d pós-tratamento (p.t.). Indivíduos mortos e ovos postos foram retirados, contados e incubados em UR > 98% e 25°C por 15 d. Os ovos foram em seguida submersos em água e a eclosão de larvas avaliada diariamente até 5 d para todos os testes. Primeiros ovos postos foram encontrados em até 48 horas após a primeira hematofagia das fêmeas. O número médio de ovos/fêmea/dia (o/f/d) no teste 1 foi de 2,5 e no teste 2 variou entre 0,15 (*Paecilomyces carneus* CG 525) e 1,3 o/f/d (*Isaria fumoserosea* CG 325). Apenas IP 46 formou hifas e novos conídios sobre ovos e reduziu significativamente a eclosão quantitativa de larvas (39,2%), comparado com o grupo controle (68,6%; t = 2,3; P = 0,04). Nos demais testes a eclosão foi acima de 40%. Primeiros adultos geralmente morreram a partir de 48 h p.t. e o maior número de mortos foi encontrado 2 a 4 d depois, independentemente do teste realizado. A maior mortalidade, 10 d p.t. foi 39% (IP 46), seguido por 28% (*Isaria farinosa* CG 195), 16,4% (*Paecilomyces marquandii* CG 190), 8% (*Penicillium* sp IP 182), 6,8% (*P. carneus* CG 525), 4,7% (*Paecilomyces lilacinus* CG 362) e 4,6% (*I. fumoserosea* CG 325). A mortalidade encontrada para os controles foi $\leq 12\%$ no mesmo momento. Mosquitos tratados com CG 195, CG 525, IP 46, CG 325 e CG 190 tiveram desenvolvimento de fungo em cadáveres. Mosquitos mortos pertencentes aos grupos tratados com os isolados IP 182, CG362 e controle não tiveram desenvolvimento de micélio. Os resultados mostraram que, de acordo com o tipo de aplicação utilizada, fêmeas de *A. aegypti* contaminaram ovos e assim propagaram a micose. Tratamento com conídios secos levou a uma maior contaminação das fêmeas e assim também dos ovos postos, comparada com a aplicação indireta utilizada para os demais fungos, no qual provavelmente a contaminação ficou restrita às partes do corpo em contato com a superfície tratada. A mortalidade reduzida encontrada para todos os fungos e para ambas técnicas pode estar relacionada à umidade subótima na qual foram mantidos os mosquitos e também ao tempo curto de observação dos adultos pós-tratamento. Os fungos testados têm atividade reduzida em adultos de *A. aegypti* e fêmeas desse mosquito podem transmitir a micose durante a oviposição. Mais estudos precisam ser feitos para selecionar linhagens mais virulentas e entender melhor mecanismos de infecção e transmissão horizontal de fungos em *A. aegypti*.

ABSTRACT

The interest in entomopathogenic fungi for integrated mosquito control is high. However, little is known about the effect of fungi in adults and transmission of micoses in *Aedes aegypti*. In the present study the adulticidal activity and propagation of the infection to the eggs layed by females treated with three *Paecilomyces* spp, two *Isaria* spp, one *Penicillium* sp and one *Metarhizium anisopliae* were studied under laboratory conditions. Two experiments were performed: dried *M. anisopliae* IP 46 conidia at 5×10^4 conidia/cm³ (Test 1) and oil-water formulated conidia of the other fungi at 10% of the oil and 10^6 conidia/cm² (Test 2). Females were fed with mice blood every two days and sugar solution (5%) was offered two both, females and males, *ad libitum*. The adults were held at 25°C, relative humidity (RH) of 70% and a 12 h photophase up to 10 d post-treatment (p.t). Dead individuals and layd eggs were removed, quantified and incubated at RH > 98% for 15 d. Subsequently, the eggs were submersed in water and the eclosion of larvae evaluated daily up to 5 d. In all tests first layed eggs were found few hours after the first blood meal of females. The mean number of eggs/female/day (e/f/d) in the first test was 2.5 and in the second test, numbers varied between 0.15 (*Paecilomyces carneus* CG 252) and 1.3 e/f/d (*I. fumoserosea* CG 325). Only IP 46 produced hyphae and new conidea on eggs and significantly reduced quantitative eclosion of larvae (39.2 %) compared to the control group (68.6%; t = 2.3; P = 0.04). In the other tests, eclosion was > 40%. Generally, first adults died after 48 h p.t. and highest number of dead individuals was found 2 - 4 d later, regardless of the test. Highest mortality, 10 d p.t. was 39% (IP 46), followed by 28% (*Isaria farinosa* CG 195), 16,4% (*Paecilomyces marquandii* CG 190), 8% (*Penicillium* sp IP 182), 6,8% (*P. carneus* CG 525), 4,7% (*Paecilomyces lilacinus* CG 362) and 4,6% (*I. fumoserosea* CG 325). The control mortality was < 12% at the same moment. Mosquitoes treated with CG 195, CG 525, IP 46, CG 325 and CG 190 were found with developing fungus on cadavers. Dead mosquitoes present on groups treated with IP 182, CG 362 and control do not shows conidia development. Results showed that according to the kind of application used *A. aegypti* female contaminated eggs and in this way disseminated the micose. Treatment with dried conidia resulted in a higher contamination of females and also of layed eggs, compared to the indirect application used for the other fungi, where contamination probably was restricted to parts of the body in contact with the treated surface. The reduced mortality registered for all fungi and both methods may be related to suboptimal humidity in wich the mosquitoes were held and also to the short time of observation of the adults after treatment. The tested fungi have reduced activity in *A. aegypti* adults and females of this mosquito can transmit mycose to the eggs during oviposition. More studies should be done in order to select more virulent strains and to understand better mechanisms of infection and horizontal transmission of fungi in *A. aegypti*.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Revisão de literatura.....	01
1.1 <i>Aedes aegypti</i>	02
1.1.1 Sistemática e morfologia.....	02
1.1.2 Aspectos biológicos.....	04
1.1.3 Importância como vetor.....	06
1.1.4 Principais métodos e dificuldades para controle vetorial.....	08
1.2. Controle biológico de pragas.....	10
1.2.1 Fungos entomopatogênicos para o controle biológico.....	12
1.2.1.1 Mecanismos gerais de infecção.....	12
1.2.1.2 Métodos de aplicação, formulação e segurança no uso....	13
1.2.1.3 Controle biológico de vetores.....	14
2. Introdução.....	16
3. Objetivos.....	20
4. Metodologia.....	22
4.1 Criação dos mosquitos e obtenção dos adultos.....	23
4.2 Origem e cultivo dos fungos.....	24
4.3 Preparo de conídios e bioensaios.....	26
4.3.1 Preparo de conídios secos e tratamento dos adultos (teste 1).....	26
4.3.2 Preparo de formulados oleosos e tratamento dos adultos (teste 2).....	27
4.3.3 Manutenção dos adultos nas gaiolas.....	28

4.3.4 Avaliação da ovipostura, conidiogênese sobre ovos e eclosão de larvas.....	28
4.3.5 Avaliação da mortalidade e conidiogênese sobre adultos mortos.....	29
4.4 Análise dos resultados.....	30
5. Resultados.....	31
5.1 Ovipostura.....	32
5.2 Eclosão.....	33
5.3 Mortalidade dos adultos e conidiogênese.....	34
6. Discussão.....	37
7. Conclusões e considerações finais.....	40
7.1 Conclusões.....	41
7.2 Considerações finais.....	41
8. Referências bibliográficas.....	42

1. Revisão de literatura

1.1. *Aedes aegypti*

1.1.1 Sistemática e morfologia

A. aegypti é um artrópode pertencente à ordem Diptera, família Culicidae e subfamília Culicinae. Como todo culicíneo adulto, tem corpo delgado, pernas longas e apresenta um par de asas funcionais e outro par transformado, chamado balancins, que regula o equilíbrio do inseto durante o voo. A cabeça segue o padrão geral de culicíneos com um par de antenas de 15 artículos cada, probóscida ou aparelho bucal e um par de palpos maxilares, esses mais curtos que a probóscida nas fêmeas e o contrário nos machos (Fig. 1). A probóscida é constituída de maxilas, mandíbulas, labro e hipofaringe recobertos pelo lábio que permite a formação de um canal pungitivo sugador (Fig. 2). Os palpos maxilares são estruturas penta-articuladas que se situam lateralmente ao aparelho bucal. Os olhos compostos ocupam grande parte da porção ântero-lateral da cabeça e são constituídos de pequenos omatídeos, os quais são unidades ópticas responsáveis pela captação de luz.

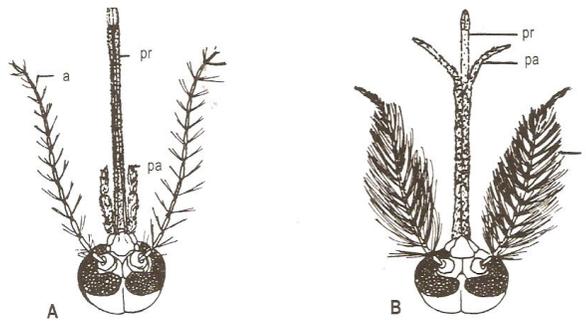


Fig. 1: Cabeça de culicíneo em vista superior- A: Culicinae fêmea; B: Culicinae macho. a: antena; pa: palpo maxilar; pr: probóscida (Fonte: Eiras 2005).

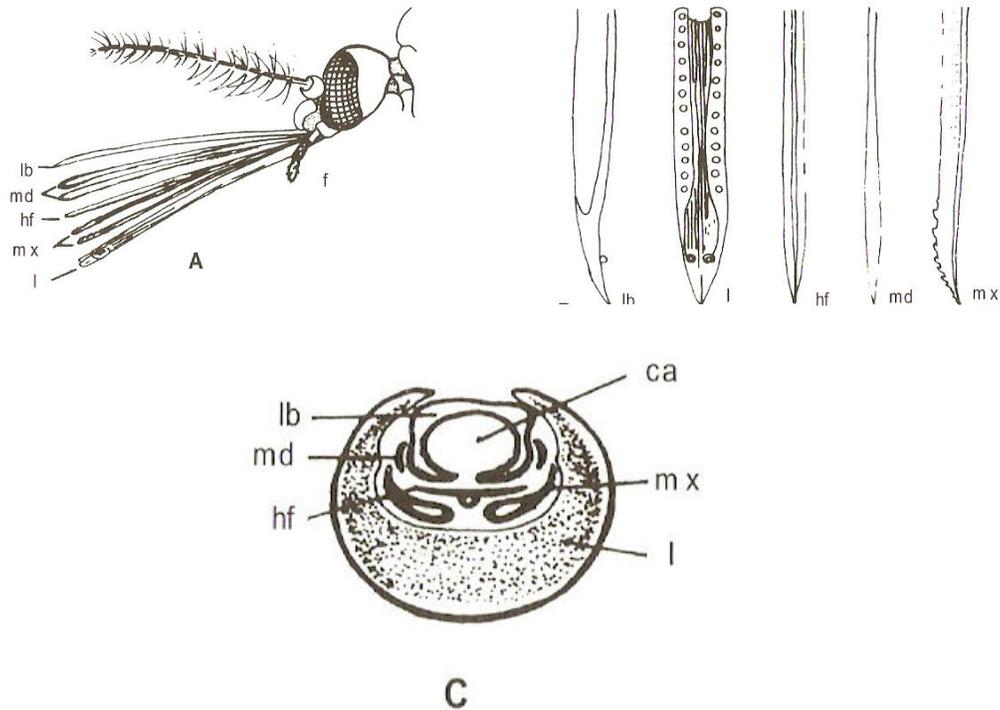


Fig. 2: Probóscida de um culicíneo (A - C). lb: labro; md: mandíbulas; hf: hipofaringe; mx: maxilas; l: lábio; f: palpo; ca: canal alimentar (Fonte: Eiras 2005).

O tórax é dividido em protórax, mesotórax e metatórax, sendo grande parte tomada pelo mesotórax, onde estão inseridas as asas. Os balancins encontram-se inseridos no metatórax. O escudo característico de *A. aegypti* apresenta um conjunto de escamas prateadas em forma semelhante a uma lira, e juntamente com o escutelo compreende o mesonoto (Fig. 3C).

O abdome é composto por oito segmentos evidentes e dois segmentos reduzidos modificados em ânus e genitália externa (Consoli & Oliveira 1998).

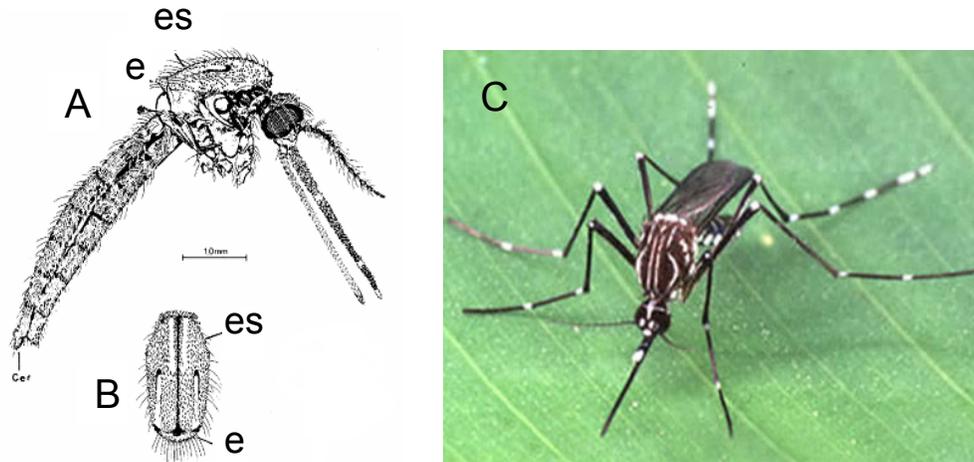


Fig. 3: A: Culicídeo em vista lateral: escudo (es) e escutelo (e); B: mesonoto com escudo e escutelo (Fonte: Consoli & Oliveira 1998); C: *Aedes aegypti*: desenho característico em forma de lira no mesonoto (Fonte: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?Infoid=1282&sid=9&tpl=priinterview>; Acesso em 10 de Novembro de 2008).

1.1.2 Aspectos biológicos

A. aegypti tem desenvolvimento holometabólico, com as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são elíptiformes e recobertos por uma camada impermeável chamada cório. São postos de forma isolada em superfícies próximas a água límpida represada. O tempo médio entre a postura e a eclosão das larvas, após o contato dos ovos com a água é variável. Estudos realizados com cepas goianas, criadas em laboratório, tiveram períodos variando entre 1 e 85 dias, e as eclosões ocorreram em blocos. É possível que esse comportamento também se repita para outras cepas (Silva & Silva 1999). Parte dos ovos permaneceu viável por mais de 450 dias em ambiente ressecado (Silva & Silva 1999; Luz et al. 2008), o que segundo Silva & Silva (1999), pode contribuir com a dispersão passiva de ovos para outras regiões através do transporte de materiais utilizados como criadouros pelas fêmeas.

Os criadouros de *A. aegypti* estão fortemente relacionados à ambientes urbanos, sobretudo materiais recicláveis que acumulam água de chuvas como latas, pneus e garrafas mas também vasos de plantas ou locais de estoque de água para uso humano, por exemplo, caixas d'água e cisternas. Esses últimos

podem contribuir a manter populações importantes nas cidades em períodos mais secos do ano (Consoli & Oliveira, 1998).

Após a eclosão das larvas, as mesmas passam por 4 estádios larvais e um período pupal, todos eles aquáticos, para enfim chegarem a fase adulta (Fig. 4). A proporção de sexo dos adultos emergidos é de cerca de um macho para cada fêmea. A longevidade dos adultos foi considerada maior para fêmeas quando comparado a machos, podendo chegar a até mais de 50 dias para fêmeas (Silva & Silva 1999). Os adultos podem dispersar-se ativamente mais de 800 metros (Honório et al. 2003; Liew & Curtis 2004).

A. aegypti apresenta hábitos diurnos e atividades como acasalamento e alimentação ocorrem durante o dia. Machos e fêmeas alimentam-se de seiva, entretanto, a fêmea necessita de repastos sangüíneos para a maturação de ovos, sendo apenas as fêmeas hematófagas. O início da manhã e o fim da tarde são os horários mais comuns para a hematofagia. Embora as fêmeas tenham hábitos alimentares ecléticos, a principal fonte de sangue é o homem. A mesma fêmea pode alimentar-se diversas vezes no mesmo hospedeiro ou em hospedeiros diferentes, e prefere picar regiões mais baixas do corpo humano como a parte baixa das pernas e os pés (Consoli & Oliveira, 1998).

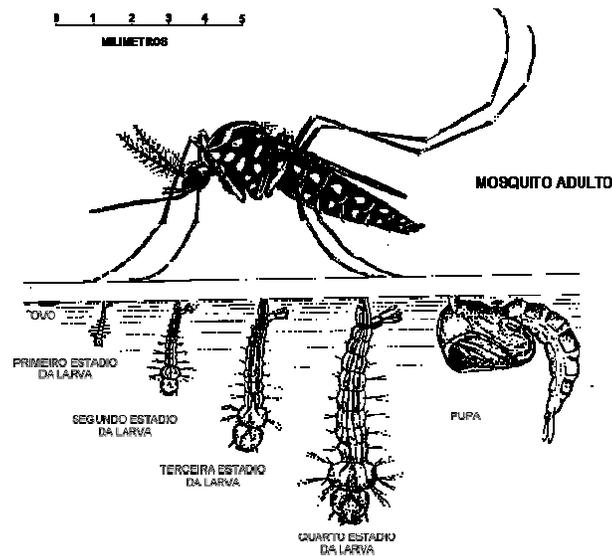


Fig. 4: Fases evolutivas de *Aedes aegypti* (Disponível em: www.prdu.unicamp.br/dengue/mosquito.html - Acessado em 30 de outubro de 2008).

1.1.3 Importância como vetor

Além dos incômodos gerados pelas picadas das fêmeas, *A. aegypti* é vetor do vírus da febre amarela em seu ciclo urbano e também dos quatro sorotipos distintos dos vírus da dengue. A transmissão de ambas as doenças para os humanos se dá a partir da picada da fêmea previamente infectada. Ela adquire a infecção via repasto num indivíduo doente ou via transovariana (Consoli & Oliveira, 1998).

Dengue é caracterizado como uma das principais arboviroses de repercussão mundial. Casos dessa doença já foram notificados em mais de 100 países (Foley et al. 2007; CDC 2008). O primeiro caso de dengue, confirmado por exames laboratoriais, ocorrido no Brasil foi registrado em 1981 no estado de Roraima (Siqueira Jr et al. 2005). Até 1993, a doença seguiu em ondas epidêmicas em áreas isoladas do país. Após a introdução de novos sorotipos várias epidemias ocorreram em praticamente todo o país, com

exceção dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Siqueira Jr et al. 2005). Contudo, nesses dois estados, casos da doença têm sido notificados desde 2007 (Ministério da Saúde 2008a). Os primeiros casos de “febre hemorrágica da dengue” (FHD) confirmados no Brasil datam de 1990, após a introdução do sorotipo 2 (DENV2). Entre janeiro e março de 2008, foram notificados cerca de 120.570 casos de dengue no Brasil, sendo 647 de FHD com 48 óbitos (Ministério da Saúde 2008a). A maioria dos casos de FHD no Brasil ainda é mais comum em adultos, embora, em estados como Amazonas o índice da doença em pacientes menores de 15 anos tem aumentado (Siqueira Jr et al. 2005). Em 2006 e até 2008 os sorotipos 1, 2 e 3 circulavam no Brasil (Ministério da Saúde 2008a; Fig. 5).

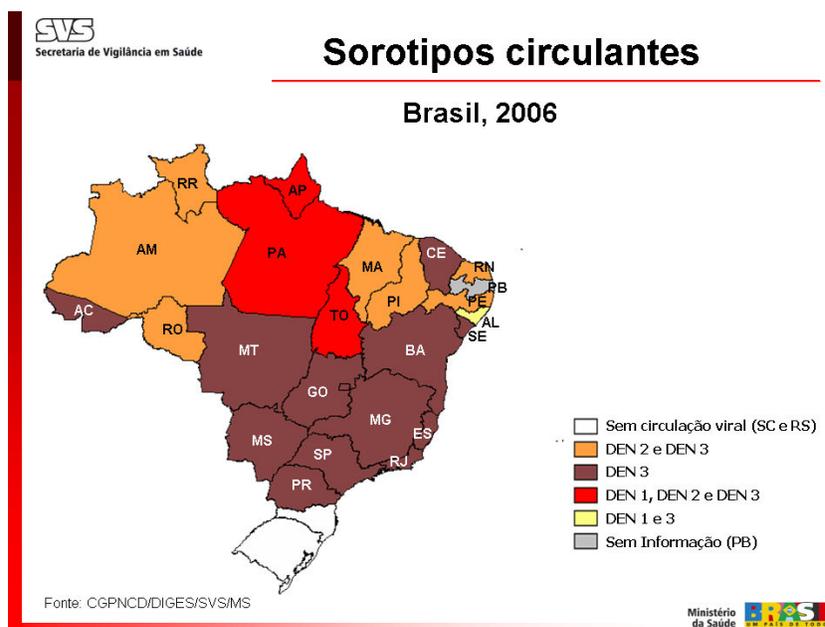


Fig. 5: Sorotipos de vírus da dengue circulantes nos estados do Brasil no ano de 2006 (Fonte:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kidengue2/epidemiologia/imagens.html> – Acesso em 03/12/2008).

A febre amarela é considerada uma das doenças viróticas febris de maior gravidade, devido às complicações hepáticas características as quais geram altos índices de mortalidade. Essa doença é dividida em “Febre Amarela

Urbana (FAU)” e “Febre Amarela Silvestre (FAS)”, em função dos diferentes locais e vetores envolvidos na transmissão.

Casos de FAU não foram descritos no Brasil desde 1942. Entretanto, a FAS permanece até hoje e é de difícil erradicação devido à impossibilidade de controle dos vetores em ambientes silvestres, à manutenção do ciclo por macacos e à falta de cobertura vacinal de toda a população. Ao final de 2007 e início de 2008 foram confirmados 18 casos de FAS no Brasil, com 9 óbitos, sendo 14 casos e 9 mortes no estado de Goiás (Ministério da Saúde 2008b).

Os surtos cíclicos de FAS tornam real o risco de novos casos de FAU em municípios brasileiros, já que a FAU e dengue são transmitidos pelo mesmo vetor (Massad et al. 2001).

1.1.4 Principais métodos e dificuldades para controle vetorial

A. aegypti tem sido alvo de campanhas de combate desde a década de 1900 através de políticas sanitárias idealizadas por Oswaldo Cruz para erradicação da FAU no Rio de Janeiro. Essa espécie foi erradicada do Brasil e de mais 17 países das Américas entre 1950 e 1960. O combate era realizado através de ataques aos focos do vetor, baseadas em rígidas estruturas hierárquicas e participação voluntária da população (Tauil 2002). Entretanto, devido ao aumento da complexidade urbana essas políticas tornaram-se ineficazes e em 1976 houve a re-introdução definitiva do vetor no país, a partir do estado do Pará (Tauil 2002) (Fig. 6).

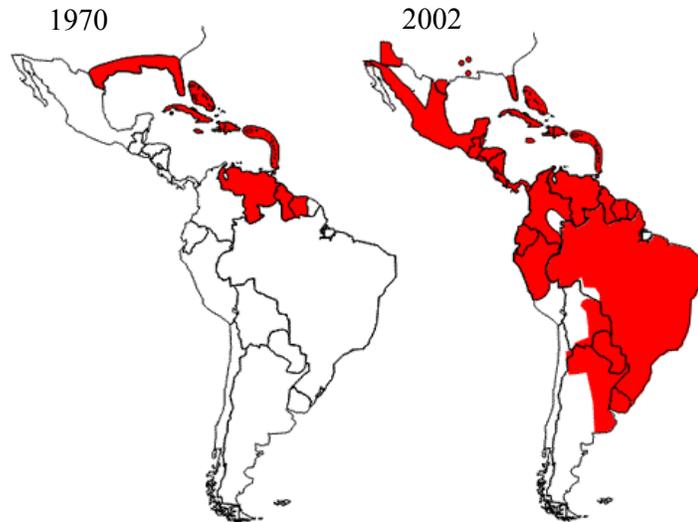


Fig. 6: Distribuição de *Aedes aegypti* nas Américas em 1970 e em 2002 (Fonte: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>).

O “Programa Nacional de Controle do Dengue” (PNCD) atualmente em vigor tem como principais medidas de controle, políticas de conscientização populacional associadas à vigilância entomológica e combate ao vetor, através do uso de temefós como larvicida e nebulização térmica e atérmica para controle de adultos (Braga & Valle 2007). Desde 1985 os inseticidas mais utilizados em nebulizações foram o propoxur, malathion e piretróides (Macoris et al. 1999; Braga & Valle 2007). Entretanto, segundo estudos realizados na cidade de Salvador, a prática proposta pelo PNCD, além de muito onerosa, mostrou-se ineficaz para a minimização de casos de dengue nesta cidade e acredita-se que o mesmo quadro se repita no restante do país (Teixeira et al. 2002; Ministério da Saúde 2008a).

Mudanças em relação a métodos de controle têm sido propostas pelo PNCD, de acordo com a situação epidemiológica específica em diferentes estados. A falta de melhor planejamento regional de ações públicas de controle, necessidade de melhores condições sanitárias nas cidades brasileiras, uma pequena participação popular em campanhas de destruição de focos do mosquito e uma queda de suscetibilidade do vetor a inseticidas utilizados, dificultam a erradicação de *A. aegypti*. Resistência de larvas a

temefós já foi notificada nos estados de São Paulo (Macoris et al. 2003), Espírito Santo, Rio de Janeiro, Sergipe, Alagoas (Lima et al. 2003; Braga et al. 2004), Distrito Federal (Carvalho et al. 2004), Ceará (Lima et al. 2006) e Paraíba (Beserra et al. 2007). Casos de adultos resistentes a cipermetrina foram relatados no Paraná (Luna et al. 2004), Rio de Janeiro e Alagoas (Cunha et al. 2005). O mesmo quadro de resistência a piretróides e organofosforados também se repete em outros países da América Latina como em Cuba (Rodríguez et al. 2002) e Peru (Chavez et al. 2005). Nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, em função da situação crítica de resistência de larvas a temefós, são utilizados biolarvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) desde o ano de 2001. Embora esses biolarvicidas apresentem menor persistência do que o temefós quando expostos diretamente à luz solar, são eficazes no controle de larvas resistentes (Braga & Valle 2007).

Similares sintéticos de hormônios juvenilizantes produzidos pelos insetos, conhecidos como inibidores de crescimento, são também recomendados pela OMS para controle de *A. aegypti* (OMS 1997). Estes produtos têm demonstrado resultados promissores no manejo populacional de larvas resistentes a temefós em laboratório (Braga et al. 2005)

1.2 Controle biológico de pragas

Medidas de controle biológico visam manipular inimigos naturais para reduzir populações de uma determinada praga alvo (Pedigo 2002). O uso de seres vivos para controle de pragas agrícolas já é antigo. Desde o ano 300 a.C. os chineses utilizavam formigas a fim de diminuir pragas em laranjais (Pedigo 2002). Muitos conhecimentos históricos e populares, entretanto, foram negligenciados durante anos, quando novos produtos à base de enxofre, arsênico e plantas com propriedades inseticidas entraram com grande sucesso no dia a dia do produtor. O DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) popularizou definitivamente os inseticidas químicos sintéticos, inclusive no combate de insetos de importância médica. O livro “Silent Spring” publicado em 1962 (Carson 1962) ressaltou os efeitos secundários dramáticos do DDT sobre o

ambiente, especialmente em animais, e foi considerado um marco da preocupação e conscientização no uso indiscriminado de DDT. Esse livro contribuiu para o surgimento de formas alternativas, eficazes, específicas e menos poluentes para o controle de pragas agrícolas e de artrópodes de importância médica e veterinária (Pedigo 2002). Hoje, o controle biológico tornou-se uma ferramenta indispensável no controle integrado devido à sustentabilidade, especificidade e aos baixos danos ambientais.

Um exemplo de controle integrado de vetores bem sucedido é a erradicação de *A. aegypti* num pequeno vilarejo no Vietnã, unindo controle biológico e conscientização da população (Nam et al. 1998). Nesse vilarejo, com cerca de 400 habitações, nos principais poços e locais de armazenamento de água foram liberados microcrustáceos aquáticos do gênero *Mesocyclops*, que são predadores de larvas de mosquitos. Os habitantes foram responsáveis pela manutenção dos microcrustáceos e eliminação de criadouros nos quais os microcrustáceos não conseguiam sobreviver, como garrafas, pneus, entre outros. Não houve reaparecimento de larvas e de adultos de *A. aegypti* durante dois anos após a eliminação do mosquito (Nam et al. 1998).

Além de predadores, pragas podem ser combatidas com patógenos como vírus, bactérias, fungos, protozoários ou nematódeos. O microsporídeo *Edhazardia aedis* é um patógeno específico de *A. aegypti*. Pode ser transmitido via oral, pela ingestão de esporos ou via transovariana, caso a larva sobreviva a infecção e se torne adulta (Becnel & Johnson 2000). Após aplicação inundativa desse patógeno, até 100% de larvas de *A. aegypti* foram eliminadas em testes de laboratório (Becnel & Johnson 2000). Porém, a sobrevivência e atividade dos microsporídeos em criadouros naturais não se mostraram suficientes sem novas aplicações inundativas (Becnel & Johnson 2000).

Bactérias esporogênicas como o *Bti* são bem conhecidas no controle de larvas de mosquitos (Boisvert & Boisvert 2000). Os esporos contêm cristais protéicos denominados protoxinas, que são ativadas quando os esporos são ingeridos pelas larvas e entram em contato com o meio alcalino do intestino médio. As toxinas ligam-se ao epitélio do mesêntero onde formam poros o que leva o inseto a morte por septicemia.

Produtos à base de *Bti* causaram mortalidade acima de 95% em larvas de *A. aegypti* durante um período de até 100 dias em condições de laboratório (Lima et al. 2005). No entanto, em condições de campo, a alta atividade larvicida foi mantida por apenas 13 dias e um efeito residual, com mortalidades acima de 70%, por 2 a 5 semanas (Lima et al. 2005). A eficiência foi menor devido a suscetibilidade dos esporos a luz ultravioleta.

Em recipientes de ferro a mortalidade não ultrapassou 80% a partir do sétimo dia pós-aplicação. É possível que reações de oxidação nesses recipientes tenham minimizado a eficácia dos esporos (Lima et al. 2005).

1.2.1 Fungos entomopatogênicos para o controle biológico

1.2.1.1 Mecanismos gerais de infecção

Os primeiros estudos sobre fungos patogênicos em insetos foram feitos a partir de 1834 quando o cientista italiano Agostino Bassi infectou lagartas *Bombyx mori* com um fungo, hoje conhecido como *Beauveria bassiana* (Alves 1998).

O principal mecanismo de infecção de insetos por esse e muitos outros fungos é através da cutícula, diferentemente de outros patógenos que invadem o inseto através da ingestão de alimentos contaminados (Alves 1998). A invasão parenteral garante a esse grupo de entomopatógenos a possibilidade de infectar diversos estágios como ovos, larvas, pupas e adultos.

Os processos de invasão do inseto pelo fungo se dão basicamente em quatro etapas: adesão; germinação; penetração e colonização. A adesão à cutícula é fundamental para o sucesso da infecção. De forma geral, conídios presentes no nicho dos insetos fixam-se passivamente à cutícula. Alguns fungos têm uma camada de muco sobre os conídios, que protege o conídio contra a dessecação e reforça a adesão sobre a cutícula (Alves 1998). Em condições favoráveis, principalmente umidade alta, conídios aderidos começam a germinar. Para isso formam um tubo germinativo e apressório que auxilia durante a penetração de hifas. A penetração pode variar de acordo com a

espécie do fungo ou do inseto, condições ambientais e a presença de determinados nutrientes e microbiota sobre a cutícula. Esse processo envolve fatores físicos de pressão da hifa terminal sobre a cutícula associados a mecanismos enzimáticos. Os principais locais de invasão são as membranas intersegmentares, e além dessas, o aparelho bucal, espiráculos, ânus, sifão respiratório e tarsos. A invasão pode ocorrer também via oral e nesse caso a infecção inicia - se no mesêntero do inseto (Alves 1998).

Hifas que chegam a hemocele, colonizam o inseto inteiro ramificando-se e produzindo corpos hifais. A morte do inseto ao final da infecção está relacionada com ação de micotoxinas, atividades histolíticas e bloqueios mecânicos no canal digestivo e espiráculos por hifas. Após a morte, hifas começam a emergir sobre o cadáver e novos conídios são formados. Esses podem contaminar outros insetos, dando continuidade ao ciclo de vida do fungo.

1.2.1.2 Métodos de aplicação, formulação e segurança no uso

Em vista do potencial de fungos para controle de insetos, é importante salientar que os métodos de aplicação adaptados as pragas alvo, são decisivos para bons resultados. A aplicação direta de conídios sobre um inseto, leva a uma maior contaminação quantitativa comparada a aplicação indireta, ou seja, sobre uma área na qual o inseto posteriormente entra em contato (Scholte et al. 2003; Luz & Batagin, 2005). Mesmo assim, métodos indiretos de aplicação mostram ter maior praticidade em mosquitos adultos (Blanford et al. 2005; Scholte et al. 2005; Paula et al. 2008).

Fatores abióticos adversos no ambiente natural como umidade relativa subótimal para os fungos e luz ultravioleta tendem a dificultar ou até mesmo inviabilizar o desenvolvimento de micoses em insetos. Aditivos em formulações de conídios podem auxiliar o fungo na superação de efeitos deletérios no ambiente e potencializar a ação entomopatogênica (Bateman 1997; Fargues et al. 1997; Lomer et al. 2001; Alves et al. 2002; Luz & Batagin, 2005). Conídios formulados em óleo, por exemplo, mantiveram a atividade alta contra

gafanhotos em umidades subotimais (Bateman et al. 1993). Formulações à base de óleo aumentaram a mortalidade também de outros insetos tratados com fungos quando comparados a formulações aquosas (Fargues et al. 1997; Batta 2003; Luz & Batagin 2005; Maranga et al. 2005). Provavelmente o óleo melhorou o contato de conídios com a cutícula, devido à superfície lipofílica de ambos, e aumentou assim a contaminação quantitativa dos insetos com os conídios (Luz & Batagin 2005). Além disso, formulações oleosas protegeram conídios da ação de raios ultravioletas e aumentaram o tempo de vida útil de conídios (Alves et al. 2002; Batta et al. 2003).

Fungos entomopatogênicos normalmente não estão relacionados a quadros infecciosos em humanos. Casos esporádicos foram notificados em indivíduos imunossuprimidos (Vestergard et al. 2003). Para *M. anisopliae* não se conhecem efeitos adversos em organismos não alvos (Alves et al. 1996, Butt et al. 1998), como aqueles existentes no solo (Broza et al. 2001), peixes (Milner et al. 2002), anfíbios (Genthener et al. 1998), répteis (Austwick, 1980), aves (Wasti et al. 1980) e o homem (Ignoffo 1973, Saik et al. 1990, Siegel & Shadduck 1990, Zimmermann 1993, 2007, Goettel et al. 2001, Vestergard et al. 2003).

1.2.1.3 Controle biológico de vetores

Fungos têm sido estudados como ferramenta para controle biológico de vetores importantes em saúde pública. Em ensaios de laboratório, triatomíneos, vetores da tripanossomíase americana em diversos países da América Latina, mostraram-se muito susceptíveis à infecção por *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Luz et al. 1998; Lecuona et al. 2001; Luz & Batagin 2005). Moscas, da espécie *Musca domestica*, morreram em altas taxas quando expostas a suspensão aquosa de conídios de *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* (Senna - Nunes et al. 2002).

Fungos entomopatogênicos também têm sido estudados e demonstraram ter potencial para o controle de mosquitos (Scholte et al. 2004a). Resultados obtidos em estudos com *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *Anopheles gambiae*

indicaram uma possível redução nos níveis de transmissão vetorial da malária em mais de 80% (Scholte et al. 2003, 2005; Blanford et al. 2005). Outros estudos sobre transmissão horizontal mostraram que conídios de *M. anisopliae* podem ser veiculados da fêmea para o macho de *An. gambiae* durante o acasalamento (Scholte et al. 2004b).

Isolados de *M. anisopliae* causaram até 100% de mortalidade de larvas de segundo estágio de *A. aegypti* (Silva et al. 2004). Em outro estudo, adultos de *A. aegypti*, *A. albopictus* e *Culex quinquefasciatus* tratados com conídios desse fungo tiveram mais de 80% dos seus indivíduos infectados. Os tempos de sobrevivência (TL_{50}) dos mosquitos foram significativamente mais curtos quando comparados ao controle (Scholte et al. 2003, 2007).

Vários fungos mostraram ter também atividade ovicida em *A. aegypti* em condições de laboratório (Luz et al. 2007, 2008). A redução da eclosão de larvas variou de acordo com a espécie do fungo (Luz et al. 2007), reduções de mais de 80% foi observado em ovos tratados com fungos dos gêneros *Paecilomyces*, *Isaria* e *Penicillium* e também com *M. anisopliae*.

Linhagens que consigam infectar todos os estágios de *A. aegypti* e de outros mosquitos após aplicação em habitats ou por transmissão horizontal teriam grande interesse para uso em um controle integrado desse vetor.

2. Introdução

A. aegypti é um mosquito de origem africana, encontrado principalmente em países de clima tropical e subtropical. É o principal vetor da febre amarela urbana e dos quatro sorotipos da dengue, em mais de cem países (Foley et al. 2007). Tem maior distribuição em ambientes urbanos, ricos em criadouros artificiais gerados pelo aglomerado de residências e acúmulo de lixo.

Embora esse vetor tenha sido erradicado do Brasil na década de 1950, foi reencontrado a partir de 1976, e desde então as medidas utilizadas têm sido ineficientes para o seu controle permanente (Tauil 2002; Teixeira et al. 2002). Dentre os principais fatores que levaram a esse insucesso, destaca-se uma crescente ineficácia do temefós no combate de larvas e de piretróides no combate de adultos, que são os principais inseticidas utilizados no controle deste vetor (Macoris et al. 1999; Luna et al. 2004; Cunha et al. 2005; Braga & Valle 2007). Além disso, a falta de adesão da população no combate aos focos e criadores do vetor e a falta de um melhor planejamento específico das campanhas de combate para cada cidade, também contribuíram para o insucesso.

Novas formas de controle têm sido desenvolvidas nos últimos anos, visando reduzir os riscos de propagação de vetores resistentes e efeitos nocivos promovidos pelos inseticidas químicos, tanto para o homem quanto para o ambiente. Larvicidas sintéticos, como reguladores de crescimento ou larvicidas à base de bactérias são utilizados em programas de controle em regiões com resistência comprovada de larvas de *A. aegypti* contra o temefós, por exemplo. *Bti* tem elevada atividade larvicida e grande efeito residual quando protegido da luz solar (Melo – Santos et al. 2001; Lima et al. 2005). O uso de *Bti* já tem sido praticado em programas de controle de *A. aegypti* nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, onde o status de resistência de larvas ao temefós é considerado crítico (Braga & Valle 2007).

Fungos entomopatogênicos são também promissores no controle de mosquitos. Atividades larvicida e adulticida de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em mosquitos já foram descritas em condições de laboratório (Scholte et al. 2003, 2004a; Silva et al. 2004). Esses fungos foram estudados intensamente para uso contra *An gambiae*, principal vetor da malária na África sub-saariana

(Scholte et al. 2003, 2005; Blanford et al. 2005). Atualmente estão sendo realizados testes de campo com *M. anisopliae* e *B. bassiana* na Tanzânia, a fim de avaliar modelos matemáticos promissores elaborados para a mesma região por Scholte et al. (2005) que prevêem redução de pelo menos 80% da transmissão de malária por esse vetor (Mnyone et al. - resultados não publicados).

A atividade de fungos varia de acordo com a espécie e linhagem. Linhagens virulentas que conseguem infectar e eliminar rapidamente todos os estágios evolutivos de *A. aegypti* têm potencial para um controle mais eficiente desse vetor. *M. anisopliae* apresentou atividade larvicida (Silva et al. 2004) adulticida (Scholte et al. 2007; Paula et al. 2008) e ovicida (Luz et al. 2007; 2008; Albernaz et al. 2009, Santos et al. 2009) em *A. aegypti*. Outros fungos dos gêneros *Isaria*, *Paecilomyces* e *Penicillium* também infectaram ovos de *A. aegypti*, semelhante a *M. anisopliae* (Luz et al. 2007). Contudo, a atividade contra adultos e larvas desses últimos fungos ainda não foi estudada.

Fungos entomopatogênicos propagam-se em condições naturais por disseminação de conídios formados principalmente sobre insetos mortos pela infecção, contaminando o meio ambiente e novos insetos. A transmissão acontece indiretamente ou também pelo contato direto entre insetos sadios e insetos vivos contaminados e/ou infectados ou ainda insetos mortos com fungo. Ainda existem poucos estudos sobre transmissão de micoses entre insetos vivos ou diferentes estágios do mesmo inseto. Melhores conhecimentos sobre a dinâmica de uma micose numa população alvo relacionada à transmissão horizontal irão contribuir para um controle mais efetivo da praga visada. Estudando doses variadas de conídios de *M. anisopliae* em *An. gambiae*, Scholte et al. (2004b) observaram que fêmeas tratadas contaminaram machos durante o vôo de acasalamento (Scholte et al. 2004b). Para *A. aegypti*, *entretanto*, não existem relatos sobre uma transmissão da infecção entre estágios.

Grande parte de fungos entomopatogênicos precisa de alta umidade, sobretudo, durante o desenvolvimento extra-cuticular como na invasão do inseto, e propagação de conídios após a morte do inseto. Formulados à base

de óleo muitas vezes garantem um contato melhor do produto com a cutícula e assim uma maior contaminação quantitativa também com conídios, dado a característica lipofílica tanto da cutícula como dos conídios (Luz & Batagin, 2005). Além disso, o óleo aumenta a resistência dos conídios a fatores abióticos como umidades subótimas e luz ultravioleta (Alves et al. 2002), sendo que formulados oleosos têm mostrado mais eficiência, além de permanecerem viáveis por mais tempo quando comparados a formulados aquosos (Bateman et al. 1993; Luz et al. 1998; Batta 2003; Maranga et al. 2005).

Testes sobre a patogenicidade de um fungo num inseto ou estágio alvo, em condições de laboratório, visam oferecer ao fungo as melhores condições para a infecção, como dosagens altas e umidade elevada. A aplicação de conídios pode ser feita diretamente por pulverização de indivíduos ou indiretamente por tratamento de um suporte e posterior exposição dos insetos. No caso de mosquitos adultos, um tratamento indireto, visando a contaminação em locais de repouso ou oviposição parece ser a técnica mais indicada.

Em estudos sobre transmissão horizontal entre indivíduos do mesmo estágio e entre estágios diferentes, grupos tratados estão sendo expostos a grupos não tratados ou a sua própria prole (Scholte et al. 2004b).

No presente trabalho foi estudada a atividade adulticida de isolados de *M. anisopliae*, *Isaria farinosa*, *Isaria fumoserosa*, *Paecilomyces marquandii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces carneus* e *Penicillium* sp, todos com atividade ovicida em *A. aegypti* previamente comprovada (Luz et al. 2007), em diferentes formulações e aplicação indireta. Foi também avaliado o efeito da infecção sobre o número de ovos postos, a contaminação com conídios durante a oviposição e a eclosão quantitativa de larvas oriundas desses ovos.

3. Objetivos

Avaliar a ação de *M. anisopliae* IP 46, *I. farinosa* CG 195, *I. fumoserosea* CG 325, *P. carneus* CG 525, *P. marquandii* CG 190, *P. lilacinus* CG 362, *Penicillium* sp IP 182 sobre:

1. Patogenicidade em adultos de *A. aegypti*.
2. Influência da infecção fúngica sobre o número de ovos postos e eclosão quantitativa de larvas de *A. aegypti*.
3. Transmissão da micose de fêmeas de *A. aegypti* para os ovos postos.

4. Metodologia

4.1 Criação do mosquito e obtenção dos adultos

A população de *A. aegypti* originou-se a partir de larvas livres de vírus coletadas em 1991 em Goiânia, Brasil (Silva et al. 1998). Toda a criação ocorreu em sala climatizada a $28 \pm 5^\circ\text{C}$, UR de $80 \pm 10\%$ e fotofase natural. Ovos aderidos a papéis filtro foram incubados em bacias brancas (30 cm de diâmetro x 7 cm de altura) contendo 1,5 litros de água de torneira. Larvas eclodidas foram transferidas para bacias novas e alimentadas com ração triturada para gato (Black Jack[®] - Alisul Alimentos S. A., Rio Grande do Sul, Brasil; Silva et al. 1998) (Fig. 7).

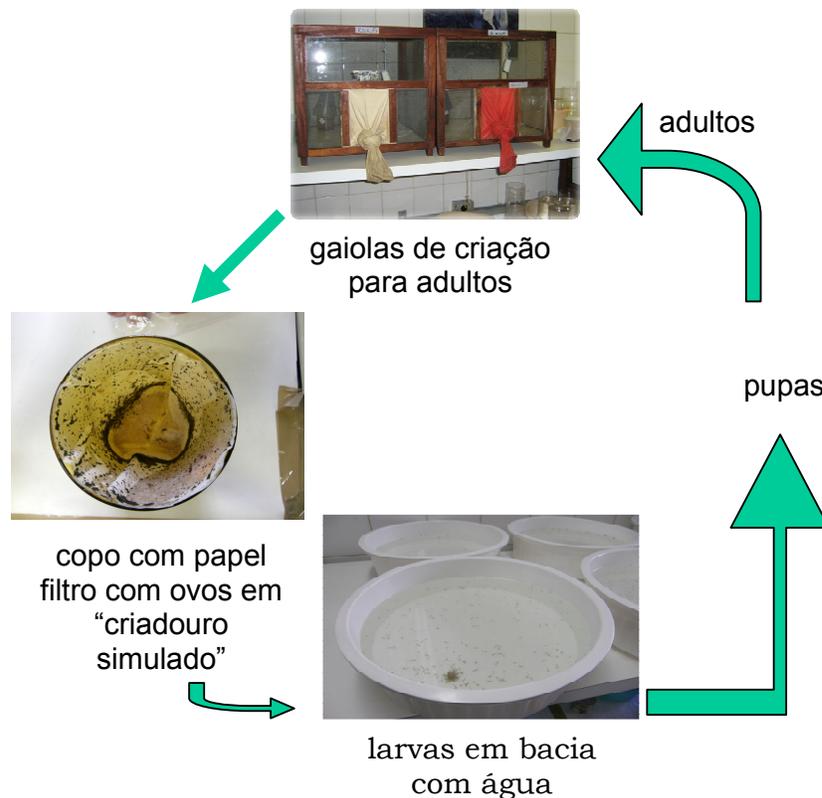


Fig. 7: Criação de *Aedes aegypti* em laboratório.

Para a obtenção dos adultos utilizados nos testes, quarenta pupas foram transferidas para um copo de poliestireno (50 cm^3) com 20 ml de água de torneira autoclavada. Esse copo foi grampeado na face interna da parede

lateral de outro copo maior (500 cm³) do mesmo material. As pupas foram mantidas a temperatura e fotofase natural. O copo maior foi fechado com uma malha de filó e liga (Fig. 8). Dessa maneira, os adultos, ao emergirem do pupário podiam voar no interior do copo, sendo contidos pela tela de filó. Após o final da emergência dos adultos, um “capturador de Castro” era introduzido no recipiente através de um pequeno orifício feito na parede lateral do copo maior e todos os adultos eram retirados, sexados e usados nos testes.

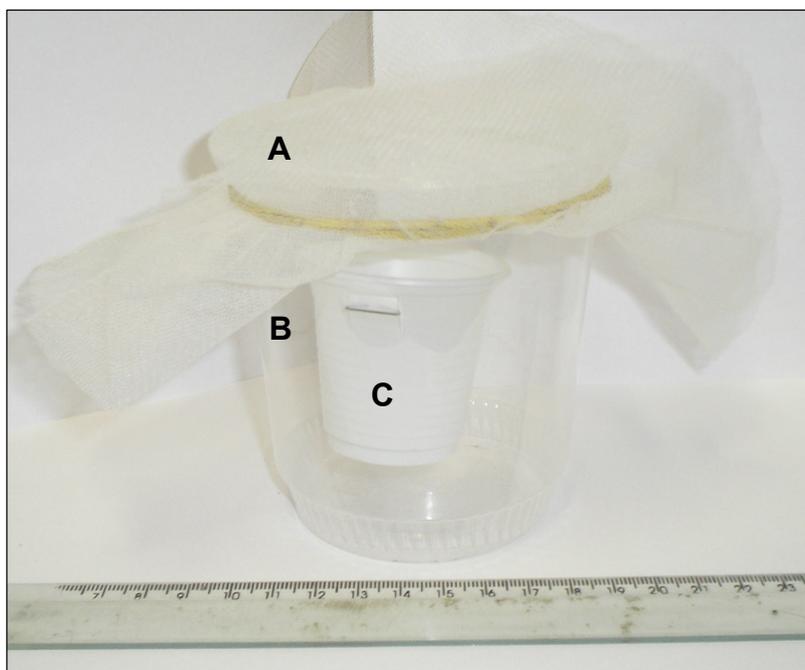


Fig. 8 - Recipiente para obtenção de adultos de *Aedes aegypti* - A: Malha de filó; B: Copo maior (500 cm³); C: Copo menor (50 cm³).

4.2 Origem e cultivo dos fungos

Os fungos utilizados foram: *M. anisopliae*, *I. farinosa*, *I. fumoserosea*; *P. carneus*; *P. marquandii*; *P. lilacinus* e *Penicillium* sp. Informações sobre os isolados, bem como o país e coleção de origem, ano do isolamento e o hospedeiro ou substrato original estão apresentadas na tabela 1.

Tab. 1 – Informações sobre os fungos estudados

Gênero/Espécie	Isolado	Coleção	País	Ano	Hospedeiro/ Substrato
<i>Metarhizium anisopliae</i>	IP 46	B	Brasil	2001	solo
<i>Isaria farinosa</i>	CG 195	A	Brasil	1983	<i>Chlosyne lacinia</i> (Lepidoptera)
<i>I. fumoserosea</i>	CG 325	A	Filipinas	1985	<i>Nilaparvata lugens</i> (Homoptera)
<i>Paecilomyces carneus</i>	CG 525	A	Brasil	1995	solo
<i>P. marquandii</i>	CG 190	A	Brasil	1990	solo
<i>P. lilacinus</i>	CG 362	A	Brasil	1991	solo
<i>Penicillium</i> sp	IP 182	B	Brasil	2003	<i>Scaptocoris carvalhoi</i> (Hemiptera)

A = Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF;

B = IPTSP/UFG, Goiânia, GO.

Todos os isolados foram previamente passados em *Triatoma infestans*, para aumento da virulência (Luz et al. 2007), reisolados e então cultivados em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) em placa de Petri (90 x 15 mm) durante 15 d a 25°C, 70 ±10% de umidade relativa (UR) e fotofase de 12 h. Para a preparação do meio, 170 g de batatas descascadas e cortadas em pequenos pedaços foram autoclavadas em 1.000 ml de água destilada. Após resfriamento e filtração por peneira, o filtrado foi completado com água destilada até 1.000 ml e acrescido de 20 g de dextrose e 18 g de ágar. O meio teve o pH ajustado em sete, foi autoclavado novamente durante 20 min e distribuído em placas de Petri.

4.3 Preparo de conídios e bioensaios

Foram realizados dois testes com métodos de tratamento indireto diferentes: Exposição de adultos a conídios secos de *M. anisopliae* IP 46 sem outra formulação (teste 1) e exposição de adultos a conídios dos demais isolados formulados em óleo – água (teste 2). Em ambos os testes, os mosquitos foram mantidos a 25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ de UR e fotofase de 12 h.

4.3.1 Preparo de conídios secos e tratamento dos adultos (teste 1)

Conídios de *M. anisopliae* foram raspados da superfície da cultura com uma espátula e colocados em placa de Petri sobre sílica gel durante 5 d a 4°C.

Para a avaliação da quantidade de conídios, uma alíquota de 0,02 g de conídios secos foi pesada em balança analítica, suspensa em 10 ml de Tween 80[®] (0,1%), e o número de conídios/ml foi contado em câmara de Neubauer.

Um total de 25 casais de *A. aegypti* foi colocado num copo plástico (500 cm³) com abertura superior fechada com malha de filó e liga. Por meio de um orifício (5 mm) feito na parede lateral deste copo, foi introduzido um funil de vidro, pelo qual 10^7 conídios secos de *M. anisopliae* foram colocados dentro do copo. O orifício foi em seguida vedado com fita crepe e os conídios foram cautelosamente distribuídos por todo o interior do copo em movimentos horizontais. Os mosquitos permaneceram dentro do copo tratado por 30 minutos. O tratamento foi realizado a temperatura e umidade ambiente. Mosquitos do grupo controle também foram mantidos em copos plásticos sem nenhum tratamento, movimentados igualmente aos do grupo teste e expostos as mesmas condições de temperatura e umidade. Terminado o período de exposição, os mosquitos foram transferidos para gaiolas teladas (33 x 30 x 21,5 cm) e mantidas nas condições mencionadas.

4.3.2 Preparo de formulados oleosos e tratamento dos adultos (teste 2)

Conídios foram raspados da superfície das culturas e colocados em tubos de ensaio com pérolas de vidro e 10 ml de Tween 80® (0,1%). Os tubos foram agitados em vórtex, o conteúdo filtrado com algodão hidrófilo e o número conídios/ml quantificado em câmara de Neubauer.

Os formulados foram preparados em suspensão óleo-água 10% de óleo emulsionável (Graxol® - Agrária Indústria e Comércio Limitada, Indústria Brasileira) acrescido da suspensão de conídios previamente preparada.

Papeis filtro de formato circular (38,5 cm²) foram colocados em placa de Petri descartáveis e com o auxílio de uma micropipeta, foi aplicado sobre cada um, 1 ml de formulado, em movimento espiral lento (Fig. 9) a fim de alcançar uma distribuição homogênea de 10⁶ conídios/cm² sobre a superfície de cada papel filtro. As placas foram então deixadas em repouso, semi - fechadas durante 24 h para secar. Depois os papéis filtro foram colocados na base de copos plásticos de 500 cm³, um para cada papel tratado. Trinta adultos, com pelo menos 10 fêmeas, com idade entre 2 e 3 d foram colocados em cada copo telado e mantidos por 24 h em contato com a superfície tratada, sendo então transferidos para gaiolas teladas, iguais as utilizadas no teste 1.

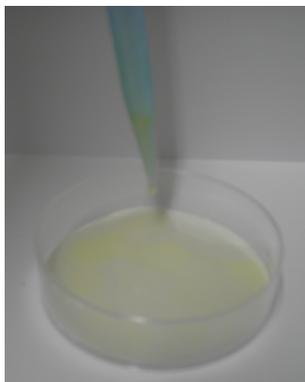


Fig. 12 - Tratamento de papel filtro com formulado em óleo-água.

4.3.3 Manutenção dos adultos nas gaiolas

Em todos os testes, solução açucarada (5%) previamente autoclavada foi permanentemente oferecida aos mosquitos. A mesma foi colocada em tubo de Eppendorf de 1 ml, cuja tampa foi perfurada e através deste orifício foi colocado um fio de algodão hidrófilo em contato com a solução açucarada, o que permitia a alimentação dos adultos. Alimentação sanguínea em camundongos imobilizados durante 90 minutos, foi ofertada em dias alternados segundo a metodologia proposta por Silva et al. (1998).

4.3.4 Avaliação da ovipostura, conidiogênese sobre ovos e eclosão de larvas

Para ambos os testes, recipientes simulados para oviposição com baixa luminosidade e alta umidade, fatores importantes para a oviposição das fêmeas (Silva et al. 1998) foram mantidos permanentemente em cada gaiola. Cada “criadouro simulado” consistia de uma xícara de vidro de cor âmbar (90 cm³) com algodão umedecido na base e um papel filtro em formato circular (r = 2,5 cm) sobre o algodão, o papel permanecia úmido permanentemente pelo contato com o algodão (Fig. 10). Sobre a xícara, colocava-se um copo plástico de cor azul escuro (300 ml) de forma invertida, com o fundo recortado, o que limitava a exposição do papel filtro a luz.

Os papéis filtro com ovos foram retirados das gaiolas em dias alternados, durante 10 d (Fig. 11) e colocados em placas de Petri para contagem. As placas com os ovos foram incubadas em UR > 98% a 25°C e fotofase de 12 h durante 15 d. Passado o período de incubação, foi avaliado o crescimento de fungos sobre os ovos, bem como a eclosão de larvas.

Para a avaliação da eclosão, uma alíquota com cerca de 20 ovos foi submersa em um copo de poliestireno (50 cm³) com 20 ml de água de torneira autoclavada. Os copos foram mantidos nas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo já mencionadas. Larvas eclodidas foram contadas

diariamente durante 5 d e alimentadas com ração triturada para gatos em dias alternados.

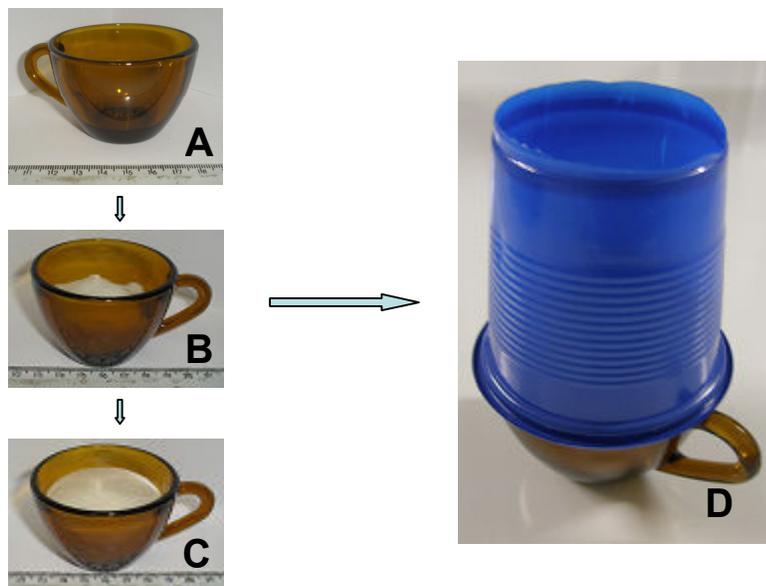


Fig. 10 – “Criadouro” simulado para ovipostura de *Aedes aegypti*: A. Xícara (90 cm³) de cor âmbar; B. Xícara com algodão umedecido; C. Papel filtro colocado sobre o algodão; D. Copo azul escuro invertido sobre a xícara.

4.3.5 Avaliação da mortalidade e conidiogênese sobre adultos mortos

A leitura da mortalidade dos adultos foi feita durante 10 d em dias alternados (Fig. 11). Mosquitos mortos foram retirados das gaiolas e colocados em placas de Petri com meio ágar água (18 g de ágar em 1000 ml de água). A formação de conídios sobre os cadáveres (conidiogênese) foi avaliada de maneira qualitativa durante 10 d em dias alternados, com o auxílio de uma lupa estereoscópica.

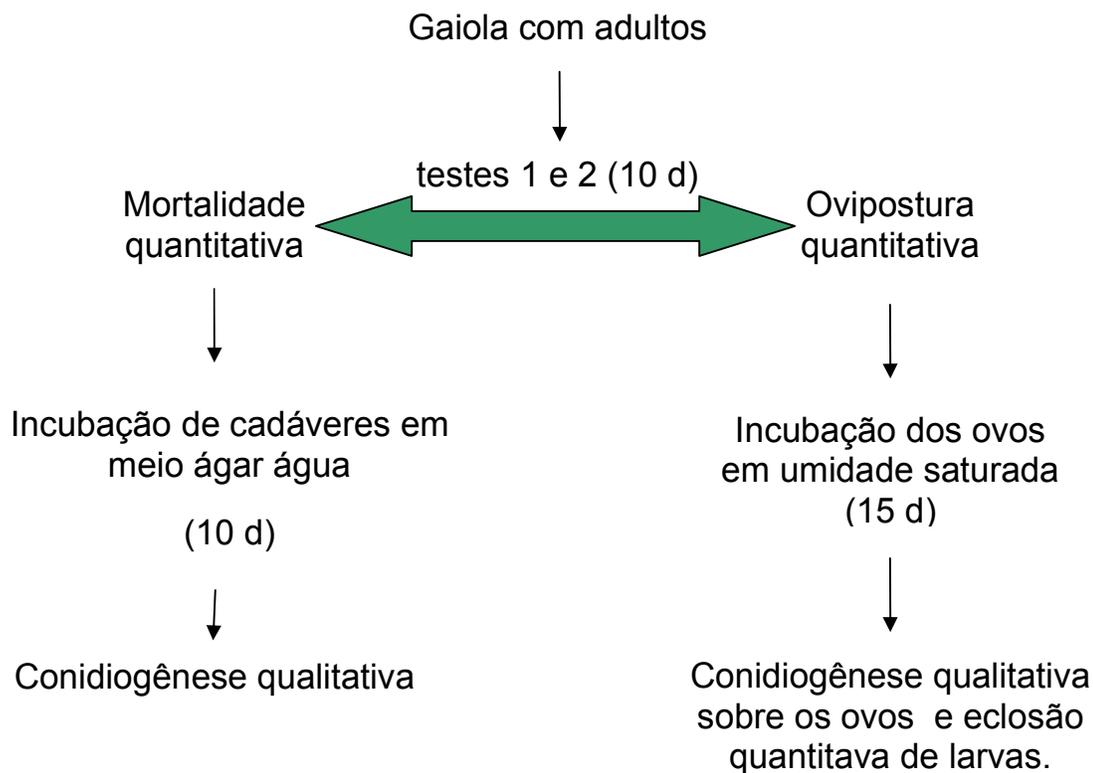


Fig. 11 – Avaliação de mortalidade de adultos, postura de ovos e eclosão de larvas.

4.4 Análise dos resultados

Os testes com conídios secos (teste 1) foram realizados em duas repetições independentes, cada uma delas com seis réplicas ao mesmo tempo, totalizando doze réplicas do tratamento com *M. anisopliae*. Os bioensaios com os demais fungos foram feitos em três repetições independentes (teste 2). Os resultados percentuais foram transformados em arcsin e examinados com teste de t ou análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. As médias foram consideradas significativamente diferentes com $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Oviposição

A postura de ovos, de forma geral, teve início em até 48 h após a primeira alimentação das fêmeas com sangue. O período de maior postura foi entre 5 e 8 d pós – tratamento (p.t.). e variou entre 0,7 ovos por fêmea por dia (o/f/d) para mosquitos tratados com *P. carneus* e 6,9 o/f/d em tratamentos com *M. anisopliae*. O número médio de ovos postos durante 10 d p.t. para fêmeas tratadas com conídios secos de IP 46 foi de 2,5 o/f/d (teste 1; Tab. 2). Fêmeas tratadas com os outros fungos tiveram número médio de ovos variando entre 0,15 o/f/d (*P. carneus*) e 1,3 o/f/d (*I. fumoserosa*) (teste 2; Tab. 3). Não houve efeito tratamento sobre a oviposição quantitativa durante 10 d p.t. ($t_{14} = 1,4$; $P = 0,2$; teste 1; $F_{6,133} = 1,8$; $P = 0,1$; teste 2; Tabs. 2 e 3).

Tab. 2: Número médio de ovos de *Aedes aegypti* (\pm erro padrão da média) durante 10 d pós-tratamento dos adultos com conídios secos de *Metarhizium anisopliae* IP 46, eclosão relativa, 5 d após a submersão de ovos em água, mortalidade dos adultos e número relativo de cadáveres com fungo sobre a cutícula, 10 d após incubação em meio agar-água (teste 1).

Tratamento*	Ovos/fêmea /dia	Eclosão (%)**	Mortalidade (%)***	Conidiogênese (%)****
<i>Metarhizium anisopliae</i>	2,5 \pm 0,5 a	61,8 \pm 12,1 a	39 \pm 3,2 a	94,3 \pm 2
Controle	1,3 \pm 0,4 a	68,6 \pm 5,9 a	12 \pm 2,3 b	0
	$t_{14} = 1,4$ $P = 0,19$	$t_8 = 0,2$ $P = 0,85$	$t_{14} = 4,7$ $P < 0,001$	- -

* Conídios secos aplicados em copo com 50 adultos (5×10^4 conídios/cm³) e grupo controle sem conídios.

** Os ovos foram incubados por 15 d em umidade relativa (UR) > 98% e depois submersos em água.

*** Adultos foram expostos por 30 min aos conídios e posteriormente incubados a 25°C e 70 \pm 10% UR durante 10 d.

**** Adultos mortos foram incubados por 15 d em UR > 98%.

Resultados na mesma coluna seguidos pelas mesmas letras (a ou b) não apresentaram diferença significativa (teste de t; $P < 0,05$). Foram realizadas duas repetições independentes, cada uma com seis gaiolas teste.

Tab. 3: Número médio de ovos de *Aedes aegypti* (\pm erro padrão da média) durante 10 d pós-tratamento com fungos (teste 2), eclosão relativa, 5 d após submersão de ovos em água, mortalidade dos adultos e número relativo de cadáveres com fungo sobre a cutícula, 10 d após incubação em meio ágar - água

Tratamento*	Isolado	Ovos/fêmea /dia	Eclosão** (%)	Mortalidade*** (%)	Conidiogênese (%) ****
<i>Isaria farinosa</i>	CG 195	1 \pm 0,25 a	55,7 \pm 7,1 a	28 \pm 9,2 a	82,1 \pm 7,9
<i>I. fumoserosea</i>	CG 325	1,3 \pm 0,4 a	50 \pm 25 a	4,6 \pm 1 c	50 \pm 28,9
<i>Paecilomyces carneus</i>	CG 525	0,15 \pm 0,06 a	28 \pm 7,1 a	6,8 \pm 3,2 bc	100
<i>P. lilacinus</i>	CG 362	0,6 \pm 0,31 a	41,7 \pm 8,3 a	4,7 \pm 3 c	0
<i>P. marquandii</i>	CG 190	0,6 \pm 0,24 a	46,4 \pm 3,6 a	16,4 \pm 4 b	55,5 \pm 5,5
<i>Penicillium</i> sp	IP 182	0,6 \pm 0,27 a	50 \pm 25 a	8 \pm 2,8 bc	0
Controle	-	0,6 \pm 0,15 a	61,2 \pm 26,7 a	6,5 \pm 1,9 c	0
		F _{6,133} = 1,8	F _{6,61} = 0,8	F _{6,98} = 8,5	F _{6,14} = 12,9
		P = 0,097	P = 0,57	P < 0,001	P < 0,001

* Conídios formulados em óleo – água (10% v/v) e grupo controle com apenas óleo – água (10% v/v) aplicados sobre papel filtro (10⁶ conídios/cm²).

** Os ovos foram incubados por 15 d em umidade relativa (UR) > 98%.

*** Os adultos foram expostos sobre papel filtro durante 24 h e posteriormente incubados a 25°C e 70 \pm 10% UR durante 10 d.

**** Adultos mortos foram incubados por 15 d em UR > 98%.

Resultados na mesma coluna seguidos pelas mesmas letras (a, b ou c) não apresentaram diferença significativa (Análise de Variância e teste de comparação múltipla Student Newman Keuls, P < 0,05). Foram realizadas até quatro repetições independentes, com 30 adultos cada.

5.2 Eclosão

As primeiras larvas eclodiram poucos minutos após submersão dos ovos em água, independentemente do isolado ou tratamento testado. A eclosão cumulativa de larvas a partir de ovos postos por fêmeas tratadas com *M. anisopliae* IP 46 (teste 1) e incubadas por até 48 h p.t. foi significativamente menor (24 \pm 8,6%) comparada com a eclosão no mesmo período do controle (78 \pm 3%; t = 3,4; P = 0,02; Fig. 13). Considerando todas as médias gerais obtidas durante 10 d p.t. para todos os fungos e tratamentos, não houve efeito do tratamento sobre a eclosão quantitativa (t₈ = 0,2; P = 0,85; teste 1; F_{6,61} =

0,8; $P = 0,57$; teste 2; Tabs. 2 e 3). Apenas para IP 46 foram encontrados micélio e novos conídios sobre ovos em 34% das gaiolas de tratamento e a eclosão média nessas repetições ($39,2 \pm 13,8\%$) foi significativamente menor do que a eclosão no grupo controle ($68,6 \pm 5,9\%$; $t = 2,3$; $P = 0,04$).

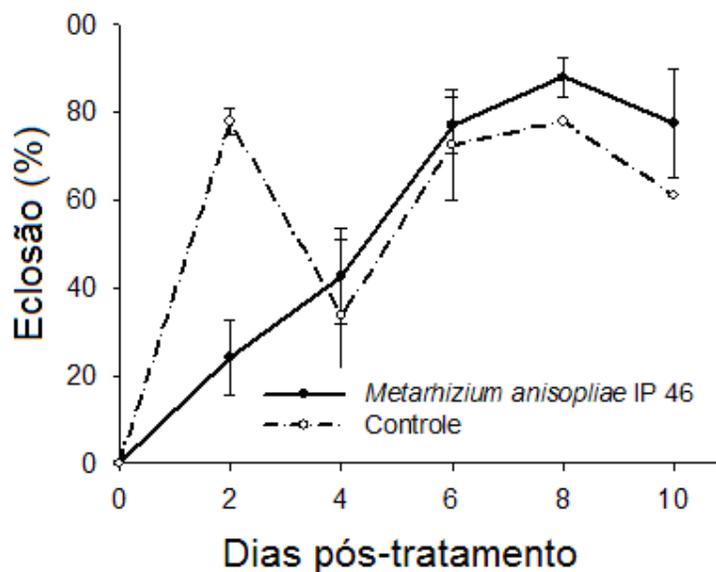


Fig. 13: Eclosão acumulativa de larvas pós - submersão em água de ovos coletados em dias alternados pós tratamento com IP 46 e incubados em umidade relativa > 98% durante 15 d.

5.3 Mortalidade dos adultos e conidiogênese

Primeiros adultos morreram a partir de 2 d p.t., independentemente do fungo e tratamento testado. Em grupos tratados com *M. anisopliae* foi obtida a maior mortalidade, 10 d p.t. ($39 \pm 3,2\%$), seguido de *I. farinosa* CG 195 ($28 \pm 9,2\%$), *P. marquandii* CG 190 ($16,4 \pm 4\%$), *Penicillium* sp IP 182 ($8 \pm 2,8\%$), *P. carneus* CG 525 ($6,8 \pm 3,2\%$), *P. lilacinus* CG 362 ($4,7 \pm 3\%$) e *I. fumoserosa* CG 325 ($4,6 \pm 1\%$). A mortalidade no controle no mesmo momento foi de $12 \pm 2,3\%$ e $6,5 \pm 1,9\%$ para os testes 1 e 2, respectivamente (Tabs 2 e 3). O efeito tratamento sobre a mortalidade acumulada, 10 d p.t. foi altamente significativo para os ensaios com conídios secos ($t_{14} = 4,7$; $P < 0,001$; teste 1) e com

conídios formulados em óleo - água ($F_{6,98} = 8,5$; $P < 0,001$; teste 2), sendo que, *M. anisopliae*, *I. farinosa* e *P. marquandii* foram os fungos que causaram mortalidade a adultos significativamente maior quando comparado com o grupo controle (Tabs. 2 e 3; Figs. 14 e 15).

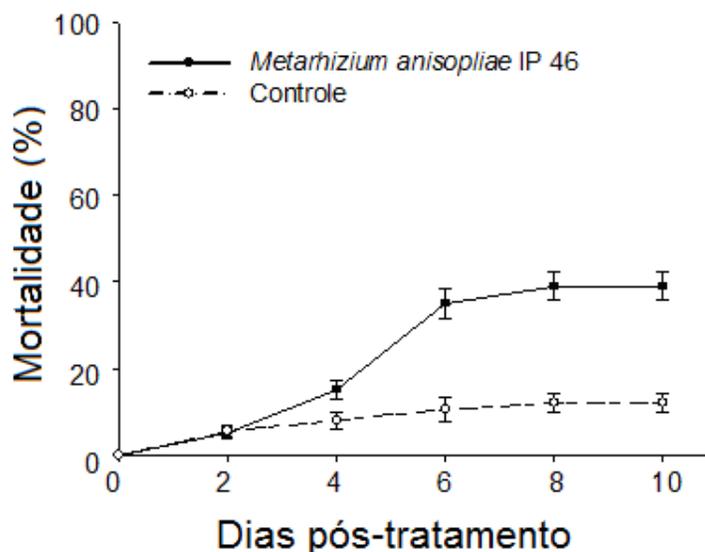


Fig. 14 - Mortalidade acumulada (\pm erro padrão da média) de adultos de *Aedes aegypti* durante 10 d pós tratamento com conídios secos de *Metarhizium anisopliae* e grupo controle.

Cadáveres oriundos de adultos tratados anteriormente com *M. anisopliae*, *I. farinosa*, *I. fumoserosea*, *P. marquandii* e *P. carneus* tiveram desenvolvimento de micélio e novos conídios na superfície (Fig.16). A formação de hifas foi observada 2 d após a morte de adultos em testes com *I. farinosa*, *P. carneus* e *M. anisopliae*, sendo que mais de 80% dos cadáveres tiveram desenvolvimento de novos conídios dos fungos aplicados. *P. marquandii* e *I. fumoserosea* cresceram em cerca de 50% dos cadáveres, sendo que o desenvolvimento de micélio foi observado após 4 e 8 d respectivamente. Mosquitos tratados com *P. lilacinus*, *Penicillium* sp e controle, não formaram hifas sobre cadáveres durante o período de observação (Tabs. 2 e 3).

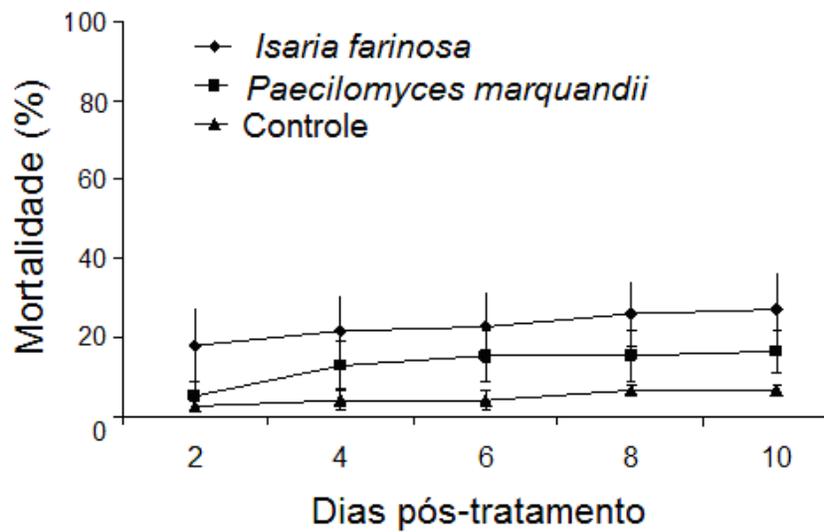


Fig. 15 - Mortalidade acumulada (\pm erro padrão da média) de adultos de *Aedes aegypti* até 10 d pós-tratamento com conídios em formulado óleo-água (10% v/v) de *Isaria farinosa*, *Paecilomyces marquandii* e controle (óleo-água 10% v/v).



Fig. 16 - Desenvolvimento de micélio e conídios de *Isaria farinosa* (CG 1985) sobre adulto macho de *Aedes aegypti* morto incubados sobre ágar água.

6. Discussão

Os resultados mostraram pela primeira vez que fêmeas de *A. aegypti* tratadas com conídios podem contaminar ovos durante a oviposição e assim transmitir a micose aos ovos, reduzindo o número de novas larvas. Transmissão de *M. anisopliae* entre adultos já foi descrito anteriormente para *An. gambiae* quando fêmeas tratadas com o fungo infectaram machos sadios durante o acasalamento (Scholte et al. 2004b). Acredita-se que o contágio de ovos no presente estudo tenha se dado pelo contato de ovos com o ovipositor da fêmea contaminado no momento da postura. Isso ocorreu exclusivamente com *M. anisopliae* provavelmente devido ao tratamento com conídios secos, diferente do utilizado para os demais fungos. Embora todos os isolados testados tenham apresentado atividade ovicida sobre *A. aegypti* em estudos anteriores (Luz et al. 2007), e ambos os tipos de tratamento tenham sido indiretos, a maior dispersão dos conídios secos no espaço no qual os adultos foram mantidos durante o tratamento (teste 1) e assim também na superfície dos indivíduos, pode ter proporcionado uma contaminação quantitativa maior das fêmeas do que o contato com o formulado a base de óleo aplicado sobre o papel filtro (teste 2), que concentrou a contaminação com conídios nos tarsos.

M. anisopliae, *I. farinosa*, e *P. marquandii* apresentaram discreta patogenicidade em adultos de *A. aegypti*, nas condições nas quais foram testados. *P. lilacinus* e *I. fumoserosea*, que também desenvolveram sobre um número reduzido de adultos mortos, comprovaram ser patogênicos para esse mosquito. Resultados mais promissores com outras linhagens de *M. anisopliae* já foram relatados por Scholte et al. (2007) e Paula et al. (2008), ambos os estudos realizados com formulados oleosos, aplicação indireta de conídios e UR inferiores a 98%.

Em vista da baixa mortalidade de adultos encontrada para todos os fungos e formulações testados, acredita-se que o formulado à base de óleo não foi eficaz a ponto de superar a limitação imposta pela umidade subotimal de 70% no desenvolvimento da micose. Além disso, é possível que os dez dias de acompanhamento dos adultos tratados tenham sido insuficientes para a instalação da infecção e morte de mais indivíduos. Contudo, é importante ressaltar que um biopesticida à base de fungos para ter potencial no controle

integrado de *A. aegypti* e outros mosquitos, precisa matar rapidamente um número elevado de adultos para interromper a transmissão de dengue e outras doenças transmitidas por esses vetores.

Novos estudos ainda são necessários na busca por isolados mais virulentos contra *A. aegypti* e para esclarecimento de mecanismos envolvidos na transmissão horizontal de micoses.

7. Conclusões e considerações finais

7.1 Conclusões

1. *M. anisopliae*, *I. farinosa* e *I. fumoserosea* são patogênicos para adultos de *A. aegypti*.
2. Ambos os tipos de formulação e aplicação de conídios testados não causaram mortalidade rápida e alta de mosquitos e nem redução do número de ovos postos.
3. Verificou-se a transmissão de micose das fêmeas tratadas com *M. anisopliae* IP 46 para ovos postos por elas.

7.2 Considerações finais

Outras linhagens mais virulentas dessas espécies de fungos têm interesse para controle integrado desses vetores. A transmissão da micose de fêmeas contaminadas para os ovos postos por elas depende da virulência da linhagem e da contaminação quantitativa das fêmeas, com conídios. Portanto, novos estudos na busca por outras linhagens mais virulentas desses, ou outros fungos, para adultos de *A. aegypti*, bem como o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na transmissão de conídios para a prole se fazem necessários.

8. Referências Bibliográficas

- Albernaz DAS, Tai MHH, Luz C 2009. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol* 23: no prelo, doi nº: 10.1111/j.1365-2915.2008.00792x
- Alves SB 1998. Fungos entomopatogênicos. In: Alves SB, *Controle Microbiano de Insetos*, Fealq, Piracicaba, p. 289-381.
- Alves SB, Marchini LC, Pereira RM, Baumgratz LL 1996. Effects of some insect pathogens on the africanized honey bee, *Apis mellifera* L. (Hym., Apidae). *J Appl Entomol* 97: 127-129.
- Alves SB, Alves LFA, Lopes RB, Pereira RM, Vieira AS 2002. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *J Appl Entomol* 126: 504-509.
- Austwick PKC 1980. The pathogenic aspects of the use of fungi: The need for risk analysis and registration of fungi. *Ecol Bull* 31: 91-102.
- Bateman RP, Carey M, Moore D, Prior C 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to the desert locusts at low humidities. *Ann Appl Biol* 122: 145-152.
- Bateman R 1997. Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. *Mem Ent Soc Can* 171: 69-81.
- Batta YA 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Prot* 22: 415-422.
- Becnel JJ, Johnson MA 2000. Impact of *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Culicosporidae) on a seminatural population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biol Control* 18: 39-48.
- Beserra EB, Fernandes CRM, Queiroga MFC, de Castro Jr FP 2007. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. *Neotrop Entomol* 36: 303-307.
- Blanford S, Chan BHK, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Thomas MB 2005. Fungal pathogen reduces potencial for malaria transmission. *Science* 308: 1638-1641.

- Boisvert M, Boisvert J 2000. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: A review of laboratory and field experiments. *Biocont Sci Tech* 10: 517-561.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- Braga IA, Mello CB, Peixoto AA, Valle D 2005. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 435-440.
- Braga IA, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saude* 16: 295-302.
- Broza M, Pereira RM, Stimac JL 2001. The nonsusceptibility of soil *Collembola* to insect pathogens and their potential as scavengers of microbial pesticides. *Pedobiol* 45: 523-534.
- Butt TM, Carreck NL, Ibrahim L, Williams IH 1998. Honey bee mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocont Sci Technol* 8: 533-538.
- Carson R 1962. *Silent spring*, Mariner Books, 400 pp.
- Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, de Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. *Rev Saúde Públ* 38: 623-629.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [homepage on the internet]. Outbreak Notice: Update: Dengue, tropical and subtropical regions [acesso em 03 de Dezembro de 2008]. Disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/travel/contentDengueTropicalSubTropical.aspx>
- Chavez J, Vargas J, Vargas F 2005. Resistance to deltamethrine in two populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) from Peru. *Rev Peru Biol* 12: 161-164.
- Consoli RAGB, Oliveira RL 1998. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 225 pp.

- Cunha MP, Lima JNP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- Eiras AE 2005. Culicidae. In Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*, Atheneu, São Paulo, p. 355-367.
- Fargues J, Quedraogo A, Goettel MS, Lomer CJ 1997. Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocont Sci Technol* 7: 345-356.
- Foley DH, Rueda LM, Wilkerson RC 2007. Insight into global mosquito biogeography from country species records. *J Med Entomol* 44: 554-567.
- Genthener FJ, Chancy CA, Couch JA, Foss SS, Middaugh DP, Geoge SE, Warren MA, Bantle JA 1998. Toxicity and pathogenicity testing of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 317-324.
- Goettel MS, Hajek AE, Siegel JP, Evans HC 2001. Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as Biocontrol Agents: progress, problems and potential*: 347-376.
- Honório NA, Silva WC, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Oliveira RL 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 191-198.
- Ignoffo CM 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann New York Acad Sci* 217: 141-172.
- Lecuona RE, Edelstein JD, Berretta MF, Rossa FR, Arcas JA 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 38: 172-179.
- Liew C, Curtis CF 2004. Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, in Singapore. *Med Vet Entomol* 18: 351-360.

- Lima JBP, Cunha MP, Silva Júnior RC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
- Lima JBP, Melo NV, Valle D 2005. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 47: 125-130.
- Lima EP, Filho AMO, Lima JWO, Ramos Júnior NA, Cavalcanti LPG, Pontes RJS 2006. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 259-263.
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu Rev Entomol* 46: 667-702.
- Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Rev Saúde Públ* 38: 2 pp.
- Luz C, Batagin I 2005. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia* 160: 51-62.
- Luz C, Tigano MS, Silva IG, Cordeiro CMT, Aljanabi SM 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 839-846.
- Luz C, Tai MHH, Santos AH, Rocha LFN, Albernaz DAS, Silva HHG 2007. Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *J Med Entomol* 44: 799-804.
- Luz C, Tai MHH, Santos AH, Silva HHG 2008. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 214-215.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB 1999. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Públ* 33: 521-522.

- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takau L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708.
- Maranga RO, Kaaya GP, Mueke JM, Hassanali A 2005. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. *Mycopathologia* 159: 527-532.
- Massad E, Coutinho FAB, Burattini MN, Lopez LF 2001. The risk of yellow fever in a dengue-infested área. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 370-374.
- Melo-Santos MAV, Sanches EG, Jesus FJ, Regis L 2001. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis sorovar. israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1-2.
- Milner RJ, Lim RP, Hunter DM 2002. Risks to the aquatic ecosystem from the application of *Metarhizium anisopliae* for locust control in Australia. *Pest Manag Sci* 58: 718-723.
- Ministério da Saúde 2008a. Situação epidemiológica da dengue 2008. *Nota Técnica*: 6 pp.
- Ministério da Saúde 2008b. Situação da febre amarela silvestre no Brasil, 2007 e 2008. *Boletim Diário*: 4 pp.
- Nam VS, Yen NT, Kay BH, Marten GG, Reid JW 1998. Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam, using copepods and community participation. *Am J Trop Med Hyg* 59: 657-660.
- OMS 1997. *Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment and control*. WHO, Geneva, viii + 84 pp.
- Paula AR, Brito ES, Pereira CR, Carrera MP, Samuels RI 2008. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocont Sci Technol* 18: 1017-1025.
- Pedigo LP 2002. *Entomology & Pest Management*, Prentice Hall, New Jersey, 784 pp.

- Rodriguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol* 39: 882-888.
- Saik JE, Lacey LA, Lacey CM 1990. Safety of microbial insecticides to vertebrates – domestics animals and wildlife. In: Laird M, Lacey CM, Davidson EW, editors. *Safety of Microbial Insecticides*: 115-132.
- Santos AH, Tai MHH, Rocha LFN, Silva HHG, Luz C 2009. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. *Biol Cont* 50: 37-42.
- Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BGJ 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J* 2: 8pp.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W 2004a. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *J Insect Sci* 4: 24pp.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Takken W 2004b. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Malar J* 3: 6pp.
- Scholte EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BGJ 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult african malaria mosquitoes. *Science* 308: 1641-1642.
- Scholte EJ, Takken W, Knols BGJ 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop* 102: 151-158.
- Senna – Nunes M, Costa G, Bittencourt VREP, Souza EJ 2002. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Bol Chil Parasitol* 57: 9-14.
- Siegel JP, Shaddock JA 1990. Safety of microbial insecticides to vertebrates – humans. In: Laird M, Lacey CM, Davidson EW, editors. *Safety of Microbial Insecticides*: 101-113.

- Silva HHG, Silva IG, Lira KS 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Pat Trop* 27: 53-63.
- Silva HHG, Silva IG 1999. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 349-355.
- Silva RO, Silva HHG, Luz C 2004. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil of the central brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Rev Pat Trop* 33: 207-216
- Siqueira Jr JB, Martelli CMT, Coelho GE, Simplício ACR, Hatch DL 2005. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. *Emerg Infect Dis* 11: 48-53.
- Tauil PL 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Publ* 18: 867-871.
- Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Ferreira LDA, Vasconcelos PFC 2002. Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. *Rev Bras Epidemiol* 5: 108-115.
- Vestergard S, Cherry A, Keller S, Goettel M 2003. Safety of Hyphomycetes fungi as microbial control agents. In: Hokkanen HMT, Hajek AE, editors. *Environment Impact Microbial Insect*: 35-62.
- Wasti SS, Hartmann GC, Rousseau AJ 1980. Gypsy moth (*Lymantria dispar*) mycoses by 2 species of entomopatogenous fungi and an assessment of their avian toxicity. *Parasitol* 80: 419-424.
- Zimmermann G 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic Sci* 37: 375-379.
- Zimmermann G 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocont Sci Technol* 17: 879-920.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)