

A SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:
CULICIDAE) AO *Metarhizium anisopliae* É MODIFICADA PELO
INSETICIDA IMIDACLOPRID E ESTADO NUTRICIONAL

ADRIANO RODRIGUES DE PAULA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO 2011

A SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:
CULICIDAE) AO *Metarhizium anisopliae* É MODIFICADA PELO
INSETICIDA IMIDACLOPRID E ESTADO NUTRICIONAL

ADRIANO RODRIGUES DE PAULA

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 071/2011

Paula, Adriano Rodrigues de

A susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ao *Metarhizium anisopliae* é modificada pelo inseticida Imidacloprid e estado nutricional / Adriano Rodrigues de Paula. – 2011.

86 f. : il.

Orientador: Richard Ian Samuels

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

Bibliografia: f. 64 – 86.

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

CDD – 614.517

A SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:
CULICIDAE) AO *Metarhizium anisopliae* É MODIFICADA PELO
INSETICIDA IMIDACLOPRID E ESTADO NUTRICIONAL

ADRIANO RODRIGUES DE PAULA

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 21 de Março de 2011

Comissão Examinadora:

Prof. Francisco José Alves Lemos (D.Sc. Bioquímica de Insetos) - UENF

Prof. José Oscar Gomes de Lima (D.Sc. Entomologia) -UENF

Prof. Milton Erthal Junior (D.Sc. Entomologia) - IFF

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

Aos meus pais Arnaldo e Silvânia, aos meus tios Silvaldo e Luciana e ao meu irmão Eduardo, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Richard Ian Samuels, pela orientação;

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

Ao César Ronald, pelos ensinamentos sobre *Aedes aegypti*;

Ao Francisco José Alves Lemos pela criação de *Aedes aegypti*;

Aos Professores José Oscar Gomes de Lima, Francisco José Alves Lemos e Milton Erthal Junior pela participação na comissão examinadora deste estudo;

Aos companheiros do laboratório de Entomologia - Patologia de Insetos: Aline, Simone, Milton, Laerciana, Cátia, Sheila, Denise, Paulo, Gustavo, Thalles.

Aos amigos: Anderson Ribeiro, Guilherme Pincerato, Renato Muçouçah; Patrícia Machado; Aline Teixeira; Juarez Ogliari; Elda Albertini; Gabriela Thomaz; Max; Alex, às primas Laura, Helena e aos demais familiares que contribuíram com a realização desse trabalho.

Obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 DADOS BIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DE <i>Aedes aegypti</i>	5
2.2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Aedes aegypti</i>	10
2.3 - MONITORAMENTO DE <i>Aedes aegypti</i>	11
2.4 - CONTROLE DOS CULICÍDEOS	13
2.5 - FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	15
2.5.1 - GÊNERO <i>Metarhizium</i>	16
2.5.2 - USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS	18
2.5.3 – COMBINAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM INSETICIDAS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS	20
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 - CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS LINHAGEM ROCKFELLER.....	23
4.1.1 - CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS DE CAMPO	24
4.2 - FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	24
4.3 - INFECÇÕES DE <i>Aedes aegypti</i> USANDO PAPEL-FILTRO IMPREGNADO COM FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO	25

4.4 TOXICIDADE DO IMIDACLOPRID E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SUBLETAL	27
4.4.1 - EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DO IMIDACLOPRID NA SOBREVIVÊNCIA DE <i>Aedes aegypti</i>	27
4.4.2 – COMBINAÇÃO DO IMIDACLOPRID COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO CONTRA <i>Aedes aegypti</i>	27
4.5 - INFECÇÃO DAS FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> ALIMENTADAS COM SACAROSE OU SANGUE.....	28
4.5.1 TESTES COM FÊMEAS LINHAGEM ROCKEFELLER	28
4.5.2 - TESTES COM FÊMEAS DO CAMPO.....	29
4.6 –TESTES EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO	29
4.6.1 - TESTES EM GAIOLAS GRANDES	30
4.6.2 - TESTES SIMULANDO UM CÔMODO RESIDENCIAL.....	30
4.7 - ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	31
5. RESULTADOS	32
5.1 – TOXICIDADE DO IMIDACLOPRID CONTRA <i>Aedes aegypti</i>	32
5.2 – SOBREVIVÊNCIA DE <i>Aedes aegypti</i> EXPOSTOS POR DIFERENTES TEMPOS À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DO IMIDACLOPRID.....	34
5.3 – COMBINAÇÃO DO IMIDACLOPRID COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO CONTRA <i>Aedes aegypti</i>	35
5.4 - VIRULÊNCIA DO FUNGO <i>Metarhizium anisopliae</i> CONTRA FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> ALIMENTADAS COM SACAROSE OU SANGUE.....	39
5.4.1 – VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS LPP 133 E ESALQ 818 CONTRA FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> DA LINHAGEM ROCKEFELLER ALIMENTADAS COM SANGUE OU SACAROSE	39
5.4.2 – VIRULÊNCIA DO ISOLADO ESALQ 818 CONTRA FÊMEAS DE <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> ORIUNDAS DE OVOS COLETADOS NO CAMPO.....	43
5.5 – VIRULÊNCIA DA COMBINAÇÃO ESALQ 818 + IMI CONTRA FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> ALIMENTADAS COM SACAROSE OU COM SANGUE	44
5.5.1 – VIRULÊNCIA DA COMBINAÇÃO ESALQ 818 + IMI CONTRA FÊMEAS DA LINHAGEM ROCKEFELLER	45
5.5.2 – VIRULÊNCIA DA COMBINAÇÃO ESALQ 818 + IMI CONTRA FÊMEAS ORIUNDAS DE OVOS COLETADOS NO CAMPO	46

5.6 - TESTE EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO	49
5.6.1 – TESTES FEITOS EM GAIOLA GRANDE	49
5.6.2 – TESTES DE VIRULÊNCIA DO FUNGO EM UMA SIMULAÇÃO DE UM CÔMODO RESIDENCIAL.....	51
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

PAULA, A. R.; D.Sc. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO. MARÇO DE 2011. A SUSCEPTIBILIDADE DO MOSQUITO
Aedes aegypti AO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* É
MODIFICADA PELO INSETICIDA IMIDACLOPRID E ESTADO NUTRICIONAL.
Supervisor: Professor Richard Ian Samuels.

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos têm sido considerados promissores para o controle do mosquito adulto *Aedes aegypti*. No atual estudo foi observada a toxicidade e foi determinada a concentração subletal do inseticida Imidacloprid (IMI) contra fêmeas de *A. aegypti*. A concentração subletal do IMI foi combinada com o fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado LPP 133) e exposta às fêmeas de *A. aegypti*. Os mosquitos também foram infectados com somente o isolado LPP 133. Em outro experimento os mosquitos foram alimentados com sangue ou sacarose e expostos aos isolados LPP 133 ou ESALQ 818 ou à combinação ESALQ 818 + IMI. Subseqüentemente dois testes em condições de semi-campo foram realizados. Primeiro os mosquitos foram expostos por quatro tempos 3, 12, 24 e 48 horas a um pano preto impregnado com ESALQ 818. Em uma simulação de um cômodo residencial, os mosquitos ficaram expostos por 7 dias a cinco panos pretos impregnados com ESALQ 818 ou ESALQ 818 + 0,1ppm do IMI ou ESALQ 818 + 10ppm do IMI. Os panos foram fixados em móveis como cadeira, mesa, estante, armário. Os tratamentos controle foram feitos com 0,05% Tween 80 (TW) ou IMI. O IMI foi tóxico para adultos de *A. aegypti*, o valor da Concentração Letal (CL₅₀) foi de 4,04 ppm. A concentração subletal do IMI foi de 0,1ppm. A combinação de LPP 133 + 0,1ppm IMI reduziu significativamente as taxas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência (S₅₀) dos mosquitos, comparado com o tratamento feito somente com o LPP 133. Nos quatro primeiros tempos pós-alimentação sanguínea (0, 24, 48 e 72 horas) as fêmeas da linhagem Rockefeller foram menos suscetíveis aos isolados LPP 133 e ao ESALQ 818, comparado com as fêmeas alimentadas com somente sacarose. As fêmeas expostas ao LPP 133 ou ESALQ 818 a 96, 120 e 144 horas após a alimentação com sangue voltaram a ser suscetíveis ao fungo. Os mosquitos oriundos do campo apresentaram menor suscetibilidade ao isolado ESALQ 818 até 72 horas

pós-alimentação sanguínea, comparado com o tratamento feito com as fêmeas alimentadas com sacarose. No entanto, quando expostos ao isolado ESALQ 818 a 120 horas pós-alimentação com sangue os mosquitos foram suscetíveis ao fungo. Tanto as fêmeas da linhagem Rockefeller como as fêmeas do campo, expostas à combinação ESALQ 818 + 0,1ppm IMI, apresentaram significativas taxas de mortalidade nas primeiras horas pós-alimentação sanguínea (0 e 48 horas). Nos testes feitos em gaiolas grandes, os mosquitos expostos por 48 horas a um pano preto impregnado com ESALQ 818 apresentaram taxas de sobrevivência de 12% e S_{50} de 2 dias, valores significativamente menores comparados com os resultados dos outros tratamentos e grupo controle. Na simulação de um cômodo residencial a exposição a cinco panos pretos impregnados com ESALQ 818 + 10ppm IMI resultou na menor taxa de sobrevivência dos mosquitos, comparado com os tratamentos ESALQ 818 e ESALQ 818 + 0,1ppm IMI. Resumindo os resultados: até 72 pós-alimentação sanguínea as fêmeas de *A. aegypti* foram menos suscetíveis ao fungo comparado com as fêmeas alimentadas com sacarose. Entretanto a combinação do isolado ESALQ 818 com 0,1ppm do IMI reduziu a sobrevivência de *A. aegypti* independente do estado nutricional. Panos pretos impregnados com fungo+IMI parecem ser promissores para o uso no campo. A diminuição da sobrevivência de *A. aegypti* no campo possivelmente reduzirá a transmissão do vírus da dengue.

Palavras-chave: Dengue, mosquito, *Aedes aegypti*, fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae*, inseticida, Imidacloprid.

PAULA, A. R.; D.Sc. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO. MARCH, 2011. SUSCEPTIBILITY OF THE MOSQUITO *Aedes aegypti* TO THE ENTOMOPATOGENIC FUNGUS *Metarhizium anisopliae* IS MODIFIED BY THE INSECTICIDE IMIDACLOPRID AND NUTRICIONAL STATUS. Supervisor: Professor Richard Ian Samuels.

ABSTRACT

Fungi are potential candidates for the control of adult Dengue mosquitoes *Aedes aegypti*. Firstly, the study showed the toxicity of the insecticide Imidacloprid (IMI) against female *A. aegypti*. A sub-lethal concentration of IMI was determined and combined with the fungus *Metarhizium anisopliae* isolate LPP 133 (LPP 133+IMI). Survival rates of mosquitoes exposed to a combination of fungus and IMI were compared to the survival of mosquitoes exposed only to LPP 133. Three independent bioassays were conducted to study the effect of blood and sucrose feeding status on survival of *A. aegypti* exposed to LPP 133, ESALQ 818, and a combination of ESALQ 818+IMI. Females were exposed to the fungus after different time periods post-blood feeding and immediately after sucrose feeding. Rockefeller strain females and females obtained from eggs collected in the field were used in this study. In another experiment, under semi-field conditions, mosquitoes were exposed to fungus (ESALQ 818) impregnated black cloths for four different time periods (3, 12, 24 and 48 hours). In experiments simulating a residential room, five black cloths impregnated with isolate ESALQ 818 or ESALQ 818+IMI were attached to objects in the room and mosquitos were released into the room for 7 days. The LC_{50} of IMI was 4.04 ppm. The sub-lethal concentration of IMI was 0.1ppm. A combination of LPP133+IMI significantly reduced survival and median survival time (S_{50}) of mosquitoes when compared with mosquitoes exposed to isolate LPP 133 alone. Rockefeller strain females exposed to isolates LPP 133 and ESALQ 818 at 0, 24, 48 and 72h post-blood feeding were less susceptible fungal infection when compared with females fed on sucrose only. However, the females exposed to isolates LPP 133 and ESALQ 818 96, 120 and 144h post-blood feeding were susceptible fungal infection. Females obtained from eggs collected in the field were less susceptible to fungal infection at 0, 48 and 72h post-blood feeding when compared to sucrose only fed insects,

however, females exposed to ESALQ 818 at 120 hours post-blood feeding were susceptible fungal infection. Rockefeller strain females and those obtained from eggs collected in the field, exposed the combination ESALQ 818+IMI (0 and 48 hours post-blood feeding) were equally susceptible to fungal infection when compared with sucrose fed females. Low percentage survival (12%) and low S_{50} values (2 days) were observed in large cages when *A. aegypti* were exposed to a black cloth impregnated with ESALQ 818 for 48 hours. In a simulation of a residential room, mosquitoes exposed to ESALQ 818 + IMI 10ppm resulted in lower percentage survival when compared with mosquitoes exposed to ESALQ 818 and ESALQ 818+ IMI 0.1ppm. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with sub-lethal concentration of IMI increases virulence against the dengue vector *A. aegypti*, independent of nutritional status. Black cloths impregnated fungus+IMI may be promising for use in the field. The reduction of the adult of *A. aegypti* populations could reduce the risk of dengue virus transmission.

Key words: Dengue, mosquito, *Aedes aegypti*, entomopatogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, insecticide, Imidacloprid.

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos do gênero *Aedes* pertencem à subfamília Culicinae, tribo Adenini. *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue e da febre amarela urbana (Vianna, 2001), enquanto *Aedes albopictus* é um vetor secundário da dengue (Marcondes, 2001). No Brasil, no ano de 2008 foram registrados 743.517 casos de dengue, caindo para 387.158 em 2009, com 98 mortes por dengue hemorrágica e 58 mortes relacionadas a outras complicações da dengue (Ministério da Saúde, 2009). Em 2010, 936.260 casos foram notificados, com 592 mortes (Ministério da Saúde, 2010).

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*. Conhecem-se atualmente quatro sorotipos distintos do vírus, “Dengue virus” (DENV 1, 2, 3 e 4). A doença dengue apresenta diferentes quadros clínicos: dengue assintomática, clássica, hemorrágica e síndrome do choque da dengue. As causas das formas graves ainda não foram plenamente identificadas, existindo algumas teorias relacionadas à virulência do vírus infectante, à sequência de infecções por diferentes sorotipos, aos fatores individuais do hospedeiro e à combinação de todas as explicações anteriores (Gomes et al., 2007). Apesar de muito pesquisada, ainda não está disponível uma vacina preventiva e eficaz para dengue. O único elo vulnerável na cadeia de transmissão da dengue é o controle do mosquito vetor (Tauil, 2002; Teixeira et al., 2002; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b).

As incidências das epidemias de dengue estão crescendo devido ao aumento desordenado da população humana, uso de recipientes não biodegradáveis, coletas de lixo deficientes e saneamento básico inadequado, fatores que propiciam a criação do mosquito vetor (Tauil, 2002; WHO 2008). Métodos convencionais para controlar o mosquito *A. aegypti* consistem na vigilância epidemiológica, aplicações contínuas de larvicidas químicos ou biológicos e pulverização de inseticidas (Paula et al., 2011a). Existem várias formas de aplicação dos inseticidas, os larvicidas podem ser aplicados em água, os adulticidas podem ser aplicados pelo método residual ou aspersão. Em escala maior, recomenda-se o método residual com aplicações de inseticidas nas paredes internas e externas nas moradias humanas e nos abrigos de animais domésticos, ambientes considerados como locais de repouso dos mosquitos.

Os inseticidas, Malathion, Fenitrothion ou Permetrina, podem ser vaporizados utilizando dispersores em altas temperaturas (acima de 200°C) e podem ser aplicados usando veículos ou pulverizadores (Donalísio & Glasser, 2002). Luz et al. (2009) questionaram as atuais intervenções para o controle das larvas e adultos de *A. aegypti* e demonstraram, por modelos matemáticos, que os inseticidas químicos só deveriam ser utilizados no início da temporada de dengue.

A resistência dos mosquitos *A. aegypti* aos inseticidas químicos organofosforados e piretroides tem sido mostrada em vários estudos (da-Cunha et al., 2005; Montella et al., 2007, Lima et al., 2011). Montella et al., 2007 observaram resistência de *A. aegypti* a organofosforado e piretróide em todo o Brasil. Os inseticidas utilizados para controle de vetores, sem dúvida, salvaram milhões de vidas humanas e continuarão sendo de extrema importância para reduzir a população desses insetos, principalmente em epidemias. Entretanto, a evolução da resistência dos mosquitos faz com que novos métodos sejam urgentemente investigados (Paula et al., 2011b). Mosquitos modificados geneticamente tornando-se refratários aos parasitas (James, 2005; Marrelli et al., 2007) e/ou altamente suscetíveis à infecção por agentes microbianos (Shin et al., 2006) parecem ser estratégias promissoras para o controle de vetores.

As bactérias entomopatogênicas *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* possuem endotoxinas protéicas que destroem as células epiteliais do intestino médio larval, levando-as à morte (Neto et al., 1985; Lacey et al., 1986). A

bactéria *Bacillus thuringiensis var. israelensis* é virulenta contra larvas de *A. aegypti* (Espindola et al., 2008; Costa et al., 2010; Ritchie et al., 2010). Os fungos entomopatogênicos, diferentemente das bactérias, podem ser virulentos ao ovo (Luz, et al., 2007), às larvas e pupas (Pereira et al., 2009) e aos adultos de *A. aegypti* (Paula et al., 2008; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b). Vários estudos mostraram que os fungos foram altamente virulentos às larvas de *A. aegypti* (Clark et al., 1968; Goettel et al., 1987; Alves et al., 2002; Pereira et al., 2009), aos mosquitos adultos *Culex quinquefasciatus* (Scholte et al., 2003; Scholte et al., 2005), *Anopheles* (Scholt et al., 2004; Scholt et al., 2005; Thomas & Read, 2007; Mnyone et al., 2009; Farenhorst et al., 2009; Howard et al., 2010a) e *A. aegypti* (Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Leles et al., 2010; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b). A autodisseminação dos conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* durante a cópula já foi observada no mosquito *Anopheles gambiae* (Scholte et al., 2004) e *A. aegypti* (Munguia et al., 2011), respectivamente.

Vários trabalhos estudaram os efeitos subletais da infecção fúngica nos mosquitos. Scholte et al., 2006 observaram que *An. gambiae* diminuiu a alimentação sanguínea e a fecundidade depois de infectado com o fungo *M. anisopliae*. A infecção do fungo *M. anisopliae* no mosquito *Anopheles stephensi* prejudicou a maturação do Plasmodium (Blanford et al., 2005). A persistência da infecção do fungo em diferentes estágios do mosquito *A. aegypti* foi registrada por Pereira et al. (2009), larvas sobreviventes à infecção fúngica formaram pupas, entretanto nem todas as pupas se desenvolveram em adultos.

A idade, sexo, desenvolvimento e estado nutricional pode afetar a suscetibilidade do inseto à infecção fúngica (Dimbi et al., 2003). Um recente trabalho mostrou que *Anophele gambiae* alimentados com sangue foram menos suscetíveis ao fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae*, comparado com mosquitos alimentados com sacarose (Mnyone et al., 2011). Assim, novas estratégias devem ser investigadas com o intuito de diminuir a sobrevivência dos mosquitos, independente do tipo de alimentação da fêmea. A combinação do fungo com um inseticida pode ser promissora em reduzir a sobrevivência de fêmeas independente de estado nutricional. Inseticidas aumentam o estresse e alteraram o comportamento dos insetos, melhorando o desempenho de fungos

entomopatogênicos (Boucias et al., 1996). Os efeitos do fungo combinados com os inseticidas têm sido relatados com sucesso contra pragas agrícolas (Hiromori et al., 2001; Jaramillo et al., 2005; Santos et al., 2007; Brito et al., 2008) e contra mosquitos vetores da malária e filariose (Farenhorst et al., 2009; Howard et al., 2010a; Howard et al., 2010b), entretanto nenhum trabalho foi feito com *A. aegypti*.

O inseticida Imidacloprid (IMI) nunca foi testado em combinação com fungos entomopatogênicos visando o controle de mosquitos. Os neonicotínicos como o IMI atuam como neurotoxinas nos receptores nicotínicos da acetilcolina do inseto, provocando a hiperexcitação do sistema nervoso, com consequente paralisia e morte (Elbert et al., 1991). Larvas (Paul et al., 2006) e adultos (Paul et al., 2006; Pridgeon et al., 2008) do mosquito *A. aegypti* foram considerados suscetíveis ao inseticida IMI, entretanto o IMI só foi considerado promissor para o controle das larvas (Paul et al., 2006).

O atual estudo investigou se a combinação de *Metarhizium anisopliae* com uma concentração subletal do inseticida IMI reduziria as taxas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência (S_{50}) das fêmeas de *A. aegypti*. Testes de sobrevivência usando *M. anisopliae* ou *M. anisopliae* +IMI foram feitos contra os mosquitos alimentados com sacarose ou sangue. Panos pretos atrativos para o descanso de mosquitos (Scholte et al., 2005; Paula et al., 2008) foram impregnados com *M. anisopliae* e os mosquitos expostos ao panos em duas condições de semi-campo, em uma gaiola grande e em uma sala simulando um cômodo residencial. A redução da sobrevivência da população de *A. aegypti* possivelmente diminuirá a transmissão da doença dengue.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DADOS BIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DE *Aedes aegypti*

O ciclo biológico do mosquito *A. aegypti* compreende as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os ovos são colocados isoladamente fora da água, em locais úmidos ou em paredes de recipientes com capacidade de reter água. O tamanho dos ovos não ultrapassa 1 mm de comprimento. Externamente, os ovos são revestidos por uma camada denominada de exocório (casca). O horário de oviposição é regulado por fatores biológicos e mesológicos. *A. aegypti* oviposita duas horas após o nascer do sol e duas horas antes do por do sol (Consoli et al., 1998 ; Marcondes, 2001). O desenvolvimento embrionário dura de 2 a 3 dias e as larvas eclodem dentro da água. As larvas de primeiro instar utilizam um órgão cônico quitinoso para romper o exocório do ovo. O tempo de crescimento larval está condicionado às condições dos criadouros como bom suprimento alimentar, ausência de predadores e condições climáticas adequadas. As baixas temperaturas retardam o crescimento larval. As larvas se alimentam de micro-organismos aquáticos (fitoplâncton e zooplâncton) e da matéria orgânica sedimentada no fundo de criadouros (Consoli et al., 1998; Marcondes, 2001). O corpo da larva compreende a cabeça, tórax e abdome. A cabeça da larva é globosa provida de um par de antenas, olhos compostos e alguns ocelos. O aparelho bucal é do tipo mastigador-raspador. As peças bucais são formadas por

epifaringe, mandíbulas, maxilas, hipofaringe e lábio. Na frente da cabeça há escovas orais ou palatais que produzem correntes na água que levam para boca partículas alimentares. O tórax das larvas é globoso e mais largo que a cabeça, com segmentos pro, meso e metatórax fundidos e revestidos por cerdas. No oitavo segmento abdominal localiza-se o sifão respiratório, dotado de um único par de espiráculos. Na parte ventral do sifão há uma fileira de espinhos denominada pecten e um ou mais tufo de cerdas. O 10º segmento é modificado em lobo anal e possui uma estrutura denominada sela, que é incompleta. O estágio larval tem o período entre 5 a 7 dias. As larvas e as pupas são aquáticas (Consoli et al., 1998; Marcondes, 2001; Strieder, 2005).

O corpo da pupa é formado por cefalotórax (cabeça + tórax) e o abdome. A pupa de *A. aegypti* possui um par de trompas respiratórias. O abdome tem 8 segmentos. No oitavo segmento situa-se um par de paletas que auxiliam na movimentação. A fase de pupa dura de 2 a 3 dias (Consoli et al., 1998; Marcondes, 2001).

O mosquito adulto emerge de uma fenda em T situada na parte dorsal do cefalotórax da pupa. O corpo do mosquito adulto reveste-se de exoesqueleto esclerotizado, é segmentado e apresenta cabeça, tórax e abdome. A cabeça é globosa, ocupada em grande parte pelos olhos compostos. Na frente dos olhos implantam-se antenas longas com 15 a 16 flagelômeros dotados de longos pelos. Nos machos estes pelos são bastante numerosos e conferem aspecto plumoso às antenas; nas fêmeas os pelos são mais escassos e apresentam aspecto piloso. A parte bucal é formada por um aparelho longo, constituído por seis estiletes - duas maxilas, duas mandíbulas, hipofaringe e labro, alojados em uma estrutura em forma de calha, denominada lábio. Ao conjunto dessas peças dá-se o nome de probóscida, que é mais ou menos reta e do tipo pungitivo-sugadora em fêmeas, e sugador em machos. Ao lado da probóscida, na parte basal, implantam-se palpos maxilares, que diferem quanto ao tamanho e à forma. Os palpos maxilares dos machos são tão longo quanto a proboscida, e nas fêmeas os palpos maxilares são curtos.

O tórax divide-se em protorax, mesotórax e metatórax. O mesotórax ocupa a maior parte. Na parte dorsal do tórax localizam-se dois lobos pronotais e o escudo formando o escutelo, que nesse caso é trilobado. Na parte lateral do

tórax localizam-se dois espiráculos torácicos, duas asas funcionais, dois halteres ou balancins e outros escleritos importantes. O abdome é constituído por 10 segmentos, cada um dos quais formado por tergitos na parte dorsal e esternitos na parte ventral, unidos pelas pleuras nas laterais. (Consoli et al., 1998; Marcondes, 2001).

O mosquito adulto *A. aegypti* se caracteriza por possuir escudo com 2 faixas longitudinais e 1 faixa central longitudinal em forma de lira na cor branco prateada. *A. albopictus* possui escudo com apenas 1 faixa central longitudinal na cor branca prateada. Ambas as espécies possuem manchas claras nos tarsos (Eiras, 2000).

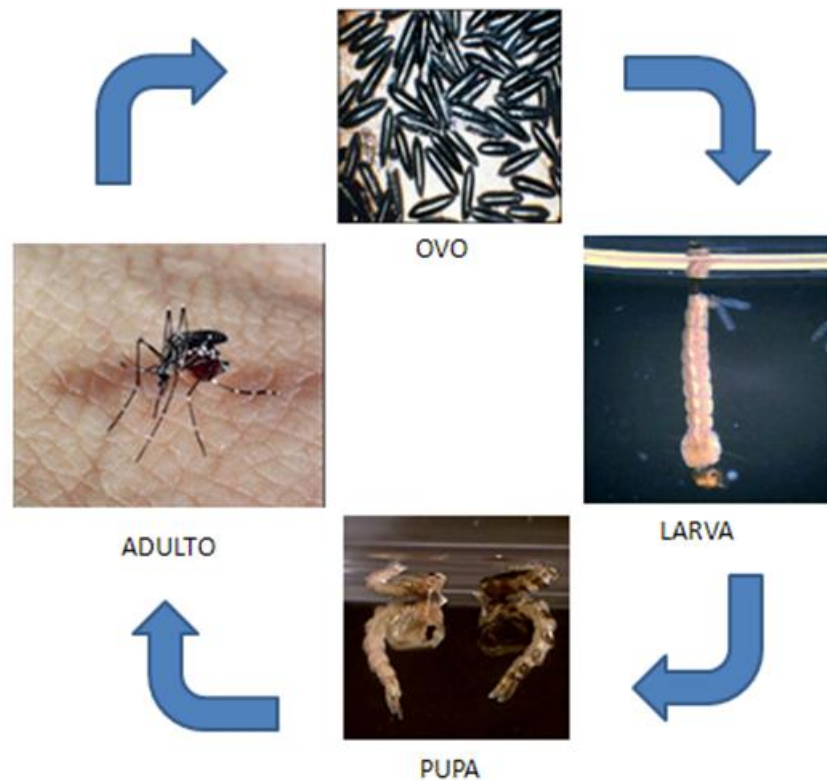


Figura 1 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Os estágios ovo, larva e pupa são aquáticos.

A fêmea de *A. aegypti* seleciona o local de oviposição influenciada pela luz, cor do recipiente, temperatura e grau de salinidade. Os criadouros preferenciais são aqueles que têm água limpa, pobre em matéria orgânica acumulada em recipientes sombreados e paredes escuras (Vianna, 2001). Tanto no Brasil quanto em outros países sul-americanos tem-se observado a criação de *A. aegypti* em recipientes naturais como bromélias, buracos de árvores, escavações em rocha e bambu. A densidade populacional de *A. aegypti* aumenta na época das chuvas, mas a população é mantida fora desta época em número considerável em razão de recipientes antrópicos com água que possibilitam o desenvolvimento do mosquito (Consoli et al., 1998). Os ovos podem resistir ao ressecamento até mais de um ano, assim, se ocorrer a evaporação da água o ovo pode permanecer viável até que tenha condições adequadas para seu desenvolvimento (Vianna, 2001).

O metabolismo energético de machos e fêmeas depende da ingestão de carboidratos, provenientes de seivas de flores e frutos. O repasto sanguíneo, exclusivo das fêmeas está relacionado primordialmente ao desenvolvimento dos ovos podendo igualmente contribuir para a energia e o aumento da longevidade. Os açúcares fornecem aos mosquitos energia necessária para o voo, a dispersão e as demais atividades biológicas e fisiológicas (Clements, 1963; Consoli et al., 1998; Marconi, 2001; Eiras, 2000). O repasto sanguíneo tem como objetivo ativar mecanismos neuroendócrinos para completar a maturação ovarioles. A digestão proteolítica do sangue no intestino médio da fêmea é seguida pela vitelogênese. A proteína vitellogenina é sintetizada no corpo gorduroso e transportada via hemolinfa para os oócitos, propiciando a maturação do ovo (Zhou et al., 2004).

O repasto sanguíneo ocorre nos horários diurnos. O pico de atividade de voo das fêmeas ocorre ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, mas o ataque ao homem e aos animais domésticos pode ocorrer a qualquer hora do dia. À noite, embora raramente, as fêmeas podem ser oportunistas, atacando o homem que se aproxima do seu abrigo. O hábito diurno de alimentação também é demonstrado pelos machos. O repasto sanguíneo em outros animais ocorre quando estes estão próximos aos criadouros ou abrigos dos mosquitos *A. aegypti* (Hagedorn et al., 1975).

A fêmea se infecta com o vírus da dengue quando faz repasto sanguíneo em uma pessoa em fase de viremia. O período de incubação do vírus no mosquito ocorre durante 7 dias (Salazar et al., 2007). O vírus se aloja e acumula na glândula salivar da fêmea de *A. aegypti* (Marconi, 2001). No sétimo dia os mosquitos se tornam aptos a disseminar o vírus e permanecem assim por toda sua vida (Consoli et al., 1998).

O vírus é inoculado no homem no momento do repasto sanguíneo. A replicação do vírus no homem ocorre em células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, bem como nos linfonodos locais, e logo após se dissemina por todo o organismo. Os vírus podem circular livres no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos. Sabe-se que os vírus da dengue têm tropismo por essas células fagocitárias, as quais são os maiores sítios de replicação viral no homem (Kurane & Eennis, 1992).

A Dengue Clássica é de início abrupto e se assemelha com uma gripe durando de 5 a 7 dias. Os sintomas são febres altas (39 a 40 °C), seguido de náuseas, vômitos, prurido cutâneo. A Dengue Hemorrágica tem os mesmos sintomas da Dengue Clássica, porém é caracterizada por diminuição de números de plaquetas e hemorragias nasais, gengivais ou de órgãos internos, podendo levar a pessoa à morte. A Síndrome do Choque da Dengue é a forma mais séria da doença, caracteriza-se pelos sintomas da dengue hemorrágica e com queda ou ausência da pressão arterial evoluindo para o óbito (Ministério da Saúde, 2006; Gomes, 2007).

O período em que o homem pode transmitir o vírus para o mosquito inicia um dia antes do início da febre e dores musculares, prosseguindo até o sexto dia da doença, período que corresponde à fase de viremia, quando surgem os anticorpos da classe IgG e IgM (Consoli et al., 1998). Uma vez infectada, a fêmea de *A. aegypti* é incapaz de combater a invasão do vírus em todas as partes de seu corpo. Assim, os ovários também podem ser atingidos e certas proporções dos ovos produzirão adultos que já nascerão naturalmente infectados com o vírus. Isto é conhecido como transmissão transovariana ou vertical (Cruz, 2006). Uma só fêmea de *A. aegypti* infectada com o vírus da dengue pode realizar diversas alimentações curtas em diferentes hospedeiros, resultando na constante disseminação da dengue (Marcondes, 2001).

2.2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Aedes aegypti*

O primeiro relato da doença dengue foi feito em uma enciclopédia chinesa da dinastia Chin (265 a 420 anos a.C.). O mosquito *A. aegypti* foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos. Devido à sua importância como vetor da febre amarela e dengue o mosquito foi intensamente combatido nesse território, tendo sido considerado erradicado em 1958. Contudo, países vizinhos como as Guianas e a Venezuela, dentre outros Sul-Americanos, e igualmente Estados Unidos da América, Cuba e vários países Centro-Americanos, não o erradicaram. Incidências de dengue voltaram a ser notificadas no Brasil em 1967 em Belém do Pará, no Estado do Rio de Janeiro em 1977 e Roraima no início da década de 80. A infestação também ocorreu nos Estados litorâneos: do Maranhão ao Paraná, bem como na região Centro-Oeste, somados aos Estados de Minas Gerais e Tocantins (Consoli et al., 1998). Em 1977 o sorotipo 1 foi encontrado nas Américas, sendo isolado primeiramente na Jamaica. Na década de 80 a epidemia de dengue aumentou consideravelmente no Brasil, na Bolívia, no Paraguai, no Equador e no Peru (Instituto Virtual da Dengue, 2006).

As intervenções direcionadas para a eliminação do vetor permeiam mediante a execução de três linhas de ações: saneamento básico, atividades de educação da população visando à redução dos criadouros do mosquito, e o combate direto a larvas e adultos de *A. aegypti* por meio de agentes químicos, físicos e biológicos (Reiter et al., 1997). Há muitas décadas o Brasil vem desenvolvendo ações de combate ao *A. aegypti*. Contudo, após a reintrodução do mosquito as ações de controle não conseguiram mais eliminá-lo (Teixeira et al., 1996; WHO, 2009). Mesmo com o Plano de Erradicação do Mosquito *A. aegypti* (PEAa) não foi observado indícios da redução de novos casos de dengue (Teixeira et al., 2001). O fato é que o crescimento da população de *A. aegypti* na área urbana pode ser decorrente de recursos governamentais insuficientes na execução dos procedimentos técnicos necessários ao controle do mosquito vetor (Teixeira et al., 2001).

No Brasil extensivas epidemias de dengue ocorreram durante o período 1986/87, sorotipo 1 (DEN-1). O sorotipo 2 (DEN-2) foi verificado por volta de 1990, causando epidemia de Dengue Hemorrágica no Estado do Rio de Janeiro com 274 casos e 8 mortes. O sorotipo 3 foi detectado pela primeira vez em dezembro de 2000. Em 2002 uma séria epidemia ocorreu com 794.219 casos de dengue, algumas no estado do Rio de Janeiro. No período de janeiro a março de 2008 o governo federal registrou 120.413 casos de dengue, 647 casos de dengue hemorrágica e 48 mortes. Atualmente estima-se que 80 milhões de pessoas já foram infectadas pelo vírus da dengue (WHO, 2009). Agravando a possibilidade de dengue hemorrágica e choque da dengue pela re-infecção dos primoinfectados. O desenvolvimento de uma vacina ainda está no estágio inicial, sendo que o único método capaz de reduzir a incidência da doença concentra-se no monitoramento e controle do mosquito vetor, *A. aegypti*.

2.3 - MONITORAMENTO DE *Aedes aegypti*

O monitoramento do mosquito *A. aegypti* tem se estruturado sobre inúmeros métodos que detectam e mensuram a densidade da população. Armadilhas utilizadas para monitoramento podem ser específicas para fase de ovo, larva e adulto (Gomes et al., 2008).

No Brasil o monitoramento centra-se na inspeção larval nas residências (Braga et al. 2004). No entanto, este método é trabalhoso, não muito sensível e sujeito a motivação do agente de saúde e permissão do proprietário, podendo resultar em estimativas imprecisas de baixa confiança dos índices de infestação (Focks, 2003).

Em países endêmicos para dengue, armadilhas de oviposição (ovitrapas) foram eficazes para avaliar o impacto das medidas de controle do mosquito *A. aegypti* (Reiter & Nathan, 2001). Desde sua invenção e aplicação as ovitrapas demonstram ser um método sensível e econômico para mensurar a presença de *A. aegypti* (Rawlins et al., 1998). No Brasil confirmou-se a maior sensibilidade das ovitrapas comparado com a pesquisa larvária e as larvitrapas (Marques et al., 1993; Braga et al., 2000). O sucesso da

implementação de qualquer programa de vigilância para artrópodes de importância médica depende muito da sensibilidade dos métodos empregados (Braga et al., 2000). A coleta de larvas não é um bom indicador para se medir a abundância do mosquito adulto (Focks, 2000).

As armadilhas para captura de adultos têm sido bastante utilizadas. Ritchie et al. (1997) verificaram que a Adultrap, um recipiente de plástico preto com água limpa, fita adesiva e um atrativo para as fêmeas foi eficiente para captura do mosquito *A. aegypti*. O Monitoramento Inteligente da Dengue (MI-Dengue) consiste em uma armadilha, a MosquiTrap[®], que captura fêmeas grávidas de *A. aegypti*, juntamente com um sistema informatizado para coleta de dados de campo, transmissão e acesso aos mapas geo-referenciados em tempo real (Eiras & Resende, 2009). A armadilha MosquiTrap foi mais eficiente na captura de mosquitos adultos comparado com a armadilha Adultrap (Maciel-de-Freitas et al., 2008). A BG-Sentinel utiliza uma substância química atrativa baseada em ácido láctico que atrai os mosquitos adultos. Uma vez perto da armadilha os mosquitos são sugados para o seu interior por meio de um mini-ventilador e ficam isolados em um saco coletor sem chance de retornar ao ambiente (Ball et al., 2010).

Para maximizar a captura de adultos de *A. aegypti*, a literatura apresenta vários relatos sobre a especificidade das armadilhas. Apesar de algumas dessas armadilhas mostrarem-se eficazes seu uso em grande escala confere dificuldades operacionais e financeiras para os municípios. Isso porque utilizam iscas atrativas de produção industrial, artefatos, luzes e fontes de energia para funcionamento, o que eleva os custos da operação. Essas armadilhas também requerem laboratórios e recursos humanos especializados quase sempre indisponíveis na realidade local, tornando seu uso inexecutável nas rotinas dos programas oficiais (Ritchie et al., 2003; Maciel-de-Freitas et al., 2006).

A viabilidade econômica da implantação das armadilhas deve ser levada em consideração. O ideal sempre foi dispor de uma técnica específica, econômica e sensível para amostrar a população do vetor da dengue. Recentes estudos provaram que a coleta de ovos do mosquito da dengue pode ser feita com ovitrampas confeccionadas de vasos pretos com 4 palhetas de madeira e água, indicando locais de maior infestação do mosquito adulto (Cypriano et al., 2010).

2.4 - CONTROLE DOS CULICÍDEOS

A principal meta do controle de mosquitos é impedir a veiculação de organismos patogênicos ao homem. Para surtir efeito desejado e duradouro o controle deve agir simultaneamente combatendo ovos, larvas, pupas e adultos. Devem ser acionados vários meios para o combate a essa entomofauna englobando, sob esta a visão, o controle integrado. O processo de combate às formas aquáticas e aos adultos deve ser idealizado em longo prazo com constante monitoramento. A aplicação dos inseticidas químicos deve ser feita somente em casos de epidemia (Marcondes, 2001).

O uso do inseticida organofosforado iniciou-se após a constatação do aumento da população de insetos resistentes a inseticida clorado Diclorodifeniltricloroetano (DDT). Desde 1985 o controle larvário dos mosquitos *A. aegypti* tem sido feito por meio dos inseticidas fenitrothion e malathion. Nebulizações térmicas e atérmicas têm sido utilizadas para controlar a população adulta desse vetor, empregando vários inseticidas destacando-se: propoxur (carbamato), malation (organofosforado) e cipermetrina (piretróide) (Macoris et al., 1999). Os principais problemas do uso destes inseticidas foram o desenvolvimento de populações resistentes e os danos provocados ao ambiente (Polanczyk et al., 2003; Luna et al., 2004).

Por mais de 30 anos o inseticida organofosforado temephos foi o larvicida exclusivamente usado no Brasil para o controle de *A. aegypti*. Com as epidemias de 1986, seu uso foi amplamente intensificado. Em pouco tempo, casos de resistência ao temephos em diversas regiões do Brasil começaram a surgir, levando à implantação de programas de monitoramento da suscetibilidade do mosquito aos inseticidas químicos (Campos & Andrade 2001; Polanczyk et al. 2003; Braga et al., 2004).

A resistência é uma característica genética que se insere em uma população em função do uso de inseticidas, ou seja, quanto mais o inseticida for utilizado mais rápido é a seleção de insetos resistentes. A capacidade dos insetos de tolerar concentrações inicialmente letais promove uma redução gradual na eficácia dos inseticidas, até a sua completa ineficiência (Cruz, 2002; Carvalho et al., 2004). Martins et al. (2004) sugeriram que o inseticida diflubenzuron fosse

usado em localidades onde *A. aegypti* apresenta resistência ao temephos. O diflubenzuron é um inseticida regulador de crescimento, mais conhecido como IGR (“insect growth regulator”) que age pela inibição da síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto e tem sido comercializado em muitos países com o nome dimilin (Silva et al., 2002).

Organismos capazes de parasitar ou predação mosquitos em suas várias fases evolutivas vêm sendo estudados há bastante tempo. Existem mais de 250 predadores de larvas de mosquitos, entre os predadores invertebrados destacam-se as planárias (ex.: *Dugesia dorotocephala*), microcrustáceos (*Mesocyclops*), baratas d'água (Hemiptera: Belostomatidae), larvas de mosquitos (ex.: *Toxorhynchites*, *Psorophora*, *Sabethes* e *Culex*). Entre os vertebrados destacam-se os peixes larvívoros (ex.: *Oreochromis* = tilápia; *Poecilia reticulata* = guppy). Vários nematódeos da família Mermithidae têm sido estudados para o controle de larvas de culicídeos, destacando-se *Romanomermis culicivorax*, cujos estudos de campo na Colômbia indicaram redução na população de *Anopheles albimanus*. A dificuldade de produção em massa limita o uso desses agentes. Diversos microsporídeos têm sido estudados, porém não há perspectivas de sua utilização prática, com exceção de *Hedzardia aedis*, que é específico para o mosquito *A. aegypti*. A espécie *H. aedis* foi capaz de eliminar 100% da população de *A. aegypti* em testes de laboratório (Consoli et al., 1998, Eiras, 2000).

Os agentes microbianos podem ser promissores para o controle de mosquitos (Scholte et al., 2004). Em 1964, foi descrita uma cepa de *Bacillus sphaericus* virulento contra mosquitos. Embora o modo de ação seja restrito às larvas, sua eficácia em águas poluídas tornou a bactéria *B. sphaericus* particularmente útil contra larvas de *Culex*. Outra bactéria, a *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) (de Barjac, 1978) provou ser tão efetiva que alguns anos depois de sua descoberta tornou-se um dos principais componentes do Programa de Controle de Oncocercose da África Ocidental e, posteriormente, passou a ser usada como uma alternativa para inseticidas químicos sintéticos em programas de controle de mosquitos (WHO, 1999).

Desde então vêm sendo realizados inúmeros programas de seleção visando o isolamento de variedades mosquitocidas (Delecluse et al., 2000). *Bti* foi usado com grande sucesso no Peru, Equador e na região Amazônica do Peru

contra o mosquito *Anopheles* (Kroeger et al., 1995), nos EUA e na Alemanha para o controle de pernilongos e na África contra simúlídeos vetores da Oncorcerose (Glare e O'Callaghan, 2000).

No Brasil, devido a problemas de resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos o uso de *Bti* tornou-se uma tática para o controle de simúlídeos (Vilarinhos et al., 1998). De acordo com Becker (2000), todos os estudos feitos após a introdução de *Bti* mostraram que ocorreu um controle eficaz dos mosquitos, com danos irrisórios ao ambiente e sem toxicidade ao homem. *Bti* representa uma alternativa eficiente no controle de *A. aegypti* (Polanczyk et al., 2003).

Para otimizar o efeito de toxicidade do *Bti* pode-se utilizar este bioinseticida em combinação com organofosforados (Polanczyk et al., 2003). Futuros estudos devem concentrar esforços a procura de formulações que possam maximizar a ação do *Bti* em condições de campo, como feito por Araujo et al. (2007), que observaram que *Bti* formulado em pó ou em tabletes aumentou sua eficácia contra larvas de *A. aegypti*.

A evolução da resistência dos mosquitos às bactérias entomopatogênicas é mínima, entretanto já foram observados mosquitos *Culex quinquefasciatus* resistentes a *Bti* (Wieth et al., 1997; Wieth et al., 2005). Os vírus têm sido pouco estudados. Becnel et al. (2001) demonstraram a virulência do baculovírus contra larvas do mosquito *Culex nigripalpus* e *C. quinquefasciatus*. Os fungos entomopatogênicos têm sido considerados potenciais candidatos para o controle dos mosquitos adultos, inclusive da dengue (Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b).

2.5 - FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos fungos pertencentes à cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. Normalmente, eles apresentam grande variabilidade genética, a qual resulta em variados graus de especificidade ao hospedeiro. De um modo geral, os fungos entomopatogênicos são organismos de tamanho e forma variáveis, podendo ser

unicelulares ou constituídos por um conjunto filamentosos de micélio, que é composto por células denominadas hifas, cujas paredes são ricas em quitina, celulose e outros açúcares (Alves, 1998). Dentre os gêneros mais importantes de fungos entomopatogênicos encontram-se: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (Ferron, 1978; Faria & Magalhães, 2001).

2.5.1 - GÊNERO *Metarhizium*

O gênero *Metarhizium* pertence ao Filo Ascomycota, à Classe Sordariomycetes (Pyrenomycetes), Ordem Hypocreales e Família Clavicipitaceae (Gindin et al., 2009). Os insetos atacados pelo gênero *Metarhizium* tornam-se duros e cobertos por uma fina camada pulverulenta de conídios. No final da conidiogênese o cadáver apresenta coloração verde, que varia de claro a escuro, e acinzentada ou mais esbranquiçada com pontos verdes. A doença é conhecida como muscardine verde, contrastando com a muscardine branca provocada por *B. bassiana*. Os conídios são, geralmente, uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre conidióforos simples os quais, justapostos, resultam em uma massa regular sobre o inseto (mononematosa) (Alves, 1998).

O fungo *Metarhizium anisopliae* foi descrito pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*, pelo russo Ilya Mestchnikoff em 1897, sendo isolado de larvas do besouro do grão do trigo, *Anisopliae astriaca* (Coleóptera: Scarabaeidae) (Sung et al., 2007). Bridge et al. (1993) descreveram no seu trabalho três espécies de *Metarhizium*: *Metarhizium anisopliae* (Metschnikov) Sorokin, *Metarhizium flavoviride* Gams e Rozsypal e *Metarhizium album* Petch. Essas três espécies foram identificadas através da morfologia e tamanho dos conídios.

Bidochka et al. (1994) utilizaram marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) em estudos de variabilidade genética entre isolados de *M. flavoviride* e *M. anisopliae*. Os resultados mostraram que *M. flavoviride* apresentou pouca variabilidade intraespecífica (75% de similaridade) quando comparado ao *M. anisopliae*, provando então que esses dois isolados eram similares taxonomicamente.

M. flavoviride (variedades *minus*, *flavoviride*) e a *M. anisopliae* (var. *anisopliae*, *majus*) distinguem-se pela morfologia dos seus conídios, fíalides, coloração e desenvolvimento (Alves, 1998).

Driver et al. (2000) reavaliaram a taxonomia do gênero *Metarhizium* através do sequenciamento de regiões ITS (sequências internas transcritas-rDNA), de rDNA 28S e de RAPD. Este estudo permitiu o reconhecimento de quatro clades dentro do grupo *M. anisopliae*, correspondendo a duas variedades já anteriormente descritas (*M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus*) e duas variedades novas (*M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *lepidiotum*).

Os fungos entomopatogênicos têm ciclo de vida simples, as formas de reprodução conhecidas compreendem a fase assexual, própria do desenvolvimento vegetativo da espécie, e a parassexual, como alternativa para troca de material genético (Wang, et al., 2004). Os Ascomycetos possuem estágio sexual (teleomorfos) e estágio anamórfico (representado pelos conídios) e representam a grande maioria dos Hyphomycetos entomopatogênicos pertencentes à família Clavicipitales (Pyrenomycetes) (Lacey, 1997).

Huang, et al. (2005) citaram que a fase teleomorfa da espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* é a *Cordyceps taii*. Segundo a classificação de Sung et al. (2007), usando a análise de DNA ribossômico, três espécies de *Metacordyceps* foram consideradas teleomorfos do gênero *Metarhizium*: *Metacordyceps brittlebankisoides*, *Metacordyceps campsosterni*, *Metacordyceps taii*. Para a fase teleomórfica de *Metacordyceps brittlebankisoides*, o anamórfico foi *M. majus* (= *Metarhizium anisopliae* var. *majus*). Sung et al. (2007) observaram que o fungo *M. anisopliae*, em sua fase anamórfica, pertence ao filo Ascomycota, à classe Sordariomycetes (Pyrenomycetes), à ordem Hypocreales, família Clavicipitaceae.

Recentemente Bischoff et al., (2009), usando biologia molecular rDNA, descreveram duas novas espécies *Metarhizium globosum* e *Metarhizium robertssi*. No mesmo ano Yan et al., (2009) isolaram uma nova espécie de *Cordyceps* em Chongqing, na China, *Cordyceps chongqingensis*, a partir de análises das regiões 26S rDNA D1/D2 e ITS e concluíram que *C. chongqingensis*

se tratava de uma variedade de *Metarhizium taii* (*Metarhizium taii* var. *chongqingensis* nov.).

2.5.2 - USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS

Vários autores já estudaram a virulência de fungos entomopatogênicos em insetos vetores. Clark et al., (1968) observaram a virulência do fungo *B. bassiana* em larvas de *Culex tarsalis*, *Culex pipiens*, *Anopheles albimanus*, *A. aegypti*, *Aedes sierrensis*, e *Aedes nigromaculis*. Esse fungo também apresentou virulência nos vetores da leishimaniose, *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* (Reithinger et al., 1997).

Daoust (1982) infectou larvas de *A. aegypti*, *C. pipiens* e *Anopheles stephens* usando o fungo *M. anisopliae*. Riba et al (1986) observaram que o segundo estágio larval de *A. aegypti* foi menos suscetível à infecção fúngica. Lacey et al. (1987) avaliaram a histopatologia da infecção por fungo em larvas de *Culex quinquefasciatus* e observaram que os micélios dos conídios iniciaram o crescimento no sifão respiratório, estendendo-se e bloqueando a traquéia. Após 48 horas, a mortalidade das larvas ocorreu por meio de sufocação e não pela toxicidade dos conídios, as toxinas dos conídios somente foram patogênicas quando ingeridas pelas larvas. O fungo *Tolypocladium cylindrosporum* foi altamente virulento às larvas de *A. aegypti* durante o período de muda (Goettel et al., 1987).

Maniania (1998) observou, em condições de campo, a infecção de adultos da mosca Tsetse, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae) com o fungo *M. anisopliae*. Luz et al. (1999) infectaram *Triatoma infestans* com o fungo *B. bassiana*. Costa et al. (2003) observaram a virulência do fungo *Aspergillus giganteus* e *Penicillium corylophilum* nas espécies de barbeiros *T. infestans*, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus*, importantes vetores de chagas.

Moraes et al (2001) avaliaram 11 isolados de *Aspergillus* sp. em larvas de *Aedes fluviatilis* e *C. quinquefasciatus* e constataram que os isolados *Aspergillus*

ochraceus, *Aspergillus kanagawaensis* e *Aspergillus sulphureus* foram os mais virulentos.

Scholte et al. (2004) documentaram a autodisseminação do fungo *M. anisopliae* durante a cópula de fêmeas e machos de *A. gambiae*. Em um trabalho de campo na África Scholte et al (2005) colocaram panos pretos impregnados com o fungo *M. anisopliae* em habitações humanas e observaram a diminuição da sobrevivência do mosquito *Anopheles*. Blanford e colaboradores (2005) observaram que fungo *B. bassiana* prejudicou a maturação do protozoário *Plasmodium chaboudi* e reduziu o repasto sanguíneo das fêmeas de *Anopheles*. A fecundidade do mosquito *A. gambiae* foi significativamente reduzida após a infecção com o fungo *M. anisopliae* (Scholte et al., 2006).

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* foram altamente suscetíveis ao fungo *M. anisopliae* (Scholte et al., 2007). Paula et al. (2008) observaram que três isolados de *M. anisopliae* e um isolado de *B. bassiana* foram virulentos contra fêmeas de *A. aegypti*. Foi verificado que 3,5 horas de exposição dos mosquitos ao fungo foi o suficiente para causar 50% de mortalidade de *A. aegypti* e, em teste de semi-campo, concluíram que um pano preto impregnado com fungo resultou na redução da sobrevivência dos mosquitos. Nem todas as pupas oriundas de larvas sobreviventes à infecção com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* não se desenvolvem em mosquitos adultos (Pereira et al. 2009).

Albernaz et al. (2009) demonstraram que a combinação do fungo *M. anisopliae* com óleo vegetal aumentou a atividade ovicida, e sugeriram a aplicação dessa combinação no controle integrado de *A. aegypti*. Leles et al. (2010) infectaram o mosquito *A. aegypti* com os fungos *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium*, *Lecanicillium psalliotae*, *M. anisopliae*, *Metarhizium lepidiotae*, *Metarhizium majus*, *Metarhizium frigidum*, *Paecilomyces carneus* e *Paecilomyces lilaci*, todas as espécies de fungo foram patogênicas ao vetor. Bukhari et al. (2010) verificaram que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram altamente virulentos aos mosquitos *A. gambiae* e *A. stephensi*.

O estado nutricional do inseto pode influenciar a virulência do fungo. Fêmeas de *Anopheles gambiae* alimentadas com sangue foram menos suscetíveis aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* do que as fêmeas alimentadas com sacarose, entretanto a idade dos mosquitos não afetou a infecção fúngica

(Mnyone et al., 2011). Dimbi et al. (2003) observaram que a suscetibilidade da mosca *Ceratitis* ao fungo entomopatogênico pode ser afetada pela idade, sexo, desenvolvimento, estado fisiológico e alimentação.

Os fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para serem usados no manejo integrado de vetores no campo, principalmente em regiões onde os mosquitos são altamente resistentes aos inseticidas químicos (Farenhorst et al., 2009).

2.5.3 – COMBINAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM INSETICIDAS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS

Poucos trabalhos têm combinado fungo+inseticidas para o controle de mosquitos. Farenhorst et al. (2009) observaram que os mosquitos da malária resistentes a inseticidas e mosquitos não resistentes foram igualmente suscetíveis à infecção fúngica. Howard et al. (2010a) afirmaram que *A. gambiae* resistente a piretroides foi mais suscetível à infecção com fungo do que mosquitos não resistentes a piretroides, contudo as duas linhagens de mosquitos eram diferentes, tornando-se difícil afirmar o resultado. A interação sinérgica entre fungos e inseticidas poderia ser eficiente em locais onde os mosquitos *Anopheles* apresentam resistência aos inseticidas químicos (Knols et al., 2010). Howard et al. (2010b) fazendo experimentos em Benim, observaram que o fungo *B. bassiana* diminuiu o repasto sanguíneo do mosquito *C. quinquefasciatus*, entretanto não observaram sinergismo do fungo com o inseticida permetrina.

A combinação de fungos entomopatogênicos com baixas dosagens de inseticida químico pode melhorar o desempenho do fungo, diminuindo as taxas de sobrevivência dos insetos. O produto a ser combinado não pode afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade, a conidiogênese e a composição genética do fungo, fatores esses que podem acarretar modificações na virulência do fungo (Alves, 1998). Já as combinações devem favorecer a ação do fungo em condições adversas, tais como temperaturas elevadas, umidade relativa baixa e radiação ultravioleta (Batta, 2003; Scholte et al., 2005; Blanford et al., 2005). O produto final deve permitir a estocagem do fungo sem perdas efetivas no seu

potencial, ou seja, manter suas propriedades ao longo do tempo compreendido desde a produção até sua utilização no campo e, ademais, ser economicamente viável (Batista filho et al., 2001).

Ignoffo et al. (1975) testaram a combinação de fungicidas, inseticidas e herbicidas com o fungo entomopatogênico *Womurae rileyi* em meio de cultura e observaram que todos os fungicidas e alguns inseticidas e herbicidas inibiram o crescimento e a virulência do fungo. Vários trabalhos têm mostrado que a combinação do fungo com inseticida diminuiu significativamente a sobrevivência de insetos pragas (Santos et al., 2007; Brito et al., 2008) e de mosquitos vetores (Farenhorst et al., 2009; Howard et al., 2010a).

O inseticida Imidacloprid (IMI) não apresenta efeitos prejudiciais sobre a germinação de conídios (Santos et al., 2007). O IMI é um inseticida sistêmico do grupo neonicotinóides. O local de ação do inseticida é o receptor de acetilcolina, agindo como uma neurotoxina (Elbert et al., 1991). Esse inseticida se liga aos receptores nicotínicos da acetilcolina localizados nos neurônios pós-sinápticos. Ao contrário da acetilcolina que é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase o IMI não é degradado imediatamente, com isso os impulsos nervosos são transmitidos continuamente levando a hiperexcitação ou colapso do sistema nervoso do inseto (Gallo et al., 2002). Quintela & McCoy (1997) constataram que o IMI atuou sinergicamente com *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera). Desde então o IMI tem se mostrado eficaz apresentando sinergismo quando combinado com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, (Moino Jr. & Alves, 1998; Batista Filho et al., 2001). O IMI sozinho foi considerado tóxico a larvas (Paul et al., 2006) e adultos (Paul et al., 2006; Pridgeon et al., 2008) do mosquito *A. aegypti*, entretanto o IMI ainda não foi testado em combinação com fungos para controle de mosquitos .

Constatado que o fungo foi altamente virulento ao adulto de *A. aegypti* (Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Leles et al., 2010; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b) o presente estudo investigou os efeitos da combinação do fungo *M. anisopliae* com uma concentração subletal do inseticida IMI na sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* em diferentes estados nutricionais. Foram feitos também experimentos de semi-campo e testes simulando um cômodo residencial.

3. OBJETIVOS

- Investigar se o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* combinado com uma concentração subletal do IMI (fungo+IMI) diminuiria as taxas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência do mosquito *A. aegypti*, comparado com a sobrevivência dos mosquitos expostos somente ao fungo;
- Observar se as fêmeas alimentadas com sangue seriam igualmente suscetíveis ao fungo ou fungo+IMI, comparado com fêmeas alimentadas com sacarose;
- Verificar em condições de semi-campo, usando uma gaiola grande, a taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos a um pano preto impregnado com o fungo;
- Avaliar a sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* expostos a cinco panos pretos impregnados com fungo ou fungo+IMI em uma sala simulando um cômodo residencial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (UENF/CCTA/LEF), localizada na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

4.1 - CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS LINHAGEM ROCKFELLER

Os mosquitos foram criados em um pote de plástico (gaiola de criação) de 30 x 20 x 20 cm, recoberto com tecido organza e mantido à temperatura de 25°C, 75% UR 12h fotoperíodo. Um camundongo imobilizado em uma malha de arame foi exposto aos mosquitos para a alimentação sanguínea. A oviposição das fêmeas ocorreu em um copo de plástico (100 mL) recoberto com papel-filtro (25 x 5 cm). Dentro do copo foi adicionado 50 mL de água destilada até a altura de 2,5 cm do papel-filtro. A eclosão das larvas foi estimulada por imersão total do papel-filtro com ovos em água previamente (24h) tratada com 0,05g de ração do camundongo. As larvas foram alimentadas diariamente com ração de camundongo. As pupas foram transferidas para um copo descartável com água colocado dentro da gaiola de criação. Os mosquitos adultos foram alimentados

com uma solução de sacarose (10%). Fêmeas recém-emergidas (2-3 dias) foram usadas nos experimentos.

4.1.1 - CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS DE CAMPO

No campo as coletas de ovos do mosquito foram feitas usando armadilhas de oviposição denominadas “ovitrapas”. As ovitrapas foram confeccionadas de um vaso plástico preto de 500 mL com quatro palhetas de madeira eucatex (3 x 12 cm) presas na borda do vaso com elástico. Dentro do vaso foi adicionado 250 mL de água de torneira. A face áspera das palhetas foi voltada para parte interna do vaso.

As ovitrapas foram colocadas por 5 dias no campus da UENF, no quinto dia as palhetas foram retiradas e secas por 48 horas à temperatura ambiente. Para a eclosão das larvas, as palhetas foram colocadas dentro de uma bandeja (10 x 30 x 20 cm) com água e 0,5g de ração do camundongo. Todo o procedimento de criação dos mosquitos oriundos do campo foi feito como citado no item 4.1.

4.2 - FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Foram utilizados dois isolados de *M. anisopliae* (Tabela 1) já descritos como de alta virulência contra fêmeas de *A. aegypti* (Paula et al., 2008).

Os isoaldos do fungo *M. anisopliae* foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido SDA (Dextrose 10g; Peptona 2,5g; Extrato de levedura 2,5g; Ágar 20g e água destilada 1L) por duas semanas a 27° C, em câmara climatizada (marca: FANEM) e depois armazenados a 4 °C. Para a produção de conídios, Erlenmeyers de 250mL contendo 25g de arroz parboilizado cru + 10 mL de água destilada, fechados com algodão foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121° C). Logo após, com o auxílio de uma colher estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados nos Erlenmeyers com o arroz autoclavado. Movimentos circulares foram feitos, de modo a obter uma distribuição uniforme

dos conídios entre os grãos de arroz. Os Erlemeyers foram mantidos em câmara climatizada, a 27 °C, e a concentração dos conídios foi avaliada em uma câmara de Neubauer.

Todo o processo de coleta de conídios foi feito em câmara de fluxo previamente desinfetada com álcool 70% e 15 minutos de exposição à UV. Foi realizada diluição consecutiva de uma suspensão de conídios usando 0,05% de Tween 80, até a obtenção da concentração desejada. A concentração padrão foi de 1×10^9 conídios mL⁻¹. As suspensões fúngicas foram misturadas vigorosamente usando um vórtex antes de serem pulverizadas no papel-filtro ou utilizadas para banhar o pano preto.

Tabela 1 - Isolados de *Metarhizium anisopliae* usados nos testes de patogenicidade e virulência das fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

ISOLADO	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO/FONTE	ORIGEM
ESALQ 818	<i>M. anisopliae</i>	Amostra de solo (re-isolado do <i>A. aegypti</i>)	Piracicaba - SP
LPP 133	<i>M. anisopliae</i>	Amostra de solo (re-isolado do <i>A. aegypti</i>)	Montenegro - RO

4.3 - INFECÇÕES DE *Aedes aegypti* USANDO PAPEL-FILTRO IMPREGNADO COM FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

O papel-filtro de 8 x 6 cm foi esterilizado em autoclave durante 15 min. a 1 atm (121°C) e 1 mL da suspensão do fungo foi pulverizado em cada lado do papel usando uma Torre de Potter (Burkart Ltd. UK). O papel-filtro foi seco em uma câmara climatizada (BOD) a 25 °C, 70 ± 10% UR por 16h e depois foi exposto aos mosquitos.

Depois de secar, o papel-filtro foi colocado no sentido vertical dentro de um pote de plástico coberto com organza (gaiola de tratamento) de 12 x 7 cm (Figura 2). Os mosquitos ficaram expostos ao papel-filtro por tempos determinados em cada teste. O papel-filtro do grupo controle foi tratado da mesma maneira, entretanto foi pulverizado somente com 0,05% Tween 80 (TW).

As fêmeas de *A. aegypti* foram adormecidas usando uma corrente de dióxido de carbono durante 30 segundos e, com auxílio de uma pinça fina, 10 mosquitos foram colocados em cada gaiola de tratamento. Nos testes feitos em laboratório foram utilizados 30 insetos por repetição, divididos em grupo de 10 insetos por gaiola de tratamento. Foram feitas 3 repetições de cada experimento, totalizando 90 insetos por teste. Os mosquitos foram alimentados com 10% de sacarose colocada em discos de papel sobre a organza da gaiola de tratamento. O número de mosquitos vivos foi avaliado diariamente por 7 dias. Os insetos mortos foram retirados da gaiola de tratamento durante o período de avaliação do teste.

Nota-se que os testes não foram realizados como recomendado pela OMS (WHO, 2010), os mosquitos puderam escolher se pousariam ou não no papel-filtro, considerando que no campo os mosquitos não seriam obrigados a descansar em superfícies impregnadas com inseticidas ou fungos.

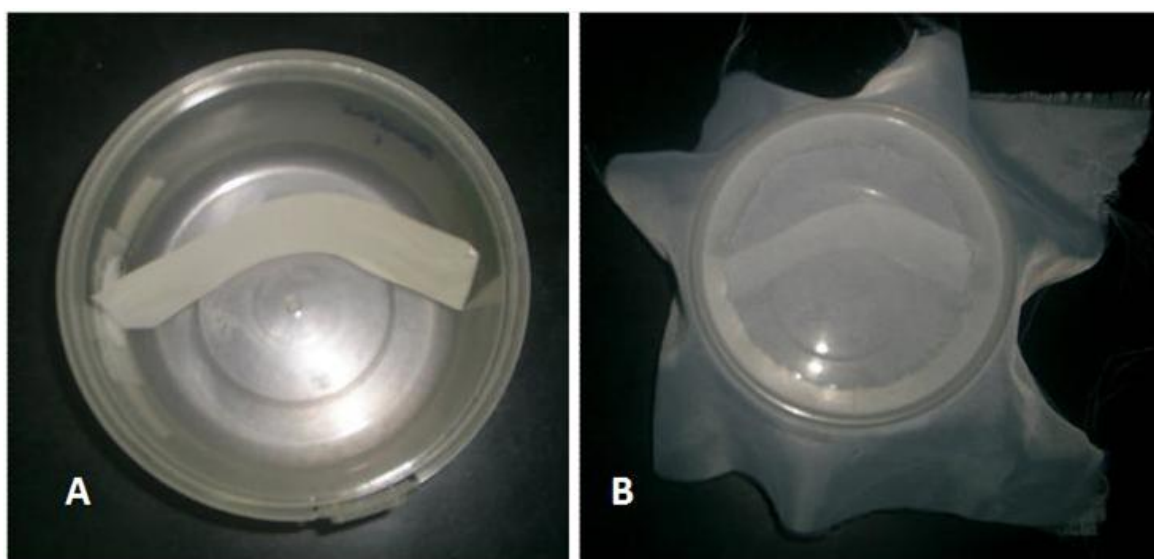


Figura 2 – Pote de plástico (Gaiola de tratamento) com papel filtro usado para a infecção do mosquito *Aedes aegypti*. (A) Gaiola de tratamento e papel filtro. (B) Gaiola de tratamento coberta com tecido organza.

4.4 TOXICIDADE DO IMIDACLOPRID E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SUBLETAL

O produto comercial Confidor[®] (Bayer, Brasil) que possui 70% de Imidacloprid (IMI) e 30% de ingredientes inertes foi usado nos testes. Cinco concentrações do IMI 0,1; 1; 10; 50 e 100 ppm foram preparadas com 0,05% de TW e pulverizadas no papel-filtro. O papel-filtro foi tratado conforme o procedimento do item 4.3. Os mosquitos *A. aegypti* foram expostos ao papel-filtro por 24 horas.

A seleção da concentração subletal do IMI foi realizada comparando a sobrevivência dos mosquitos expostos às cinco concentrações de IMI com a sobrevivência dos mosquitos expostos ao papel-filtro pulverizado somente com 0,05% de TW (tratamento controle). A comparação das taxas de sobrevivência foi feita usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan.

4.4.1 - EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DO IMIDACLOPRID NA SOBREVIVÊNCIA DE *Aedes aegypti*

Este teste visou avaliar por quanto tempo o mosquito *A. aegypti* poderia ficar exposto à concentração subletal do IMI (0,1 ppm - ver seção resultados) sem que ocorresse mortalidade dos insetos. O papel-filtro foi tratado conforme o procedimento do item 4.3. Os mosquitos foram expostos ao papel-filtro por cinco tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. O tratamento controle foi feito da mesma maneira, entretanto o papel-filtro foi pulverizado somente com TW.

4.4.2 - COMBINAÇÃO DO IMIDACLOPRID COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO CONTRA *Aedes aegypti*

O isolado LPP 133 (*M. anisopliae*) foi preparado junto com a concentração subletal (0,1 ppm) do IMI (LPP133+IMI), pulverizado no papel-filtro, e exposto aos

mosquitos em três tratamentos diferentes, variando o tempo de exposição (3, 6 e 12 horas).

As taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos ao LPP133+IMI foram comparadas com as taxas de sobrevivência dos insetos expostos ao LPP 133 (somente fungo). Os tratamentos controle foram feitos com TW e somente com 0,1 ppm do IMI.

A concentração final do fungo depois de pulverizado no papel-filtro foi de $1,5 \times 10^8$ conídios cm^2 no tratamento LPP 133+IMI, e de $1,1 \times 10^8$ conídios cm^2 no tratamento LPP 133.

4.5 - INFECÇÃO DAS FÊMEAS DE *Aedes aegypti* ALIMENTADAS COM SACAROSE OU SANGUE

4.5.1 TESTES COM FÊMEAS LINHAGEM ROCKEFELLER

Os isolados LPP133 e ESALQ 818 (*M. anisopliae*) foram usados contra fêmeas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller alimentadas com sacarose ou sangue. A alimentação dos mosquitos com sacarose foi feita utilizando um disco de papel-filtro sobre o tecido organza da gaiola de tratamento. A alimentação com sangue foi feita usando um camundongo preso em uma malha de arame e exposto aos insetos por 1 hora. Mosquitos não alimentados ou parcialmente alimentados com sangue (observação visual) não foram utilizados nos testes. Foram utilizadas somente fêmeas com o abdômem estendido cheio de sangue. As fêmeas foram alimentadas uma vez com sangue e depois diariamente com sacarose.

A infecção dos mosquitos com o fungo entomopatogênico foi feita usando um papel-filtro conforme o procedimento do item 4.3. Os mosquitos foram expostos ao papel-filtro por 48 horas. A concentração do fungo no papel-filtro foi $1,1 \times 10^8$ conídios cm^2 .

Os mosquitos alimentados com sangue foram expostos ao fungo em sete tratamentos variando o tempo pós-alimentação com sangue, ou seja, as fêmeas foram expostas ao fungo 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas pós-

alimentação sanguínea. Os mosquitos alimentados com sacarose foram imediatamente expostos ao fungo, não variando o tempo pós-alimentação.

4.5.2 - TESTES COM FÊMEAS DO CAMPO

O isolado ESALQ 818 foi selecionado para infecção das fêmeas do campo. A alimentação dos mosquitos com sacarose ou sangue seguiu os mesmos padrões de item 4.5.1, entretanto os mosquitos alimentados com sangue foram expostos ao papel-filtro 0, 48, 72, 96 e 120 pós-alimentação sanguínea. Os grupos controle dos testes feitos com mosquitos do laboratório e oriundos do campo foram feitos usando papel-filtro pulverizado somente com TW.

4.5.3 – VIRULÊNCIA DO ISOLADO ESALQ 818 EM COMBINAÇÃO COM IMIDACLOPRID CONTRA FÊMEAS ALIMENTADAS COM SACAROSE OU SANGUE

Esse experimento foi feito usando fêmeas da linhagem Rockefeller e fêmeas oriundas de ovos coletados no campo.

As fêmeas foram alimentadas com sacarose ou sangue (idem item 4.5.1) e expostas por 24 horas ao isolado ESALQ 818 ou ao ESALQ 818 combinado com concentração subletal do IMI (ESALQ 818+IMI). O processo de infecção foi feito usando papel-filtro.

Os mosquitos foram expostos ao fungo 0 e 48 horas pós-alimentação sanguínea e imediatamente após a alimentação com sacarose. O tratamento controle foi feito com somente TW ou IMI.

4.6 –TESTES EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO

Nos testes de semi-campo panos pretos já utilizados para infecções do mosquito *A. aegypti* (Paula et al., 2008) foram impregnados com o fungo

entomopatogênico e expostos aos insetos. O pano preto (100% de algodão) de 20 x 10 cm foi autoclavado por 15 minutos a 1 atm (121° C), banhado em 200 mL de uma suspensão do isolado ESALQ 818 a 1×10^9 conídios mL^{-1} e seco por 16 horas em uma sala com temperatura média de 26 °C, $71 \pm 7\%$ UR, fotofase de 12h. A concentração final dos conídios no pano preto foi de 1×10^8 conídios cm^2 .

4.6.1 - TESTES EM GAIOLAS GRANDES

Duas gaiolas medindo 115 x 60 x 75 cm foram mantidas na varanda do insetário do LEF/CCTA/UENF, protegidas de chuva e expostas à luminosidade natural. Quatro tratamentos foram feitos em uma gaiola e os mosquitos foram expostos por 3, 12, 24 e 48 horas ao pano preto impregnado com o isolado ESALQ 818. O mesmo foi feito em uma outra gaiola, entretanto o pano preto foi tratado somente com TW.

Foram feitas 3 repetições deste experimento com 50 fêmeas em cada gaiola, totalizando 150 fêmeas por tratamento. Os mosquitos foram alimentados com sacarose 10%. O número dos mosquitos mortos foi avaliado diariamente durante 7 dias.

4.6.2 - TESTES SIMULANDO UM CÔMODO RESIDENCIAL

A porta, janela e o ar condicionado de uma sala de alvenaria de 16 metros² foram totalmente vedados com fita adesiva para a realização desse teste. Três frascos de 30 mL de sacarose foram colocados dentro da sala. Um umidificador elétrico (Relion[®]) foi usado para umidecer a sala. Móveis como: cadeira, mesa, bancada, armário e estante foram organizados de forma uniforme. Cada móvel teve um pano preto fixado de modo que ambos os lados do pano ficaram expostos para o descanso dos mosquitos.

Três tratamentos com fungo foram realizados. Os panos pretos foram banhados em uma suspensão do isolado ESALQ 818 ou ESALQ818 + 0,1ppm IMI ou ESALQ 818 + 10ppm IMI. O tratamento controle foi feito banhando o pano

preto em TW ou 0,1ppm ou 10ppm do IMI. Cinquenta mosquitos (fêmeas) foram liberados na sala após a colocação dos panos. Três repetições foram feitas em cada teste, totalizando 150 mosquitos por tratamento.

Os mosquitos ficaram expostos aos panos por 7 dias, depois uma armadilha (BG-Sentinel™; Biogents Ltd.) foi instalada na sala por 48 horas para captura das fêmeas vivas. A armadilha foi utilizada em combinação com um atraente (BG Lure™; Biogents Ltd.). Os mosquitos atraídos foram sugados para a armadilha por meio de um mini-ventilador, e ficaram isolados em um saco coletor impossibilitados de retornar ao ambiente. Uma inspeção minuciosa de aproximadamente 10 minutos foi feita na sala a procura de insetos vivos, confirmando a captura de todos pela armadilha.

4.7 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os experimentos foram realizados três vezes. A homogeneidade dos experimentos foi determinada usando o teste de Log-Rank (Elandt-Johnson et al, 1980) em nível de significância de 95%. Os resultados foram agrupados para análise da curva de sobrevivência, média percentual da sobrevivência e desvio padrão. A análise de Probit foi usada para calcular o valor de CL_{50} do IMI e a concentração subletal do IMI foi verificada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan. Os resultados dos grupos controle que não apresentaram diferenças significativas em suas curvas de sobrevivência foram agrupados ("pooled") e somente uma curva de sobrevivência foi mostrada. As comparações das médias de sobrevivência dos mosquitos *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). Curvas de sobrevivência foram comparadas usando Log-Rank.

5. RESULTADOS

5.1 – TOXICIDADE DO IMIDACLOPRID CONTRA *Aedes aegypti*

Primeiramente foi testada a toxicidade do IMI contra fêmeas de *A. aegypti*. Cinco concentrações do IMI 100, 50, 10, 1 e 0,1 ppm foram usadas contra os mosquitos. A concentração subletal do IMI também foi avaliada.

Os resultados da análise de Probit mostraram que o valor da Concentração Letal (CL_{50}) do IMI foi de 4,04 ppm (limites de confiança: 0,88-15,3). No sétimo dia de avaliação a concentração de 100 ppm resultou no menor número de insetos vivos (14%) comparado com a sobrevivência dos insetos expostos às demais concentrações.

A Figura 3 mostra as curvas de sobrevivência dos insetos expostos às concentrações 100, 50, 10, 1 e 0,1 ppm do IMI.

Todas as concentrações do IMI apresentaram taxas de sobrevivência dos mosquitos significativamente diferentes do grupo controle [$F_{(5,17)} = 260,98$, $p < 0,001$] exceto 0,1 ppm ($p > 0,01$; Tabela 2). As comparações das curvas de sobrevivência usando o teste de Log-Rank confirmaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos feitos com 0,1 ppm do IMI e com o grupo controle ($p > 0,05$). Com isso 0,1 ppm do IMI foi selecionada como a concentração subletal e usada nos demais experimentos.

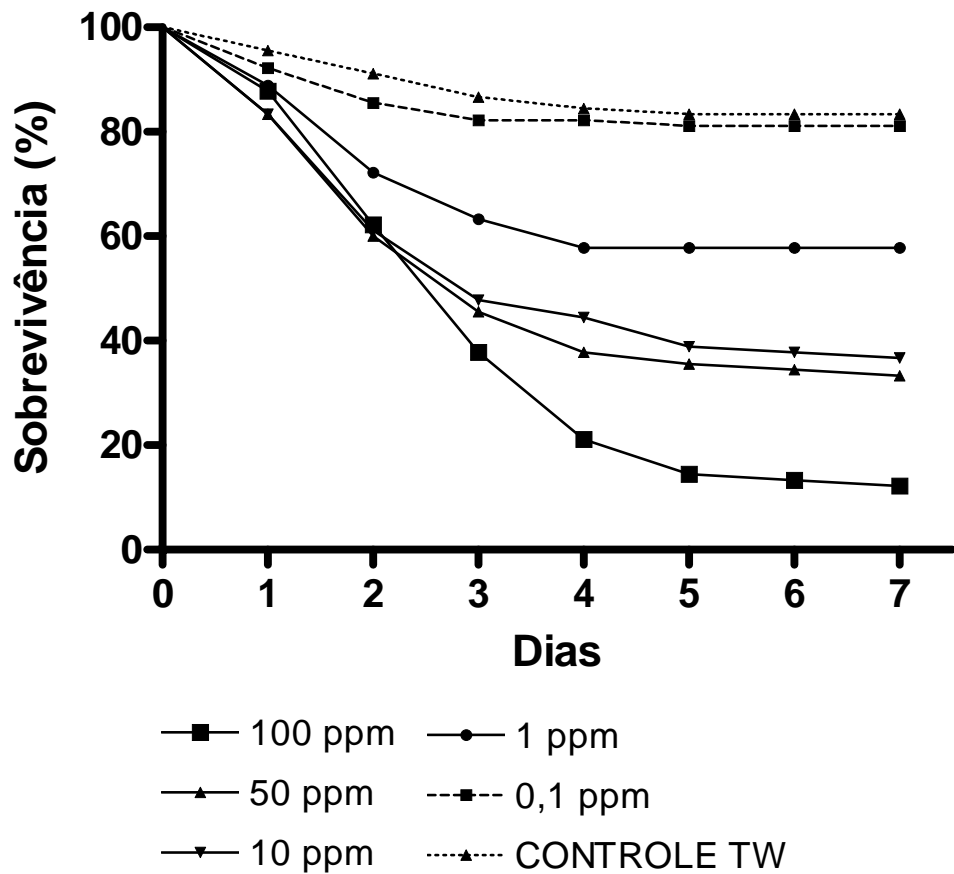


Figura 3. Sobrevivência das fêmeas de *Aedes aegypti* expostas por 24 horas a cinco concentrações de Imidacloprid (100, 50, 10, 1 e 0,1 ppm). A curva de sobrevivência controle é a média de todos os grupos controle. O tratamento controle foi feito com somente 0,05% de Tween 80. O teste foi conduzido por 7 dias.

Tabela 2. Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) expostas a cinco concentrações de Imidacloprid.

CONCENTRAÇÃO (ppm)	% MÉDIA DE SOBREVIVÊNCIA \pm DP	S_{50}
0	85 \pm 0,95 a	ND
0,1	82 \pm 1,97 a	ND
1	57 \pm 4,53 b	ND
10	39 \pm 5,21 c	4
50	37 \pm 6,52 c	3
100	14 \pm 7,25 d	3

Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND). O teste foi avaliado por 7 dias.

5.2 – SOBREVIVÊNCIA DE *Aedes aegypti* EXPOSTOS POR DIFERENTES TEMPOS À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DO IMIDACLOPRID

Esse teste visou avaliar por quanto tempo os mosquitos *A. aegypti* poderiam ficar expostos à concentração subletal do IMI (0,1ppm) sem que ocorresse mortalidade dos insetos. A concentração subletal do IMI foi pulverizada no papel-filtro e exposta com mosquitos por cinco tempos: 3, 6, 12, 24, 48 horas.

A menor taxa de sobrevivência ocorreu quando os mosquitos foram expostos à concentração subletal do IMI (0,1 ppm) por 48 horas (37,7%), comparado com os demais tempos de exposição (Figura 4).

A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que todos os tempos de exposição apresentaram, no sétimo dia de avaliação, taxas de sobrevivência de *A. aegypti* significativamente iguais ($p > 0,01$), exceto o tratamento por 48 horas [$F_{(5,17)} = 87,69$ $p < 0,01$]. As comparações das curvas de sobrevivência usando o teste de Log-Rank confirmaram esse resultado, a sobrevivência dos insetos expostos por 48 horas à concentração subletal do IMI foi significativamente diferente de todos os outros tratamentos, inclusive o grupo controle ($p < 0,0001$). Com isso, tempos de exposição maiores que 24 horas foram evitados nos testes posteriores.

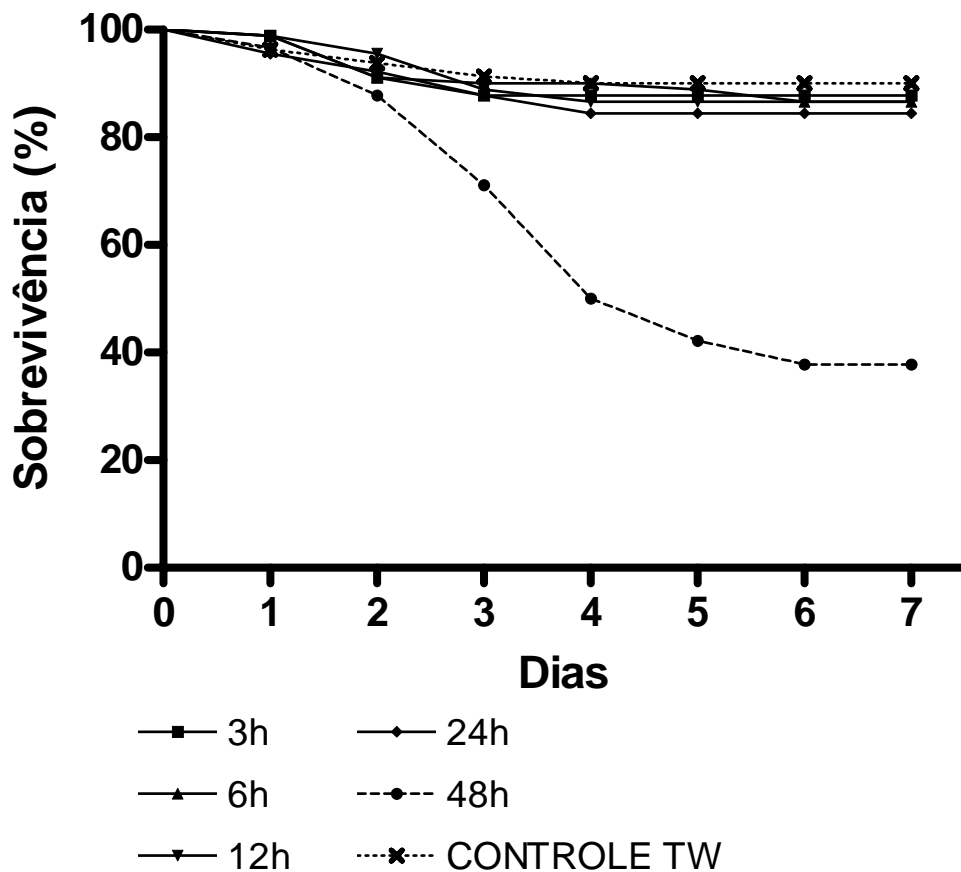


Figure 4. Sobrevivência (%) das fêmeas de *Aedes aegypti* expostas por 3, 6, 12, 24, 48 horas à concentração subletal (0,1ppm) do Imidacloprid. A curva de sobrevivência controle é uma média de todos os grupos controle. O tratamento controle foi feito com somente 0,05% de Tween 80.

5.3 – COMBINAÇÃO DO IMIDACLOPRID COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO CONTRA *Aedes aegypti*

Nesse teste as taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos a uma combinação de LPP133+IMI foram comparadas com as taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos somente ao LPP 133. Os insetos ficaram expostos ao isolado LPP133+IMI e ao isolado LPP 133 por três tempos: 3, 6 e 12 horas.

A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que a taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos por 3 horas ao tratamento LPP 133 não foi significativamente diferente da taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos à combinação LPP 133+IMI ($p > 0,01$; Tabela 3), entretanto

ambos os tratamentos foram significativamente diferentes do grupo controle [$F_{(3,11)}=5,11$ $p<0,01$].

A taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos por 6 horas ao tratamento LPP 133 foi significativamente diferente dos resultados obtidos no tratamento LPP 133+IMI [$F_{(3,11)}=172,05$, $p<0,01$; Tabela 3]. Os insetos expostos ao LPP 133 e ao LPP 133+IMI por 12 horas também apresentaram taxas de sobrevivência significativamente diferentes [$F_{(3,11)}=105,17$, $p<0,01$; Tabela 3].

Nota-se que os mosquitos expostos por 12 horas ao tratamento LPP 133 tiveram valor de S_{50} de 3 dias, enquanto os mosquitos expostos pelo mesmo tempo ao LPP133+IMI apresentaram valor de S_{50} de 2 dias.

A Figura 5 mostra as curvas de sobrevivência diária dos mosquitos expostos por três tempos 3, 6 e 12 horas ao LPP 133 e ao LPP 133+IMI.

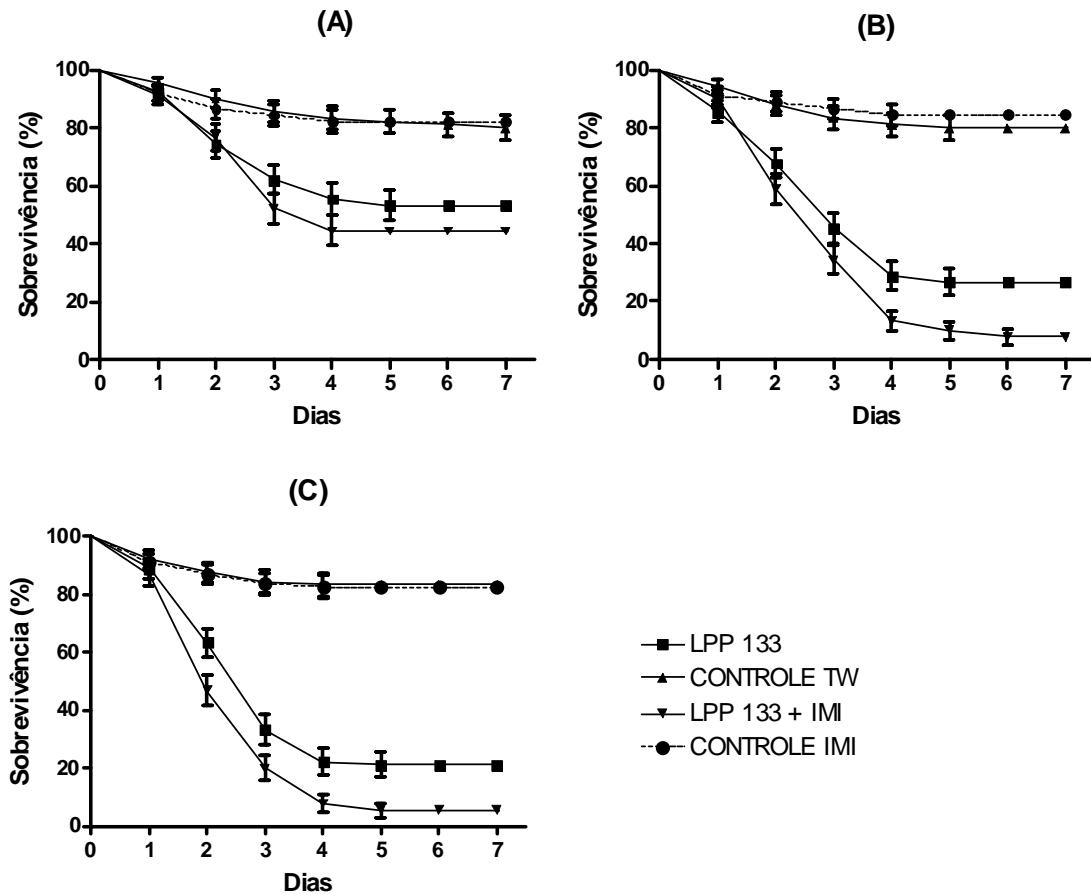


Figure 5. Sobrevivência (%) dos mosquitos expostos por três tempos ao isolado LPP 133 e à combinação LPP 133+IMI. (A) 3 horas de exposição. (B) 6 horas de exposição. (C) 12 horas de exposição. CONTROLE TW: 0,05% Tween 80. CONTROLE IMI: 0,1 ppm Imidacloprid.

Tabela 3 – Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas de *Aedes aegypti* (linhagem Rokefeller) expostas por 3, 6 e 12 horas ao isolado LPP 133 e à combinação de LPP 133+IMI.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO (h)	TRATAMENTOS	% MÉDIA DE SOBREVIVÊNCIA \pm DP	S_{50}
3	CONTROLE TW	83,3 \pm 2,85 a	ND
	CONTROLE IMI	85,5 \pm 2,67 a	ND
	LPP 133	51,1 \pm 6,01 b	ND
	LPP 133+IMI	44,4 \pm 8,25 b	ND
6	CONTROLE TW	80 \pm 2,43 a	ND
	CONTROLE IMI	84,4 \pm 2,82 a	ND
	LPP 133	26,6 \pm 8,48 b	3
	LPP 133+IMI	11,1 \pm 11,34 c	3
12	CONTROLE TW	83,3 \pm 2,67 a	ND
	CONTROLE IMI	85,5 \pm 2,47 a	ND
	LPP 133	23,3 \pm 10,6 b	3
	LPP 133+IMI	7,77 \pm 12,32 c	2

Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND). O teste foi avaliado por 7 dias.

5.4 - VIRULÊNCIA DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* CONTRA FÊMEAS DE *Aedes aegypti* ALIMENTADAS COM SACAROSE OU SANGUE

Nesse experimento foi comparada a sobrevivência das fêmeas alimentadas com sacarose e imediatamente expostas à infecção com fungo, e das fêmeas expostas ao fungo depois de diferentes tempos pós-alimentação sanguínea. Duas linhagens de mosquitos foram usadas, Rockefeller e fêmeas oriundas de ovos coletados no campo. As infecções foram feitas usando papel-filtro e os mosquitos foram expostos ao fungo por 48 horas.

5.4.1 – VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS LPP 133 E ESALQ 818 CONTRA FÊMEAS DE *Aedes aegypti* DA LINHAGEM ROCKEFELLER ALIMENTADAS COM SANGUE OU SACAROSE

Os isolados LPP 133 e ESALQ 818 foram virulentos contra fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue, comparado com a sobrevivência dos mosquitos do grupo controle ($p < 0,01$). Entretanto, as fêmeas de *A. aegypti* expostas ao isolado LPP 133 0, 24, 48, 72 horas pós-alimentação sanguínea apresentaram taxas de sobrevivência significativamente maior comparado com o tratamento feito somente com sacarose [$F_{(9,29)} = 141,41$; $p < 0,01$; Tabela 4]. No entanto, os mosquitos expostos ao isolado LPP 133 96, 120 e 144 horas depois da alimentação sanguínea tiveram taxas de sobrevivência iguais aos resultados dos tratamentos feitos com fêmeas alimentadas somente com sacarose ($p > 0,01$).

Os maiores valores de S_{50} (6 dias) foram observados nos tratamentos 24 e 48 horas pós-alimentação com sangue com subsequente exposição ao isolado LPP 133 (Tabela 4).

Tabela 4 – Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas de *A. aegypti* (linhagem Rockefeller) alimentadas com sacarose ou sangue e expostas aos isolados LPP 133 ou ESALQ 818 imediatamente após a alimentação com sacarose ou 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas pós-alimentação sanguínea.

ISOLADOS TRATAMENTOS	LPP 133		ESALQ 818	
	% MÉDIA DE SOBREVIVÊNCIA \pm DP	S_{50}	SOBR. (%) (DP)	S_{50}
CONT SAC	76,6 \pm 2,88 b	ND	73,3 \pm 2,50 a	ND
CONT SANG	85,5 \pm 2,55 a	ND	77,7 (\pm 2,06 a	ND
SAC + FUNGO	23,3 \pm 10,66 e	3	25 \pm 8,96 d	3
SAN 0h + FUNGO	42,2 \pm 8,63 c	5	43,3 \pm 7,13 b	6
SAN 24h + FUNGO	46,6 \pm 8,23 c	6	42,2 \pm 6,50 b	6
SAN 48h + FUNGO	44,4 \pm 8,00 c	6	45 \pm 7,15 b	6
SAN 72h + FUNGO	31,1 \pm 7,58 d	3	36,6 \pm 6,30 bc	4
SAN 96h + FUNGO	27,7 \pm 7,43 de	3	31,1 \pm 6,89 cd	3
SAN 120h + FUNGO	26,6 \pm 7,16 de	3	27,7 \pm 8,51 d	3
SAN 144h + FUNGO	25,5 \pm 6,16 e	3	22,1 \pm 7,98 d	3

Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). Dados não determinados (ND). Alimentação com sacarose (SAC). Alimentação com sangue (SAN). Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW (CONT). Teste avaliado por 7 dias.

A Figura 6 mostra as taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos ao isolado LPP 133 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas pós-alimentação com sangue.

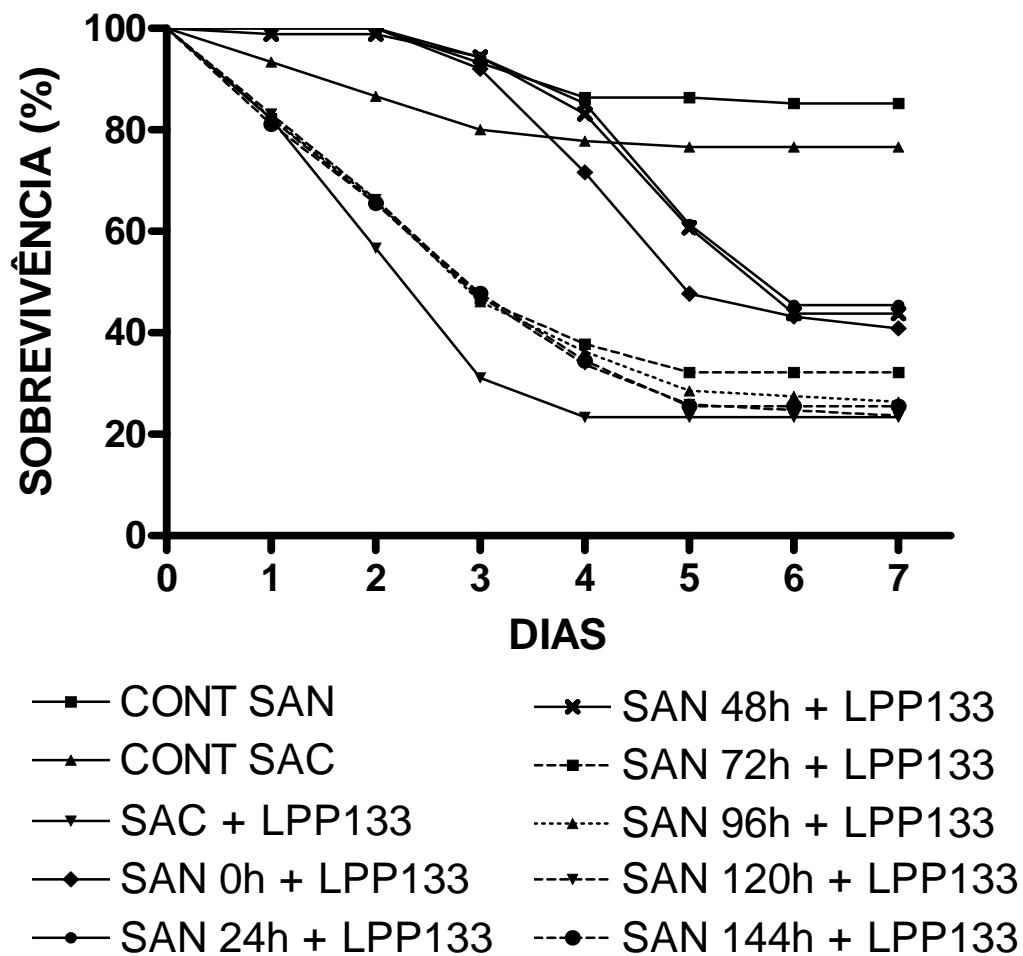


Figure 6. Sobrevivência (%) dos mosquitos expostos ao isolado LPP 133 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas depois da alimentação sanguínea e imediatamente depois a alimentação com sacarose. SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue; CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. Teste avaliado por 7 dias.

Os mosquitos alimentados com sangue e expostos ao isolado ESALQ 818 apresentaram taxas de sobrevivência significativamente maiores [$F_{(9,29)} = 54,17$; $p < 0,01$], comparado com a alimentação com sacarose, exceto nos tratamentos 96, 120 e 144 horas pós-alimentação sanguínea ($p > 0,01$; Tabela 4).

O tratamento 144 horas pós-sangue resultou, no sétimo dia de avaliação, em 22,2% de mosquitos vivos, valor menor comparado à sobrevivência das fêmeas alimentadas com sacarose (25,5%). Os maiores valores de S_{50} (6 dias) ocorreram nos tratamentos 0, 24, 48 horas pós-alimentação com sangue, com subsequente exposição ao ESALQ 818 (Tabela 4).

A Figura 7 mostra as taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos ao isolado ESALQ 818 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas depois da alimentação sanguínea e imediatamente depois da alimentação com sacarose.

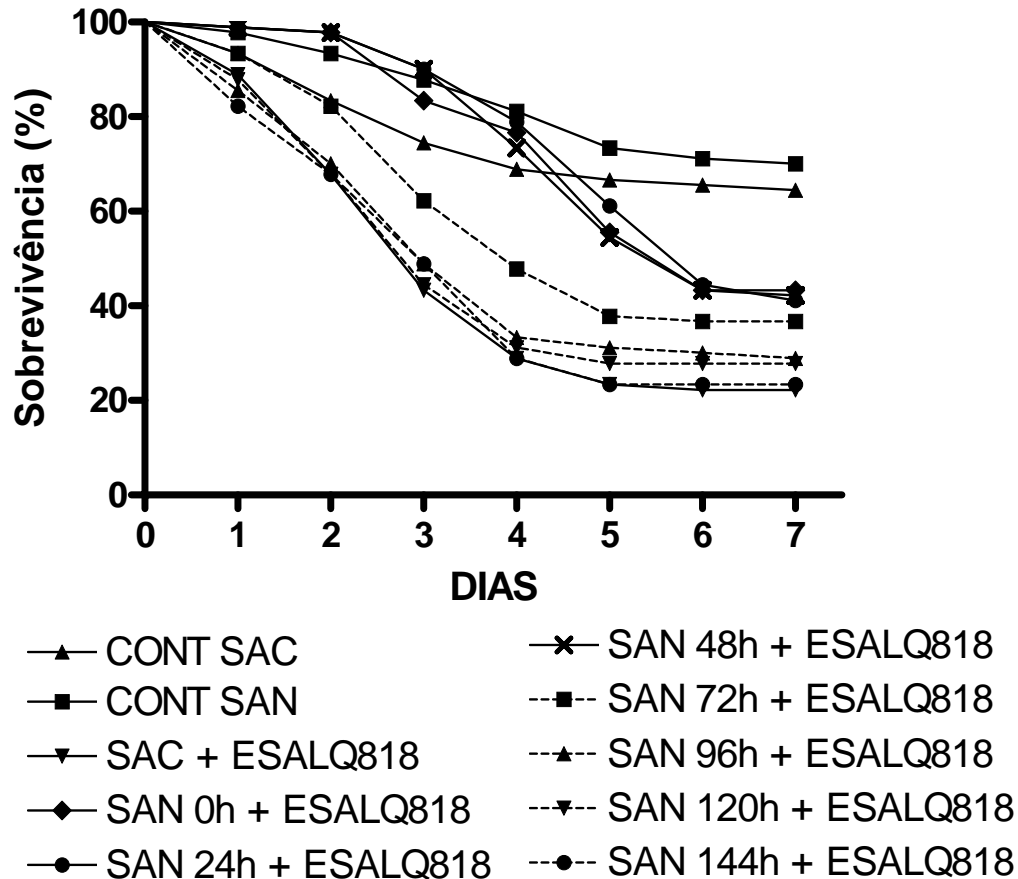


Figure 7. Sobrevivência (%) dos mosquitos expostos ao isolado ESALQ 818 zero, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas depois da alimentação sanguínea e imediatamente depois a alimentação com sacarose. SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue; CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. Teste avaliado por 7 dias.

Por apresentar alta virulência e fácil produção *in vitro* o isolado ESALQ 818 foi selecionado para os demais experimentos.

5.4.2 – VIRULÊNCIA DO ISOLADO ESALQ 818 CONTRA FÊMEAS DE *Aedes aegypti* ORIUNDAS DE OVOS COLETADOS NO CAMPO

No autal estudo as fêmeas do campo foram expostas ao ESALQ 818 zero, 48, 72 e 120 horas pós-alimentação com sangue, e imediatamente depois a alimentação com sacarose.

Somente o tratamento 120 horas pós-alimentação sanguínea apresentou taxa de sobrevivência significativamente igual à sobrevivência das fêmeas alimentadas com sacarose ($p > 0,01$). Os demais tempos (0, 48 e 72 horas pós-alimentação sanguínea) tiveram taxas de sobrevivência significativamente diferentes, comparado com a alimentação com sacarose [$F_{(6,20)} = 71,90$; $p < 0,01$; Tabela 5]. Os maiores valores de S_{50} (6 dias) ocorreram nos tratamentos 0, 48, 72 horas após a alimentação sanguínea (Tabela 5).

Tabela 5 – Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas do campo alimentadas com sacarose ou com sangue e expostas ao isolado ESALQ 818 durante quatro diferentes tempos: 0, 48, 72 e 120 horas após a alimentação sanguínea, e imediatamente após a alimentação com sacarose

Tratamentos	% Média de Sobrevivência \pm DP	S_{50}
CONT SAC	74,4 \pm 3,03 b	NA
CONT SAN	84,4 \pm 2,51 a	NA
SAC + ESALQ 818	34,4 \pm 8,32 e	5
SAN 0h + ESALQ 818	44,4 \pm 6,96 cd	6
SAN 48h + ESALQ 818	46,6 \pm 6,39 c	6
SAN 72h + ESALQ 818	41 \pm 6,00 d	6
SAN 120 h+ ESALQ 818	35,5 \pm 7,16 e	5

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: Dados não determinados; SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue. CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. Teste avaliado por 7 dias.

A Figura 8 mostra a sobrevivência das fêmeas do campo alimentadas com sangue ou sacarose e expostas ao isolado ESALQ 818.

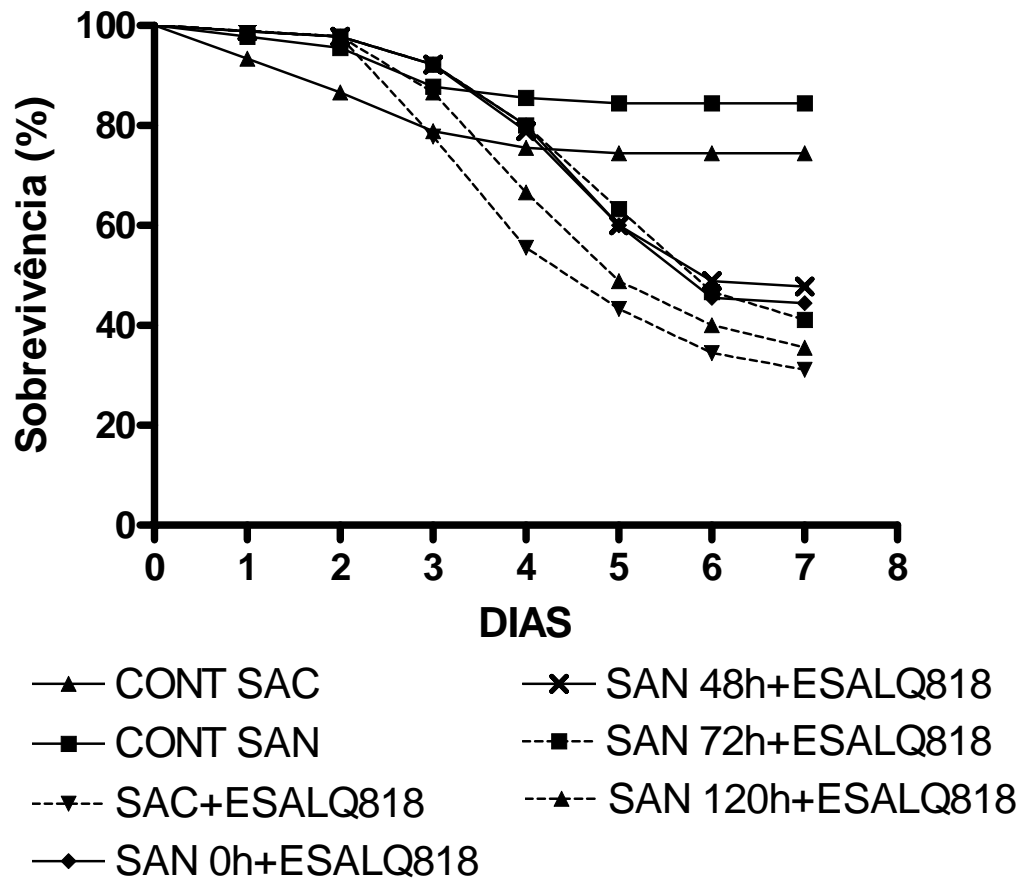


Figure 8. Sobrevivência (%) dos mosquitos expostos ao isolado ESALQ 818 depois de 0, 48, 72 e 120 horas da alimentação com sangue, e imediatamente depois a alimentação com sacarose. SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue; CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. Teste avaliado por 7 dias.

5.5 – VIRULÊNCIA DA COMBINAÇÃO ESALQ 818 + IMI CONTRA FÊMEAS DE *Aedes aegypti* ALIMENTADAS COM SACAROSE OU COM SANGUE

Os seguintes experimentos foram conduzidos com a finalidade de investigar o efeito da combinação do isolado ESALQ818 + IMI na sobrevivência das fêmeas alimentadas com sacarose ou sangue. A infecção fúngica foi feita usando fêmeas Rockefeller e fêmeas oriundas de ovos coletados no campo. Os tratamentos foram feitos comparando a sobrevivência dos mosquitos tratados

com o isolado ESALQ818 + IMI versus tratamento feito somente com isolado ESALQ 818 + TW.

5.5.1 – VIRULÊNCIA DA COMBINAÇÃO ESALQ 818 + IMI CONTRA FÊMEAS DA LINHAGEM ROCKEFELLER

Os mosquitos alimentados com sangue e expostos ao isolado ESALQ 818 + IMI apresentaram taxas de sobrevivência significativamente menores [$F_{(7,23)} = 248,64$; $p < 0,01$] comparado com a sobrevivência dos mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos a ESALQ 818 + TW (Tabela 6). O valor de S_{50} no tratamento ESALQ 818 + TW foi de 6 dias e no teste ESALQ818 + IMI foi de 3 dias (Tabela 6).

A Figura 9 mostra a sobrevivência diária das fêmeas alimentadas com sacarose ou sangue e expostas ao isolado ESALQ818 + IMI ou ESALQ 818 + TW.

Tabela 6 – Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas (linhagem Rockefeller) alimentadas com sacarose ou sangue e expostas ao isolado ESALQ 818 + TW ou ESALQ 818+IMI durante dois diferentes tempos após a alimentação sanguínea: 0 e 48 horas, e após a alimentação com sacarose

Tratamentos	% Média de Sobrevivência \pm DP	S_{50}
CONT SAC	77,7 \pm 3,62 a	NA
CONT SAN	82,2 \pm 2,98 a	NA
CONT SAN + IMI	78,8 \pm 3,42 a	NA
SAC + ESALQ 818	23,3 \pm 9,85 c	3
SAN 0h + ESALQ 818	41,1 \pm 6,99 b	6
SAN 48h + ESALQ 818	43,3 \pm 6,11 b	6
SAN 0h + ESALQ 818 + IMI	18,8 \pm 10,7 c	3
SAN 48h + ESALQ 818 + IMI	20 \pm 11,07 c	3

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: Dados não determinados; SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue; CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. Teste avaliado por 7 dias.

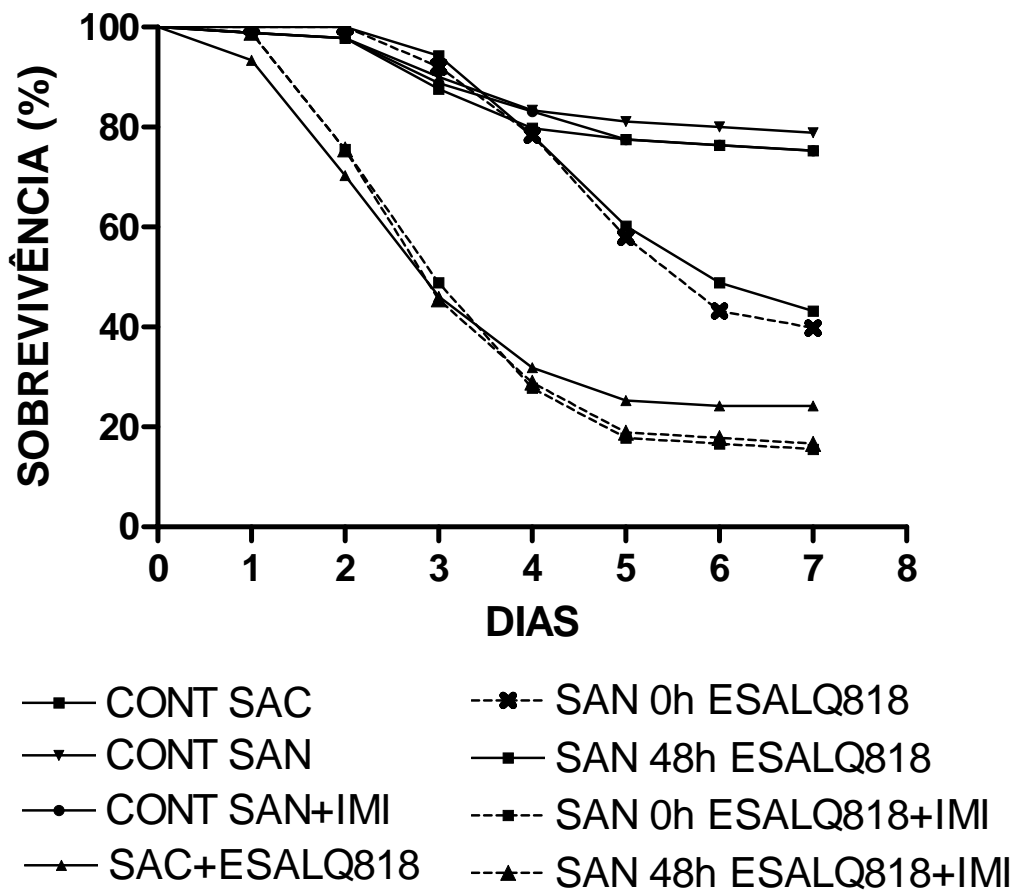


Figure 9. Sobrevivência (%) dos mosquitos (linhagem Rockefeller) expostos ao isolado ESALQ818+IMI ou ESALQ818 + TW, depois de 0 e 48 horas após a alimentação com sangue, e após a alimentação com sacarose. SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue; CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. CONT+SAN+IMI: Mosquitos alimentados com sangue e expostos somente a IMI. Teste avaliado por 7 dias.

5.5.2 – VIRULÊNCIA DA COMBINAÇÃO ESALQ 818 + IMI CONTRA FÊMEAS ORIUNDAS DE OVOS COLETADOS NO CAMPO

As fêmeas do campo expostas ao isolado ESALQ 818 + IMI, 0 e 48 horas pós-alimentação sanguínea, apresentaram taxas de sobrevivência significativamente menores [$F_{(5;17)}=176,18$; $p<0,0$] comparado com a sobrevivência das fêmeas alimentadas com sangue ou sacarose e expostas somente ao ESALQ 818 (Tabela 7; Figura10).

Tabela 7 – Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas do campo alimentadas com sacarose ou sangue e expostas ao isolado ESLAQ 818 + TW ou ESALQ 818+IMI durante dois diferentes tempos após a alimentação sanguínea: 0 e 48 horas, e após a alimentação com sacarose

Tratamentos	% Média de Sobrevivência \pm DP	S_{50}
CONT SAC	75,5 \pm 2,98 a	NA
CONT SAN	77,7 \pm 3,43 a	NA
CONT SAN + IMI	73,3 \pm 4,03 a	NA
SAC + ESALQ 818	34 \pm 10,27 c	5
SAN 0h + ESALQ 818	48,8 \pm 7,18 b	6
SAN 48h + ESALQ 818	45,5 \pm 6,58 b	6
SAN 0h + ESALQ 818 + IMI	31,1 \pm 9,45 c	5
SAN 48h + ESALQ 818 + IMI	28,8 \pm 10,35 c	5

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: Dados não determinados; SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue; CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. Teste avaliado por 7 dias.

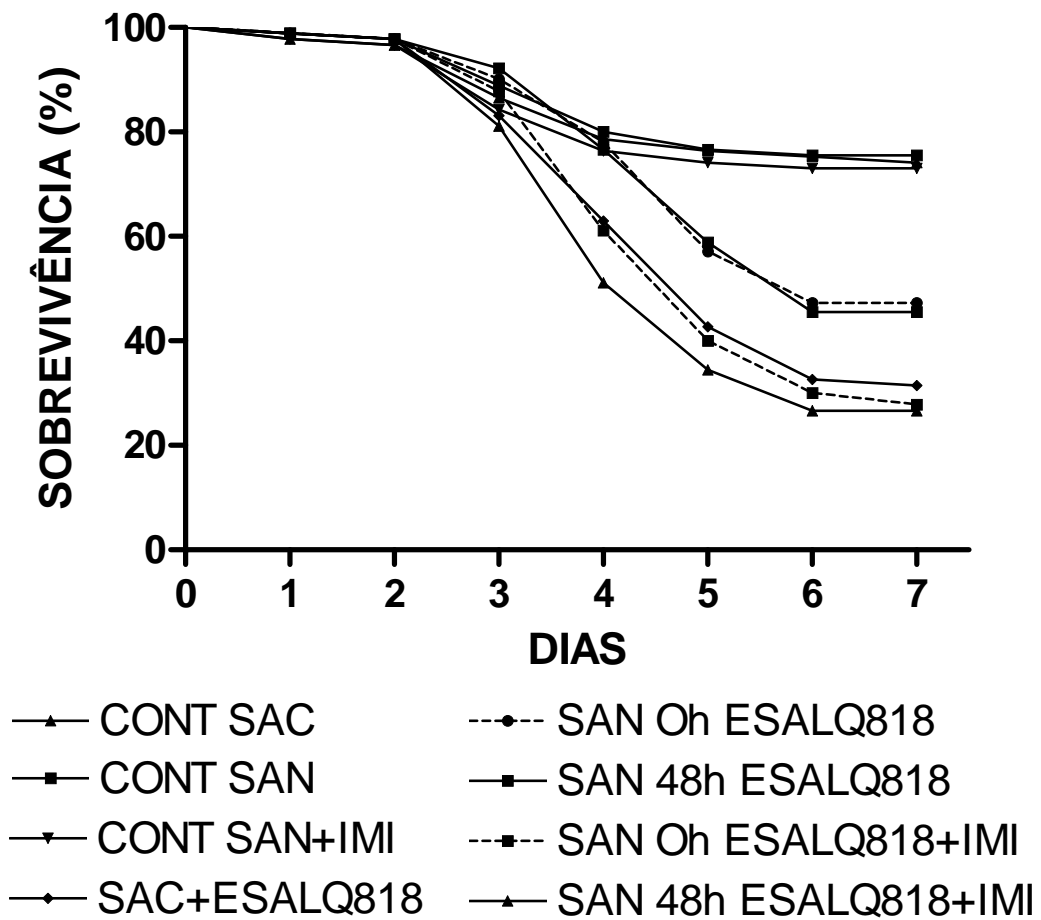


Figure 10. Sobrevivência (%) dos mosquitos do campo expostos ao isolado ESALQ 818 ou à combinação ESALQ818+IMI 0 e 48 horas pós-alimentação com sangue, e após a alimentação com sacarose. SAC: Alimentação com sacarose; SAN: Alimentação com sangue; CONT: Mosquitos alimentados com sacarose ou sangue e expostos ao TW. CONT+SAN+IMI: Mosquitos alimentados com sangue e expostos somente a IMI. Teste avaliado por 7 dias.

5.6 - TESTE EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO

Este teste visou avaliar as taxas de sobrevivência das fêmeas (linhagem Rockefeller) expostas a um pano preto impregnado com o fungo. Os mosquitos foram expostos ao pano preto por tempos determinados em cada experimento. A avaliação da sobrevivência dos mosquitos foi feita diariamente por 7 dias. O pano foi banhado em 200 mL de uma suspensão do fungo (1×10^9 conídios mL^{-1}). A concentração final dos conídios no pano foi de 1×10^8 conídios cm^2 .

5.6.1 – TESTES FEITOS EM GAIOLA GRANDE

A Figura 11 mostra as taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos por quatro tempos (3, 12, 24 e 48 horas) a um pano preto impregnado com isolado ESALQ 818 + TW. O tratamento controle foi feito somente com TW.

Todos os tempos de exposição apresentaram taxas de sobrevivência significativamente diferentes entre si e entre o grupo controle [$F_{(4,14)} = 100,19$; $p < 0,01$] exceto a comparação 3 horas de exposição com o grupo controle ($p > 0,01$).

A exposição dos mosquitos por 48 horas ao pano preto resultou na menor taxa de sobrevivência (12%) e o menor valor do S_{50} (2 dias), enquanto o tratamento 3 horas de exposição dos mosquitos ao pano apresentou a maior taxa de sobrevivência (73%) de *A. aegypti* (Tabela 8).

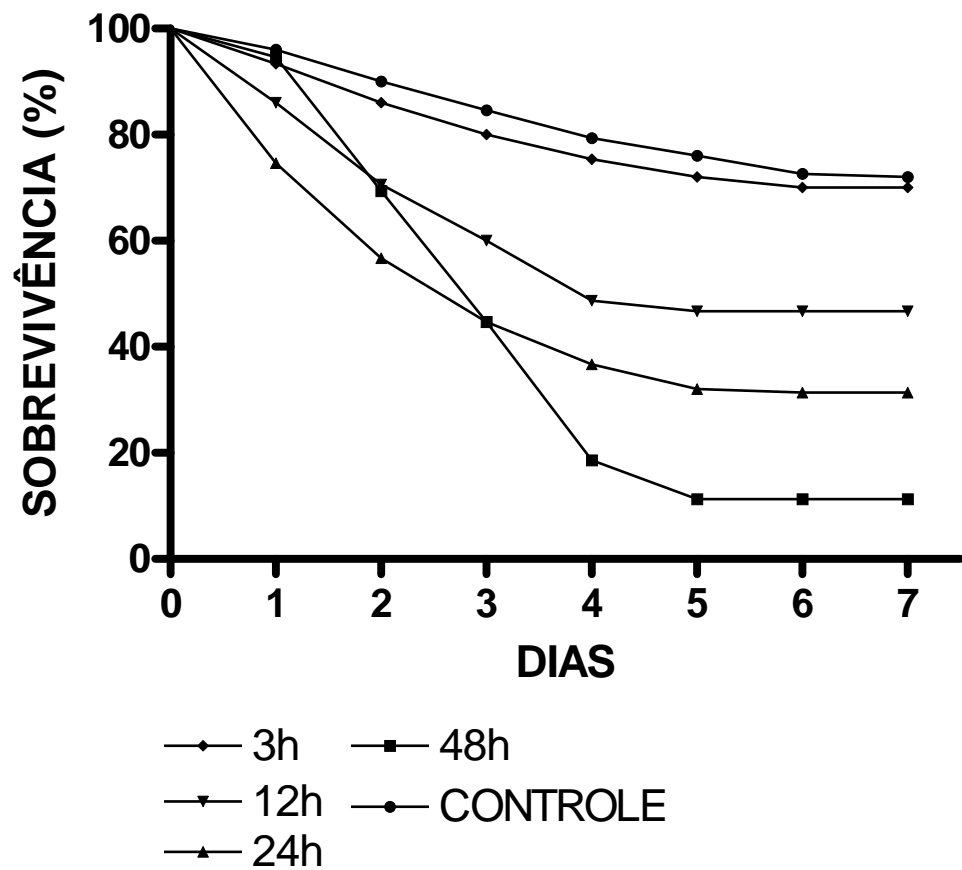


Figure 11 – Sobrevivência (%) das fêmeas (linhagem Rockefeller) expostas a um pano preto impregnado com o isolado ESALQ 818. A curva de sobrevivência do controle é uma média de todos os grupos controle. O controle foi feito com somente 0,05% Tween 80.

Tabela 8 – Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) e Tempo Médio de Sobrevivência (S_{50}) das fêmeas (linhagem Rockefeller) expostas por quatro tempos 3, 12, 24 e 48 horas a um pano preto impregnado com isolado ESALQ 818.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (H)	% MÉDIA DE SOBREVIVÊNCIA \pm DP	S_{50}
CONTROLE	76 \pm 3,52 a	ND
3h	73 \pm 3,49 a	ND
12h	47 \pm 10,08 b	4
24h	31 \pm 14,30 c	3
48h	12 \pm 33,27 d	2

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: Dados não determinados.

5.6.2 – TESTES DE VIRULÊNCIA DO FUNGO EM UMA SIMULAÇÃO DE UM CÔMODO RESIDENCIAL

Na simulação feita de um cômodo residencial, cinco panos pretos foram impregnados com o isolado ESALQ 818 ou com a combinação do isolado ESALQ 818 com 0,1ppm ou 10ppm do IMI. Os panos pretos foram fixados em vários móveis e fêmeas de *A. aegypti* foram liberadas na sala durante 7 dias.

O tratamento feito com pano preto impregnado somente com ESALQ818 resultou em 44% de mosquitos vivos, enquanto o grupo controle apresentou 76% de sobrevivência dos insetos (Tabela 9).

A análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Duncan mostraram que o tratamento ESALQ 818 + 10ppm apresentou a menor porcentagem de sobrevivência dos mosquitos (38,3%), comparado com os tratamentos ESALQ 818 (44%) e ESALQ 818 + 0,1ppm IMI (43,3%) [$F_{(6,20)} = 176,79$; $p < 0,01$; Tabela 9].

Tabela 9 – Sobrevivência (%) \pm Desvio Padrão (DP) das fêmeas (linhagem Rockefeller) expostas a cinco panos pretos impregnados com o isolado ESALQ 818 ou ESALQ 818 + IMI

Tratamento Fungo / Fungo+IMI	% Média de Sobrevivência \pm DP
CONTROLE TW	76 \pm 1,41 a
CONTROLE 0,1 ppm	74 \pm 1,11 a
CONTROLE 10 ppm	73 \pm 0,70 a
ESALQ 818 + TW	44 \pm 1,52 bc
ESALQ 818 + 0,1ppm	43,3 \pm 0,57 c
ESALQ 818 + 10ppm	38,3 \pm 1,02 d

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: Dados não determinados.

Os testes não foram avaliados diariamente, portanto o valor do S_{50} não foi calculado. A média da temperatura e umidade dentro do cômodo foi de 26 °C, 71 \pm 7% UR e fotofase de 12h.

6. DISCUSSÃO

Os fungos entomopatogênicos têm sido considerados potenciais candidatos para o controle do mosquito adulto *A. aegypti* (Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Paula et al., 2011). O presente estudo, primeiramente, observou a toxicidade do inseticida químico Imidacloprid (IMI) aos adultos de *A. aegypti*. O valor da CL_{50} foi de 4ppm, a concentração subletal foi de 0,1 ppm. A concentração subletal do IMI foi combinada com o isolado LPP 133 (LPP 133+IMI). Os mosquitos expostos por 12 e 6 horas à combinação LPP133+IMI apresentam taxas de sobrevivência significativamente menores comparado com a sobrevivência dos insetos expostos a somente LPP 133 ($p < 0,01$; Tabela 3). Um curto tempo de exposição dos mosquitos a LPP 133+IMI (3h de exposição) não resultou em taxas de sobrevivência significativamente diferentes, comparado com o tratamento de apenas LPP133 ($p > 0,01$; Tabela 3).

O IMI foi considerado tóxico às larvas (Paul et al., 2006) e aos adultos (Paul et al., 2006; Pridgeon et al., 2008) do mosquito *A. aegypti*, entretanto nenhum estudo havia investigado uma combinação de IMI e fungos entomopatogênicos contra mosquitos vetores. Concentrações subletais de inseticidas químicos têm a capacidade de aumentar o estresse e alterar o comportamento dos insetos melhorando a eficiência dos entomopatógenos (Boucias et al., 1996). Quintela & McCoy, 1997 observaram os efeitos sinérgicos de um fungo entomopatogênico combinado com IMI contra o Coleoptera:

Curculionidae, *Diaprepes abbreviatus*. O inseticida imidacloprid aumentou a suscetibilidade de *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) ao fungo *M. anisopliae* (Ramakrishnan et al., 1999).

Os efeitos da combinação de fungos entomopatogênicos com o inseticida permetrina foram recentemente estudados para o controle do mosquito da malária, *Anopheles funestus*, *A. arabiensis*, *A. gambiae*. Os mosquitos pré-infectados com *B. bassiana* ou *M. anisopliae* e depois expostos à permetrina tiveram significativas taxas de mortalidade, comparado com os mosquitos expostos somente à permetrina (Farenhorst et al., 2009), entretanto a mortalidade dos mosquitos expostos a somente fungo não foi observada. Outro estudo investigou os efeitos do fungo impregnado em telas de janelas, em conjunto com mosquiteiras tratadas com permetrina contra o mosquito *Culex quinquefasciatus* (Howard et al., 2010b). Apenas uma modificação de comportamento foi observada, em que *C. quinquefasciatus* significativamente reduziu a alimentação de sangue.

No atual estudo, a combinação do fungo com a concentração subletal do IMI (LPP 133+IMI) reduziu as taxas de sobrevivência e também o valor do S_{50} . Os mosquitos expostos por 12 horas ao LPP 133+IMI apresentaram um S_{50} de 2 dias, enquanto os insetos expostos a somente LPP 133 apresentaram S_{50} de 3 dias (Tabela 3). Estudos de infecções fúngicas do mosquitos da malária têm mostrado que mudanças relativamente pequenas nas taxas de sobrevivência foram suficientes para reduzir significativamente a capacidade vetorial (Thomas & Read, 2007). Testes de campo poderão comprovar se a combinação LPP 133+IMI diminuirá a população de *A. aegypti* e, conseqüentemente, a transmissão do vírus da dengue.

É possível que os peptídeos tóxicos, como as destruxinas, produzidas por alguns isolados de *M. anisopliae* (Samuels et al., 1988) inibam o desenvolvimento de micro-organismos na hemolinfa dos insetos. Kopecky et al. (1992) observaram que as destruxinas inibiram a replicação viral em células do *Aedes albopictus* *in vitro*. Com isso, supõe-se que peptídeos secretados pelos isolados de *M. anisopliae* durante a colonização do hospedeiro reduzam a capacidade vetorial dos mosquitos. Entretanto, como nem todos os isolados de *M. anisopliae* produzem destruxinas seria interessante correlacionar inibição da replicação do vírus da dengue ou do desenvolvimento do plasmódio no caso de infecção de

Anopheles. Tornando-se importante selecionar com cuidado os isolados dos fungos não só considerando a virulência. Interessantemente, infecções fúngicas prejudicam a maturação do protozoário *Plasmodium* no mosquito *Anopheles* (Blanford et al., 2005).

Talvez mosquitos infectados com o vírus da dengue sejam mais suscetíveis aos fungos, comparado com mosquitos não infectados. Sim & Dimopoulos (2010) notaram que o mosquito *A. aegypti* infectado com o vírus tornou-se imunocomprometido devido à baixa na regulação (“*down regulation*”) de numerosos sinalisadores imuno-moleculares e de peptídeos antimicrobianos.

O fungo foi igualmente virulento ao mosquito *Anopheles* resistente aos inseticidas e aos mosquitos *Anopheles* não resistentes (Farenhorst et al., 2009). Howard et al. (2010a) mostraram que o fungo foi mais virulento ao mosquito *A. gambiae* resistente a piretroides, comparado às linhagens não resistentes, porém, como duas linhagens diferentes foram usadas, torna-se difícil fazer esse tipo de comparação.

Os fungos entomopatogênicos devem ser virulentos aos mosquitos adultos independente da idade (Mnyone et al., 2011), do sexo (Scholte et al., 2007) e do estado fisiológico. Entretanto, o atual estudo observou que os mosquitos *A. aegypti* alimentados com sangue foram menos suscetíveis ao fungo *M. anisopliae*, comparado com as fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ($p < 0,01$; Tabela 4).

Os mosquitos *A. aegypti* da linhagem Rockefeller expostos aos isolados LPP 133 ou ESALQ 818 a 0, 24, 48 e 72 horas pós-alimentação sanguínea tiveram taxas de sobrevivência significativamente maior, comparado com a sobrevivência dos mosquitos alimentados com sacarose e imediatamente expostos aos mesmos isolados ($p < 0,01$; Tabela 4). Os mosquitos alimentados com sangue só voltaram a ser suscetíveis aos isolados a 96, 120 e 144 horas pós-alimentação com sangue (Tabela 4).

Um recente estudo verificou que os mosquitos *Anopheles* alimentados com sangue foram menos suscetíveis ao fungo do que os mosquitos alimentados com sacarose (Mnyone et al., 2011), entretanto não foi observado quanto tempo depois da ingestão do sangue, as fêmeas voltaram a ser suscetíveis ao fungo.

A alimentação com sangue pode diminuir a virulência do fungo devido à capacidade do hospedeiro de ativar uma resposta imune ou, inversamente, alterar

o nível de nutrientes disponíveis para propagação do patógeno (Mnyone et al., 2011). Os triatomíneos *Rhodnius prolixus* alimentados com sangue mostraram maior resposta imune à infecção por *Enterobacter cloacae*, em comparação aos *R. prolixus* alimentados com plasma (Feder et al., 1997). A alimentação dos mosquitos *A. stephens* com sangue, associado diariamente à alimentação com sacarose aumentou significativamente a cascata de melanização, ou seja, a defesa imunológica do mosquito contra micro-organismos (Koella et al., 2002).

Os estudos observando os efeitos da alimentação sanguínea na longevidade dos mosquitos têm sido contraditórios (Mnyone et al., 2011). Uma das hipóteses é que os mosquitos que se alimentam somente de sangue sobrevivem menos porque ocorre o desvio de nutrientes para a produção dos ovos (Okech et al., 2003). Outros experimentos registraram que a alimentação sanguínea aumentou significativamente a sobrevivência dos mosquitos, comparado com alimentação com açúcar (Scott et al., 1993; Scott et al., 1997; Styer et al., 2007). No presente trabalho foi observado aumento da sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue+sacarose (uma vez com sangue e posteriormente com sacarose), comparado com a sobrevivência das fêmeas alimentadas diariamente com sacarose. Okech et al., 2003 observaram que a alimentação sangue+sacarose propiciou maior longevidade às fêmeas de *A. gambiae*, aumentando seu potencial para transmitir malária. No campo tem sido raro capturar fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com frutose, indicando que as fêmeas silvestres de *A. aegypti* não têm que necessariamente se alimentar de açúcar para sobreviver e reproduzir (Edman et al., 1992, Van Handel et al., 1988, Costero et al., 1998).

A digestão do sangue é importante para o desenvolvimento do parasita nos mosquitos (Muller et al., 1993). A tripsina, enzima digestiva, ativa quitinases responsáveis pela infecção de *P. gallinaceum* no mosquito *A. aegypti* (Shahabuddin et al., 1996). A inibição da tripsina diminui significativamente a carga infectiva do vírus da dengue em *A. aegypti* (Molina-Cruz et al., 2005). Richman et al. (1997) observaram que o desenvolvimento de *Plasmodium* no mosquito *A. gambiae* desencadeou significativamente a expressão de defensinas que são peptídeos antimicrobianos.

Os mosquitos *A. gambiae* depois de alimentados com sangue sofrem uma série de mudanças fisiológicas com expressões de genes relacionados à

formação da matriz peritrófica, digestão, ao desenvolvimento do ovo e imunidade (Danna et al., 2005). Kokoza et al. (2000) observaram altos níveis de defensinas em *A. aegypti* 24 horas após a alimentação com sangue. Os peptídeos e proteínas antimicrobianas levam de 1-3 horas para serem produzidos e de 12 a 48 horas para atingirem o pico máximo (Haine et al., 2008). No atual trabalho as fêmeas só voltaram a ser suscetíveis ao fungo 96 horas depois da alimentação com sangue, quando possivelmente o sistema imunológico do mosquito voltaria ao estado pré-alimentação sanguínea.

Shin et al. (2006) verificaram que a via Toll e citocina foram responsáveis por respostas antifúngicas em *A. aegypti*. Os fungos entomopatogênicos produzem uma série de metabólitos secundários que interrompem respostas imunológicas nos insetos (Gillespie et al., 2000). Pal et al. (2007) observaram que a destruxina produzida pelo fungo *M. anisopliae* inibiu a imunidade inata de *Drosophila melanogaster*. Sugere-se que futuros trabalhos investiguem a expressão de proteínas e peptídeos antifungos entomopatogênicos em *A. aegypti* depois da alimentação sanguínea.

A seleção de fungos altamente virulentos deve ser feita principalmente para o controle de *A. aegypti* que tem período de desenvolvimento do vírus curto, por volta de 7 dias (Salazar et al., 2007). No sétimo dia as fêmeas se tornam infectantes e permanecem disseminando o vírus em cada alimentação sanguínea (Consoli et al., 1998). O fungo entomopatogênico germina de 6 a 12 horas depois da adesão no tegumento do inseto e penetra por volta de 12 a 24 horas (Neves et al., 2004). A morte dos mosquitos pode ocorrer em 3-14 dias (Knols et al., 2010) estimulando o desenvolvimento de agentes biológicos que matem os insetos mais rapidamente. A mortalidade de um vetor deve ocorrer antes que a parasita desenvolva formas infectantes.

No atual estudo, no sétimo dia de avaliação, foi observada significativa mortalidade de *A. aegypti* alimentados com sacarose ou sangue, ressaltando o potencial do fungo para o controle de mosquitos. Os maiores valores do S_{50} foram de 6 dias, menor que o período de desenvolvimento do vírus da dengue (Salazar et al., 2007). Não houve diferença nos valores do S_{50} , comparando o isolado LPP 133 com ESALQ 818, exceto nos tratamentos zero e 72 horas pós-alimentação sanguínea, e subsequente exposição ao fungo (Tabela 4).

As fêmeas oriundas do campo, alimentadas com sangue e expostas ao isolado ESALQ 818, tiveram taxas de sobrevivência significativamente maior comparado com fêmeas do campo alimentadas com sacarose ($p < 0,01$; Tabela 5), exceto no tratamento SAN 120h+ESALQ818 ($p > 0,01$), indicando que 120 horas pós-alimentação com sangue as fêmeas voltaram a ser suscetíveis ao fungo.

O valor do S_{50} das fêmeas do campo alimentadas com sacarose foi maior, comparado com os mosquitos criados em laboratório (linhagem Rockefeller), sendo 5 e 3 dias, respectivamente. Provavelmente as fêmeas do campo estão sujeitas à maior pressão de seleção, o que resulta em maior diversidade genética e imunidade, comparado com as fêmeas criadas em laboratório.

Como foi previamente descrito, os mosquitos alimentados com sangue foram menos suscetíveis à infecção com o fungo entomopatogênico, comparado com os mosquitos alimentados com sacarose (Tabela 4), portanto o presente estudo observou a suscetibilidade dos mosquitos alimentados com sangue depois de expostos ao fungo combinado com concentração subletal do IMI. Foi observado que as fêmeas de *A. aegypti* expostas ao isolado ESALQ818+IMI a 0 e 48 horas pós-alimentação sanguínea, apresentaram taxas de sobrevivência iguais à sobrevivência das fêmeas alimentadas com sacarose expostas ao ESALQ 818. O fungo combinado com a concentração subletal do IMI foi virulento às fêmeas de *A. aegypti*, indicando que essa combinação poderia ser usada em testes de campo, reduzindo a população de mosquitos independente do estado nutricional.

Vários estudos têm mostrado que cortinas e panos pretos impregnados com inseticida (Gimnig et al., 2003; Kroeger et al., 2006) ou fungos entomopatogênicos (Scholte et al., 2005; Paula et al., 2008; Lwetoijera et al., 2010; Mnyone et al., 2010) causaram significativa mortalidade de mosquitos, sendo potenciais ferramentas para o controle de vetores em campo.

Nos testes de semi-campo do atual trabalho os mosquitos foram expostos a um pano preto impregnado com isolado ESALQ 818 por quatro tempos: 3, 12, 24 e 48 horas. A menor porcentagem de sobrevivência (12%) e o menor valor do S_{50} (2 dias) ocorreram quando os mosquitos foram expostos ao pano+ESALQ 818 por 48 horas (Tabela 8). A sobrevivência dos mosquitos expostos por 12, 24 e 48 horas ao pano+ESALQ 818 diferiu significativamente entre si. As taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos por 3 horas ao pano+ESALQ 818 não foram significativamente diferentes da sobrevivência do grupo controle (Tabela 8).

Com o objetivo de atrair e manter os mosquitos descansando por mais tempo no pano, nosso grupo fixou um atrativo no pano (BG Lure™; Biogents Ltd.), porém não foi observado aumento da mortalidade (dados não publicados). Scholte et al. (2005) observaram, em condições de campo na África, que um pano preto impregnado com fungo e pendurado no teto de residências resultou em uma taxa de infecção de 23% de *A. gambiae*. Paula et al. (2008), em condições de semi-campo, mostraram que um pano preto pulverizado via Torre de Potter com o isolado LPP 133 e exposto por 48 horas aos mosquitos, resultou em 30% de sobrevivência de *A. aegypti*, com valor do S_{50} de 4 dias.

Os métodos contemporâneos e amplamente utilizados como a pulverização podem não ser eficaz para garantir a uniformidade dos conídios na superfície de descanso dos mosquitos (Farenhorst & Knols, 2010). No presente trabalho não foi observado significativa mortalidade de *A. aegypti* quando o isolado ESALQ 818 foi aplicado em um pano via pulverizador costal (Guarany®). No entanto, dados promissores foram observados com o pano preto banhando em 200 mL de suspensão de conídios a 1×10^9 conídios mL^{-1} . A persistência do fungo usando este método deve ser avaliada.

Outro fator a ser levado em consideração é a concentração de conídios nas superfícies usadas para o descanso dos mosquitos. Em nossos estudos anteriores, foi selecionada uma suspensão de conídios de 1×10^9 conídios mL^{-1} , que causou 70% de mortalidade de *A. aegypti* ao longo de um período de sete dias (Paula et al., 2008). No atual estudo, a diminuição da concentração da suspensão para 1×10^8 conídios mL^{-1} foi desfavorável para infecção dos insetos. Mnyone et al. (2009) observaram que concentrações crescentes de conídios não resultaram sempre em um aumento da mortalidade dos mosquitos *Anopheles*, a redução máxima nas taxas de sobrevivência ocorreu quando foi usado 2×10^{10} conídios m^2 .

A aplicação dos conídios no pano deve garantir a maior viabilidade do fungo. Formulações em óleo vegetal facilitam a aderência dos conídios (Scholte et al., 2005; Blanford et al., 2005), propiciam um microambiente que protege o fungo contra raios ultravioletas, desidratação, além de permitir a aplicação em ultrabaixo volume UBV (Prior et al., 1988; Batta, 2003). Atualmente a viabilidade, infectividade e persistência dos conídios em condições de campo são inadequadas, exigindo o desenvolvimento de formulações de longa duração,

matando os mosquitos, pelo menos, seis meses após a aplicação (Knols et al., 2010). Também deve ser levada em consideração a possibilidade da reaplicação do fungo nos panos pretos, reduzindo assim os gastos com material.

A perda da virulência do fungo nos panos tem sido documentada (Scholte et al., 2005; Farenhorst et al., 2008). No entanto, Mnyone et al. (2010) notaram que, apesar do declínio na virulência, a patogenicidade dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* durou por 28 dias nos panos.

Superfícies atrativas para o descanso dos mosquitos podem ser colocadas em residências humanas, especificamente em lugares sombreados, garagens, varandas, atrás de armários, embaixo de mesas e camas. Contudo, ainda não foram estudadas as consequências étnicas e médicas do uso do fungo em ambientes humanos (Lwetoijera et al., 2010).

Para ser usado no ambiente intradomiciliar o pano deve ser cortado em um tamanho que não incomode o morador. Nesse estudo foram usados panos pequenos de 20 x 10 cm que proporcionaram significativa mortalidade de *A. aegypti*. Panos pretos de 3m² como testado por Scholte et al. (2005), apesar de eficazes, não seriam adequados. Programas de educação esclarecendo a população do benefício do controle microbiano devem ser priorizados, garantindo a aceitação de novas estratégias para controle de vetores.

O uso de panos com fungos no ambiente extradomiciliar foi altamente eficaz para o controle de *Anopheles* (Lwetoijera et al., 2010), pode ser que o mesmo ocorra para o controle de *A. aegypti*, entretanto o presente trabalho não descartou a possibilidade do uso de panos pretos com fungos dentro de moradias humanas.

Em uma simulação de um cômodo residencial, o atual estudo observou a sobrevivência de *A. aegypti* expostos a cinco panos pretos impregnados com fungos. Os panos foram fixados embaixo de mesas, cadeiras e atrás de armários ficando expostos aos mosquitos durante sete dias. No sétimo dia os mosquitos vivos foram capturados com a armadilha BG-Sentinel. Foi observado que os mosquitos expostos aos panos pretos impregnados com o isolado ESALQ818 tiveram taxas de sobrevivência iguais à sobrevivência dos mosquitos expostos aos panos banhados com o isolado ESALQ818 + 0,1ppm IMI ($p > 0,01$; Tabela 9). A menor taxa de sobrevivência dos insetos (38,3%) ocorreu quando os panos pretos foram banhados com o isolado ESALQ818 + 10ppm IMI, indicando que

essa concentração deve ser usada em futuros experimentos de campo. A análise de variância dos percentuais de sobrevivência mostrou que o tratamento ESALQ818 + 10ppm foi significativamente diferente dos outros tratamentos ESALQ818 ou ESALQ818 + 0,1ppm ($p>0,01$).

Howard et al. (2010b) investigaram no campo o possível sinergismo do fungo entomopatogênico com permetrina, mas não observaram mortalidade dos mosquitos, o fungo foi impregnado em telas de janelas e o inseticida em mosquiteiras. Sabe-se que a radiação UV é altamente prejudicial aos conídios do fungo *M. anisopliae* (Morley-Davis et al., 1995). Portanto, os panos pretos impregnados com o fungo devem ser colocados em lugares sombreados, evitando os efeitos nocivos do UV.

Novos testes deverão avaliar se panos pretos impregnados com ESALQ818+IMI reduzirão a sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti* em condições de campo. Os isolados LPP 133 e ESALQ 818, ambos *M. anisopliae*, apresentaram sinergismo com 0,1ppm IMI, sendo virulentos contra fêmeas de *A. aegypti* independente do estado nutricional. A redução da sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* possivelmente reduzirá a incidência da dengue.

7. CONCLUSÕES

- O isolado LPP 133 combinado com 0,1ppm IMI reduziu significativamente as taxas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*, comparado com a sobrevivência das fêmeas infectadas somente com LPP 133;
- Até 72h pós-alimentação sanguínea os mosquitos *A. aegypti* linhagem Rockefeller foram menos suscetíveis aos isolados LPP 133 e ESALQ 818, comparado com os mosquitos alimentados somente com sacarose. Entretanto, 96 horas pós-alimentação sanguínea as fêmeas voltaram a ser suscetíveis ao fungo;
- As fêmeas do campo apresentaram menor suscetibilidade ao isolado ESALQ 818 a zero até 72h pós-alimentação sanguínea, comparado com as fêmeas alimentadas somente com sacarose. No entanto, 120 horas pós-alimentação com sangue as fêmeas voltaram a ser suscetíveis ao fungo;
- A combinação do isolado ESALQ 818 com 0,1ppm IMI foi altamente virulenta às fêmeas de *A. aegypti* independente do tipo de alimentação, sangue ou sacarose;

- Os mosquitos da linhagem Rockefeller e os mosquitos do campo foram altamente suscetíveis a uma combinação ESALQ 818+IMI independente do estado nutricional;
- Nos testes feitos em gaiolas grandes a exposição das fêmeas de *A. aegypti* a um pano preto impregnado com o isolado ESALQ 818 por 48 horas resultou na menor porcentagem de sobrevivência (12%) e menor S_{50} (2 dias), comparado com os outros tempos de exposições (3, 12, 24 horas);
- Nos experimentos conduzidos em uma sala simulando um cômodo residencial o tratamento feito com cinco panos pretos impregnados com ESALQ 818 + 10ppm IMI resultou na menor taxa de sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* (38%), comparado com os tratamentos ESALQ 818 ou ESALQ 818 + 0,1ppm IMI;
- A combinação do fungo entomopatogênico com o inseticida IMI foi altamente eficaz contra as fêmeas de *A. aegypti*, independente do estado nutricional. Panos pretos impregnados com fungo+IMI parecem ser promissores para serem usados em condições de campo, reduzindo a população de *A. aegypti* e possivelmente a transmissão do vírus da dengue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albernaz, D. A. Z., Tai, M. H. H., Luz, C. (2009) Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*. 23: 141–147.
- Alves, S. B. (1998) *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba. 1163p.
- Alves, S. B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R. M. Vieira, S. A. (2002) Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology*. 126: 504-509.
- Araújo, A. P., Santos, M. A. V., Carlos, S. O., Rios, E. M. M. M., R, L. (2007) Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biological Control*. 41: 339–347.
- Ball, T. S., Ritchie, S. R. (2010) Evaluation of BG-sentinel trap trapping efficacy for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in a visually competitive environment. *Journal of Medical Entomology*. 47(4): 657-63.

- Batista Filho, A., Almeida, J. E. M., Lamas, C. (2001) Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*. 30: 437-447.
- Batta, Y. A. (2003) Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphmycetes). *Crop Protection*. 22: 415-422.
- Becker, N. (2000) Bacterial control of vector mosquitoes and black flies. *In*: Charles J.F., Delécluse A., Leroux C.N., Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*. 45: 383-398.
- Becnel, J. J., White, S. E., Moser, B. A. Fukuda, T., Rotstein, M. J., Undeen, A. H. Cockburn, A. (2001) Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *C. quinquefasciatus*. *Journal of General Virology*. 82: 275-282.
- Bidochka, M. J., McDonald, M. A., St-Leger, R. J., Roberts, D. W. (1994) Differentiation of species and strains of entomopatogenic fungi by Randon Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*. 25: 07-113.
- Bischoff, J.f., Rehner, S. A., Humber, R. A., (2009) A multilocus phylogeny of *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*. 101 (4): 512-530.
- Blanford, S., Chan, B. H. K., Jenkins, N. Sim, D. Turner, R. J., Read, A. F. Thomas, M. B. (2005) Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*. 308: 1638–1641.
- Boucias D.G, Stokes C, Storey G, Pendland J.C. (1996) The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 49: 103-144.

- Braga, I. A., Lima, J. B. P., 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99 (2): 199-203.
- Braga, I.A., Gomes, A.C., Nelson, M.M., Mello, R.C.G., Bergamaschi, D.P., Souza, J.M.P. (2000) Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor populations of *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33 (4): 347-353.
- Bridge, P. D., Williams, M. A. J., Prior, C., Paterson, R. R. M. (1993) Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. favoviride*. *Journal of General Microbiology*. 139: 1163-1169.
- Brito, E. S., Paula, A. R., vieira, L. P., Dolinski, C., Samuels, R. I. (2008) Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*. 18 (7): 665 - 673.
- Bukhari, T., Middelman, A., Koenraadt, C. J. M., Takken, W. Knols, B. G. L. (2010) Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal*. 9 (22) 2-15.
- Butt T. M., Jackson C., Magan N. (2001). Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. <http://bookshop.cabi.org/Uploads/Books/PDF/9780851993560/>
- Campos J., Andrade C. F. S. (2001) Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*. 35 (3): 232-236.

- Carvalho M.S.L, Caldas E. D, Degallier N, Vilarinhos P. T. R, Souza L. C. K. R, Yoshizawa M. A. C, Knox M. B, Oliveira C. (2004) Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. *Revista Saúde Pública*. 38: 623-629.
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., Lindegren. (1968) Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to tree genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 11: 1-7.
- Clements, A. N. (1963) *The physiology of mosquitoes. International series of monographs on pure and applied biology*. The Macmillan Company–NY. 393p.
- Consoli, R. A. G. B., Oliveira R. L. (1998) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Reimpressão. 225p.
- Costa, G. L., Moraes, A. M. L., Galvão, C. (2003) Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. *Journal Basic Microbiology*. 43: 3-7.
- Costa, J. R. V., Rossi, J. R., Marucci, S. C., Alves, E. C., Volpe, H. X. L., Ferraudo, A. S., Lemos, M. V. F., Desiderio, J. A. (2010) Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Cculicidae). *Neotropical Entomology*. 39 (5): 757-766.
- Costero, A., G. M. Attardo, T. W. Scott, and J. D. Edman (1998) An experimental study on the detection of fructose in *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14: 234-242.
- Cruz I. (2002) *Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em Spodoptera frugiperda* (Smith). Embrapa Milho e Sorgo. 15p.
- Cruz, C. R. (2006) Comitê Infectologia Sociedade Paranaense de Pediatria. <http://www.spp.org.br/dengue.asp>. Acessado: 24/10/2009.

- Cypriano, M. B. C, Areia, P. A. V., Bifano, G. P. C., Paula, A. R., Samuels, R. I. (2010) Monitoramento do mosquito da dengue em residências do município de São João da Barra - RJ e participação da população na eliminação de criadouros do mosquito *Aedes aegypti*. II Mostra de Extensão IFF, UENF, UFF. Campos dos Goytacazes - RJ.
- da-Cunha MP, Lima JB, Brogdon WG, Moya GE, Valle D (2005) Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100: 441-444.
- Daoust, R. A., Roberts, D. W. (1982) Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larva. *Journal of Invertebrate Pathology*. 40: 107-117.
- Dana, A. N., Hong, Y. S., Kern, M. K., Hillenmeyer, M. E., Harker, B. W., Lobo, N. F., Hogan, J. R., Romans, P. e Collins, F. H. (2005) Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 2005,6:5 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/5>.
- de-Barjac, D. (1978). A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. (10): 797-800.
- Delécluse, A., Pérez V., Berry, C. (2000) Vector active toxins: structure and diversity. In: Charles, J.F., Delecluse, A., Leroux, C.N. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers. 101-126.
- Dimbi S., Maniania N. K., Lux S. A., Mueke J.M. (2003) Host species, age and sex as factors affecting the susceptibility of the African tephritid fruit fly species, *Ceratitis capitata*, *C. cosyra* and *C. fasciventris* to infection by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Pest Science*. 76:113–117.

- Donalísio M.R., Glasser C.M. (2002) Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 5: 259-272.
- Driver, F., Milner, R. J., Trueman, J. W. H., (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research. Cambridge*. 104: 134 - 150.
- Edman, J. D., D. Strickman, P. Kittayapong, and T. W. Scott (1992) Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. *Journal Medical Entomology*. 29: 1035-1038.
- Eiras, A. E., Resende, M.C. (2009) Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro*. 1: 45-58.
- Eiras, A. E. (2000) Culicidae. *In: Neves, David Pereira. Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 428 p.
- Elandt-Johnson R., Johnson N. L. (1980) *Survival models and data analysis*. John Wiley and Sons, New York 1980.
- Elbert A., Becker B., Hartwig J., Erdelen C. (1991) Imidacloprid - a new systemic insecticide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 44: 113-136.
- Espindola, C. B., Guedes, R. N., Souza, R. C. P. (2008) Avaliação da eficácia do *Bacillus thuringiensis var. israelensis* no controle de formas imaturas do *Aedes (stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em ambiente de laboratório. *EntomoBrasilis*. 1 (1): 10-13.
- Farenhorst, M., Knols, B. G. J (2010) A novel method for standardized application of fungal spore coatings for mosquito exposure bioassays. *Malaria Journal*. 9 (27) 1-13.

- Farenhorst M, Mouatchob J. C, Kikankieb C. K, Brookeb B. D, Hunt R. H, Thomas M. B, Koekemoerb L. L, Knols B. G. J, Coetzee M (2009) Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *PNAS*. 106: 17443–17447.
- Farenhorst M, Farina, D., Scholte, E. J., Takken, W., Hunt, R. H., Coetzen, M., Knols, B. G. J. (2008) African Water Storage Pots for the Delivery of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* to the Malaria Vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 78 (6): 910–916.
- Faria, M. R., Magalhães, B. P. (2001) O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento*. Brasília 2 (2): 18-21.
- Feder D., Mello C. B., Garcia E. S., Azambuja P. (1997) Immune responses in *Rhodnius prolixus*: influence of nutrition and ecdysone. *Journal of Insect Physiology*. 43:513–519.
- Ferron, P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. 23: 409-442.
- French-Constant, R. H. (2005) Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control. *Ecology and Evolution*. 20: 577-579.
- Fillinger, V., Knols, B. G. J., Becker, N. (2003) Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Tropical Medicine and International Health*. 8 (1) 37–47
- Focks, D. A. (2003) *A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors*. Gainesville, World Health Organization, 40 p.
- Focks, D. A. (2000) A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors: <http://www.ID-Analysis.com> em 10/10/09.

- Gallo, D., O. Nakano, S. S. Neto, R. P. L. Carvalho, G. C. Batista, E. B. Filho, J. R. P. Parra, R. A. Zucchi, S. B. Alves, J. D. Vendramim, L. C. Marchini, J. R. S. Lopes & C. Omoto (2002) *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Gary, R. E. J., Foster, W. A. (2001) Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal Medical Entomology*. 38: 22-28.
- Giannini, M. L. (2001) *Dengue hemorragica*. 2º ed. Editora Santos. 84p.
- Gillespie J. P, Burnett C., Charnley A. K (2000) The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Insect Physiology*. 46(4): 429-437.
- Gimnig, J. E., Kolczak, M., Hightower, A. E., Vulule, J. M., Schoute, E., Kamau, L., Phillips-Howard, P. A., Ter Kuile, F. T., Nahlen, B., Hawley, W. A. (2003) Effect of permethrin-treated bed nets on the spatial distribution of malaria vectors in western kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*., 68:115-120.
- Gindin, G., Ment, D., Rot, A., Glazer, I., Samish, M (2009) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to Tick Eggs and the Effect of Egg Cuticular Lipids on Conidia Development. *Journal of Medical Entomology*. 46 (3): 531-538.
- Glare, T. R., O'Callaghan, M. (2000) *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety Chichester: John Wiley & Sons. 350p.
- Goettel M. S. (1987) Preliminary field trials with the entomopathogenic hypmycete *Tolypodcladium cylindrosporium* in Central Alberta. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 3:239–245.

- Gomes, A. C., Silva, N. N., Bernal, R. T. I. (2008) Estimação da infestação predial por *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) por meio da armadilha Adultrap. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 17 (4): 293-300.
- Gomes, C. R. P., Cruz, E., Filartiga, D., Aquino, D: (2007) *Imunopatogenia da Dengue clássica e da dengue hemorrágica* In: Souza, L. J. *Dengue diagnóstico, tratamento e prevenção*. 1º Edição. Editora Rubio. 174p.
- Hagedorn, H. H., O'Connort, J. O., Fuchsf, M. S. Becky, S., Schlaegers, D. A. Bohm, M. K. (1975) The ovary as a source of ecdysone in an adult mosquito. *Science*. 72: 3255-3259.
- Haine, E. R., Pollitt, L. C., Moret, Y., Siva-Joty, M. T., Rolff, J (2008) Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*) *Journal of Insect Physiology*. 54. 10-90.
- Hiromori, H. and Nishigaki, J. (2001) Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Entomology Zoology*. 36: 321-236.
- Howard A. F. V., Koenraadt C. J. M., Farenhorst M., Knol B. G. J, Takken W (2010a) Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malaria Journal*. 9 (168) 2-9.
- Howard AFV, N'Guessan R, Koenraadt CJM, Asidi A, Farenhorst M, Akogbéto M, Thomas MB, Knols BGJ, Takken W. (2010b) The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors*. 3 (87) 2-11.
- Huang, Bo, Li, Chunru, Humber, K. T., Fan, M., Li, Z (2005) Molecular evidence for the taxonomic status of *Metarhizium taii* and its teleomorph, *Cordyceps taii* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Mycotaxon*. 94: 137-147.

- Ignoffo, C. M., Hostetter, D. L., Garcia, C., Pinnell, R. E (1975). Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomurae rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. *Entomology*. 4: 765-768.
- Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro: <http://www.ivdrj.ufrj.br>
Histórico. Acessado: 03/04/2006.
- James A. A. (2005) Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road. *Trends Parasitology*. 21: 64-67.
- Jaramillo, J., Borgemeister C., Ebssa, L., Gaigl, A., Tobón, R., Zimmermann G. (2005) Effects of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Foreschner (Hemiptera: Cydnidae). *Biological Control*. 34: 12-20.
- Kaur, J. S., Lai, Y. L., Giger, A. D. (2003) Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. *Medical and Veterinary Entomology*. 17: 457-460.
- Knols, B. G. J., Bukhari, T., Farenhost, M. (2010) Entomopathogenic fungi as the next-generation control agents against malaria mosquitoes. *Future Microbiol*. 5(3): 339–341.
- Koella, L. C., Sorensen, F. L. (2002) Effect of adult nutrition on the melanization immune response of the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology*. 16: 316 - 320.
- Kokoza V., Ahmed, A., Cho, W. L., Jasinskiene, N., James, A. A., Raikhel, A. (2000) Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PNAS*. 97(91): 44-49.

- Kroeger, A., Lenhart, A., Ochoa, M., Villegas, E., Levy, M., Alexander, N., McCall, P. J. (2006) Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela cluster randomized trials. *BMJ*. 332: 1-6.
- Kroeger A., Villegas E., Ordoñez-Gonzalez J., Pabon E, Scorza J. V. (2003) Prevention of the transmission of Chagas disease with pyrethroid-impregnated materials. *Journal Tropical Medicine*. 68: 307-11.
- Kroeger A, Villegas E, Morison L. (2002) Insecticide-impregnated curtains to control domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *BMJ*. 325: 810-813.
- Kroeger, A., Horstick, O., Riedl, C., Kaiser, A., Becker, N. (1995) The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropical*. 60: 47-57.
- Kurane I. & Eennis F. E. (1992) Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminars in Immunology*. 4: 121 – 127.
- Lacey, L. (1997) *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, Academic Press. 409p
- Lacey, L.A., Undeen, A. H. (1986) Microbial Control of Black Flies and Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*. 31: 265-296.
- Lacey, C. M., Lacey, L. A., Roberts, D. R. (1987) Route of invasion and histopathology of *Metharizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Jornal of Invertebrate Pathology*. 52: 108-118.
- Leles, R. N., Sousa, N. A., Rocha, L. F. N., Santos, A. H., Silva, H. H. G., Luz, C. (2010) Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 107: 1271-1274.

- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., Araújo, A. P., Silva, E. V. G., Silva, U. M., Oliveira, L. N., Santana, A. E., Barbosa, C. N., Neto, C. C. P., Goulart, M., Wilding, C. S., Ayres, C. F. J., Santos, M A. V. N. (2011) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*. 4 (5): 2-12.
- Luna J. E. D., Martins M. F., Anjos A., Kuwabara E. F., Navarro-Silva M. A. (2004) Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista Saúde Pública*. 38: 842-843.
- Luz 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*. *Epidemiology and Infection*. 137: 1203–1215
- Luz, C., Tai, M. H. H., Santos, A. H., Rocha, L. F. M., Albernaz, D. A. Z., Silva, H. H. G (2007) Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*. 44 (5) 799-804.
- Luz, C., Silvia, I. G., Magalhães, B. P., Cordeiro, C. M. T., Tigano, M. S. (1999) Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidar: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary Assays on Formulation and Application in the Field. *Anais Sociedade de Entomologia Brasileira* 28: 101 – 110.
- Lwetoijera, D. W., Sumaye, R. D., Madumla, E. P., Kavishe, D. R., Mnyone, L. L., Russell, T. L., Okumu, F. O. (2010) An extra-domiciliary method of delivering entomopathogenic fungus, *Metharizium anisopliae* IP 46 for controlling adult populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *Parasites & Vectors*. 3: 2-6.
- Mabaso, M. L., Sharp, B., Lingeler, C. (2004) *Tropical Medicine Health*. 846p.

- Maciel-de-Freitas, R., Peres, R.C., Alves, F., Bradolini, M.B. (2008) Mosquito traps designed to capture *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females: preliminary comparison of Adultrap, MosquiTRAP and backpack aspirator efficiency in a dengue-endemic area of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 103 (6): 602-605.
- Maciel-De-Freitas, R., Brocki Neto, R., Gonçalves, J.M., Codeço, C.T., Lourenço-de-Oliveira, R. (2006) Movement of dengue vectors between the human modified environment and urban forest in Rio de Janeiro. *Journal of Medical Entomology* 43: 1112-1120.
- Maniania, N. K. (1998) A Device for Infecting Adult Tsetse Flies, *Glossinaspp.*, with an Entomopathogenic Fungus in the Field. *Biological Control*. 11: 248–254.
- Marcondes, C.B. (2001) *Entomologia médica*. Rio de Janeiro, Atheneu, 432 p.
- Marcoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., Otrera, V. C. G., Carvalho, L. R. Brogdon, W. G. (2007) Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 102 (8): 895-900.
- Marcoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., Takaku, L., Classer, C. M., Garbeloto, V. C., Cirino, V. C. (1999) Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 33: 521-522.
- Marques, C. C. A.; Marques, G. R. A. M. M.; Brito, M., Neto, L. G. S., Ishobashi, V. C., Gomes, F. A. (1993) Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. *Revista de Saúde Pública*. 27 (4) 237-41.

- Marrelli M. T., Li C., Rasgon J. L., Jacobs-Lorena M (2007) Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *PNAS*. 104: 5580–5583.
- Martins, F., Silva, I. G. (2004) Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37 (2): 135-138.
- Ministério da Saúde – Funasa (2006) Programa nacional de controle da dengue. 37p.
- Ministério da Saúde – Funasa (2009) Programa nacional de controle da dengue. 38p.
- Ministério da Saúde – Funasa (2010) Programa Nacional de Controle da Dengue. 32p.
- Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Mpingwa, M. W., Lwetoijera, D. W., Knols, B. G. J., Takken, W., Koenraadt, C. J. M., Russell, T. L. (2011) Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol Ver*.108: 317–322.
- Mnyone L. L, Kirby M. J, Lwetoijera D. W, Mpingwa M. W, Knols B. G. J., Takken W, Russell T. L (2010) Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malaria Journal*. 9: 2-46.
- Mnyone L. L, Kirby M. J, Lwetoijera D. W, Mpingwa M. W, Knols B. G. J., Takken W, Russell T. L (2009) Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*. 8: 309-320.

- Moino Jr., A. & S. B. Alves. (1998) Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tennuis* (Hagen). *Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil*. 27: 611-620.
- Molina-Cruz A., Gupta, L. Richardson, J., Bennett, K., Blak, W. (2005) Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 72: 631-637.
- Montella I. R., Martins A. J., Viana-Medeiros P. F., Lima J. B., Braga I. A., Valle D (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77: 467-477.
- Moraes, A. G. M. L., Costa G. L., Barcelos M. Z. C., Oliveira R. L., Oliveira P. C. (2001) The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. In: Mosquitoes vectors of tropical diseases. *Journal of Basic Microbiology*. 1: 45-49.
- Morley-Davis J, Moore D, Prior C: (1995) Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycology*. 100: 31-38.
- Muller, H. M., Cramptom J. M., Torre, A. D., Sinden, R., Crisanti, A. (1993) Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *The EMBO Journal* 12 (7): 2891 -2900.
- Munguia, A. M. G., Hernandez, J. A. G., Tellez, E. A. R., Perez, M. A. R., Villanueva, F. R. (2011) Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Parasites & Vectors* 4: 1-24.
- Nahlen BL, Clark JP, Alnwick D. (2003) Insecticide-treated bednets. *Journal Tropical Medicine*. 68:1-2.

- Neto, A L. R., Oliveira, C. M. (1985) Controle biológico de culicídeos e simúlídeos inseticidas bacterianos. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. 37: 67-75.
- Neves, P. M. O. J., Alves, S. B. (2004) External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isopetra: Termitidae) by the entomopatogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Neotropical Entomology*. 33 (1): 051-056.
- Newton, E. A., Reiter P. (1992) A model of the transmission of dengue fever with and evaluation of the impact of ultra–low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *American Journal of Tropical Medicine e Hygiene*. 47: 709-20.
- Okech BA, Gouagna LC, Killeen GF, Knols BG, Kabiru EW, Beier JC, Yan G, Githure JI (2003) Influence of sugar availability and indoor microclimate on survival of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) under semifield conditions in western Kenya. *Journal Medical Entomology*. 40:657–663.
- Pal, S., St Leger, R.J., and Wu, L.P. (2007) Fungal peptide Destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 8969–8977.
- Paul A., Harrington L C., Scott J. G. (2006) Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 43: 55-62.
- Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2011a) Susceptibility of adult females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites & Vectors*. 4 (91): 2-7.

- Paula, A. R., Carolino, A. T., Paula, C. O., Samuels, R. I. (2011b) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the Dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Parasites & Vectors*. 4 (8): 2-8.
- Paula, A. R., Brito, E., Pereira, C., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science Technology*. 18: 1-21.
- Pedersen E. M, Mukoko D. A. (2002) Impact of insecticide-treated materials on filaria transmission by the various species of vector mosquito in Africa. *Journal Tropical Medicine*. 96: 91-5.
- Pereira, C. R., Paula, A. R., Gomes, S. A., Pedra Jr, P. C. O, Samuels, R.I. (2009) The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval. *Biocontrol Science and Technology*. 19:1-6.
- Polanczyk, R. A., Garcia, M. O., Alvez, S. B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*. 6: 813-816.
- Pridgeon J. W, Pereira R. M, Becnel J. J, Allan S. A, Clark G. G, Linthicum K. J (2008) Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 Pesticides with Different Modes of Action. *Journal Medical Entomology*. 45: 82-87.
- Prior, C., Jollands, P., Le Patourel, G. (1988) Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 52:66-72.

- Quintela E. D. & McCoy C. W. (1997) Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environmental Entomology*. 26: 1173-1182.
- Rawlins, S.C., Martinez, R., Wiltshire, R., Legall, G. (1998) Comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14: 131-136.
- Reiter P. & Nathan M. B. (2001) Guidelines for assessing the efficacy of insecticide space sprays for the control of the Dengue vector *Aedes aegypti*. http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CPE_PVC_2001.1.pdf.
- Reiter P. & Gubler D. J. (1997) Surveillance and control of urban dengue vectors. *In: Gubler DJ, Kuno G Editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever fever. New York: CAB International.* 45-60.
- Reithinger, R., Davies, C. R., Cadena, H., Alexander, B. (1997) Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against Phebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70:131-135.
- Riba, G., Keita, A., Soares, G. G. Jr. and Ferron, P. (1986) Comparative studies for *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvA. *Journal of Mosquito Control*. 2: 469-473.
- Richaman, A. M., Dimopoulos, G., Seeley, D. Kofatos, F. C. (1997) *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *The EMBO Journal*. 16 (20): 6114–6119.
- Ritchie, S. A., Ropley, L. P., Benjamin, S. (2010) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) Provides Residual Control of *Aedes aegypti* in Small Containers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82 (6): 1053-1059.

- Ritchie, S. A., Long, S., Smith, G., Pyke, A., Kmox, T. B. (2004) Entomological Investigation in a Focus of Dengue Transmission in Cairn, Queensland, Australia, by using the Stichy ovitraps. *Entomological Society of America*. 41: 1-4.
- Ritchie, S.A., Long, S., Hart, A., Webb, C.E., Russell, R.C. (2003) An adulticidal sticky ovitrap for sampling container breeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 19: 235-242.
- Ramakrishnan, R., Suiter, D. R., Nakatsu, C. H., Humber, R. A., Bennett, G. W. (1999) Imidacloprid-Enhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) Susceptibility to the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*. 92 (5) 1125-1132.
- Salazar M. I., Richardson J. H., Sanchez-Vargas I., Olson K. E., Beaty B. J (2007) Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*. 45: 7: 9.
- Samuels, R. I.; Charnley, A. K. & Reynolds, S. E. (1988) The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia*. 104: 51-58.
- Santos A, Oliveira B. L, Samuels R. I (2007) Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of Imidacloprid. *Mycopathology*. 63: 233-240.
- Scholte, E. J., Takken, W., Knols, B. G. J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *A. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. 102: 151-158.

- Scholte, E. J., Knols, B. G. J., Takken, W. (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91: 43-49.
- Scholte, E., Ng`habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G. F., Knols, B. G. J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*. 308: 1641– 642.
- Scholte, E., Knols, B. G., Takken, W. (2004) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the Malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*. 3: 1-6.
- Scholte E. J., Njiru B. N., Smallegange R. C., Takken W., Knols B. G (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*. 2: 29-38.
- Scott, T. W., A. C. Morrison, L. H. Lorenz, G. G. Clark, D. Strickman, P. Kittayapong, H. Zhou, and J. D. Edman. (2000) Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: population dynamics. *Journal Medical Entomology*. 37: 77-88.
- Scott T. W, Naksathit A., Day J. F., Kittayapong P., Edman J. D. (1997) A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 57: 235–239.
- Scott, T. W., E. Chow, E. Strickman, P. Kittayapong, R. A. Wirtz, L. H. Lorenz, and J. D. Edman. (1993) Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histological technique. *Journal Medical Entomology*. 30: 922-927.

- Shahabuddin, M., Lemos, F., Kaslow, D., Jacobs-Lorena, M. (1996) Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsins blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infective Immunology*. 64: 39-743.
- Shin, S. W., Brian, G., Raikel, A. S. (2006) A Toll receptor and a cytokine, Toll5A and Spz1C, are involved in Toll antifungal immune signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*. 28 (51): 39388 - 39395.
- Silva J. J, Mendes J. (2002) Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 679-682.
- Sim S. & Dimopoulos G. (2010) Dengue Virus Inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti* Cells. *Plos One*. 5 (5): 1-9.
- Strieder, M. N. (2005) Controle eficiente dos borrachudos. *Ciência Hoje*. 36: 70–71.
- Styer LM, Carey JR, Wang JL, Scott TW (2007) Mosquitoes do senesce: departure from the paradigm of constant mortality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76:111–117
- Tauil, P. L. (2002) Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*. 18 (3): 867-871.
- Teixeira, M. G., Barreto, M. L., Costa, M. C., Ferreira, L. D. A, Vasconcelos, P. F. C. (2002) Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. *Revista Brasileira de epidemiologia*. 5 (1) 109-115.
- Teixeira, M. G., Costa, M. C. N., Barreto, M. L., Barreto, F. (2001) Epidemiologia do dengue em Salvador- Bahia. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*. 34(3): 269-74.

- Teixeira, M. G., Barreto, M. L. (1996) Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. *Ciência & Saúde Coletiva*. 1: 122-35.
- Thomas M. B., Read A. F. (2007) Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*. 5: 377-383
- VanHandel, E., Day, J. F. (1988) Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field-collected *Aedes vexans*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 4: 549-50.
- Vianna, M. S. R. (2001) *A transmissão urbana da febre amarela e dengue*. *Saúde Rio*. Rio de Janeiro. 5p.
- Vilarinhos, P. T. R., Dias, J. M. C. S., Andrade, C. F. S., Araújo-Coutinho, C. J. P. C. (1998) Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlideos. *In: Alves, S. B. Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 447p.
- Wang, C., Powell, J. E. (2004) Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biological Control*. Orlando. 30 (2): 523-529.
- Wirth, M. C., Giannino, J. A., Federici, B. A., Walton, W. E. (2005) Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B. sphaericus*+Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 88: 154–162.
- Wirth, M. C., Georghiou, G. P., Federici, B. A. (1997) CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Agricultural Sciences*. 94: 10536–10540.

- World Health Organization (WHO): <http://www.who.int/en/> (acessado 14/10/2008)
- World Health Organization (WHO): <http://www.who.int/whopes/guidelines/en/> (accessed 10/12/2010)
- Yan, Y., Cail, S., Zheng, Y., Xi, L., Xi, X., Han, Y (2009) *Metarhizium taii* var. *chongqingensis* Nov., Anamorph of *Cordyceps chongqingensis* sp. Nov. Isolated from a Low Altitude Area in Chongqing, China. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=21356649> em 22/07/10.
- Zhou, G., Flowers, M., Friedrich, K., Horton, J., Pennington, J. and Wells, M. A. (2004) Metabolic fate of [¹⁴C]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Jornal of Insect Physiology*. 50: 337 -349.