

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA ALGA  
*LAURENCIA DENDROIDEAE* E DE *AZADIRACHTA INDICA* (NIM) E  
SINERGISMO ENTRE O ÓLEO DE NIM E O FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* CONTRA  
LARVAS DE *Aedes aegypti*

**SIMONE AZEVEDO GOMES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
AGOSTO DE 2012



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA ALGA  
*LAURENCIA DENDROIDEAE* E DE *AZADIRACHTA INDICA* (NIM) E  
SINERGISMO ENTRE O ÓLEO DE NIM E O FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* CONTRA  
LARVAS DE *AEDES AEGYPTI*

**SIMONE AZEVEDO GOMES**

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

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

Coorientador: Adriano Rodrigues de Paula

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO DE 2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 082/2012

Gomes, Simone Azevedo

Avaliação da toxicidade de extratos da alga *Laurencia dendroideae* e de *Azadirachta indica* (Nim) e sinergismo entre o óleo de Nim e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti* / Simone Azevedo Gomes. – 2012.

70 f. :il.

Orientador: Richard Ian Samuels

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

Bibliografia: f. 54 – 70.

1. Dengue 2. Alga 3. Óleo de Nim 4. Controle biológico I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD–  
632.96

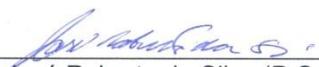
**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA ALGA  
LAURENCIA DENDROIDEAE E DE AZADIRACHTA INDICA (NIM) E  
SINERGISMO ENTRE O ÓLEO DE NIM E O FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO METARHIZIUM ANISOPLIAE CONTRA  
LARVAS DE Aedes Aegypti**

**SIMONE AZEVEDO GOMES**

"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 17 de agosto de 2012

Comissão examinadora:

  
Prof. José Roberto da Silva (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) UFRJ/Macaé

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

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

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

“Fracassos? Não sei do que falas. Em cada experiência descubro um dos motivos pelo qual a lâmpada não funciona. Agora sei mais de mil maneiras de como não fazer a lâmpada.”

Thomas Edson

## **AGRADECIMENTOS**

A UENF, representada pelo seu corpo docente e técnico-administrativo;

Aos órgãos de fomento CNPq e FAPERJ;

Ao professor Richard Ian Samuels pela orientação, conseguindo ser profissional e humano;

Ao Adriano Rodrigues de Paula pela coorientação e amizade;

Ao professor Francisco Lemos por sempre ajudar toda a equipe colocando o insetário do CBB a disposição. Agradeço também aos professores Tarcisio Thiebaut e Geraldo Gravina pelo profissionalismo e apoio;

À professora Angélica Soares do NUPEM/UFRJ/Macaé e sua equipe por ceder o extrato da alga;

Aos professores José Roberto, Jorge Moraes, Rodrigo Fonseca e aos alunos e colegas técnico-administrativos do NUPEM/UFRJ/Macaé pelo apoio;

Aos colegas do laboratório, em especial a Aline, Cátia, Mariana, Denise, Lala, Paulo Anderson, Thalles e Gustavo pelos momentos de trabalho e descontração. Sou grata por trabalhar com pessoas de boa vontade!

Aos meus familiares, em especial aos meus pais e irmãos por entender a minha ausência;

Às minhas amigas, Verônica, Raquel, Inês, Paula e Paloma pela segurança da nossa amizade;

Ao Juarez Ogliari, por sempre me incentivar, sendo meu maior apoio nos momentos difíceis;

## SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Biologia do mosquito <i>A. aegypti</i>	4
2.2 Histórico da dengue e distribuição geográfica do vetor	6
2.3 Métodos de controle do mosquito <i>A.aegypti</i>	8
2.3.1 Controle mecânico	8
2.3.2 Controle químico	8
2.3.3 Controle biológico	10
2.3.4 Controle Integrado	13
2.4 Produtos naturais para o controle de insetos vetores de doenças	15
2.5 Extratos de algas marinhas	16
2.6 Óleo de Nim	18
2.6.1 Características da planta Nim	18
2.6.2 Utilização de Nim no controle de insetos	19
3. HIPÓTESES DO TRABALHO	22
4. OBJETIVO GERAL	23
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. MATERIAL E MÉTODOS	25
6.1 Criação dos mosquitos linhagem Rockefeller	25
6.2 Montagem do experimento	26

6.2.1 Preparo do extrato da alga e montagem do experimento	26
6.2.2 Experimento com óleo vegetal de Nim	27
6.3 Produção do fungo	28
6.3.1 Experimento com o fungo entomopatogênico <i>M. anisoplia</i>	28
6.3.2 Efeito de Nim na germinação de <i>M. anisopliae</i>	29
6.4 Análise dos resultados	30
7. RESULTADOS	31
7.1 Experimentos com extrato da alga	31
7.2 Toxicidade do óleo vegetal de Nim	39
7.3 Teste de germinação	44
8. DISCUSSÃO	45
9. CONCLUSÕES	53
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

## RESUMO

GOMES, SIMONE AZEVEDO; Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Agosto de 2012; Avaliação da toxicidade de extratos da alga *Laurencia dendroideae* e de *Azadirachta indica* (nim) e sinergismo entre o óleo de Nim e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti*; Orientador: Richard Ian Samuels; Coorientador: Adriano Rodrigues de Paula.

No presente trabalho, foi investigado a toxicidade de extratos da alga *Laurencia dendroidea* e da planta *Azadirachta indica* (Nim) a larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Também foi investigado o possível sinergismo entre extratos de Nim e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* visando o controle de larvas de *A. aegypti*. No primeiro experimento as larvas foram expostas aos extratos da alga *L. dendroidea* oriundas de diferentes locais e dissolvido em 0,1% de Dimetilsulfóxido (DMSO). Foi avaliado a sobrevivência de larvas de *Aedes*

*aegypti* com três repetições para cada tratamento, avaliado diariamente durante 8 dias. As larvas expostas à concentração de 5 ppm do extrato da alga coletada em Manguinhos (ES) apresentaram porcentagem de sobrevivência de 47,7 ( $\pm$  7,98) e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de 7 dias, as expostas a concentração de 10 ppm sobreviveram 1,1% ( $\pm$  13,2) com  $S_{50}$  de 3 dias. As larvas expostas à concentrações de 20 ppm resultaram em 0% de sobrevivência. O extrato de algas coletadas em Angra dos Reis (RJ) na concentração de 5 ppm não causou mortalidade. As tratadas com a concentração de 10 ppm apresentaram sobrevivência de 20% ( $\pm$  6,56) e  $S_{50}$  de 4 dias. Nas concentrações de 20, 30 e 40 ppm 100% das larvas morreram. Todos os tratamentos com os extratos da alga coletada em Parati (RJ) resultaram em 100% de mortalidade das larvas e  $S_{50}$  de 2 dias na concentração de 5 ppm e de 1 dia nas demais concentrações. O extrato da alga coletada em Búzios (RJ) resultou em 100% de mortalidade e  $S_{50}$  de 1 dia em todas as concentrações testadas. A sobrevivência do tratamento controle foi de 100% e do tratamento DMSO foi de 98% ( $\pm$  0,35). No segundo experimento foi avaliada a toxicidade do óleo de Nim nas concentrações de  $10^{-5}$  % a 1%. As larvas expostas às concentrações de  $10^{-5}$ %,  $10^{-4}$ %, de Nim, resultaram em sobrevivência de 92,2% ( $\pm$  1,24), 82,2% ( $\pm$  2), respectivamente, não diferindo estatisticamente do tratamento controle  $P > 0,01$ . As larvas expostas às concentrações de  $10^{-3}$ %,  $10^{-2}$  %,  $5 \times 10^{-2}$  %,  $10^{-1}$  e 1% tiveram sobrevivência de 74,4% ( $\pm$  3,27), 18,12% ( $\pm$  15,95), 22,43% ( $\pm$  11,10), 16,7% ( $\pm$  16,92) e 5,6% ( $\pm$  19,04), respectivamente, diferindo estatisticamente do controle ( $F_{7,23} = 71,51$ ;  $P < 0,01$ ). No terceiro experimento, foi utilizado o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818) nas concentrações de  $10^5$  a  $10^8$  conídios/mL suspenso em 0,05% Tween 80. A sobrevivência das larvas tratadas com as concentrações de fungo  $10^5$  e  $5 \times 10^5$  conídios/mL foi de 93,3% ( $\pm$  1,03) e 92,2% ( $\pm$  1,24), respectivamente, não diferindo estatisticamente do controle ( $P > 0,01$ ). A sobrevivência das larvas tratadas com as demais concentrações diferiu estatisticamente do controle ( $F_{5,17} = 226,13$ ;  $P < 0,01$ ). As tratadas com as concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  conídios/mL tiveram sobrevivência de 12,2% ( $\pm$  11,83) e 7,8% ( $\pm$  13,86), respectivamente. As larvas tratadas com a concentração de  $10^8$  conídios/mL apresentaram sobrevivência de 0%. No quarto experimento foi avaliado se o fungo associado ao óleo de Nim reduziria a sobrevivência de larvas, comparado com testes feitos somente com fungo ou somente com óleo de Nim.

Na formulação fungo ( $5 \times 10^5$  conídios/mL) associado ao óleo de Nim ( $10^{-4}\%$ ) a sobrevivência das larvas foi de 30% ( $\pm 12,2$ ), comparado com o teste feito somente com o fungo que teve 92% ( $\pm 1,2$ ) de sobrevivência e com o óleo de Nim a sobrevivência foi de 98% ( $\pm 0,35$ ). Neste trabalho foi mostrado, pela primeira vez, possibilidade da utilização da alga marinha *L. dendroidea* para o controle de larvas de *A. aegypti*, demonstrando que essa pode ser uma alternativa promissora para o controle de insetos vetores de doenças. Também foi mostrado que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* é mais virulento a larvas de *A. aegypti* quando formulado em baixas concentrações do óleo vegetal de Nim, o que pode ser uma alternativa promissora para aplicação do fungo no campo.

Palavras-chave: Dengue, alga, óleo de Nim, controle biológico

## ABSTRACT

GOMES, SIMONE AZEVEDO. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August, 2012. Evaluation of the toxicity of extracts of the alga *Laurencia dendroideae* and *Azadirachta indica* (neem) and synergism between Neem oil and the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against *Aedes aegypti* larvae. Professor Advisor: Richard Ian Samuels. Co-advisor: Adriano Rodrigues de Paula.

In the present study, we investigated the toxicity of extracts of the alga *Laurencia dendroidea* and *Azadirachta indica* (Neem) to larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. We also investigated the possible synergism between neem extracts and the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the aim of developing a control strategy for *A. aegypti* larvae. In the first experiment the larvae were exposed to extracts of the alga *L. dendroidea* collected from different locations in Brazil. The extract was dissolved in 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO). We evaluated the survival of larvae with with three replicates for each treatment evaluated daily for 8 days. The larvae exposed to concentrations of 5 ppm of the extract from algae collected in Manguinhos (ES) had a mean survival 47.7% ( $\pm$  7.98) and median survival time ( $S_{50}$ ) 7 days. Only 1.1% of the larvae exposed to 10 ppm ( $\pm$  13.2) survived with  $S_{50}$  of 3 days. No larvae survived following exposure to 20 ppm. The algal extract collected in Angra dos Reis (RJ) when used at a concentration of 5 ppm caused no mortality. Those treated with 10 ppm showed a survival rate of 20% ( $\pm$  6.56) and  $S_{50}$  of 4 days. At concentrations of 20, 30 and 40

ppm 100% of the larvae died. All treatments with algal extracts collected in Paraty (RJ) resulted in 100% mortality of larvae and  $S_{50}$  2 days when using 5 ppm and  $S_{50}$  of 1 day at all other concentrations. The algal extract from Buzios (RJ) resulted in 100% mortality and  $S_{50}$  of 1 day at all concentrations tested. Survival of controls was 100% with water and 98% ( $\pm 0.35$ ) with DMSO. In the second experiment the toxicity of neem oil was evaluated at concentrations of  $10^{-5}\%$  to 1%. The larvae exposed to concentrations of  $10^{-5}\%$  and  $10^{-4}\%$  Neem resulted in 92.2% ( $\pm 1.24$ ) and 82.2% ( $\pm 2$ ) survival respectively, and were not statistically different from the control treatment ( $P > 0.01$ ). The survival rates of larvae exposed to concentrations of  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-2}\%$ ,  $5 \times 10^{-2}\%$  and  $10^{-1}\%$  were 74.4% ( $\pm 3.27$ ), 18.12% ( $\pm 15.95$ ), 22.43% ( $\pm 11.10$ ), 16.7% ( $\pm 16.92$ ) and 5.6% ( $\pm 19.04$ ), respectively, differing statistically from the control ( $F_{7,23} = 71.51$ ;  $P < 0.01$ ). In the third experiment we used the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818) in concentrations from  $10^5$  to  $10^8$  conidia / mL suspended in 0.05% Tween 80. The survival of the larvae treated with concentrations of  $10^5$  and  $5 \times 10^5$  conidia/mL was 93.3% ( $\pm 1.03$ ) and 92.2% ( $\pm 1.24$ ), respectively, which were not statistically different from the controls ( $P > 0.01$ ). The survival of larvae treated with other concentrations differed from the controls ( $F_{5, 17} = 226.13$ ,  $P < 0.01$ ). The survival of larvae treated with concentrations of  $10^6$  and  $10^7$  conidia / ml was 12.2% ( $\pm 11.83$ ) and 7.8% ( $\pm 13.86$ ) respectively. The survival rate of larvae treated with  $10^8$  conidia/ml was zero. In the fourth experiment we evaluated whether the fungus associated with Neem oil would reduce the survival of larvae, compared with tests carried out with only fungus or only Neem oil. For the formulation fungus ( $5 \times 10^5$  conidia/ml) + neem oil ( $10^{-4}\%$ ), larval survival was 30% ( $\pm 12.2$ ), whilst survival with fungus alone was 92% ( $\pm 1.2$ ) and with Neem oil only survival was 98% ( $\pm 0.35$ ). In this study we show for the first time, the potential of the marine alga *L. dendroidea* for the control of *A. aegypti* larvae showing that this could be a promising alternative for the control of insect vectors of disease. It was also shown that the virulence of the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* is enhanced when formulated in low concentrations of neem oil, which may be a promising alternative for applying the fungus under field conditions.

Keywords: Dengue, alga, Neem oil, biological control

## 1. INTRODUÇÃO

O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é originário da África sendo o principal vetor da dengue. *A. aegypti* é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais e é altamente adaptado a ambientes urbanos. Sendo frequentemente encontrado dentro ou perto de casas desempenhando um papel importante na transmissão de arbovírus como a dengue e a febre amarela urbana (Consoli & Oliveira, 1998).

A dengue é uma infecção viral causada por um dos quatro sorotipos denominados DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A dengue é endêmica em muitos países tropicais e subtropicais, mas sua incidência segue um padrão sazonal. Isso ocorre porque a abundância de *A. aegypti* é regulada pela chuva, que fornece os locais de reprodução e estimula a eclosão dos ovos, e pela temperatura, que influencia a sobrevivência dos insetos e sua taxa de desenvolvimento e reprodução (Johansson et al., 2009).

As algas marinhas se apresentam como alternativa para o controle de insetos, visto que em seu ecossistema elas produzem substâncias para se defender contra a injúria nos seus tecidos pela ação de micro-organismos parasitos, e organismos incrustantes. Elas são conhecidas por produzir uma gama de produtos bioativos com possíveis usos na indústria farmacêutica, apresentando ações como anticoagulante, antifúngica, anti-helmíntica, antibacteriana e anti-inflamatória (Mayer & Hamann, 2005).

As algas sintetizam produtos com um amplo espectro de atividades biológicas, principalmente os representantes de mares tropicais e subtropicais, como é o caso da costa brasileira, sendo, portanto, muito relevante o seu uso fitoquímico (Texeira et al., 1991).

Os extratos da planta Nim (*Azadirachta indica*) são capazes de controlar grande número de pragas por meio de uma gama de compostos bioativos. Seus principais elementos químicos são uma mistura de 3 ou 4 compostos correlatos, que podem ser modificados em mais de 20 outros menores, porém não menos ativos (Mossini & Kemmelmeier, 2005). Diante de tais propriedades essa espécie vegetal tem sido relatada na literatura como eficiente no controle de insetos, principalmente no controle de pragas agrícolas.

A azadiractina, principal composto da planta com atividade inseticida, pode atuar no nível fisiológico, interferindo na síntese e liberação de hormônios levando a muda incompleta em insetos imaturos. Em fêmeas de adultos, um mecanismo de ação semelhante leva à esterilidade. Além disso, azadiractina é um composto antialimentar potente para muitos insetos (Isman, 2006).

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos para elucidar as modificações no mecanismo de controle endócrino induzido pela azadiractina, responsável pelos efeitos observados na inibição de crescimento. Estes estudos permitiram identificar modificações nos níveis de hormônios morfogenéticos como a ecdisona. Foi identificada uma acentuada similaridade estrutural entre a ecdisona e a azadiractina, entretanto não está claro se os efeitos sobre estas taxas hormonais são diretos ou indiretos (Júnior, 2003).

Os fungos entomopatogênicos são relatados com potencial para o controle de insetos agrícolas e vetores. Trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do professor Richard Ian Samuels da Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro mostraram a suscetibilidade do mosquito *A. aegypti* aos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* visando o controle de larvas (Pereira et al., 2009) e adultos (Paula et al., 2008). Em trabalho posterior Paula et al., (2011) formularam o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com dose subletal do inseticida Imidacloprid para aumentar a virulência do fungo, contra adulto de *A. aegypti* e observaram efeitos sinérgicos.

Neste trabalho, além dos testes realizados com a alga marinha da espécie *Laurencia dendroidea* coletada em diferentes regiões, também foram realizados testes para investigar o possível sinergismo do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com o óleo de Nim, visando melhorar a eficiência do fungo para o controle de larvas de *A. aegypti*.

O presente trabalho objetivou buscar métodos alternativos ao controle do mosquito vetor da dengue, avaliando em laboratório a toxicidade do extrato químico da alga marinha *L. dendroidea* coletada em diferentes regiões do Brasil contra larvas de *A. aegypti*. Também foi avaliada a toxicidade de diferentes concentrações do óleo vegetal de Nim, e a virulência de diferentes concentrações do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Para finalizar foi avaliada a associação do óleo vegetal de Nim com o fungo para averiguar a ação sinérgica. A principal perspectiva é a utilização de tais métodos em pesquisa de campo após testes de persistência em laboratório.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biologia do mosquito *A. aegypti*.

Os mosquitos são insetos pertencentes à Ordem Diptera e Família Culicidae (Tabela 1), conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. Mosquitos do gênero *Aedes* desenvolvem-se em criadouros, tanto naturais (buracos em árvore, bromélias, internódios de bambu) quanto artificiais que são representados principalmente por pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos e xaxins e vasos de cemitério, caixas d'água, tonéis, latões e cisternas destampadas ou mal tampadas, ou mesmo lagos artificiais, piscinas e aquários abandonados.

Tabela 1: Classificação do mosquito da espécie *Aedes aegypti* segundo Linnaeus, 1762

Classificação científica	
<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	
<b><i>Aedes aegypti</i></b> ( <i>Aedes</i> do grego "odioso" e <i>aegypti</i> do latim "do Egito").	
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Diptera
Família	Culicidae
Gênero	<i>Aedes</i>
Espécie	<i>Aedes aegypti</i>

Os mosquitos fêmeas se alimentam de seiva e, após a cópula precisam de sangue para a produção de ovos. Nesse ato podem adquirir o vírus da dengue ou Febre Amarela e após o estabelecimento da infecção no mosquito pode transmitir ao homem.

Em geral, a fêmea de culicídeos faz uma postura após cada repasto sanguíneo. Entretanto, *A. aegypti*, alimenta-se mais de uma vez entre oviposições sucessivas, antes de estar totalmente ingurgitado. Essa característica aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e transmitir o vírus (Barata et al., 2001).

Os ovos dos mosquitos são elípticos ou ovais, muitas vezes com um lado achatado, plano ou mesmo um tanto côncavo. De modo geral, quando observados em corte transversal são de contorno circular ou elíptico. Têm cor pálida no momento da oviposição, tornando-se escuros após alguns minutos, sendo que os inférteis geralmente não alcançam a tonalidade escura dos férteis (Consoli & Oliveira, 1998). A oviposição não é feita diretamente na água, os ovos são depositados isoladamente na superfície (parede) do recipiente, cerca de 1 a 2 centímetros acima do nível da água (Roberts & Hsi, 1977).

As larvas dos mosquitos são sempre aquáticas, têm aspectos vermiforme e com coloração que varia do esbranquiçado ao enegrecido. O corpo é dividido nitidamente em cabeça, tórax e abdome e ao contrário dos adultos que possuem aparelho bucal picador sugador, as larvas dos mosquitos têm aparelho bucal do tipo mastigador-raspador (Consoli & Oliveira, 1998). As mandíbulas e maxilas são placas robustas, dotadas de dentes e cerdas fortes, úteis à trituração dos alimentos e empregadas em estudos filogenéticos (Harbach & Peyton, 1993). A fase larval do inseto é um período de nutrição e desenvolvimento pelo qual as larvas passam a maior parte do tempo se alimentando de matéria orgânica acumulada nas laterais ou no fundo do recipiente. A duração desta fase depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro (Brasil, 2001).

As pupas possuem o aspecto de vírgula e é nesta fase que elas cessam a alimentação devido ao período de metamorfose do estágio larval para o adulto. São divididas em cefalotórax e abdômen. Normalmente ficam paradas na superfície da água e se movimentam ativamente quando perturbadas (Mardondes, 2001).

Segundo Gama et al., (2005), o tamanho corporal das fêmeas de mosquitos parece estar relacionado a vários fatores de importância ecológica e epidemiológica, tais como: longevidade, número de ovos por postura e capacidade vetorial. Os autores observaram uma relação inversamente proporcional entre densidade larval e tamanho de adultos, com uma redução no tamanho de fêmeas e machos de *A. aegypti* em condições de laboratório quando a densidade das larvas criadas em bandejas foi aumentada.

## 2.2 Histórico da dengue e distribuição geográfica do vetor

A palavra dengue tem origem espanhola e quer dizer "manha". O nome faz referência ao estado de moleza e prostração em que fica a pessoa contaminada pelo arbovírus (abreviatura do inglês de *arthropod borne vírus*: vírus oriundo dos artrópodes). A transmissão ocorre pela picada do mosquito *A. aegypti*, uma espécie hematófaga originária da África que chegou ao continente americano na época da colonização. A dengue foi vista pela primeira vez no mundo no final do século XVIII, no Sudoeste Asiático, em Java, e nos Estados Unidos, na Filadélfia. Mas a Organização Mundial de Saúde (OMS) só a reconheceu como doença neste século (Ministério da Saúde, 2011).

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

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

Sudoeste Asiático e Pacífico Ocidental e o segundo surto ocorreu na Venezuela, em 1989 (Ministério da Saúde, 2011).

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

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

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

A possibilidade de reintrodução do vírus causador da febre amarela no ambiente urbano, pela ampla dispersão de *A. aegypti*, tem motivado uma intensa atividade de vacinação, que registrou mais de 60 milhões de doses aplicadas entre 1998 e 2002 (Finkelman, 2002).

## **2.3 Métodos de controle do mosquito *A.aegypti***

### **2.3.1 Controle mecânico**

Para iniciar o controle de mosquitos vetores é importante o monitoramento do inseto para verificar a abundância em diferentes locais, a resistência e eficiência das estratégias de controle utilizadas anteriormente.

O controle mecânico das larvas consiste na retirada de ambientes propícios, natural ou artificial, para a proliferação do mosquito vetor. No ambiente urbano foram introduzidas bromélias que são usadas pelos mosquitos fêmeas para a postura dos ovos, o que torna agravante nesses ambientes por não estarem presentes os predadores das larvas desses mosquitos. O fator mais preocupante é o acúmulo de lixo, que em períodos de chuvas servem para armazenar água, propiciando a eclosão de larvas provenientes de ovos postos nas paredes internas dos recipientes, que podem permanecer por meses e eclodir na próxima estação chuvosa. O controle mecânico dos mosquitos adultos consiste principalmente na colocação de telas nas janelas e cortinados sobre as camas (Consoli & Oliveira, 1998).

### **2.3.2 Controle químico**

Uma estratégia global importante para conter doenças transmitidas por mosquitos é o controle de vetores utilizando inseticidas químicos. No entanto, a forte dependência de inseticidas para o controle de mosquito no mundo inteiro e o uso de tais produtos químicos têm levado à resistência fisiológica de importantes mosquitos vetores nos últimos anos, incluindo *Anopheles gambiae* (Koffi et al., 2012), *Aedes aegypti* (Dusfour et al., 2011) e *Culex pipiens* (Liu et al., 2011).

Os inseticidas têm sido bastante usados, tanto na agricultura e agropecuária quanto na área da Saúde Pública. Seu uso continuado tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores. Resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando a reemergência das doenças transmitidas por vetores (Brogdon & McAllister, 1998). Apesar dos importantes avanços alcançados no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos continuam sendo uma importante ferramenta dos programas integrados de controle (Rose, 2001).

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (Rose, 2001).

A principal tática adotada para o combate de mosquito é o uso maciço de produtos químicos para o controle de larvas e adultos. Entretanto, o uso intensivo de agentes químicos aumenta o custo de controle e pode afetar a saúde pública (Polanczyk et al., 2003).

As estratégias de controle do *A. aegypti* estão baseadas na utilização de produtos químicos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental. No Brasil, os programas que visam o controle do *A. aegypti* utilizam principalmente inseticidas químicos, onde se destacam os organofosforados (OP) e piretroides (P) que requerem monitoramento de resistência constante (Luna et al., 2004). Portanto, devem-se investir formas de controle alternativas que possam eliminar ou minimizar os riscos de desenvolvimento de resistência aos produtos utilizados. Uma delas é o controle integrado, medida que está sendo incentivada no Brasil, envolvendo o controle químico, biológico e mecânico, com a participação da população e respeitando as peculiaridades de cada área infestada (Lima et al., 2006).

O monitoramento aos vetores de doenças tem como finalidade o mapeamento de áreas de risco em determinados territórios e se utilizando da vigilância entomológica que se caracteriza pela presença do vetor, índices de infestação, características biológicas, tais como susceptibilidade aos inseticidas e aos vírus, avaliação da eficácia dos métodos de controle, etc. Se utiliza também das ações de controle químico, biológico ou físico, e das relações com a vigilância epidemiológica quanto à incidência e prevalência dessas doenças e ao impacto das ações realizadas (Funasa, 2002).

Marques et al., (1993), com a finalidade de aprimorar a vigilância entomológica dos vetores de dengue e febre amarela (*A. aegypti* e *A. albopictus*), no Estado de São Paulo, realizaram um estudo comparativo de eficácia de *larvitampas* (armadilhas para larvas), e *ovitampas* (armadilhas para ovos). Conclui-se que a *ovitampa*, apresenta-se como sendo bom instrumento de detecção precoce de vetores de Dengue e Febre Amarela.

A implantação de um sistema de vigilância de alerta precoce, com a capacidade de integrar dados meteorológicos, será uma ferramenta valiosa para a

prevenção bem-sucedida e controle da dengue, especialmente em países não endêmicos (Shang et al., 2010).

Lima et al., (2011) averiguaram os níveis de resistência dos inseticidas Temefos e Cipemetrina e caracterizaram os mecanismos de resistência do *A. aegypti*, tanto em nível molecular e bioquímica em populações do Estado do Ceará. Segundo os autores, a resistência a produtos químicos inseticidas é uma característica multifatorial que pode ser afetada pela disponibilidade (ambientais e tipos de locais de criação), operacional (frequência de aplicação de inseticida, quantidade e tempo de exposição) e fatores genéticos. O controle das larvas constitui aplicação de inseticidas em locais de reprodução, induzindo mortalidade inicial elevada, que decai lentamente com o tempo (Pontes et al., 2005).

Segundo Luz et al., (2009) o monitoramento contínuo da resistência é necessário para o controle adequado de *A. aegypti* e, portanto, a transmissão da dengue. Para os autores a aplicação de inseticidas deve ser restrita à incidência da dengue, reduzindo assim a resistência e aumentando o tempo de vida de um inseticida. O desenvolvimento de estratégias de controle deve otimizar a alocação de recursos, reduzir a transmissão da dengue e minimizar a evolução da resistência.

### **2.3.3 Controle biológico**

O termo “controle biológico” foi usado pela primeira vez em 1919 pelo pesquisador Harry S. Smith, quando se referiu ao uso de inimigos naturais no controle de insetos pragas (Parra et al., 2002). O controle biológico é feito através de predadores, parasitoides e patógenos. O controle microbiano é feito pelos agentes entomopatogênicos, que são microorganismos que vivem ou se alimentam sobre ou dentro de um inseto hospedeiro. Além de micro-organismos como fungos, bactérias, vírus e protozoários, inclui os nematoides, que não são micro-organismos, mas são considerados agentes entomopatogênicos, usados no controle de insetos (Parra et al., 2002). Destes, os fungos entomopatogênicos talvez sejam os mais adequados para o desenvolvimento como biopesticidas, porque eles não requerem a ingestão pelo hospedeiro, pois infectam via contato externo (Thomas & Read, 2007)

O controle biológico também pode ser feito com a utilização de peixes larvófagos. Pamplona et al., (2004) utilizaram para o controle de larvas do *A.*

*aegypti* o peixe *Betta splendens* em tanques de cimento localizados em nível do solo e observaram a capacidade dessa espécie como agente de controle biológico.

Por ser de difícil acesso aos agentes da dengue, as piscinas de casas de veraneio não utilizadas se transformaram em criadouros de mosquito. A Secretaria de Saúde Pública (Sesap) da Praia Grande em São Paulo tem utilizado peixes larvófagos conhecidos como “Guppy”, que se alimentam de larvas do pernilongo comum e da espécie que transmite a dengue. Os exemplares são colocados em reservatórios que apresentam riscos, como poços de elevador de obras e piscinas abandonadas (Almeida et al., 2007).

Os bioinseticidas, ao contrário dos inseticidas, permanecem no ambiente, pois são disseminados entre os insetos da população. Os patógenos microbianos apresentam vantagens em relação aos inseticidas químicos de largo espectro, pois não afetam populações de parasitos, predadores e polinizadores (insetos não alvo), não poluem o ambiente e, não são tóxicos para o homem e outros animais (Alves, 1998).

Dentre os métodos de controle biológico as bactérias e os fungos entomopatogênicos são os mais utilizados. No grupo das bactérias encontram-se as duas espécies mais estudadas e utilizadas, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus*, que possuem elevadas propriedades larvicidas. Ambas produzem endotoxinas proteicas, as quais, quando ingeridas pelas larvas atacam e destroem o epitélio do intestino médio, levando-as à morte (Consoli & Oliveira, 1998). Atualmente, *Bti* é comercializada em larga escala para o controle de mosquitos e borrachudos, e um grande número de produtos eficientes estão disponíveis no mercado (Polanczyk et al., 2003).

Os departamentos governamentais brasileiros têm aumentado o interesse na utilização de inseticidas microbianos em programas de controle de mosquitos em áreas urbanas (Andrade & Modolo, 1991). Entretanto, a prática atual da campanha contra o *A. aegypti* ainda é o tratamento com inseticida químico perifocal e focal baseado principalmente em uma formulação granulada de temephos contra a fase larval (Lima & Aragão, 1987).

No gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis* é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno que atua em várias ordens de insetos

pragas, como Lepidoptera, Coleoptera, além de dípteros vetores de doenças humanas (De Maagd et al., 2003).

A eficiência de *Bti* depende do tipo de formulação, hábitos alimentares das espécies de Culicidae e suscetibilidade dos insetos (Lopes et al., 2010). Segundo FAO & WHO (2002), todos os produtos comerciais formulados devem ter uma vida útil sem qualquer perda de potência superior a 20%.

*Bacillus thuringiensis* (Bt) tem a capacidade de produzir inclusões cristalinas, que são tóxicos para certos invertebrados, especialmente as espécies de larvas de insetos pertencentes à ordem coleópteros, dípteros e lepidópteros. As inclusões são formadas por diferentes proteínas cristalinas com atividade inseticida. Durante o crescimento vegetativo, várias cepas de *Bt* produzem uma variedade de antibióticos, enzimas, metabólitos e toxinas, que podem ter efeitos prejudiciais sobre organismos alvo e não-alvo (WHO, 2009).

Tratamentos experimentais com diferentes microrganismos têm como objetivo selecionar agentes entomopatogênicos mais adequados para o controle biológico de determinadas pragas, em que devem ser considerados os seguintes fatores: a segurança de utilização, a especificidade, a patogenicidade, a capacidade de produção industrial e a viabilidade após exposição a condições ambientais (Alves, 1998). Fernandes (2007) destaca que a maior parte dos estudos, em que se avalia o efeito entomopatogênico sobre o hospedeiro alvo, é realizada em condições ideais de laboratório, o que poderia superestimar sua ação em condições naturais.

Vários fungos têm sido pesquisados como potenciais no controle de mosquitos tanto na fase de larvas quanto adulto. As espécies de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são as mais pesquisadas. Pereira et al., (2009) demonstraram o potencial de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de larvas de *A. aegypti*. Munguía et al., (2011) realizaram o primeiro estudo que demonstrou a transmissão de *B. bassiana*, por comportamento de acasalamento, de machos virgens contaminados com conídios para fêmeas saudáveis de *A. aegypti*, causando 90% de mortalidade em 15 dias. Esporos infectantes de *B. bassiana* e *M. anisopliae* têm sido usados no controle de larvas e adultos de mosquito, mas têm como limitação a falta de persistência dos esporos no meio ambiente (Scholte et al., 2004).

Os fungos entomopatogênicos variam em seu modo de ação e virulência. Para a infecção ser bem-sucedida depende principalmente da capacidade de adesão e de penetração do fungo no tegumento do hospedeiro e uma variedade de enzimas extracelulares é produzida durante a degradação do tegumento do inseto (Shahid et al., 2012). Portanto, existem vantagens e desvantagens em se utilizar o controle biológico, assim como acontece ao se utilizar outros métodos de controle, como o químico (Gallo et al., 2002). Entre as desvantagens estão a necessidade de condições climáticas favoráveis e o cuidado no armazenamento (Alves, 1998).

*M. anisopliae* é um dos fungos mais utilizados em programas de manejo integrado de pragas (Albuquerque et al., 2005). Entretanto, em alguns casos, a lentidão no processo de infecção por alguns isolados torna inconveniente o seu uso, pois nas relações patógeno/hospedeiro, os primeiros distúrbios detectados na hemolinfa disparam reações de defesa dos hemócitos na tentativa de eliminar o agente invasor ou limitar seu desenvolvimento. Estudos sobre esses mecanismos podem sugerir o desenvolvimento de estratégias eficientes para o controle de pragas (Gunnarsson & Lackie 1985).

Quanto aos métodos de produção de fungos entomopatogênicos comercializados ou em vias de ser comercializados no Brasil, foram desenvolvidos no início do século passado e aqui introduzidos na década de 60, baseando-se no emprego de arroz ou outros cereais como substrato (Faria & Magalhães, 2001).

#### **2.3.4 Controle Integrado**

Desde 1980 o Programa de Controle da Dengue tem proposto o controle integrado do vetor com medidas sanitárias, redução de criadouros, informação e participação da comunidade (Funasa, 1994). Em 1995, uma abordagem mais ampla para o problema foi iniciada com o Plano Nacional de Erradicação do *A. aegypti* (Macoris et al., 2007). Esse plano propunha saneamento ambiental, comunicação e mobilização social e combate direto ao vetor (Sucen 1997, 2002). No entanto, as atividades de controle foram quase todas centradas no controle químico usando inseticidas para eliminar larvas e adultos.

Porém, a utilização de inseticidas está sendo prejudicada por problemas de resistência a inseticidas, contaminação ambiental e riscos para a saúde humana (Hemingway & Ranson, 2000). Braga et al., (2004) realizaram trabalho de monitoramento da resistência de larvas provenientes de ovos coletados no Rio de Janeiro (RJ), Sergipe (SE) e Alagoas (AL) ao inseticida temefós. Eles observaram resistência das larvas ao Temefós nos 12 municípios avaliados. Lima et al., (2011) verificaram resistência de larvas de *A. aegypti* coletadas em três localidades no Ceará ao inseticida temefós. Segundo os autores, os resultados demonstram que as populações estudadas sofrem pressão de seleção por temefós, comprometendo a eficácia deste organofosforado. Tais resultados também fornecem evidências de que o processo de redução de resistência ao larvicida presente no campo é difícil e lento e pode exigir mais de sete anos para que aconteça uma reversão. Segundo Montella et al., (2007), no Brasil a resistência do *A. aegypti* ao temefós, utilizado desde 1967, foi detectada em vários municípios, em 2000.

Portanto, abordagens alternativas são requeridas para minimizar a seleção de insetos resistentes (Zaim & Guillet, 2002). O uso de produtos químicos em concentrações subletais junto com agentes biológicos é uma estratégia que permite reduzir a quantidade e o custo com o inimigo natural (Tamai et al., 2002). Uma alternativa é a utilização de inseticidas em associação com entomopatógenos no manejo integrado de pragas que vem se mostrando capaz na redução da densidade populacional de pragas desde que ambos sejam compatíveis (Borges & Nova, 2011).

Sinergismo do inseticida Imidaclopid aplicado junto com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, foi observado por Paula et al., (2011), que verificaram uma redução na sobrevivência de mosquitos adultos da espécie *A. aegypti*, quando comparado com a formulação apenas com fungo. Oliveira & Alves (2007) estudaram o sinergismo do fungo entomopatogênico *B. bassiana* com algas diatomáceas para o controle do cascudinho, (*Alphitobius diaperinus*) que é considerado uma das principais pragas presentes em grãos da avicultura. Eles concluíram que pode ocorrer interação sinérgica entre os agentes dependendo da estratégia adotada, sendo a umidade do ambiente e a concentração do fungo os fatores limitantes a serem considerados para a interação. Em condições de campo Neves & Alves (1999) estudaram a eficiência

do controle de colônias do cupim (*Cornitermes cumulans*), utilizando Imidacloprid juntamente com os fungos entomopatogênicos (*M. anisopliae* e *B. bassiana*) e observaram que ocorre ação sinérgica quando aplicados em associação com o estressor Imidacloprid em concentrações subletais.

O objetivo do trabalho de Rondelli et al., (2011) foi avaliar a eficiência, a estabilidade, a forma de aplicação e a compatibilidade do óleo de mamona com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* no controle da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), que é a praga mais importante de plantas da família Brassicaceae. A mistura do óleo de mamona a 2%, com *B. bassiana* é compatível e eficiente no controle de *P. xylostella*.

O controle integrado utilizando inseticidas seletivos e fungos entomopatogênicos é uma estratégia viável, porém alguns dos inseticidas podem atuar negativamente sobre o fungo, reduzindo o crescimento vegetativo, a esporulação e viabilidade (Andaló et al., 2004). Polanczyk & Alves (2005), ao estudarem em laboratório a interação de isolados de *B. thuringiensis* com *B. bassiana*, para o controle da lagarta-do-cartucho, (*Spodoptera frugiperda*), observaram que o controle com os dois agentes juntos foi igual quando usados separadamente.

## **2.4 Produtos naturais para o controle de insetos vetores de doenças**

A utilização de produtos naturais pode ser considerada uma alternativa importante para o controle de insetos, uma vez que são biodegradáveis e não agridem ao ambiente. Algumas espécies vegetais têm demonstrado potencial no controle de insetos pragas e vetores.

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

O extrato vegetal de ramos de *Trichilia pallida* (Meliaceae) ao ser impregnado em folhas de milho, causa mortalidade larval de 100% da lagarta-do--cartucho em concentração igual ou superior a 0,05%. Na concentração de

0006% afeta a sobrevivência e alonga a fase larval e em concentração igual ou inferior a 0,0008% não provoca qualquer efeito aparente (Roel et al., 2000).

Souza & Vendramim (2001) avaliaram a atividade inseticida de extratos aquosos de ramos, folhas, frutos verdes e frutos maduros de *Melia azedarach* e de ramos, folhas e córtex de *Trichilia pallida*, ambas Meliaceae, sobre ovos e ninfas da mosca-branca *Bemisia tabaci*, criada em tomateiro. Os autores verificaram que os frutos verdes de *M. azedarach* foram a estrutura vegetal mais efetiva, seguindo-se as folhas e os frutos maduros. Para *T. pallida*, os ramos foram os mais efetivos, vindo a seguir as folhas. Os extratos de ramos de *M. azedarach* e de córtex de *T. pallida* não apresentaram efeito inseticida significativo. Nenhum dos extratos testados afetou a duração das fases imaturas.

A espécie de planta *Schinus terebinthifolia*, popularmente conhecida como aroeira, tem mostrado eficiência no controle dos estádios de ovo, larva e pupa das espécies de mosquitos *An. gambiae*, *An. arabiensis* e *Cx. quinquefasciatus* (Kweka et al., 2011).

Simas et al., (2004), verificaram ação tóxica de *Myroxylon balsamum*, uma árvore da família das leguminosas, contra larvas do mosquito *A. aegypti*. Os resultados obtidos por Pimenta et al., (2006) sugerem que extrato de frutos de *Pterodon polygalaeflorus* (Leguminosae) é um promissor agente larvicida sobre *A. aegypti*.

Silva et al., (2004) apresentaram pela primeira vez, o estudo fitoquímico das frações larvicidas isoladas da casca do caule de *Magonia pubescens* (Sapindaceae), planta característica do Cerrado brasileiro, sobre larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, e observaram que das nove frações de compostos obtidas apenas três apresentaram atividade tóxica.

## **2.5 Extratos de algas marinhas**

As algas vermelhas (Rhodophyta) são reconhecidas como as maiores produtoras de substâncias halogenadas no meio marinho (Fenical, 1975; Teixeira, 1991). Dentre elas, o gênero *Laurencia* destaca-se como uma fonte fascinante de novos produtos naturais (Erickson, 1983). Essas algas são amplamente distribuídas em mares temperados-quentes e tropicais do mundo (Bold & Wynne, 1978).

Segundo Oliveira-Filho, (1977), as algas são organismos eucarióticos que possuem clorofila *a* e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Neste ambiente, as algas podem fazer parte dos “bentos” (indivíduos fixos no substrato) ou “plâncton” (indivíduos suspensos na água).

O ambiente marinho, principalmente nas regiões tropicais, apresenta uma diversidade de espécies comparável àquela presente nas florestas tropicais. Esta riqueza de espécies é capaz de produzir uma enorme variedade de estruturas químicas com um potencial elevado para descoberta de novos fármacos (Molinski et al., 2009).

As algas vermelhas estão entre as principais produtoras de metabólitos secundários no ambiente marinho. Dentre as espécies mais estudadas mundialmente, encontram-se as algas do gênero *Laurencia* (Cardozo et al., 2007). O gênero é encontrado em mares subtropicais e tropicais de todo mundo, abrangendo cerca de 150 espécies (Machado et al., 2010).

As algas marinhas bentônicas produzem diversos metabólitos secundários que minimizam a ação de herbívoros (Hay, & Steinberg, 1992; Pereira, 1993). Por outro lado, várias substâncias também podem apresentar, simultaneamente, outras funções, tais como defesa frente a agentes patogênicos e organismos incrustantes (que ficam aderidos sobre as algas) e, deste modo, aumentam o valor adaptativo para as algas que as produzem (Van Alstyne & Paul, 1988).

Acredita-se que a produção de metabólitos secundários esteja relacionada à adaptação da alga ao ambiente marinho. Estudos mostram que os metabólitos de *Laurencia* podem apresentar múltiplas funções, como proteção contra herbívoros e organismos incrustantes, aumentando a capacidade adaptativa do indivíduo ao ambiente (Pereira et al., 2003). A mediação destes metabólitos em interações entre organismos pode indicar que estas moléculas também atuam em outros sistemas biológicos (Machado et al., 2010).

Santos et al., (2010) investigaram a atividade tóxica de sesquiterpeno elatol, o maior constituinte da alga vermelha brasileira *L. dendroidea* contra o protozoário *Leishmania amazonensis* e mostraram que o elatol é um potente agente antiproliferativo contra as formas promastigotas e amastigosta (intracelular), e induziram mudanças notáveis na ultraestrutura da mitocôndria do

parasita. Mendes et al., (2010) relataram atividade antiviral da alga verde marinha *Ulva fasciata* na replicação do metapneumovírus humano causador de infecção respiratória. Estudos realizados por Iliopoulou et al., (2003) relataram atividades de metabólitos isolados de *Laurencia obtusa* contra vírus HIV e outros.

As algas marinhas são abundantes no nosso território e esse recurso natural pode ser testado para o controle de insetos vetores de doenças, visto que não existem pesquisas nesse sentido.

## 2.6 Óleo de Nim

### 2.6.1 Características da planta Nim

A espécie vegetal conhecida popularmente como Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) é nativa da Índia (Dua et al., 2009) e cresce bem em áreas de clima tropical e subtropical (Verkerk & Wright, 1993).

Esta espécie pertence à família Meliaceae, como o mogno, e o porte da árvore pode variar de 15 a 20 m de altura, com tronco semirreto a reto, de 30 a 80 cm de diâmetro, relativamente curto e duro, com fissuras e escamas, de coloração marrom-avermelhada (Mossini & Kemmelmeier, 2005). O diâmetro da copa varia de 8 a 12m, podendo atingir 15 m em árvores isoladas (Martinez, 2002).

A planta de Nim tem chamado a atenção de muitos pesquisadores por suas propriedades medicinais, uso na agricultura e na indústria, como árvore de sombra, produção de madeira etc. A azadiractina, um tetranortriterpenoide isolado da semente de Nim, constitui um importante princípio ativo do ponto de vista entomológico (Mordue et al., 2000).

Nim tem sido descrito com atividade antimalárica: estudos relatam efeitos do extrato de sementes sobre o crescimento e desenvolvimento dos estágios sexual e assexual do parasita humano da malária *Plasmodium falciparum* (Mossini & Kemmelmeier, 2005).

Produtos à base de óleo de Nim têm demonstrado efeitos antifertilidade, ação espermicida direta e atividade antimicrobiana significativa contra patógenos sexualmente transmissíveis (Garg et al., 1998). Shaikh et al., (2009) verificaram efeitos do óleo de Nim na estrutura e função de ovários de fêmeas de ratos

albinos e concluíram que o óleo de Nim tem potencial anticonceptivo dose-dependente.

O composto azadiractina e o extrato aquoso de folhas também demonstram ação inibitória *in vitro* e *in vivo* sobre a replicação do vírus da Dengue tipo 2 (Parida et al., 2002). O Nim tem demonstrado afetar o desenvolvimento do protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* em diferentes espécies do vetor triatomíneo (Dhar et al., 1998).

### 2.6.2 Utilização de Nim no controle de insetos

Todos os inseticidas naturais à base de Nim são produzidos por extração da planta e são biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente. Possuem ação repelente, antialimentar, reguladora de crescimento e inseticida, além de atividade acaricida, fungicida e nematicida (Martinez, 2003).

O óleo de *A. indica* é retirado de sementes, onde os princípios ativos são mais concentrados e seus derivados mais efetivos (Oliveira et al., 2007). De acordo com Balandrin et al., (1988), dentre os componentes com atividade inseticida presentes em *A. indica*, 75% deles estão concentrados nas sementes.

Produtos inseticidas de origem vegetal possuem efeito após a ingestão, inibindo algumas das funções vitais, tais como reprodução, alimentação, crescimento, sempre na dependência da concentração utilizada antes de provocar mortalidade (Rodriguez & Vendramim, 1997). Produtos derivados de Nim têm vantagem de ser praticamente não tóxicos ao homem e serem rapidamente degradados no solo e nas plantas (Isman, 2006).

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

A pulverização de soluções aquosas de óleo de Nim sobre plântulas de cafeeiros reduziu o número de ovos depositados por adultos de *Leucoptera*

*coffeella* sobre as folhas, mostrando a ação inibitória de oviposição do produto sobre a espécie vegetal. Verificaram também que a pulverização sobre ovos desta espécie reduziu a eclosão das larvas dependentes da dose, mostrando efeito larvicida de contato do produto sobre essa espécie (Martinez, 2003).

Para Mordue et al., (2000) a Azadiractina, principal composto do óleo de Nim, pode apresentar efeitos diretos causando inibição da divisão celular e na síntese de proteína acarretando paralisia dos músculos, necrose e falta de produção de enzimas no intestino médio. Azevedo et al., (2005) estudaram o efeito do óleo de Nim no controle de *Bemisia tabaci* (mosca-branca) em cultura de meloeiro no Nordeste brasileiro e verificaram que foi eficiente no controle de adultos e ninfas.

### **2.6.3 Fungos entomopatogênicos no controle de insetos**

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados em controle microbiano (Alves, 1998). Os fungos entomopatogênicos invadem seus hospedeiros através do esqueleto externo (cutícula), que é uma estrutura complexa composta por proteína e quitina. Por meio da ação combinada de enzimas hidrolíticas, tais como quitinase, protease e lipase, os micélios fúngicos são capazes de penetrar nestas barreiras (Bidochka & Khachatourians, 1987).

Dessa forma, o fungo pode atuar no inseto pelo contato não precisando ser ingerido. A infecção do inseto envolve adesão e germinação dos esporos com a formação do tubo germinativo e apressório que torna a infecção possível, juntamente com as enzimas de degradação da cutícula (Devi & Lal, (2008).

Entre as principais vantagens da utilização do *M.anisopliae* no controle biológico de insetos está a facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial, facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo decorrido de sua utilização e, principalmente, o reduzido impacto ambiental (Orlandelli & Pamphile, 2011).

A associação de extratos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas, reduzindo custos e impactos. Foi demonstrado que o óleo de Nim não tem efeito na viabilidade dos fungos (Marques et al., 2004). Segundo os autores este resultado é importante, pois mostra o potencial de utilização conjunta de esporos

do fungo veiculados em solução aquosa de óleo de Nim, sem que haja redução da germinação dos esporos.

Santos et al., (2009) avaliaram em laboratório a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* com o óleo de Nim em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Os autores observaram que ambas as linhagens fúngicas apresentaram compatibilidade com óleo de Nim. Dessa forma, espera-se que o produto considerado compatível nesse tipo de teste também o seja quando aplicado em condições de campo. Trabalho realizado por Santos et al., (2009) em teste em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) verificou que as linhagens fúngicas *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentaram compatibilidade com o óleo de Nim.

### 3. HIPÓTESES DO TRABALHO

Investigar se as larvas de *A. aegypti* serão suscetíveis aos efeitos tóxicos do extrato da alga marinha *Laurencia dendroidea* e aos efeitos tóxicos do óleo extraído da planta de Nim (*Azadirachta indica*).

O extrato químico da alga extraído de diferentes regiões poderia apresentar diferenças em toxicidade contra larvas.

O óleo de Nim com o aumento das concentrações causará redução progressiva na sobrevivência das larvas.

O óleo de Nim em associação com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* terá efeito sinérgico no controle das larvas.

#### 4. OBJETIVO GERAL

Investigar em laboratório a toxicidade do extrato da alga marinha *Laurencia dendroidea* e do óleo vegetal de Nim e a virulência de diferentes concentrações do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* isoladamente e em associação com o óleo de Nim contra larvas de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a toxicidade de diferentes concentrações do extrato químico da alga marinha *L. dendroidea* coletada em diferentes regiões do Brasil.

Avaliar a toxicidade de diferentes concentrações do óleo de Nim contra larvas de *A. aegypti*.

Avaliar a sobrevivência das larvas expostas a óleo de Nim associada ao fungo *M. anisopliae*.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida durante a dissertação de mestrado no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os experimentos com os extratos da alga foram realizados em colaboração com Núcleo de Pesquisas Ecológicas de Macaé (NUPEM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

### 6.1 Criação dos mosquitos linhagem Rockfeller

Os mosquitos da espécie *A. aegypti* (Linhagem Rockfeller) foram criados no insetário do LEF e NUPEM. Os mosquitos adultos foram criados em gaiolas de plástico (30 cm x 20 cm x 20 cm) cobertas com organza e alimentados com sacarose 10%. Após copularem foram colocados em contato com uma ave em estágio juvenil (do gênero *Gallus*) e imobilizada para as fêmeas procederem ao repasto sanguíneo. Após o repasto as fêmeas ovipositaram em papel filtro colocado em um pote de 100 mL coberto com 50 mL de água no interior da gaiola. O papel fitro contendo os ovos foi coletado após quatro dias e seco em condições ambientais durante três dias. Posteriormente o papel filtro foi colocado em bandeja de (10 cm x 30 cm x 20 cm) com água de torneira tratada, preparada com 24 horas de antecedência, com aproximadamente 1 grama de ração de gato, para favorecer a proliferação de bactérias e facilitar o desenvolvimento das larvas. Após dois dias as larvas que apresentaram desenvolvimento no segundo e terceiro estágio foram coletadas para uso nos experimentos. As demais larvas foram mantidas na bandeja até a formação de pupas que foram coletadas e colocadas nas gaiolas de criação para a manutenção da colônia.

## 6.2 Montagem do experimento

O experimento foi conduzido na bancada em temperatura ambiente. Dez larvas no segundo e terceiro estágio foram adicionadas em copos plásticos de 100 mL, com 50 mL de água de torneira tratada, totalizando três parcelas por repetição (30 larvas cada repetição), e três repetições. A mortalidade das larvas foi contabilizada diariamente durante 8 dias.

### 6.2.1 Preparo do extrato da alga e montagem do experimento

A metodologia do preparo e o fracionamento dos extratos foi a empregada na dissertação da Fernanda Lacerda da Silva Machado desenvolvida em 2009 no programa de Pós-Graduação da Farmácia na UFRJ (Machado, 2009).

Segundo essa metodologia, a coleta das algas foi feita através de técnicas de mergulho livre. Após a coleta, o material foi congelado a - 20°C. Antes de serem submetidos ao processo de extração, os espécimes das algas foram triados para retirada de epífitas e material acompanhante. A identificação das algas foi feita pela Dra. Mutue Toyota Fujii (Instituto de Botânica de São Paulo) e pela Profa. Dra. Lísia Mônica Gestinari (Nupem/UFRJ). Todo o material botânico está disposto no Herbário RFA, do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Após secagem do material à temperatura ambiente, este foi triturado para ser submetido ao processo de extração, o qual foi feito por maceração com uma mistura de diclorometano: metanol (1:1) passando por quatro extrações durante sete dias. Os solventes utilizados foram da marca Tedia.

Para os tratamentos controle foi utilizado apenas água e um controle com o solvente Dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado no preparo do extrato da alga, que foi previamente testado de forma a estabelecer concentrações não letais (0,01-10%). Para os tratamentos com alga foram utilizados extratos da alga *Laurencia dendroidea* coletada em Manguinhos (ES), Angra dos Reis, Parati e Búzios (RJ). A concentração do extrato foi preparada em ppm (mg/L) de forma a determinar a média de sobrevivência das larvas.

Para o tratamento com o extrato da alga foram utilizadas concentrações de 5; 10; 20; 30 e 40 ppm, sendo que apenas para a alga coletada em Búzios foi utilizada a concentração mais baixa de 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 ppm. Para todos os

tratamentos o extrato foi diluído em 0,1% de DMSO e adicionado em 50 mL de água de torneira com 10 larvas.

### 6.2.2 Experimento com óleo vegetal de Nim

Para o tratamento controle foi utilizado apenas 50 mL de água de torneira. Para os tratamentos com Nim foi utilizado o óleo comercial “Base Nim” da marca Base fértil Nim com 0,12% p/p de Azadiractina, principal componente com atividade inseticida. Para averiguar a toxicidade, o óleo foi diluído em água destilada para o preparo de solução estoque de 0,01%, 5% e 10% do produto. A solução estoque de 0,01% foi utilizada para o preparo de soluções de  $10^{-3}$  %,  $10^{-4}$  %, e  $10^{-5}$  %. A solução estoque de 10% foi utilizada para o preparo de soluções de e 1%,  $10^{-1}$  % e  $10^{-2}$  %, A solução estoque de 5% foi utilizada para preparar a solução de  $5 \times 10^{-2}$  % do produto. Para a seleção das concentrações utilizadas levou em consideração a concentração de 1%, que é a recomendada pelo fabricante para uso no campo.

As diferentes concentrações foram testadas para a obtenção da dose subletal como demonstra na Tabela 1.

Tabela 1: Diferentes concentrações do óleo Nim

Solução Estoque	Volume	Concentração final
0,01%	50 $\mu$ L	$10^{-5}$ %
0,01%	500 $\mu$ L	$10^{-4}$ %
0,01%	5000 $\mu$ L	$10^{-3}$ %
10%	50 $\mu$ L	$10^{-2}$ %
5%	500 $\mu$ L	$5 \times 10^{-2}$ %
10%	500 $\mu$ L	$10^{-1}$ %
10%	5000 $\mu$ L	1 %

### 6.3 Produção do fungo

Para a realização dos testes de sinergismo foi utilizado o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* da linhagem ESALQ 818 de Piracicaba em São Paulo, cultivado previamente em placas de Petri em meio de cultura soja-dextrose-ágar (SDA) contendo 2g de Ágar; 1g de Dextrose; 0,25g de Peptona; 0,25g de Extrato de Levedura, autoclavado em 100 mL de água destilada durante 20 minutos a 1 atm (121 °C). As placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada (BOD) a 27 °C por duas semanas e depois armazenadas em geladeira.

Após o período de incubação na câmara de germinação uma pequena alíquota de conídios foi retirada da placa de Petri com o auxílio de uma espátula, previamente esterilizada, e misturada no arroz em Câmara de Fluxo Laminar para evitar contaminação. Para a multiplicação do fungo foi utilizado arroz parborizado autoclavado em Erlemeyers de 500 mL fechados com algodão e papel alumínio, sendo 90g de arroz em 200 mL de água destilada, autoclavados durante 20 minutos a 1 atm (121 °C).

Os Erlemeyers foram mantidos em câmara de germinação, a 27 °C, por um período de 10 dias e depois mantidos em geladeira até processar na máquina separadora de esporos. O arroz contendo os conídios foi colocado em saco de papel e secos, por 24 h, em estufa de secagem a 33 °C. Após a secagem do arroz os conídios foram separados do arroz no equipamento denominado "Mycoharvester" e guardados com sílica gel em geladeira de forma a evitar umidade.

#### 6.3.1 Experimento com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*

Para averiguar a virulência do fungo foram testadas as concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^5$  conídios/mL obtidas a partir de conídios pesados e diluídos em 0,05% do agente dispersante Tween 80 previamente autoclavado. Foi adicionado 1 mL do fungo diluído em cada copo contendo a água e as larvas. O tratamento controle foi feito apenas com Tween 80. Para manter a concentração desejada foi retirado 1 mL de água antes da adição do fungo. Os cálculos para a contagem dos conídios foram realizados previamente pelo grupo de pesquisa do

LEF utilizando a câmara de Neubauer (dados não publicados) conforme demonstra Na Tabela 2.

Para verificar o sinergismo entre Nim e *M. anisopliae* foi selecionada uma concentração do óleo de Nim em que a sobrevivência foi igual ao controle (dose subletal) e, uma concentração do fungo que não matasse 100% das larvas. Os dois agentes foram testados juntos. O tratamento controle foi realizado apenas com Tween 80.

Tabela 2: Peso do fungo seco diluído em Tween 80 para a obtenção das diferentes concentrações de fungo

Concentração do Fungo	Volume (Tween)	Peso do Fungo (pó seco)
$10^8$ conídios/mL	100 mL	2 g
$10^7$ conídios/mL	100 mL	0,2 g
$10^6$ conídios/mL	100 mL	0,02 g
$5 \times 10^5$ conídios/mL	100 mL	0,01 g
$10^5$ conídios/mL	100 mL	0,002 g

### 6.3.2 Efeito de Nim na germinação de *M. anisopliae*

As concentrações do óleo de Nim (1%,  $10^{-1}$  %,  $5 \times 10^{-2}$  %,  $10^{-2}$  %,  $10^{-3}$  %,  $10^{-4}$  %,  $10^{-5}$  %) foram utilizadas para realização de teste de germinação com o fungo *M. anisopliae* na concentração de  $10^6$  conídios/mL.

O teste foi realizado em placa de Elisa utilizando meio de cultura líquido (10g de Dextrose, 2,5g de Peptona, 2,5g de Extrato de Levedura em 1L de água destilada).

As concentrações do óleo de Nim foram preparadas no meio de cultura utilizando a mesma metodologia para os testes de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (Tabela 2). O fungo foi resuspenso em 0,05% de Tween 80 e acrescido 30  $\mu$ L em cada poço da placa Elisa. Foi adicionado um volume final de 300  $\mu$ L em cada poço, sendo descontado desse volume final o volume de cada concentração de Nim e o volume do fungo. O tratamento controle foi realizado apenas com 30  $\mu$ L do fungo diluído em meio de cultura e adicionado no poço com 270  $\mu$ L de meio de cultura.

#### 6.4 Análise dos resultados

Os dados de sobrevivência foram tabelados de forma a obter o total das três parcelas para cada repetição. Para a obtenção das curvas e do tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) os dados foram analisados pelo Software GraphPad Prism Version 5.03. Primeiramente foram analisadas as repetições de cada tratamento para averiguar se as curvas de sobrevivência entre as repetições não eram estatisticamente diferentes. Confirmada que não havia diferença entre as repetições as três repetições foram agrupadas e procedeu a análise das curvas de sobrevivência entre os tratamentos.

A homogeneidade dos experimentos foi determinada usando o teste de Log-Rank (Elandt & Johnson, 1980) em nível de significância de 95%. Os resultados foram agrupados para análise da curva de sobrevivência, média percentual da sobrevivência e desvio padrão. As comparações das médias de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* 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).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Experimentos com extrato da alga

Primeiramente foram realizados experimentos com somente o solvente DMSO nas concentrações de 0,01%, 0,1%, 1%, 5% e 10% como demonstra a Figura 1.

Comparando as taxas de sobrevivência, a análise de variância e o teste Duncan pode-se verificar que a sobrevivência das larvas expostas à concentração de 0,01% foi de 88,8 ( $\pm 0,8$ ), à sobrevivência das expostas a concentração de 0,1% foi de 96,6 ( $\pm 0,74$ ) e à sobrevivência das expostas a concentração de 1% foi de 86,6 ( $\pm 2,2$ ), não diferindo estatisticamente do tratamento controle ( $P > 0,01$ ) como demonstra a Tabela 3.

As larvas tratadas com as concentrações de 5% e 10% apresentaram mortalidade de 100%, diferindo estatisticamente do controle ( $F_{5,17} = 68,48$ ;  $P < 0,01$ ), apresentando tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de 2 e 1 dias, respectivamente.

Portanto, a concentração de 0,1% DMSO foi selecionada para dissolver o extrato químico da alga.

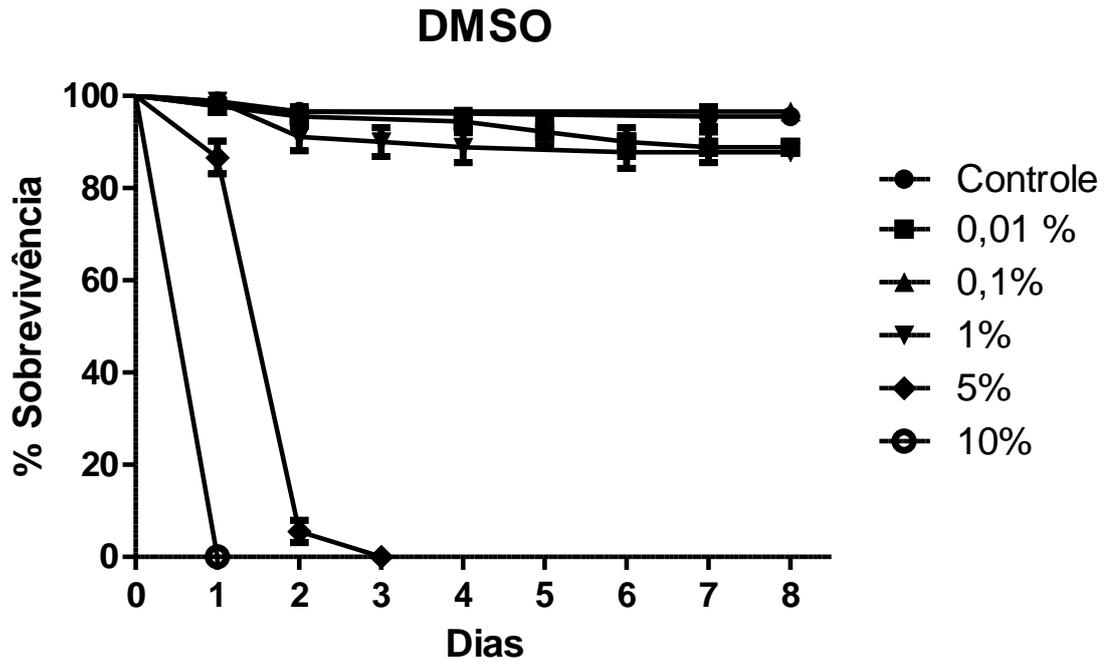


Figura 1: Teste preliminar para obtenção da concentração subletal do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para o preparo do extrato das algas.

Tabela 3: Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas com diferentes concentrações de DMSO. ND\*: Não determinado.

Tratamentos	%Sobrevivência $\pm$ Desv. Pad.	S <sub>50</sub>
0,01%	88,8 $\pm$ 0,8 a	ND*
0,1%	96,6 $\pm$ 0,7 a	ND
1%	86,6 $\pm$ 2,2 a	ND
5%	0 b	2
10%	0 b	1
Controle	95,5 $\pm$ 0,7 a	ND

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

O extrato da alga *L. dendroidea* coletada em Manguinhos (ES) apresentou redução na sobrevivência das larvas com o aumento da concentração, demonstrando o efeito tóxico e curva dose-resposta dessa alga contra larvas de *A. aegypti* (Figura 2). A sobrevivência das larvas expostas a todas as concentrações do extrato das algas coletadas na praia de Manguinhos (ES) diferiu estatisticamente do controle ( $F_{6,20} = 435,66$ ;  $P < 0,01$ ), demonstrado na Tabela 4.

As larvas expostas à concentração de 5 ppm do extrato coletado em Manguinhos apresentaram sobrevivência no oitavo dia de avaliação de 47,8% e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) de 7 dias. As larvas expostas à concentração de 10 ppm, sobreviveram apenas 1% com  $S_{50}$  de 3 dias.

As larvas expostas às concentrações de 20, 30 e 40 ppm apresentaram mortalidade de 100% ao quarto, terceiro e primeiro dia do experimento, e  $S_{50}$  de 2, 1 e 1 dias, respectivamente.

O tratamento controle usando 0,1% de DMSO não diferiu estatisticamente do controle feito apenas com água.

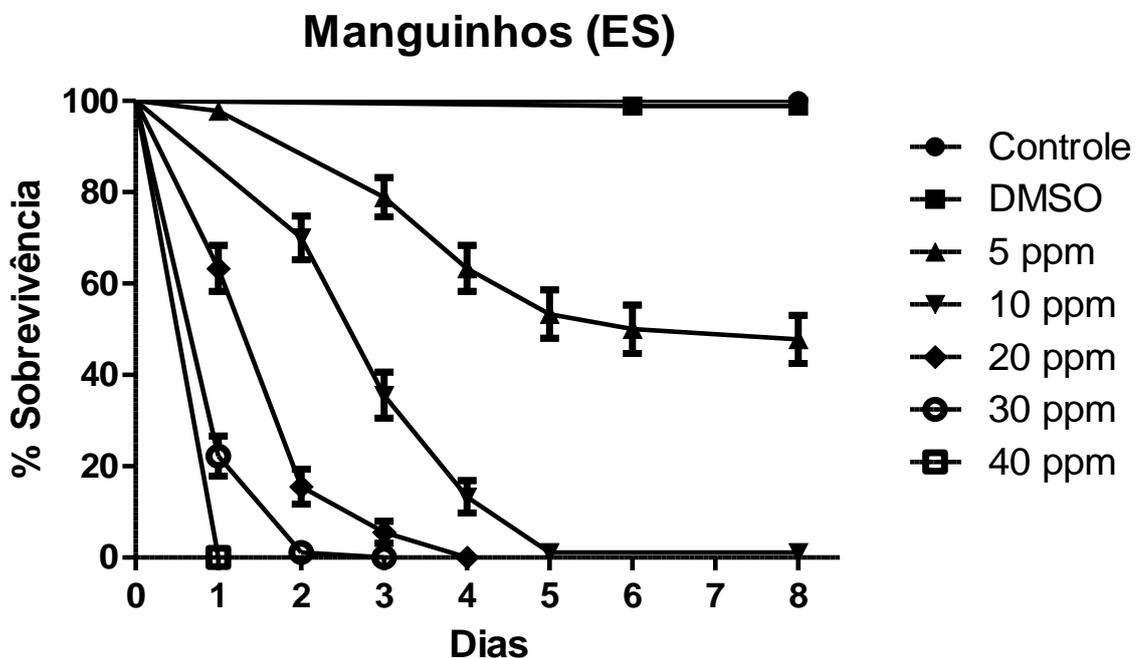


Figura 2: Teste para verificar a sobrevivência de larvas expostas a diferentes concentrações de extrato químico da alga obtida em Manguinhos (ES).

Tabela 4: Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas com diferentes concentrações dos extratos das algas coletadas em Manguinhos (ES), Angra dos Reis, Parati e Búzios (RJ)

Tratamentos	Manguinhos (ES)		Angra (RJ)		Parati (RJ)		Búzios (RJ)	
	% Sob. ± Desv. Pad.	S <sub>50</sub>	% Sob. ± Desv. Pad.	S <sub>50</sub>	% Sob. ± Desv. Pad.	S <sub>50</sub>	% Sob. ± Desv. Pad.	S <sub>50</sub>
5 ppm	47,7 ± 7,98 b	7	100 a	ND	0 b	2	0 b	1
10 ppm	1,1 ± 13,2 c	3	20 ± 6,56 b	4	0 b	1	0 b	1
20 ppm	0 c	2	0 c	2	0 b	1	0 b	1
30 ppm	0 c	1	0 c	2	0 b	1	0 b	1
40	0 c	1	0 c	1	0 b	1	0 b	1
Controle	100 a	ND*	100 a	ND	100 a	ND	100 a	1
DMSO	98,88 ± 0,35 a	ND	98,88 ± 0,35 a	ND	98,88 ± 0,35 a	ND	98,88 ± 0,35 a	1

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

As larvas tratadas com o extrato oriundo das algas coletadas em Angra dos Reis a uma concentração de 5 ppm apresentaram sobrevivência estatisticamente igual aos controles água e DMSO ( $P > 0,01$ ) como demonstra a tabela 4. A sobrevivência das larvas expostas às demais concentrações diminuiu à medida que as concentrações foram aumentando, sendo estatisticamente diferente do controle ( $F_{6,20} = 1479,10$ ;  $P < 0,01$ ).

Das larvas tratadas com a concentração de 10 ppm sobreviveram 20% e teve um  $S_{50}$  de 4 dias. As expostas a 20 ppm apresentaram mortalidade de 100% no sexto dia de avaliação e  $S_{50}$  de 2 dias. As larvas tratadas com 30 e 40 ppm apresentaram mortalidade de 100% no segundo dia de experimento e  $S_{50}$  de 2 dias e 1 dia, respectivamente.

O tratamento com somente DMSO não diferiu estatisticamente do tratamento apenas com água.

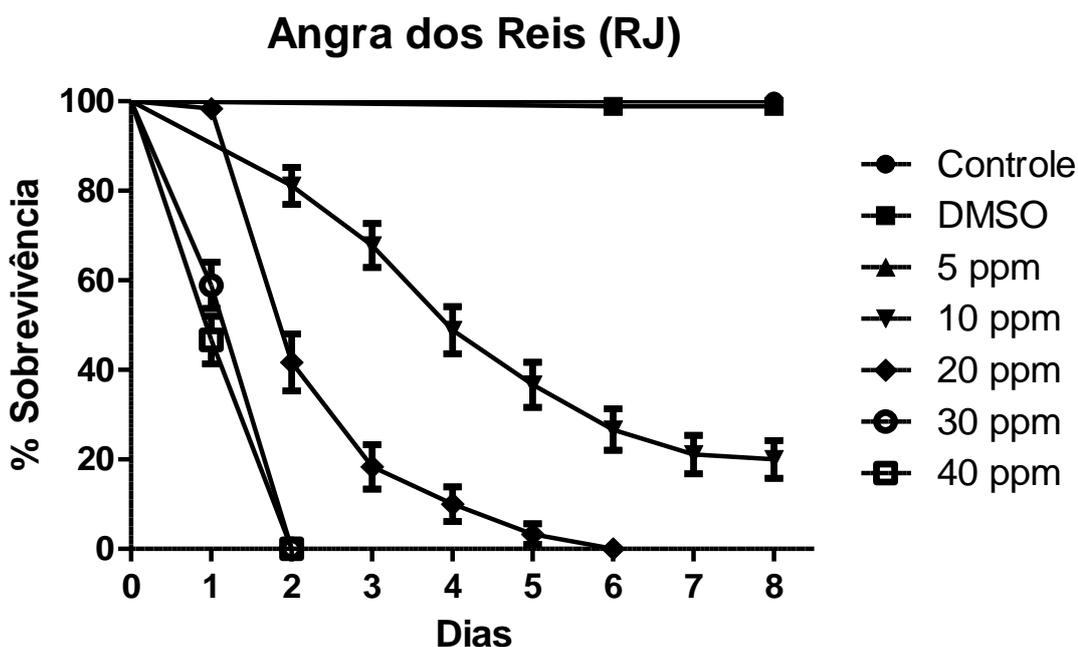


Figura 3: Teste para verificar a sobrevivência de larvas expostas a diferentes concentrações de extrato químico da alga obtida em Angra dos Reis (RJ).

O extrato químico da coletada em Parati (RJ) foi mais tóxico para as larvas quando comparado ao extrato da alga coletada em Manguinhos (ES) e Angra dos Reis (RJ) o que pode ser observado na figura 4, diferindo estatisticamente do tratamento controle ( $F_{6,20} = 13351,00$ ;  $P < 0,01$ ) mostrado na tabela 4.

Todos os tratamentos com os extratos da alga coletada em Parati causaram mortalidade das larvas em 100%. O tratamento com 5 ppm apresentou mortalidade de 100% no quarto dia de experimento, no tratamento com 10 ppm no terceiro dia e nos tratamentos com 20, 30 e 40 ppm no primeiro dia. O valor de  $S_{50}$  foi de dois dias para o tratamento com 5 ppm e um dia para os demais tratamentos.

O tratamento DMSO não diferiu estatisticamente do tratamento controle.

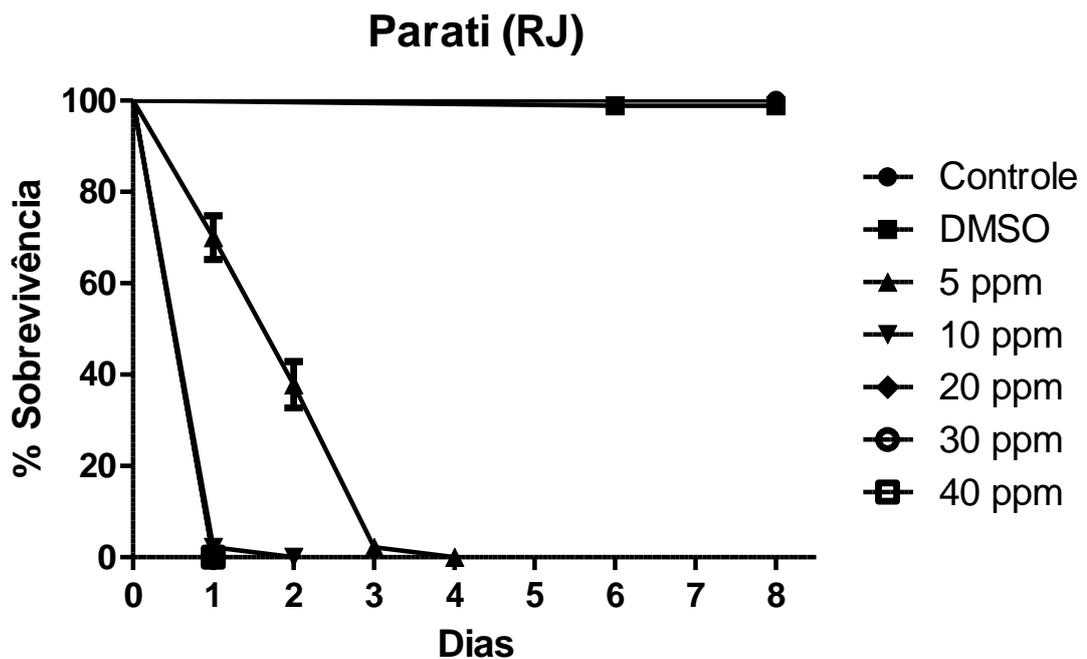


Figura 4: Teste para verificar a sobrevivência de larvas expostas a diferentes concentrações de extrato químico da alga obtida em Parati (RJ).

O extrato químico da alga coletada em Búzios (RJ) causou mortalidade das larvas em 100% para todas as concentrações testadas (Figura 5), sendo significativamente diferente do controle ( $F_{6,20} = 13351,00$ ;  $P < 0,01$ ), representado na Tabela 2.

A concentração de 10 ppm causou 100% de mortalidade no segundo dia e as demais concentrações causaram 100% da mortalidade no primeiro dia de avaliação.

Em todas as concentrações analisadas o  $S_{50}$  foi de um dia, demonstrando maior toxicidade do extrato coletado nessa praia.

Os tratamentos controle e DMSO não diferiram estatisticamente entre si.

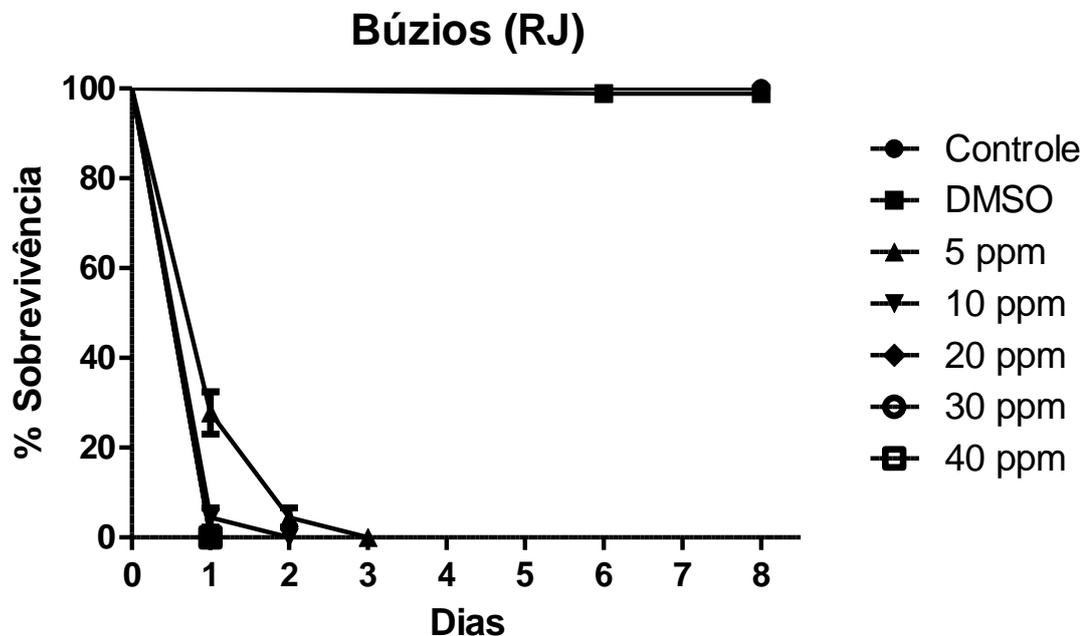


Figura 5: Teste para verificar a sobrevivência de larvas expostas a diferentes concentrações de extrato químico coletado em Búzios (RJ).

O extrato da alga coletada em Búzios causou maior mortalidade das larvas, por isso, foi realizado posteriormente experimento com as diluições de 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 ppm (Figura 6).

A sobrevivência das larvas tratadas com baixas concentrações do extrato químico da alga coletada em Búzios (RJ) diferiu estatisticamente do controle ( $F_{6,20} = 279,03$ ;  $P < 0,01$ ) como demonstra a Tabela 5.

As concentrações de 1 e 2,5 ppm resultaram em 32,2% e 5,5% de sobrevivência e valores de  $S_{50}$  de 6 e 3 dias, respectivamente.

As concentrações de 5; 7,5 e 10 ppm reduziram a sobrevivência das larvas em 100% e apresentaram  $S_{50}$  de dois dias para 5; 7,5 ppm e um dia expostas a 10 ppm.

O tratamento com DMSO não diferiu estatisticamente do controle apenas com água.

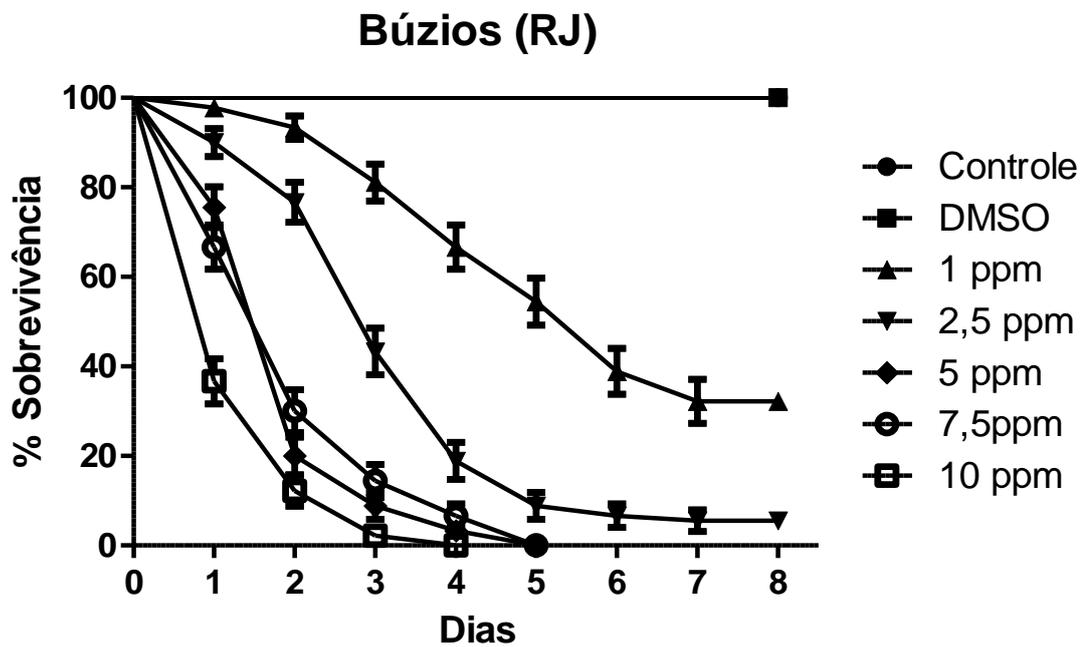


Figura 6: Teste para verificar a sobrevivência de larvas expostas a baixas concentrações de extrato químico de algas coletadas em Búzios (RJ).

Tabela 5: Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas com baixas concentrações do extrato químico da alga coletada em Búzios (RJ).

Tratamentos	%Sobrevivência ± Desv. Pad.	S <sub>50</sub>
1 ppm	32,22 ± 5,31 b	6
2,5 ppm	5,55 ± 9,54 c	3
5 ppm	0 c	2
7,5 ppm	0 c	2
10 ppm	0 c	1
Controle	100 a	ND*
DMSO	100 a	ND

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

## 7.2 Toxicidade do óleo vegetal de Nim

O tratamento controle, que foi apenas a água da torneira contida nos copos, apresentou sobrevivência de 93,3%. As concentrações de 10<sup>-5</sup>%, 10<sup>-4</sup>%, 10<sup>-3</sup>% de Nim, resultaram em sobrevivência de 92,2%, 82,2% e 74,4%, respectivamente (Figura 7). Como demonstra a tabela 6 as larvas expostas às concentrações de 10<sup>-5</sup> % e 10<sup>-4</sup> % não diferiram estatisticamente do tratamento controle P>0,01. As expostas às demais concentrações diferiram estatisticamente do controle (F<sub>7,23</sub> = 71,51; P<0,01). As larvas expostas à concentração de 10<sup>-3</sup> % apresentaram sobrevivência de 74,44% e as expostas à concentração de 10<sup>-2</sup> % de 18,12% e S<sub>50</sub> de 3,5 dias.

As larvas expostas à concentração de 5x10<sup>-2</sup>%, 10<sup>-1</sup> % e 1% tiveram sobrevivência de 22,43%, 16,7% e 5,6 %, respectivamente com S<sub>50</sub> de um dia (Tabela 6).

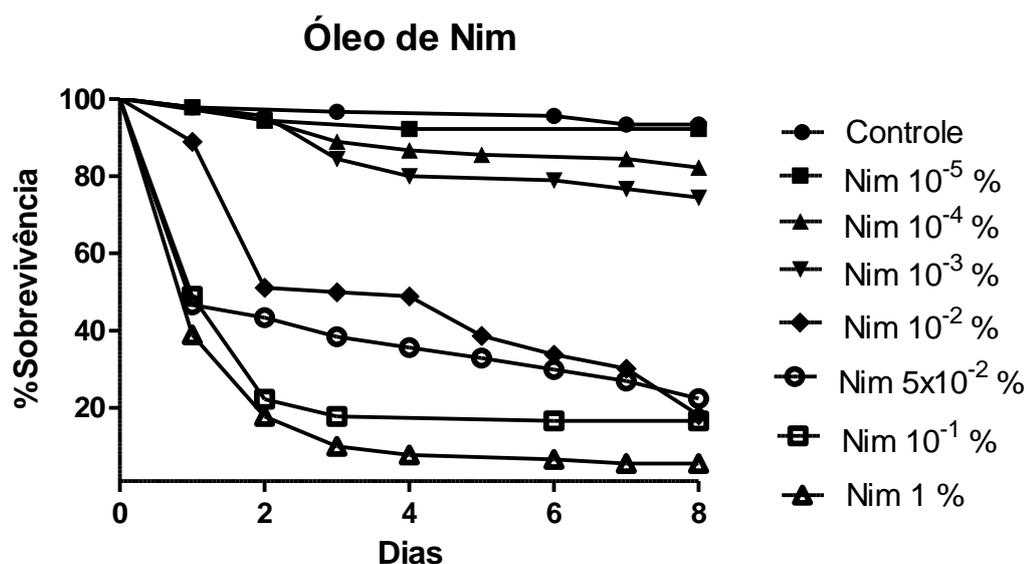


Figura 7: Toxicidade de diferentes concentrações de óleo vegetal de Nim a larvas de *Aedes aegypti*.

Tabela 6: Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas com diferentes concentrações do óleo vegetal de Nim.

Tratamentos	%Sobrevivência $\pm$ Desv. Pad.	S <sub>50</sub>
$10^{-5}$ %	92,22 $\pm$ 1,24 a	ND*
$10^{-4}$ %	82,22 $\pm$ 2 ab	ND
$10^{-3}$ %	74,44 $\pm$ 3,27 b	ND
$10^{-2}$ %	18,12 $\pm$ 15,95 c	3,5
$5 \times 10^{-2}$ %	22,43 $\pm$ 11,10 c	1
$10^{-1}$ %	16,66 $\pm$ 16,92 cd	1
1%	5,55 $\pm$ 19,04 d	1
Controle	93,33 $\pm$ 0,88 a	ND

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

Antes da realização dos testes com combinações do óleo de Nim e o fungo *M. anisopliae*, foi selecionada uma concentração do fungo para ser utilizada posteriormente. Foram testadas concentrações de  $10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL (Figura 8). Das concentrações testadas, as de  $10^5$  e  $5 \times 10^5$  não diferiram estatisticamente do controle ( $P > 0,01$ ) (Tabela 7), apresentando sobrevivência das larvas de 93,3% e 92,2%, respectivamente. A sobrevivência das larvas tratadas nas concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  diferiu estatisticamente do controle ( $F_{5,17} = 226,13$ ;  $P < 0,01$ ).

As larvas tratadas com as concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  tiveram sobrevivência de 12,2% e 7,8%, respectivamente. Na concentração de  $10^8$  a mortalidade das larvas foi de 100% no segundo dia de avaliação. O  $S_{50}$  para as três maiores concentrações foi de dois dias (Tabela 7).

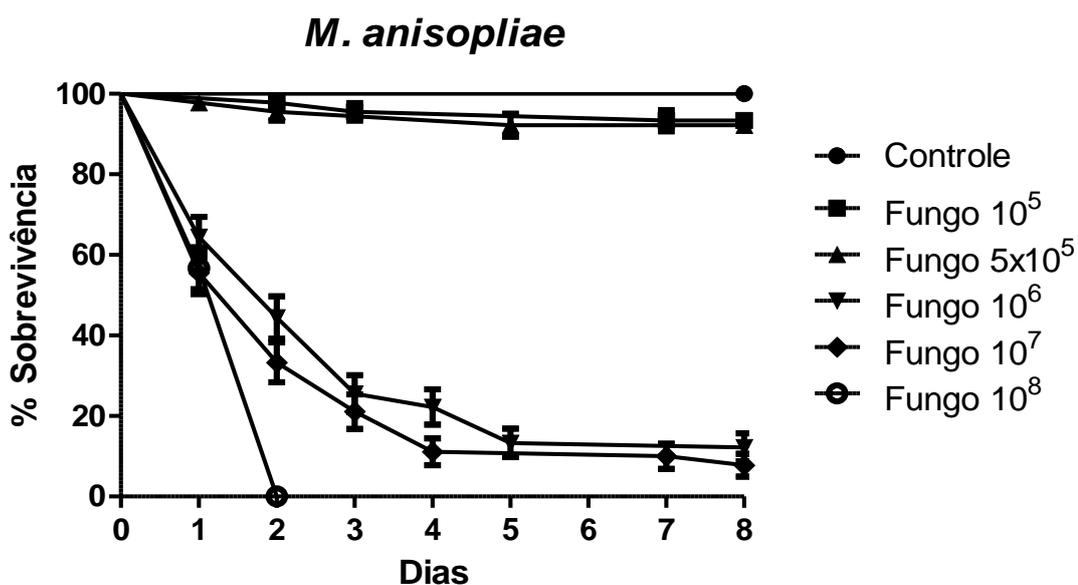


Figura 8: Teste para verificar a sobrevivência de larvas expostas a diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae*

Tabela 7: Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas com diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae*.

Tratamentos	%Sobrevivência ± Desv. Pad.	S <sub>50</sub>
10 <sup>5</sup>	93,33 ± 1,03 a	ND*
5x10 <sup>5</sup>	92,22 ± 1,24 a	ND
10 <sup>6</sup>	12,22 ± 11,83 b	2
10 <sup>7</sup>	7,77 ± 13,86 c	2
10 <sup>8</sup>	0 d	2
Controle	100 a	ND

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

Os testes de sinergismos foram realizados com a concentração de 10<sup>-4</sup> % do óleo de Nim combinado com 5x10<sup>5</sup> conídios/mL de fungo.

Para a realização dos testes de possíveis efeitos sinérgico da combinação do fungo e Nim, primeiramente foram testadas diferentes concentrações do fungo para encontrar uma concentração que em associação com o Nim diminuísse a sobrevivência das larvas.

Para o tratamento controle com 0,05% Tween 80, a sobrevivência das larvas foi de 100%. A sobrevivência das larvas tratadas com óleo de Nim na concentração de 10<sup>-4</sup>% foi de 98,8% e a sobrevivência das larvas expostas ao fungo na concentração de 5x10<sup>5</sup> conídios/mL foi de 92,2% (Figura 9) demonstrando que a sobrevivência das larvas tratadas apenas com Nim e apenas com fungo não diferiu estatisticamente do controle ( P>0,01) (Tabela 8).

A associação do fungo com o óleo de Nim reduziu significativamente a sobrevivência das larvas de *A. aegypti* (30% de larvas vivas), comparado com os testes feitos com somente Nim (98,8 % de larvas vivas) ou com somente o fungo (92, 2% de larvas vivas), demonstrando efeito sinérgico entre os dois tratamentos (F<sub>3,11</sub> = 159,92; P<0,01).

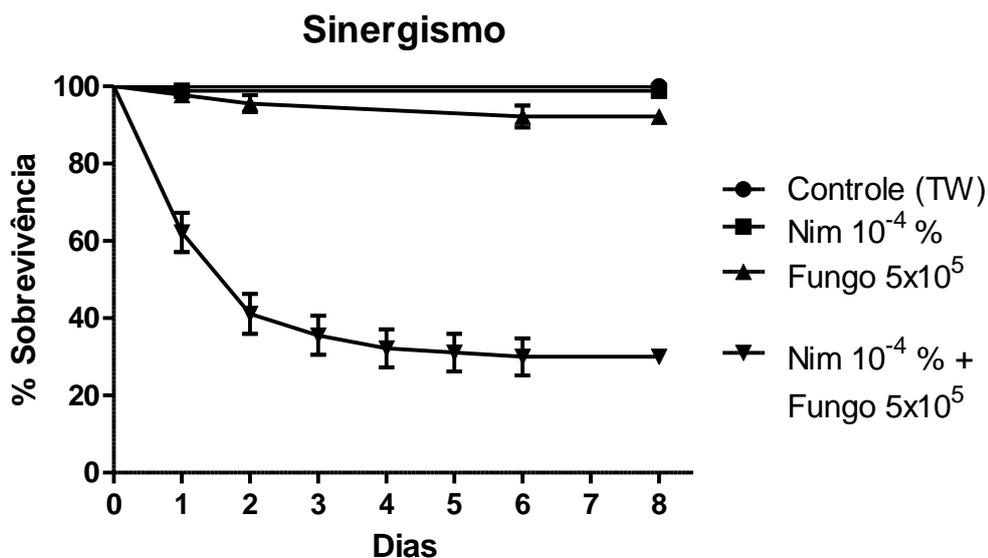


Figura 9: Teste de sobrevivência de larvas expostas ao óleo de Nim, Fungo e óleo de Nim + Fungo.

Tabela 8: Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas com o óleo de Nim, fungo *M. anisopliae* e a combinação do Nim + Fungo. ND\*: Não determinado.

Tratamentos	%Sobrevivência ± Desv. Pad.	S <sub>50</sub>
Nim 10 <sup>-4</sup>	98,88 ± 0,35 a	ND*
Fungo 5x10 <sup>5</sup>	92,22 ± 1,24 a	ND
Nim10 <sup>-4</sup> + Fungo 5x10 <sup>5</sup>	30,00 ± 12,28 b	2
Controle	100 a	ND

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

### 7.3 Teste de germinação

O teste de germinação demonstrou que todas as concentrações do óleo de Nim utilizadas não afetaram a germinação dos conídios. A observação após 6 horas de incubação impossibilitou a contagem dos conídios. A Figura 10 demonstra a germinação do fungo no tratamento controle, apenas com fungo na concentração de  $10^6$  conídios/mL e no tratamento com o óleo de Nim na concentração de  $10^{-4}$  %.

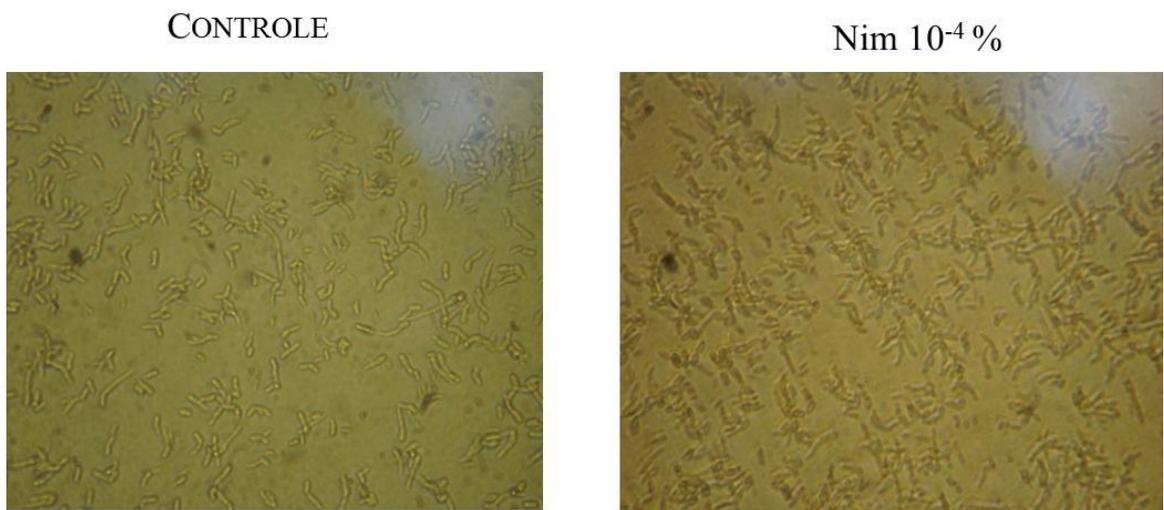


Figura 10: Teste de germinação dos conídios do fungo *M. anisopliae* no tratamento controle (apenas fungo) e no tratamento com óleo de Nim ( $10^{-4}$ %).

## 8. DISCUSSÃO

O aumento da incidência da dengue tem levado a busca por novos métodos de controle do mosquito vetor. Os mosquitos transmitem doenças para aproximadamente 700 milhões de pessoas anualmente (Fradin & Day, 2002). As estratégias de controle das doenças transmissíveis por vetores são complexas, principalmente quando associadas à existência de reservatórios domésticos e silvestres e aos aspectos ambientais (Maciel et al., 2010). Atualmente no Brasil, as principais doenças vetoriais sujeitas a controle são dengue, malária, leishmanioses, doença de Chagas e as filarioses (Maciel et al., 2010).

Dos métodos atuais de controle o uso de inseticida é o mais comum. Entretanto o uso contínuo tem levado a seleção de insetos resistentes. A resistência dos insetos aos inseticidas é, hoje, um dos assuntos centrais quando se trata de vetores de doenças ou pragas da agricultura, uma vez que dificulta ou mesmo inviabiliza programas de controle. De modo geral, os mecanismos de desenvolvimento de resistência são ainda pouco conhecidos, podendo mesmo ser diferentes para um mesmo organismo, em diferentes localidades e em relação a diversos inseticidas (Guirado & Bicudo, 2009).

Visando a redução ou substituição ao uso de inseticidas, pesquisadores têm buscado e obtido algumas formas alternativas de controle, as quais causam a

morte das larvas em seus próprios criadouros, sendo importantes especialmente quando estes não podem ser eliminados (Guirado & Bicudo, 2009).

Diante de tais fatos tem-se buscado métodos alternativos de controle de *A. aegypti*, que visem reduzir a seleção de insetos resistentes e causar menos danos ambientais. Com esse propósito o nosso trabalho buscou testar produtos naturais como mais uma alternativa no controle. No presente trabalho foi testado contra larvas de *A. aegypti* o extrato químico da alga marinha da espécie *L. dendroidea* coletada em diferentes regiões do litoral brasileiro. Também foi testado o óleo vegetal de Nim (*A. indica*), o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* e o sinergismo entre ambos.

No Brasil, a região costeira compreendida entre o Estado do Ceará e o norte do Estado do Rio de Janeiro abriga a flora de algas mais diversificada do país (Vidotti & Rollemberg, 2004). A toxicidade do extrato da alga coletada na praia de Manguinhos (Figura 2) foi mais eficiente em maiores concentrações, apresentando mortalidade de 100% nas concentrações de 20, 30 e 40 ppm. Provavelmente as substâncias que foram tóxicas às larvas são produzidas pela alga como defesas contra os predadores, patógenos e competidores (Hay & Fenical, 1996). Na busca pela adaptação ao ambiente marinho e como estratégia de sobrevivência e defesa química, as algas marinhas produzem metabólitos secundários com interessantes atividades biológicas, muitas vezes apresentando estruturas químicas não encontradas no ambiente terrestre (Carté, 1996). A multiplicação da diversidade química torna-se ainda de maior relevância se considerar que espécies do gênero *Laurencia* são as mais ricas fontes de produtos naturais marinhos (Hay & Fenical, 1996).

O extrato químico da alga coletada no litoral do Rio de Janeiro apresentou porcentagem de sobrevivência das larvas variada nas diferentes praias. O que pode ser devido ao fato das comunidades de algas serem afetadas por muitos fatores ambientais, bióticos e abióticos, os quais podem, por sua vez, ser afetados por espécies químicas estranhas ao meio (contaminantes), produzindo mudanças na estrutura e no funcionamento da comunidade (Vidotti & Rollemberg, 2004).

A mortalidade das larvas expostas ao extrato da alga coletada na praia de Angra dos Reis (Figura 3) foi menor apresentando mortalidade de 100% apenas nas três maiores concentrações testadas (20, 30 e 40 ppm). A alga coletada na praia de Parati (Figura 4) apresentou mortalidade das larvas em 100% em todas

as concentrações testadas (5, 10, 20, 30 e 40 ppm). A diferença na toxicidade dos extratos coletados em diferentes regiões pode ser devido à adaptação desses organismos em seus diferentes ecossistemas, estando expostas a variações de fatores abióticos tais como exposição à luz solar, variação na temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e dessecação que são extremamente relevantes para a distribuição geográfica das comunidades de macroalgas marinhas, assim como são responsáveis por diversas respostas fisiológicas destes organismos (Lobban et al., 1985).

A diferença na toxicidade dos extratos da alga pode ser devido a fatores ambientais naturais ou devido à influência das atividades humanas que podem ser benéficas ou não, e acabam alterando as características dos organismos aquáticos de determinadas regiões (Almeida, 2008). A sobrevivência e o sucesso reprodutivo dos seres vivos estão relacionados a adaptações ao ambiente, abrangendo as suas características físicas e as interações ecológicas com outros organismos das comunidades nas quais estão inseridos (Pianka, 1999 *apud* Sudatti, 2010).

A alga coletada na praia de Búzios apresentou mortalidade de 100% em todas as concentrações testadas (5, 10, 20, 30 e 40 ppm) e também apresentou mortalidade em concentrações menores (1, 2,5, 5, 7,5 e 10 ppm).

Trabalho realizado por Pereira et al., (2009) com a alga da espécie *Laurencia filiformis* verificou que em experimento de variação de regime de maré, foi observada menor produção de elatol (substância produzida pela alga) nos períodos de maré baixa e alta, sendo a maior concentração durante a maré intermediária. Os fatores abióticos ou estresse físico que variam durante um ciclo de marés são provavelmente: o tempo de exposição das macroalgas, a dessecação e exposição aos raios ultravioleta do sol.

As plantas terrestres também são promissoras para o controle de insetos, pois são organismos que coevoluem com insetos e outros micro-organismos, sendo, portanto, fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelos vegetais em resposta a um ataque patogênico (Simas et al. 2004).

Diante das pesquisas realizadas com a azadiractina, principal componente do Nim, para o controle agrícola de pragas seria interessante pesquisar a utilização de produtos provenientes do Nim para o controle de mosquitos. Ndione

(2007) investigou a toxicidade, histopatologia e efeitos de retardamento do crescimento nos últimos instares larvais de *A. aegypti* tratados com Nim.

A planta Nim pode fornecer medicamentos de baixo custo, reduzir a taxa de crescimento da população humana, e talvez até mesmo reduzir a erosão, o desmatamento, e a temperatura excessiva de um superaquecimento global (National Research Council, 1992).

Neste trabalho o óleo comercial de Nim “Base Nim” da marca Base Fértil Controle Orgânico de Pragas com 0,12% p/p de Azadiractina, foi diluído em água destilada e testado contra larvas de *A. aegypti*. Das diferentes concentrações testadas a sobrevivência das larvas nas concentrações de  $10^{-5}\%$ ,  $10^{-4}\%$ ,  $10^{-3}\%$ , não diferiu estatisticamente do controle (Figura 7). Segundo Naqvi et al., (1991) em experimentos realizados com Nim contra larvas de *A. aegypti* observaram que muitas das larvas morreram e as que sobreviveram deram origem a pupas melanizadas. Houve contração geral do corpo larval e as pupas apresentaram o abdômen reduzido. Alguns adultos não foram capazes de emergir e os que foram capazes apresentaram anomalias nas pernas, abdômen e asas reduzidas.

Nas maiores concentrações, ( $10^2\%$ ,  $5 \times 10^{-2}\%$ ,  $10^{-1}\%$ , 1%) a sobrevivência das larvas diferiu estatisticamente do controle. Martinez & Emden, (2001) testaram as concentrações de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 e 1 ppm (p/v) de azadiractina em larvas de *Spodoptora littoralis* e observaram que a azadiractina causou mortalidade mais elevada quando utilizada em maiores concentrações. Os autores reforçam a teoria de que a azadiractina afeta o sistema neurosecretor e é mais provável que mate o inseto por perturbar a regulação do hormônio da ecdise e não pela sua toxicidade.

Segundo Roel & Vendramim (1999), produtos inseticidas de origem vegetal possuem efeito após a ingestão, inibindo algumas das funções vitais, tais como reprodução, alimentação, crescimento, sempre na dependência da concentração utilizada antes de provocar a mortalidade. Oliveira et al., (2007) aplicaram 1% do óleo de Nim e 2% do extrato aquoso de Nim em folhas de milho para o controle da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) e verificaram que os produtos começaram a afetar o desenvolvimento da lagarta-do-cartucho alguns dias após a pulverização das folhas.

Os experimentos realizados com o fungo *M. anisopliae* demonstraram que a sobrevivência das larvas tratadas com as concentrações  $10^5$  e  $5 \times 10^5$

conídios/mL não diferiu estatisticamente do controle, evidenciando que em baixas concentrações do fungo a mortalidade das larvas é baixa. Quando as larvas foram tratadas com a concentração de  $10^6$  conídios/mL a sobrevivência foi reduzida a 12,22%, sendo estatisticamente diferente do controle, demonstrando que o aumento da concentração do fungo é fator determinante para o aumento da mortalidade das larvas. A sobrevivência das larvas tratadas com a concentração do fungo de  $10^7$  conídios/mL foi de 7,77, sendo estatisticamente diferente das larvas tratadas com a concentração de  $10^6$  conídios/mL. As larvas tratadas com a concentração de  $10^8$  conídios/mL apresentaram 0% de sobrevivência, sendo estatisticamente diferente quando comparado com a sobrevivência das larvas tratadas com as concentrações menores.

Trabalho realizado por Pereira et al., (2009) demonstrou que o fungo *B. bassiana* (isolado CG 24) e *M. anisopliae* (isolado ESALQ 818) na concentração de  $10^8$  conídios/ml causaram 50% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* em 6 dias de avaliação. A menor mortalidade foi de 6% para *B. bassiana* (isolado CG 494) e a mortalidade mais elevada foi de 90% causada por *M. anisopliae* (isolado CG 144). Os autores ainda observaram que das larvas expostas ao fungo que permaneceram vivas, apenas 20% ( $21.37 \pm 1.56\%$ ) delas formaram pupas não completando o ciclo para a formação dos adultos.

Silva et al., (2004) testaram a atividade larvicida de uma gama de isolados de *M. anisopliae* originado de solo do Cerrado brasileiro em larvas de *A. aegypti*. A mortalidade de larvas do segundo estágio variou de 10 e 100%, 10 dias após a aplicação de  $5 \times 10^6$  conídios/ml, para os 80 isolados testados.

Bukhari, et al (2010) compararam a mortalidade de larvas de *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi* expostas a esporos de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* em diferentes tempos. Eles observaram que as larvas expostas ao fungo por 1, 3 e 5 dias foram afetadas da mesma forma que as expostas por 7 dias. As larvas do controle se mantiveram vivas durante os sete dias.

A associação de fungos entomopatogênicos com inseticidas químicos vem sendo utilizada e nessa associação, espera-se que o agroquímico atue como agente estressor na população praga para aumentar a eficácia do patógeno, contribuindo para o controle do inseto praga (Alves et al., 1998).

Neste trabalho foi verificada a atuação do óleo vegetal de Nim, que possui atividade inseticida em combinação com *M. anisoplae*. As larvas expostas ao óleo

vegetal de Nim ( $10^{-4}\%$ ) combinado com o fungo ( $5 \times 10^5$  conídios/mL) apresentaram mortalidade em 70%, demonstrando ação sinérgica. Trabalho similar foi realizado por Scholte et al., (2003) em que demonstraram a combinação do fungo *M. anisopliae* com o óleo vegetal de girassol. As concentrações do fungo foram de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL diluído em 0,05% de Tween 20. A cada formulação foi adicionado 10% do óleo de girassol. Eles verificaram que o mosquito adulto macho e fêmea da espécie *A. gambiae*, foram suscetíveis ao fungo nas duas formulações utilizadas. A análise mostrou que a patogenicidade não era dependente do tempo de exposição. O trabalho demonstrou que o *M. anisopliae* tem sua viabilidade aumentada quando formulado em óleos vegetais.

Rondelli et al., (2011) em experimento para avaliar a compatibilidade do óleo de mamona com *B. bassiana*, prepararam suspensões na concentração de  $3 \times 10^5$  conídios/mL dos isolados ESALQ-447 e do formulado Boveril PM (isolado ESALQ-PL63) no controle da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*). Eles observaram que a mortalidade dos insetos tratados com o isolado ESALQ-447 foi de 48,7%, com o isolado ESALQ-PL63 de 44,0% e com o óleo de mamona de 24,4%. Quando o óleo de mamona foi formulado com o fungo a mortalidade da combinação ESALQ-447 + óleo de mamona foi de 74,9% e da combinação (Boveril PM + óleo de mamona) foi de 78,0%, constatado sinergismo de *B. bassiana* com óleo de mamona.

Alguns trabalhos têm evidenciado o efeito de combinação de baixas doses de inseticidas com fungos entomopatogênicos para facilitar a atuação do fungo sobre o inseto alvo. Santos et al., (2007) combinaram dose subletal do inseticida Imidaclopid (10 ppm) com o fungo entomopatogênicos *B. bassiana* ( $1 \times 10^7$  conídios/mL) contra adultos de formigas da espécie *Atta sexdens rubropilosa*. Os resultados mostraram que o inseticida aumenta a suscetibilidade dos insetos à infecção do fungo. A percentagem de mortalidade dos insetos tratados com o Imidaclopid e subsequentemente infectados com *B. bassiana* (CG24) foi de aproximadamente 20% mais elevada do que apenas com o fungo.

Galvanho et al., (2012) investigaram o comportamento de auto limpeza (self-grooming) e de locomoção da formiga da espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* quando expostas ao inseticida Imidaclopid (IMI) e ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Eles observaram que baixas

concentrações de IMI (10 ng/inseto) combinadas com o fungo diminuíram o comportamento de auto limpeza e a locomoção das formigas. Quando as formigas foram expostas apenas ao fungo foi observado o aumento do comportamento de auto limpeza e uma ligeira diminuição na locomoção. Subsequentemente quando as formigas foram expostas ao IMI e ao fungo foi observado diminuição da auto limpeza e ligeiro aumento na locomoção. Os resultados sugerem que a utilização de baixas concentrações do inseticida combinado com fungo pode ser uma estratégia promissora para o controle de formigas cortadeiras, visto que o Imidaclopid interferiu no comportamento de auto limpeza, facilitando a penetração do fungo.

Para comprovar que o óleo de Nim não interfere na germinação dos conídios do fungo foi realizado um experimento onde os conídios foram incubados em óleo de Nim. Em todas as concentrações utilizadas, o Nim não afetou a geminação do fungo *M. anisopliae*. Segundo Alves, (1998) testes de compatibilidade de produtos fitossanitários com fungos entomopatogênicos *in vitro* mostram que os produtos promovem grande variação de resposta e, dependendo do produto químico, podem ser observados efeitos deletérios, nulos ou mesmo sinérgicos sobre esses agentes de controle microbiano.

Provavelmente a germinação do fungo não foi afetada porque foram utilizadas baixas concentrações do óleo de Nim. O mesmo foi demonstrado em trabalho realizado por Araujo et al., (2009), em que o isolado CG 001 de *B. bassiana* teve o crescimento vegetativo (diâmetro das colônias) e a esporulação (quantificação de conídios) inibida apenas na maior concentração do Neemseto® (0,5%), não havendo nenhum efeito sobre sua viabilidade. Já para o isolado CG 30 de *M. anisopliae*, o crescimento vegetativo foi reduzido nas três concentrações (0,125, 0,25 e 0,5%); porém o número e a viabilidade de conídios produzidos só foram reduzidos na concentração de 0,5%.

Neste trabalho observou-se, pela primeira vez, que os extratos da alga marinha *L. dendroidea* foram eficazes no controle de larvas de *A. aegypti*, mostrando que esse recurso natural e abundante no litoral brasileiro pode ser uma alternativa promissora para o controle de insetos vetores. Também foi evidenciado que o óleo de Nim apresenta ação tóxica contra larvas de *A. aegypti*, mesmo quando aplicado em baixas concentrações, e em baixas concentrações o óleo pode ser utilizado juntamente com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*,

propiciando maior mortalidade das larvas e conseqüentemente diminuindo os custos de aplicação do fungo no campo.

## 9. CONCLUSÕES

Os extratos das algas marinhas da espécie *L. dendroidea* coletada em diferentes regiões foram altamente tóxicos para as larvas de *A. aegypti*, observando que os extratos das algas coletadas na praia de Búzios (RJ) foram os mais tóxicos.

O óleo de Nim também foi tóxico para larvas de *A. aegypti*, apresentando maiores mortalidades nas larvas nas maiores concentrações testadas.

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* foi virulento às larvas de *A. aegypti* apresentando mortalidade das larvas expostas às maiores concentrações testadas.

O óleo de Nim formulado com o fungo apresentou efeito sinérgico sendo altamente promissor para o desenvolvimento de novas estratégias de controle do mosquito vetor da dengue.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, A.C., Pereira, K.C.A., Cunha, F.M., Veiga, A.F.S L, Athayde, A.C.R., Lima, E.A.L.A. (2005) Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Neotrop Entomol.* 34:585-592.
- Almeida, M.C.M., Caiaffa, W. T., Assunção, R. M., Proietti, F. A. (2007) Spatial Vulnerability to Dengue in a Brazilia Urban Area During a 7-Year Surveillance Journal of Urban Health: *Bulletin of the New York Academy of Medicine.* 84(3):334-345.
- Almeida, V.F. (2008) Importância dos costões rochosos nos ecossistemas costeiros. *Cadernos de Ecologia Aquática.* 3 (2):19-32.
- Alves, S.B. (1998) *Controle microbiano de insetos.* São Paulo: Piracicaba. FEALQ. 1163p.
- Alves, S.B., Moino J.R., A., Almeida, J. E. M. (1998) Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves, S. B. (Org.). *Controle microbiano de insetos.* Piracicaba. FEALQ. 2:217-238.

- Andaló, V., Moino Jr., A., Cecília, L.V.C., Souza, E.G.C. (2004) Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com Agrotóxicos Visando o Controle da Cochonilha-da-Raiz-do-Cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Neotropical Entomology*. 33(4):463-467.
- Andrade, C.F.S. & Modolo, M. (1991) Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev. Saúde Públ.* 25(3):184-187.
- Araujo Jr., J.M., Marques, E.J., Oliveira, J.V. (2009) Potencial de Isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do Óleo de Nim no Controle do Pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). *Neotropical Entomology* 38(4):520-525.
- Azevedo, F.R., Guimarães, J.A., Sobrinhos, R.B., Lima, M.A.A. (2005) Eficiência de produtos naturais para o controle de *Bemisia Tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em meloeiro. *Arq. Inst. Biol.* 72(1):73-79.
- Balandrin, M.F., Mark-Lee, S., Klocke, J.A. (1988) Biologically active volatile organosulfur compounds from seeds of the neem tree, *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Journal of Agricultural and Food*. 36 (5):1048-1054.
- Barata, E.M.F., Costa, A.I.P., Neto, F.C., Glasser, C.M., Barata, J.M.S., Natal, D. (2001) População de *Aedes aegypti* em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 35(3):237-242.
- Bidochka, M. J. & Khachatourians, G. G. (1987) Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(7)1679-1684.
- Blanford, S., Chan, B.H.K., Jenkins, N.S.D., Turner, R.J., Read, A.F., Thomas, M. B. (2005) Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*. 308:1638–1641.
- Bold, H.C & Wynne, M.J. (1978) *Introduction to the Algae. structure and reproduction*. Englewood Cliffs, N. J. Prentice -Hall, Inc.), 706p.

- Borges, L.R. & Nova, M.X.V. (2011) Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no Manejo Integrado de Pragas - uma revisão. *Ambiência Guarapuava (PR)*. 7(1):179-190.
- Braga, I. A., Lima, J. B., Soares, S. S., Valle, D. (2004) *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 99(2):199-203.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (2001) *Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas*. 3 ed. Brasília. 84 p.
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. (1998) Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*. 4(4):605-613.
- Bukhari, T., Middelmann, A., Koenraad, C.J.M., Takken, W., Knols, B.G.J. (2010) Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal*. 9(22):271-286.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E. (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol Part C* 146:60-78.
- Carté, B. K. (1996) Biomedical Potential of Marine Natural Products. *Biosciences*. 271-286.
- Consoli, R.A.G.B. & Oliveira R.L. (1998) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Reimpressão. 225p.
- De Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E. (2003) Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Ann Rev Genet* 37: 409-433.

- Devi, S. I. & Lal, R. (2008) Microbial Biocontrol Agents for Insects and Phytopathogens. *Microbial Biotechnology*. 6:107-117.
- Dhar, R., Zhang, K., Talwar, G.P. Grag, S., Kumar, N. (1998) Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. *J. Ethnopharmacol.* 61:31-39.
- Dua, V.K., Nagpal, B.N., Sharma, V.P. (1995) Repellent action of neem cream against mosquitoes. *Indian J. Malariol.* 32(2):47-53.
- Dua, V.K., Pandey, C.A., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T.P. Dash, A. (2009) Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*. 8(124):1-6.
- Dusfour, I., Thalmensy, V., Gaborit, P., Issaly, J., Carinci, R., Girod, R. (2011) Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo.* 106:346–352.
- Elandt, J. R.C. & Johnson N.L. (1980) *Survival models and data analysis*. John Wiley & Sons, New York. 480p.
- Erickson, K.L. (1983) Marine natural products: chemical and biological perspectives (P. J. Scheuer, ed.). *Academic Press*. 5(4):131-257.
- FAO & WHO - Food and Agriculture Organization and World Health Organization (2002) *Manual on Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides*. Rome: FAO-WHO. 255p.
- Faria, M.R. & Magalhães, B.P. (2001) O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 22:18 -21.
- Fenical, W. (1975) Halogenation in the Rhodophyta, A. Review. *J. Phycol.* 11:245-259.

- Fernandes, E.K.K. (2007) Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus*. 123p. Tese (Ciências Veterinárias) - Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. UFRRJ, 123p.
- Finkelman, J. (2002) *Caminhos da saúde pública no Brasil*. Fiocruz. 328p.
- Fradin, M.S. & Day, J.F. (2002) Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine*. 347:13-18.
- Funasa. Fundação Nacional de Saúde (2002) *Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Vigilância epidemiológica*. Brasília. 32p.
- Funasa. Fundação Nacional de Saúde (1994) *Manual de Normas Técnicas. Instruções para pessoal de operações*. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. 51p.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Batista, G. C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L. C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. (2002) *Entomologia agrícola*. Piracicaba: 920p.
- Galvanho, J.P., Carrera, M.P., Moreira, D.O., Erthal Jr. M., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2012) Imidacloprid Inhibits Behavioral Defences of the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera:Formicidae). *J Insect Behav*. 1-13.
- Gama, R. A., Alves, K. C., Martins, R. F., Eiras, A. E., Resende, M. C. (2005) Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38(1):64-66.
- Garg, S., G.P. Talwar & S.N. Upadhyay (1998) Immunocontraceptive activity guided fractionation and characterization of active constituents of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts. *J. Ethnopharmacol*. 60:235-46.

- Guirado, M.M. & Bicudo, H.E.C. (2009) Alguns aspectos do control populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). 6(64):5-14.
- Gunnarsson, S.G.S. & Lackie A.M. (1985) Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. *J. Invertebr Pathol.* 46:312-319.
- Harbach, R.E. & Peyton, E.L. (1993) Morphology and evolution of the larval maxilla and its importance in the classification of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Mosq.System.* 25:1-16.
- Hay, M.E. & Fenical, W. (1996) Chemical Ecology and Marine Biodiversity: Insights and Products From The Sea. *Oceanography.* 9:10-20.
- Hay, M.E. & Steinberg, P.D. (1992) The chemical ecology of plantherbivore interactions in marine vs. terrestrial communities. In: Rosenthal, G.A. & Berenbaum, M.R. (eds). *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, Evolutionary and ecological processes.* Academic Press, San Diego. 3:371–413.
- Hemingway, J. & Ranson, H. (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 369–389.
- Honório, N.A., Nogueira, R. M. R., Codeço, C. T., Carvalho, M.S., Cruz, O.G., Magalhães, M.A.F.M., Araújo, J.M.G., Araújo, E.S.M., Gomes, M.Q., Pinheiro, L.S., Pinel, C.S., Oliveira, R.L.O. (2009) Spatial Evaluation and Modeling of Dengue Seroprevalence and Vector Density in Rio de Janeiro, Brazil. *Dengue Seroprevalence and Vector Density in Brazil.* 3:1-11.
- Isman, M.B. (2006) Botanical insecticides, deterrent and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomic.* 51: 45-66.

- Johansson, M.A., Cummings, D.A.T., Glass, G.E. (2009) Multiyear Climate Variability and Dengue—El Niño Southern Oscillation, Weather, and Dengue Incidence in Puerto Rico, Mexico, and Thailand: A Longitudinal Data Analysis. *Multiyear Climate Variability and Dengue*. 6: 1-9.
- Júnior, C.V. (2003) Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para controle químico de insetos. *Quim. Nova*. 26(3):390-400.
- Koffi, A.A., Alou, L.P., Adja, M.A., Kone, M., Chandre, F., N'Guessan, R. (2012) Update on resistance status of *Anopheles gambiae* s.s. to conventional insecticides at a previous WHOPES field site, "Yaokoffikro", 6 years after the political crisis in Cote d'Ivoire. *Parasit Vectors*. 2(5):68.
- Kweka, E.J., Nyindo, M., Masha, F., Silva, A.G. (2011) Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. *Parasites & Vectors* 4(129): 1-10.
- Iliopoulou, D., Mihopoulos, N., Vagias, C., Papazafiri, P., Roussis, V. (2003) Novel cytotoxic brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *J. Org Chem*. 68:7667-7674.
- Lima, E.P., Paiva M.H.S., Araújo, A.P., Silva, E.V.G., Silva, U.M., Oliveira, L.N., Santana, A.E.G., Barbosa, C.N., Neto, C.C.P. Goulart, M.O.F., Wilding, C.S., Ayres, C.F.J., Santos, M.A.V.M. (2011) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*. 4(5):1-12.
- Lima, M.M. & Aragão, M.B. (1987) Tratamento focal e perifocal contra *Aedes aegypti*. *Cad. Saúde públ.*3:142-147.
- Lima, E.P., Oliveira Filho, A.M.O., Lima, J.W.O., Júnior, A.N.R., Cavalcanti, L.P. G., Pontes, R.J.S. (2006) Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(3): 259-263.

- Liu, Y., Zhang, H., Qiao, C., Lu X., Cui., F (2011) Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipiens* complex from China. *Parasit Vectors*. 4:236.
- Lobban, C. S., Harrison, P. J., Duncan, M. J. (1985). The physiological ecology of seaweeds. *Cambridge University Press*. 242p.
- Lopes, J., Arantes, O.M.N., Cenci, M.A. (2010) Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Brazilian Journal of Biology*. 70:1109-1113.
- Luna, J.E.D., Martins, M.F., Anjos, A.F., Kuwabara, E.F., Silva, M.A.N. (2004) Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil Comunicação Breve. *Revista Saúde Pública* 38(6):842-843.
- Luz, P.M., Codeço, C.T., Medlock, J., Struchiner, C.J., Valle, D., Galvani, A.P. (2009) Impact of insecticide interventions on the abundance and resistance profile of *Aedes aegypti*. *Epidemiol. Infect.* 137:1203–1215.
- Machado, F. L. S., (2009) Sesquiterpenos em espécimes de algas *Laurencia dendroidea* J. Agardh: caracterização química e atividade antileishmania. Dissertação (Instituto de Química)-Rio de Janeiro, RJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 134p.
- Machado, F. L. S., Kaiser, C. R., Costa, S. S., Gestinari, L. M., Soares, A. R. (2010) Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(3):441-452.
- Maciel, M.V., Morais, S.M., Belilaqua, C.M.L., Amóra, S.S.A. (2010) Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. *Rev. Bras. Plantas Med., Botucatu*. 12 (1):105-112.

- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Otrera, V.C.G., Carvalho, L.R., Caldas Júnior, A.L., Brogdon, W.G. (2007) Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 102(8):895-900.
- Mardondes, C.B. (2001) Entomologia Médica e Veterinária, São Paulo: *Atheneu*. 59-103.
- Marques, C. C. A., Marques, G. R. A., Brito, M., Neto, L. G. S., Ishibashi, V. C., Gomes, F. A. (1993) Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. *Rev. Saúde Pública*. 27(4):237-241.
- Marques, R.P.; Monteiro, A.C.; Pereira, G.T. (2004) Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*, Santa Maria. 34(6):1675-1680.
- Martinez S.S. & Emden, H.F (2001) Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis*(Boisduval) (Lepidoptera:Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop Entomol*. 30:113-124.
- Martinez, S.S. (2003). O Uso do Nim no Café e em outras Culturas. *Revista Agroecologia Hoje*. 4:13-14.
- Martinez, S.S. (Ed) (2002) O Nim - *Azadirachta indica* Natureza, Usos Múltiplos, Produção. *IAPAR* – Londrina. 142p.
- Mayer, A.M.S. & Hamann, M. T. (2005) Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. Review Article Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Toxicology & Pharmacology*.140(3-4):265-286.

- Mendes, G.S., Soares, A.R., Martins, F.O. Albuquerque, M.C.M., Costa, S.S., Yoneshigue-Valentin, Y., Lísia Mônica de Souza Gestinari, L. M. S., Santos, N., Teresa, M. (2010) Antiviral activity of the green marine alga *Ulva fasciata* on the replication of human metapneumovirus. *Rev. Inst.Med. trop. S. Paulo* 52(1):3-10.
- Ministério da Saúde (2011) Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. *Dengue: diagnóstico e manejo clínico*. Brasília. 52p.
- Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L., Saludes, J.P. (2009) Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Disc.* 8:69-85.
- Montella, I.R., Martins, A.J., Medeiros, P.F.V., Lima, J.B., Braga, I.A., Vale, D. (2007) Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(3):467–477.
- Mordue, A.J. & Nisbet, A.J. (2000). Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29(4):615-632.
- Mossini, S.A.G. & Kemmelmeier, C. (2005) A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (1):139-148.
- Munguía, A.M.G., Hernández, J.A.G., Tellez, E.A.R., Pérez, M.A.R., Villanueva, F.R. (2011) Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female. *Vetores Parasit.* 4(24):1-6.
- Naqvi, S. N., Ahmed, S. O., Mohammad, F. A. (1991) Toxicity and IGR effect of two new neem products against *Aedes aegypti* (PCSIR Strain). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(1): 71-76.
- National Research Council (1992) In: Neem - A Tree For Solving Global Problems. *National Academy Press*. Washington, D.C.1-14.

- Neves, P.J. & Alves, S.B. (1999) Controle associado de *Cornitermescumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e Imidacloprid. *Sci. agric.* 56 (2): Piracicaba. 305-311.
- Ndione, R. D., Faye, O., Ndiaye, M., Dieye, A., Afoutou, J. M. (2007) Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *African Journal of Biotechnology.* 6(24): 2846-2854.
- Oliveira, D. G. P. & Alves, L. F. A. (2007) Interação do Fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com Terra Diatomácea para o Controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), o Cascudinho dos Aviários. *BioAssay.* 2 (6):1-7.
- Oliveira, M.S.S., Roel, A.R., Arruda, E.J., Marques, A.S. (2007) Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartuch-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec., Lavras.* 31(2):326-331.
- Oliveira-Filho, E.C. (1977) *Algas marinhas bentônicas do Brasil.* São Paulo. Tese (Livre-Docência) - São Paulo-SP. Universidade de São Paulo. 407p.
- Okumu, F.O., Knols, B.G.J., Knols, U. (2007) Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal.* 6(63):1-8.
- Orlandelli, R.C. & Pamphile, J.A. (2011) Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.* 6(2):79-82.
- Pamplona, L.G., Lima, J.W.O., Cunha, J.C.L., Santana, E.W.P. (2004) Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques decimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(5):400-404.

- Parra, J.R.P.; Botelho, P.S.M.; Ferreira, B.S.C.; Bento, J.M.S. (2002) *Controle Biológico no Brasil- Parasitóides e Predadores*. São Paulo. 635p.
- Parida, M.M., C. Upadhyay, G. Pandya & A.M. Jana (2002) Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.* 79:273-278.
- Paula, A.R., Brito, E., Pereira, C.R., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Suscetibilidade do adulto de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) à infecção por *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*: perspectivas para o controle de vetores da dengue. *Biocontrol Science and Technology*.18(10): 1017-1025.
- 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(9):1-7.
- 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). *Parasitas e Vetores*. 4(8):1-8.
- Pereira, C.R., Paula, A.R., Gomes, S.A., Oliveira, P.C., Samuels, R.I. (2009) The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*. 1-6.
- Pereira, R.C. (1993) O arsenal químico das algas marinhas. *Ciência Hoje* 96:37-43.
- Pereira, R.C., Da Gama, B.A., Teixeira, V.L., Yoneshigue-Valentin, Y. (2003) Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Braz J Biol.* 63:665-672.

- Pianka, E.R. (1999) *Evolutionary ecology*. Benjamin Cummings, 431p. Apud Sudatti, D. B. (2010) Influência de fatores abióticos e bióticos na química defensiva da macroalga marinha *Laurencia dendroidea* J. AGARDH (CERAMIALES: RHODOPHYTA). Dissertação (Biologia Marinha)- Niterói, RJ. Universidade Federal Fluminense, UFF, 120p.
- Pimenta, A.T.A., Santiago, G.M.P., Arriaga, A.M.C., Menezes, G.H.A., Bezerra, S.B. (2006) Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(4):501-505.
- Polanczyk, R.A. & Alves, R.A. (2005) Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica). 74:24- 33.
- Polanczyk, R.A., Garcia, M.O., Alves, S.B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelenses* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*. 37(6):813-816.
- Pontes, R.J.S., Regazzi, A.C.F., Lima, J.W.O., Pontes, L.R.S.K. (2005) Residual effect of commercial applications of larvicides temefos and *Bacillus thuringiensis israelensis* on *Aedes aegypti* larvae in recipients with water renewal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38:316–321.
- Quesada-Moraga, E., Carrasco-Diaz, J.A., Santiago-Alvare, Z C. (2006) Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J Appl Entomol* 130:442–452.
- Roberts, D.R. & His, B.P. (1977) Method of evaluating *Aedes* oviposition attractants. *Journal of Medical Entomology*. Lanham. 14:129-131.

- Rodriguez, H.C. & Vendramim, J.D. (1997) Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) *Revista da Agricultura*, Piracicaba. 72:305-318.
- Roel, A. R. & Vendramim, J. D. (1999) Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). *Scientia Agricola, Piracicaba*. 56:581-586.
- Roel, A.R., Vendramim, J.D., Frighetto, R.T.S., Frigheto, N. (2000) Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia*, Campinas. 59(1):53-58.
- Rondelli, V. M., Pratissoli, D., Polanczyk, R. A., Marques, E. J., Sturm, G. M., Tiburcio, M. O. (2011) Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. *Pesq. agropec. bras.* Brasília. 46(2):212-214.
- Rose, R.I. (2001) Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*. 7(1):17-23.
- Santos, A.B.S., Silva, T.F.B., Santos, A.C., Paiva, L. M., Lima, E. A.L.A. (2009) Efeito fungitóxico do óleo de Nim sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Caatinga* (Mossoró, Brasil). 22(2):17-22.
- Santos, A.O., Veiga-Santos, P., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., Sudatti, D. B., Bianco, E. M., Pereira, R. C., Nakamura, C. V. (2010) Effect of Elatol, Isolated from Red Seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Mar. Drugs*. 8(11):2733–2743.
- Santos, A.V., Oliveira, B.L., Samuels, R.I. (2007) Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia*. 1-8.

- Shahid, A.A., Rao, A.Q., Bakhsh, A., Husnain, T. (2012) Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade. 64 (1):21-42.
- Shaikh, M. A., Naqvi, S. N., Khani, Z. A. K. (2009) Efeitos do óleo de Nim (Neem) na estrutura e função de ovários de ratas albinas adultas. *Einstein*. 7 (1): 28-34.
- Shang, C. S., Fang, C. T., Liu, C. M., Wen, T. H., Tsai, K. H., King, C. C. (2010) The Role of Imported Cases and Favorable Meteorological Conditions in the Onset of Dengue Epidemics Imported Cases in the Onset of Dengue Epidemics. *Imported Cases in the Onset of Dengue Epidemics*. 4(8): 1-9.
- Scholte, E.J, Knols, B.G.J., Samson, R.A., Takken, W. (2004) Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*. 4:(19):1-24.
- Scholte, E.J., Basilio, N.N., Smallegange, R.C., Takken, W., Knols, B.G.J. (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae*) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*. 1-8.
- Silva, H.H.G., Silva, I.G., Santos, R.M.G., Filho, E.R., Elias, C.N. (2004) Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37(5):396-399.
- Silva, R.O., Silva, H.H.G., Luz, C. (2004) Efecct of *Metharhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. 33(2):207-216.
- Simas, N.K., Lima, E.C., Conceição, S.R., Kuster, R.M., Filho, A.M.O. (2004) Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides *Quim. Nova*.27(1):46-49.

- Souza, A. P. & Vendramim, J.D. (2001) Atividade Inseticida de Extratos Aquosos de Meliáceas sobre a Mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology*. 30(1):133-137.
- Sucen. Superintendência de Controle de Endemias (1997) *Plano de erradicação de Aedes aegypti*. Guia de Instruções, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 47p.
- Sucen. Superintendência de Controle de Endemias (2002) *Normas e Recomendações técnicas para Vigilância e Controle do Aedes aegypti*, Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 70p.
- Tamai, M.A., Alves, S.B., Lopes, R.B., Faion, M., Padulla, L.F.L. (2002) Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria Bassiana*( Bals.) Vuill. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo. 69:(3)89-96.
- Teixeira, V.L., Kelecom, A., Gottlieb, O.R. (1991) Produtos naturais de algas marinhas. *Química Nova*. 14:83-90.
- Thomas, M.B. & Read, A.F. (2007) Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews microbiology*. 5:377-383.
- Umeh, V.C. & Ivbijaro, M.F. (1999) Effects of termite damage to maize of seed extracts of *Azadirachta indica* and *Piper guineense* in farmers Fields. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 133:403-407.
- Van Alstyne, K.L. & Paul, V.J., (1988) The role of secondary metabolites in marine ecological interactions. *Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium*. 1:175-186.
- Verkerk, R.H.J. & Wright, D.J. (1993) Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* Pest. *Sci*. 37:83-91.

Vidotti, E.C. & Rollemberg, M.C. (2004) Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quim. Nova*. 27(1):139-145.

WHO - World Health Organization (2009) *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in drinking-water. Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. 1-6.

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