

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE LARAVAS DE  
MOSQUITO *Aedes aegypti* COM FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS

**CÉSAR RONALD PEREIRA GOMES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO - 2009

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE LARAVAS DE  
MOSQUITO *Aedes aegypti* COM FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS

**CÉSAR RONALD PEREIRA GOMES**

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  
NOVEMBRO - 2009

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE LARAVAS DE  
MOSQUITO *Aedes aegypti* COM FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS

**CÉSAR RONALD PEREIRA GOMES**

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  
Comissão Examinadora:

---

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

---

Prof. Milton Erthal Junior (D.Sc., Produção Vegetal) - ISTCA-FAETEC

---

Prof. Claudio Luiz Melo de Souza (D.Sc., Produção Vegetal) - ISTCA-FAETEC

---

Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D., Entomologia) - UENF

Orientador

Dedico esse trabalho de conclusão de Doutorado à minha companheira Eida Albertini pelos nossos trinta anos de luta juntos desde nossa juventude, nas agruras do exílio, por sua incondicional solidariedade e companheirismo em todos os projetos aos quais dediquei minha vida profissional.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Richard Ian Samuels por tudo que aprendi sobre Controle Biológico de Vetores, mas principalmente por haver-me ensinado com seu exemplo pessoal que ser Mestre é muito mais do que proporcionar informações. Ser Mestre, ensinou-me a convivência com o Professor Richard, é sentir-se responsável pelo aprendizado, pelo crescimento científico e pela responsabilidade social de seus discípulos.

Ao Professor Franze por sua permanente atitude de estímulo e colaboração.

Ao Adriano de Paula, Paulo César Pedra Junior e Gilliana Neves por sua ajuda e companheirismo.

## SUMARIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>LISTA DE QUADROS</b> -----   | Vii           |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> -----   | ix            |
| <b>RESUMO</b> -----   | Xi            |
| <b>ABSTRACT</b> -----   | xiii          |
| <b>1 – INTRODUÇÃO</b> -----   | 1             |
| <b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> -----  | 4             |
| 2.1 - Dados Biológicos de <i>Aedes aegypti</i> -----  | 4             |
| 2.2 - Características do Vírus -----  | 12            |
| 2.3 - Controle Químico e Biológico de Vetores de Doenças -----                                      | 18            |
| 2.3.1 - Controle de <i>Aedes aegypti</i> -----  | 18            |
| 2.4 - Ecologia de Fungos na Agricultura e Saúde Humana -----  | 22            |
| 2.5 - Fungos Entomopatogênicos-----   | 23            |
| 2.6 - Utilização de Fungos Entomopatogênicos para o Controle<br>de Vetores de Doenças Humanas ----- | 26            |
| <b>3 – OBJETIVOS</b> -----  | 28            |
| 3.1 - Objetivo geral -----  | 28            |
| 3.2 - Objetivos específicos -----   | 28            |
| <b>4 – MATERIAL E MÉTODOS</b> -----   | 29            |
| 4.1 - Criação das Larvas de <i>Aedes aegypti</i> Linhagem Rockefeller -----                         | 29            |
| 4.2 – Bioensaio 1: Teste de Virulência larval -----   | 30            |
| 4.3 – Preparo das Suspensões de Fungo para os Experimentos<br>de Laboratório e de Semi-campo -----  | 31            |
| 4.4 – Bioensaio 2: Persistência da virulência da Suspensão do                                       | 32            |

|   |    |
|---|----|
| Fungo ESALQ 818 em Água. -----  |    |
| 4.5 – Bioensaio 3: Infecção das Larvas com Fungos em Arroz --   | 32 |
| 4.6 – Persistência da virulência do Fungo Crescidos e Aderidos<br>no Grão de Arroz. -----   | 33 |
| 4.7 – Virulência do Fungo Crescido e Aplicado em Grão de<br>Arroz em Condições de Semicampo para Larvas de <i>Aedes</i><br><i>aegypti</i> -----                   | 33 |
| 4.8 – Persistência da virulência do Fungo Crescido e Aderido<br>em Grãos de Arroz -----   | 34 |
| 4.9 – Efeitos do Fungo ESALQ 818 e LPP 133 no<br>Desenvolvimento de <i>Aedes aegypti</i> -----  | 34 |
| 4.10 – Virulência em Condições de Laboratório do Isolado<br>ESALQ 818 Contra Larvas Selvagens de <i>Aedes aegypti</i><br>oriundas de Ovos Colhidos no Campo ----- | 35 |
| 4.11 – Virulência do Fungo ESALQ 818 Crescido e Aplicado em<br>Grão de Arroz em Condições de Semi-campo para Larvas<br>Selvagens de <i>Aedes aegypti</i> . -----  | 36 |
| 4.12 – Avaliação da mortalidade das larvas -----  | 36 |
| 4.13 – Forma de Análise dos Resultados -----  | 36 |
| <b>5. RESULTADOS</b> -----  | 38 |
| 5.1 – Seleção em Laboratório de Fungos Virulentos para Larvas<br>de <i>Aedes aegypti</i> (Rockefeller ) -----   | 38 |
| 5.1.1 – Persistência em Água da Suspensão de Fungo<br>ESALQ 818 para Larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Rockefeller) ---   | 40 |
| 5.1.2 – Virulência do Fungo ESALQ 818 Crescido e<br>Aderido no Grão de Arroz para Larvas Rockefeller -----  | 42 |
| 5.1.3 – Persistência em Água do Fungo ESALQ 818<br>Crescido e Aderido no Grão de Arroz -----  | 42 |
| 5.2 – Testes de Semi-Campo com Larvas de <i>Aedes aegypti</i><br>(Rockefeller) --   | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 5.2.1 Virulência do ESALQ 818 Crescido e Aderido em duas Quantidades de Grão de Arroz para Larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Rockefeller) -----   | 44 |
| 5.2.2 Persistência em Água da Virulência do Fungo ESALQ 818 Crescidos e Aderidos em 20 Grãos de Arroz para Larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Rockefeller) -----                             | 45 |
| 5.3 - Virulencia do ESALQ 818 e LPP 133 Contra População Natural de Larvas <i>Aedes aegypti</i> em Laboratório - -----  | 46 |
| 5.3.1 – Virulência do ESALQ 818 para os Diversos Instares Larvais de <i>Aedes aegypti</i> -----   | 46 |
| 5.3.2 – Virulência de LPP 133 para os Diversos Instares Larvais de <i>Aedes aegypti</i> -----   | 46 |
| 5.4 Virulência de Diferentes Quantidades de ESALQ 818 Crescido e Aderido em Grão de Arroz Contra uma População Natural de Larvas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de Semi-campo ----- | 47 |
| 5.5 Influência da Infecção do ESALQ 818 no desenvolvimento de <i>Aedes aegypti</i> -----  | 49 |
| 5.6 Influência da Infecção do LPP 133 no desenvolvimento de <i>Aedes aegypti</i> -----  | 51 |
| <b>6 – DISCUSSÃO</b> -----  | 53 |
| <b>7 – CONCLUSÕES</b> -----   | 59 |
| <b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----   | 60 |



## LISTA DE QUADROS

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Tabela 1</b> – Isolados de fungos entomopatogênicos usados para virulência contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> . -----   | 30     |
| <b>Tabela 2</b> – Média de mortalidade (%) ± desvio padrão das larvas expostas por 8 dias a dois isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) e oito isolados de <i>Metarhizum anisopliae</i> (Ma).-----  | 39     |
| <b>Tabela 3</b> – Sobrevivência (SOBR) ± desvio padrão (DP) e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) das larvas expostas ao Fungo ESALQ 818+Tween inoculado na água por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5, 10 dias). O tratamento controle foi feito somente com Tween. -----                                    | 41     |
| <b>Tabela 4</b> – Taxa de sobrevivência ± desvio padrão (DP) e tempo médio sobrevivência ( $S_{50}$ ) das larvas expostas ao grão de arroz com ESALQ 818 inoculado em água por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5, 10 dias). O tratamento controle foi feito da mesma forma com arroz autoclavado e sem fungo. ----- | 43     |
| <b>Tabela 5</b> – Sobrevivência ± desvio padrão (DP) e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) das larvas exposta aos grãos de arroz com fungo mantidos em água por (Tempo zero, 5, 10 e 20 dias). -----  | 46     |
| <b>Tabela 6</b> - Porcentagens de mortalidade das larvas expostas a 10 e 20 grãos de arroz com fungo (% MORT. LARVAL) ± desvio padrão (DP) da mortalidade de larvas, porcentagem da formação de pupas   |        |

das larvas que não foram mortas pelo fungo.----- 48

**Tabela 7** - Porcentagem de mortalidade das larvas, pupas e adultos; formação de pupas e adultos e desvio padrão (DP) do tratamento fungo ESALQ 818 e tratamento controle.----- 50

**Tabela 8** - Porcentagem de mortalidade das larvas, pupas e adultos; formação de pupas e adultos de insetos tratamentos com fungo LPP 133 e os tratamentos controles.----- 52

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Figura 1</b> - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> -----  | 6      |
| <b>Figura 2</b> - Estrutura de <i>Flavivirus sp.</i> da dengue -----   | 13     |
| <b>Figura 3</b> - Notificações de dengue no Brasil de 1990 a 2008-----   | 16     |
| <b>Figura 4</b> – Casos de dengue notificados no Estado do Rio de Janeiro de 1986 a 2009 -----   | 17     |
| <b>Figura 5</b> - Sobrevivência das larvas tratadas com fungos entomopatogênicos e dos grupos controle com desvio padrão.-----   | 40     |
| <b>Figura 6</b> – Sobrevivência com desvio padrão das larvas expostas ao Fungo ESALQ 818+Tween armazenado em água por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5 e 10 dias) para a avaliação da patogenicidade do fungo.----- | 41     |
| <b>Figura 7</b> – Sobrevivência com desvio padrão das larvas colocadas na água com um grão de arroz do isolado ESALQ 818. O tratamento controle foi feito com um grão de arroz sem conídios e autoclavado. --            | 42     |
| <b>Figura 8</b> –Curvas de sobrevivência com desvio padrão das larvas expostas ao grão de arroz com o fungo ESALQ 818 por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5, 10 dias). -----   | 43     |
| <b>Figura 9</b> - Curvas de Sobrevivência com desvio padrão das larvas da linhagem Rockefeller expostas a diferentes quantidades de grãos de arroz (10 – 20 grãos) com fungos ESALQ 818. -----                           | 44     |
| <b>Figura 10</b> – Sobrevivência com desvio padrão das larvas expostas ao fungo inoculado em grãos de arroz que permaneceram em água   |        |

|  |    |
|--|----|
| por diferentes tempos (tempo zero, 5, 10, e 20 dias) -----   | 45 |
| <b>Figura 11</b> – Sobrevivência (%) dos diferentes instars larvais infectados com o isolado ESALQ 818. Os tratamentos controle foram feitos apenas com 0,05% Tween 80. -----                        | 46 |
| <b>Figura 12</b> - Porcentagem de sobrevivência dos diferentes instars larvais infectados com o isolado LPP 133 A + 0,05% Tween 80. O tratamento controle foi feito apenas com 0,05% Tween 80. ----- | 47 |
| <b>Figura 13</b> - Sobrevivência com desvio padrão da população de larvas do município de Campos dos Goytacazes expostas a diferentes quantidades de grãos de arroz (10 – 20 grãos de arroz). -----  | 48 |
| <b>Figura 14</b> – Desenvolvimento das larvas em pupas nos tratamentos feitos com o isolado ESALQ 818 e os tratamentos controle. -----   | 50 |
| -  |    |
| <b>Figura 15</b> – Desenvolvimento das larvas em pupas nos tratamentos feitos com o isolado LPP 133 e os tratamentos controle. -----   | 51 |

## RESUMO

PEREIRA GOMES, CÉSAR RONALD; D.Sc. ; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, novembro de 2009, Seleção e Formas de Inoculação de Fungos Entomopatogênicos para o Controle Biológico de *Aedes Aegypti* (Diptera:Culicidae). Professor orientador: Richard Ian Samuels. Professores Conselheiros: Francisco José Alves Lemos, Milton Erthal Junior, Claudio Luiz Melo de Souza.

Dengue é uma das mais sérias doenças transmitidas por mosquitos o que instiga pesquisas para novos métodos de controle do vetor *Aedes aegypti*. A patogenicidade e virulência de vários isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foram investigadas em laboratório contra larvas do 2º – 3º instares de *Ae. aegypti*. Suspensões de fungo foram adicionadas em copos de plásticos contendo as larvas dos mosquitos e a mortalidade foi monitorada diariamente. As larvas expostas aos diferentes isolados dos fungos tiveram de 6 a 90% de mortalidade. Três dos isolados foram considerados virulentos (CG24; CG114; ESALQ818) sem diferença estatisticamente significativa entre eles. As curvas de sobrevivência mostraram que o isolado CG 144 de *M. anisopliae* causou 50% mortalidade das larvas em 5 dias. Análise de Probit foi usada para estimar a concentração letal do CG144. Foi determinado que o valor do  $CL_{50}$  foi de  $3.16 \times 10^5$  conídios  $mL^{-1}$ . Numa segunda etapa foi avaliado a virulência e a persistência do fungo contra larvas da linhagem Rockefeller e larvas selvagens oriundas de ovos coletadas na Cidade de Campos dos Goytacazes, RJ. Este teste foi feito em condição de semi-campo. O presente estudo mostrou que o fungo ESALQ818 ( $1 \times 10^8$  conídios  $mL^{-1}$ ) manteve-se viável por 10 dias depois de inoculado em copos plásticos com 50 mL de água. Observações do desenvolvimento das larvas formando pupas, mostrou que aproximadamente 20% das pupas morreram, ou seja não resultaram em adultos. Entretanto, dos adultos emergindo das pupas, a longevidade foi considerada normal. O isolado LPP133 foi re-isolado de cadáveres de larvas de *Aedes aegypti*

e um aumento na virulência foi subsequentemente observado. O isolado originalmente causou 8% de mortalidade de larvas enquanto após o reisolamento, o fungo causou 60% mortalidade em 2 dias. Grãos de arroz com fungo aderido também foram usados para verificar a virulência e a persistência do fungo na água. Para isso foi testado a virulência dos conídios depois de diferentes tempos da sua permanência na água (Tempo zero, 5, 10 e 20 dias). Foi adicionado 1 grão de arroz em 50 mL de água para verificação da persistência. O tempo zero representou o controle “positivo” no sentido que as larvas são expostas ao fungo imediatamente. Foi observada uma queda na mortalidade conforme a passagem do tempo entre a inoculação do fungo na água e a adição das larvas. Os valores do tempo médio de sobrevivência das larvas ( $S_{50}$ ) aumentaram gradativamente, sendo de sete dias quando o fungo foi deixado na água por 10 dias antes de colocar as larvas. Porém, a mortalidade ainda foi considerada alta, com somente 25% de sobrevivência das larvas. Os próximos experimentos foram feitos para testar o uso do fungo aplicado nos grãos de arroz numa simulação de campo. Foi testado o efeito da inoculação de 10 e 20 grãos de arroz em 1 litro de água. O uso de 20 grãos de arroz foi mais eficiente do que 10 grãos, com 5% das larvas sobreviventes aos 7 dias do experimento. O valor de  $S_{50}$  foi o menor de todos os experimentos, sendo de um dia. Este resultado mostrou que o fungo pode ser promissor no controle biológico de larvas de *Ae. aegypti* quando inoculados em recipientes usados para a oviposição de fêmeas do mosquito. Este método reduziria a população deste inseto e portanto a incidência da Dengue.

## ABSTRACT

PEREIRA GOMES, CÉSAR RONALD; D.Sc. ; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, november 2009, Selection and forms of inoculation of fungal isolates for the biological control of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). Supervisor: Richard Ian Samuels. Committee Members: Francisco José Alves Lemos, Milton Erthal Junior, Claudio Luiz Melo de Souza.

Dengue is one of the most serious diseases transmitted by mosquito vectors and has lead to the search for new control methods for the vector *Aedes aegypti*. The pathogenicity and virulence of a range of entomopathogenic fungal isolates of the species *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* were tested under laboratory conditions against 2<sup>nd</sup> – 3<sup>rd</sup> instar *Ae. aegypti* larvae. Fungal suspensions were added to plastic cups containing larvae and the mortality was monitored on a daily basis. The larvae exposed to different isolates showed a range of virulence, with 6 to 90% mortality. Three of the isolates were considered virulent (CG24; CG114; ESALQ818) with no statistical difference between them. Survival curve analysis showed that isolate CG144 *M. anisopliae* caused 50% larval mortality within 5 days. Probit analysis showed that the LC<sub>50</sub> for CG144 was  $3.16 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>. In the next phase of the experiments, the virulence and persistence of the fungi were investigated using the Rockefeller strain and wild-type larvae, obtained from eggs collected in the city of Campos dos Goytacazes, RJ. Results showed that ESALQ818 ( $1 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) was viable for 10 days following inoculation in water. Observations of insect development of the larvae surviving to form pupae, showed approximately 20% mortality of these pupae, previously exposed to the fungus. However, adult emergence/longevity from surviving pupae was considered normal. Isolate LPP133 was re-isolated from *Aedes* larval cadavers and a significant increase in virulence was observed, originally this isolate caused 8% mortality, but following re-isolation, caused 60% mortality in 2 days. Rice grains on which the fungus had been cultivated were used in a simplified application technique, adding the rice grains to water

containing larvae. The persistence of the fungi thus applied was tested during a 20 day time period (time zero, 5, 10 and 20 days). For tests in plastic cups with 50 mL water, 1 rice grain was added to each cup. Survival curves showed that there was a gradual decline in virulence over time. The  $S_{50}$  values increased from 2 days for time zero (positive control) to 7 days following a 10 day incubation of the fungus in the water before adding larvae. However, the mortality was still considered high, with only 25% of the larvae surviving. Experiments were then carried out under field conditions. The larvae were exposed to fungi in plastic buckets with 1 L of water. In this case 10 and 20 rice grains were tested. It was seen that 20 rice grains with fungi were more efficient than 10 rice grains. However, the fungal persistence experiments showed a rapid decline in virulence over time. Even so, the results show that following future studies of fungal formulation, it should be possible to improve field persistence. Entomopathogenic fungi are an alternative to currently used techniques for larval control and the reduction of mosquito populations will result in reduced incidence of Dengue fever.



## 1 - INTRODUÇÃO

O crescimento da população de *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor da Dengue, deve-se ao aumento do uso de recipientes não bio-degradáveis oriundos da estratégia da “Obsolescência Planejada”, aos sistemas de coleta de lixo deficientes, ao aumento da densidade populacional em áreas urbanas, à má qualidade das habitações, à decadência dos sistemas de saúde e, principalmente, às condições precárias de saneamento, às quais a maioria da população brasileira está submetida (Alva, 1997).

A persistência da hiperinfestação de *Ae. aegypti* deve-se também, entre outros fatores, ao acúmulo de água das chuvas no interior dos objetos de uso humano lançados nos peridomicílios<sup>1</sup> e nos refugos que não são devidamente acondicionados para recolhimento pelo serviço de coleta de lixo urbano, tornando-se os principais focos de proliferação de mosquitos (FUNASA, 2002).

Normalmente, os criadouros iniciais desses dípteros são os terrenos baldios, ferros-velhos, recauchutadoras, borracharias e cemitérios. A permanência dessas condições predispõe o ambiente à surtos e/ou epidemias, combatidos pelos serviços de vigilância sanitária com a aplicação de larvicidas e inseticidas organofosforados. Mesmo em baixas doses, essas substâncias entram no ecossistema e têm ação cumulativa sobre a flora e a fauna regional, e em longo prazo, sobre a saúde humana. Cabe ressaltar a ocorrência de populações de *Aedes sp.* resistentes aos organofosforados usados habitualmente como larvicidas e inseticidas (Montella et al, .2007).

O Dengue vírus (DENV) é a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui-se em um dos maiores problemas de saúde pública, especialmente nos países tropicais. A pandemia de dengue que teve em meados do século XX, vem intensificando-se nas últimas décadas, com a expansão da

---

1-Peridomicilio compreende a área exterior à casa, porém no interior do terreno, como o quintal e os jardins.

distribuição geográfica dos seus mosquitos vetores e dos quatro sorotipos do vírus. A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 100 milhões de pessoas se infectem anualmente em 100 países, de todos os continentes, com exceção da Europa. Dessas pessoas, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem da doença (Silva Júnior e Pimenta Júnior, 2008).

Até o final da década de 1970, devido ao Programa Continental de Erradicação de *Ae. aegypti* que praticamente eliminou o vetor do continente naquela ocasião, a dengue, nas Américas, deixou de ser um problema importante de saúde pública. O programa foi na realidade, executado com o objetivo de eliminar a febre amarela, e com exceção de poucos países, como a Venezuela, o sul dos EUA, as Guianas e algumas áreas do Caribe, o vetor desapareceu do continente americano. Infelizmente, o programa foi suspenso e a partir de então o mosquito foi sendo gradativamente reintroduzido a partir das áreas onde não havia sido erradicado (Schatzmayr, 2008).

Desde o começo do século XX os agentes químicos têm sido usados para combater e controlar a população de *Ae. aegypti*. Após a descoberta do Diclorodifeniltricloroetano (DDT), este se tornou o principal método utilizado em programas tendentes à erradicação do mosquito. O uso intensivo e prolongado do DDT provocou resistência na população de *Ae. aegypti* e, com isso, foi necessária a sua substituição pelos inseticidas organofosforados. No entanto, o uso intensivo e prolongado de organofosforados provocou resistência na população desse mosquito (Giannini, 2001). Apesar dos efeitos negativos do uso dos químicos contra o mosquito, esses salvaram muitas vidas e durante um período foram bastante eficientes no combate do vetor. O mosquito vetor da dengue foi erradicado no Brasil com o uso de DDT na década de 50 e somente após o ressurgimento desse vetor no país, devido a fatores externos como o não controle nos países vizinhos, o DDT passou a não apresentar eficiência contra esse inseto (Consoli e Oliveira, 1998).

As bactérias são os agentes de controle biológico dos mosquitos mais utilizados em todo o mundo. As duas espécies mais estudadas e utilizadas são *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, que possuem elevadas propriedades larvicidas e produzem endotoxinas protéicas as quais, quando ingeridas pelas larvas, atacam e destroem o epitélio do intestino médio, levando-as à morte (Neto

& Oliveira, 1985). Atualmente no Brasil, *B. thuringiensis* variedade *israelensis* (*Bti*), está sendo amplamente utilizada para o controle da fase larval de *Ae. aegypti*, enquanto peritróides estão sendo aplicados para o controle da fase adulta. Ainda, não existe um programa de uso de controle biológico para mosquitos adultos de quaisquer espécies (Vilarinho et al, 1998).

A possibilidade de utilizar fungos entomopatogênicos para o controle de larvas de uma gama de espécies de mosquitos vetores tem sido a meta de muitas pesquisas, sem chegar ao nível de programa de controle biológico (Scholte et al., 2004b).

O uso de fungos entomopatogênicos para o controle de adultos das espécies de mosquitos vetores da Malaria, recentemente tem gerado muito interesse, não somente pela possibilidade de reduzir as populações de vetores, mas também pelo fato, que os mosquitos infectados com os fungos não transmitem a doença na mesma taxa que os mosquitos não infectados (Thomas e Read, 2007).

Pesquisas de nosso grupo recentemente mostraram que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foram patogênicos e virulentos contra larvas de *Ae. aegypti* (Pereira et al., 2009), e contra adultos dessa mesma espécie (Paula et al., 2008).

O presente trabalho investigou a seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de larvas de *Ae. aegypti*, visando sua futura aplicação em campo.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Dados Biológicos de *Aedes aegypti*

O vetor da dengue é um inseto doméstico, inteiramente relacionado à população humana, sendo também o principal vetor da febre amarela urbana. Está presente na África, nas Américas e na Ásia, sendo provavelmente originário do continente africano (FUNASA, 1998), na região da Etiópia, onde se encontram três formas dessa espécie: o *Ae. aegypti* na forma típica, o *Aedes queenslandensis* e o *Aedes formosus*, um mosquito silvestre e mais escuro. Somente as duas primeiras formas são encontradas no continente americano, que provavelmente foram transportadas em tambores de água dos barcos durante as primeiras explorações e colonizações européias (Silva Junior e Pimenta Junior, 2008).

*Ae. aegypti* se adaptou intimamente ao homem em regiões áridas, utilizando seus reservatórios de água junto às moradias para postura e, conseqüentemente, passando a utilizar o homem como sua fonte de repasto sangüíneo, de preferência a outros mamíferos (Schatzmayr, 2008).

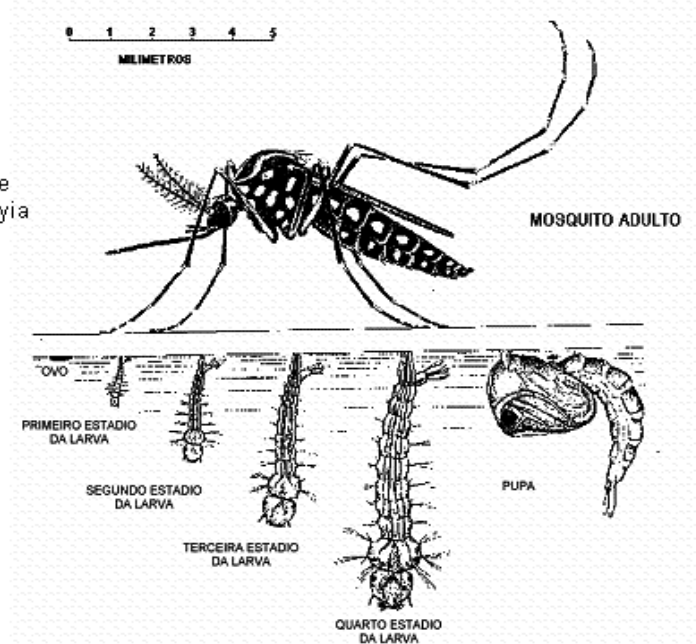
A longa associação de *Ae. Aegypti* com a espécie humana parece tê-lo dotado de certa habilidade para escapar de ser morto por sua vítima durante o repasto sanguíneo. Se o hospedeiro produz algum movimento, mesmo que suave, a fêmea de *Ae. Aegypti* prontamente o abandona procurando outra vítima ou voltando a atacá-lo depois de cessado o perigo de ser atingido. Esta peculiaridade tem grande importância epidemiológica, pois uma só fêmea de *Ae. aegypti* infectada pode fazer várias alimentações curtas em diferentes hospedeiros e disseminar rapidamente o vírus da dengue ou da febre amarela (Consoli e Oliveira, 1998).

Devido às suas características biológicas, *Ae. aegypti* tem criadouros transitórios, que são condicionados diretamente pelas chuvas, como os seus preferenciais. Decorrente disso, sua população de alados sofre flutuação grande e abrupta de densidade no ciclo anual, isto é, seu ciclo anual é influenciado pela quantidade de chuvas e pela temperatura ambiental. Seus criadouros, representados pelas poças d'água e pelos recipientes naturais e artificiais, são preenchidos quase somente na época chuvosa. Com o aumento da precipitação pluviométrica simultânea às ascensões térmicas que precedem a chegada do verão e que se mantêm durante esta estação, estes criadouros passam a ser ciclicamente reabastecidos de água, desencadeando o processo de eclosão dos ovos depositados ali meses antes. Assim, as chuvas influenciam positivamente na densidade populacional desses insetos (Consoli e Oliveira, 1998).

O ciclo biológico de *Ae. aegypti* compreende as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). O ovo tem forma elíptica com cor variável, de marrom a negra, e possui forma alongada e fusiforme. Seu desenvolvimento embrionário dura de 2 a 3 dias. A larva tem antenas cilíndricas e curtas, cerdas antenais curtas e simples. As cerdas cefálicas 5, 6, e 7 são simples. O tórax tem espinhos fortes e laterais no meso e metatorax. No oitavo segmento abdominal existem espinhos, dispostos em uma fileira única. O estágio larval tem o período entre 5 a 7 dias. A pupa possui cefalotorax com trompetas respiratórias curtas e escuras. Abdome tem a cerda nº 1 do primeiro segmento com tufo de pêlos simples ou bífida e cerda nº 9 do oitavo segmento em forma de penacho com poucos pêlos. A palheta natatória tem pêlos curtos em sua borda. A fase de pupa tem o ciclo de 2 a 3 dias (Consoli e Oliveira, 1998).

## *Aedes aegypti*

Filo: Artrópoda  
Classe: Insecta  
Ordem: Diptera  
Familia: Culicidae  
Subfamilia: Culicinae  
Subgênero: Stegomyia



**Figura 1** – Ciclo **biológico** do *Aedes aegypti* (Fonte: FUNASA, 1998)

*Ae. aegypti* é um pernilongo de coloração escura com faixas brancas no tórax, formando uma lira na parte superior (Figura 1). As pernas possuem anéis brancos e o macho se distingue da fêmea pelas antenas, que são mais plumosas. A fêmea pica, preferencialmente, durante o dia e põe seus ovos, tanto em criadouros naturais, como artificiais, de preferência naqueles que contenham água limpa, pobre em sais e matéria orgânica (FUNASA, 1998).

Os machos de *Ae. aegypti* são atraídos pela frequência vibratória do batimento das asas da fêmea da mesma espécie. Na superfície interna da bomba cibarial, em machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, encontram-se numerosas células de função supostamente quimiorreceptora que as fêmeas utilizam para avaliar as características dos possíveis locais para oviposição. (Clements, 1963).

Em laboratório uma fêmea pode viver até 2 meses. Em condições normais uma fêmea pode fazer 12 ou mais repastos sangüíneos em um mês o que é de grande importância na transmissão da dengue e da febre amarela. Somente as fêmeas dos mosquitos são hematófagas. Os estiletes bucais são introduzidos na pele do hospedeiro e a saliva inoculada pode conter anticoagulantes, aglutininas e substâncias eventualmente alergênicas, mas não há evidências que contenham

enzimas digestivas. O volume de sangue ingerido varia conforme a espécie, em *Ae aegypti* tem sido assinalado de 1,5 a 4,2 mm<sup>3</sup> (Clements, 1963).

A digestão sanguínea ocorre em 2 dias. Pouco após a ingestão, forma-se uma camada de material quitinoso, secretado pelas células do intestino, a membrana peritrófica, que separa a superfície interna do intestino e o sangue ingerido. Se um segundo repasto sanguíneo ocorre antes que o primeiro tenha sido totalmente digerido, forma-se uma segunda membrana peritrófica circundando a primeira e o novo sangue ingerido. A membrana peritrófica é permeável às enzimas proteolíticas e aos produtos da digestão que são absorvidos. Diferenças na formação da membrana peritrófica estão relacionadas com diferenças na suscetibilidade de *Ae. aegypti* e *Anopheles* a microorganismos patogênicos para o homem (Consoli e Oliveira, 1998).

Um ou dois dias após emergirem, os adultos se acasalam, sendo que as fêmeas fazem o repasto sanguíneo. Em relação ao acasalamento *Ae. aegypti* se acasala em pequenos espaços durante o vôo ou pousados sobre uma superfície. Embora as cópulas intraespecíficas sejam a regra, cruzamentos interespecíficos podem ocorrer entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. O acasalamento pode se dar antes ou após a ingestão do primeiro repasto sanguíneo, mas é freqüentemente anterior a este (Consoli e Oliveira, 1998).

A escolha do local para oviposição por parte das fêmeas é o principal fator responsável pela distribuição dos mosquitos nos criadouros e é de maior relevância para a distribuição das espécies na natureza. Fatores físicos, químicos e biológicos, como a intensidade luminosa, comprimento da onda de luz refletida, temperatura, grau de salinidade, presença de vegetais, microorganismos e substâncias diversas podem influenciar nessa seleção (Consoli e Oliveira, 1998).

A oviposição ocorre, em geral, em recipientes escuros ou sombreados, com superfícies ásperas, preferindo água limpa e cristalina, ao invés de água turbida ou muito poluída com matéria orgânica. Em geral, a fêmea distribui cada postura em recipientes diferentes (Silva Junior e Pimenta Junior, 2008).

O mosquito *Ae. aegypti* é holometabólico, ou seja, desenvolve-se através de metamorfose completa. Seu ciclo vital sofre metamorfoses de acordo com cada estágio e o tempo de desenvolvimento depende das condições da água, temperatura e da alimentação do mosquito em seus estágios iniciais (Consoli e Oliveira, 1998).

Fase 1 - a do ovo, que para se desenvolver é dependente da atividade hematófaga da fêmea em homens ou outros animais. Os ovos têm aspecto alongado, simetria bilateral e são envolvidos por uma capa composta de 3 camadas: a fina membrana vitelina interna, que envolve o núcleo, o citoplasma e o vitelo, o endocório endurecido e grosso; e o exocório fino e transparente que constitui o envoltório externo. O embrião depende da estrutura e propriedades da casca para sua proteção mecânica, passagem de gases respiratórios e resistência à perda de água (Consoli e Oliveira, 1998).

Os ovos se desenvolvem em cerca de três dias após a cópula e são postos isoladamente pela fêmea, não havendo formação de ninhos. Cada fêmea pode pôr de 70 a 150 ovos. Além disso, são bastante resistentes a períodos de seca e baixas temperaturas, podendo resistir nessas condições até um ano depois de postos pela fêmea (Secretaria Estadual de Saúde, 1998).

As fêmeas fixam os ovos, individualmente, nas paredes internas dos recipientes, na área úmida logo acima da superfície da água. Em geral, seu desenvolvimento embrionário demora 48 horas, quando o ambiente é úmido e quente ou podem suportar longos períodos de dessecação dependendo das condições ambientais. Em contato novamente com a água a maioria dos ovos eclode rapidamente embora alguns necessitem ser molhados várias vezes para eclodirem (Silva Junior e Pimenta Junior, 2008).

Em geral, os ovos postos 1 a 2 mm próximos à superfície da água eclodem assim que completam o seu desenvolvimento embrionário. Quando deixados fora da água os ovos podem apresentar uma diapausa facultativa e sobreviver por períodos mais longos. Após um período de maturação inicial em ambiente úmido (30 a 48 horas) que corresponde ao desenvolvimento embrionário, a resistência dos ovos em diapausa em ambiente seco pode ser muito prolongada em *Ae. aegypti* (Secretaria Estadual de Saúde, 1998).

Pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz descobriram que, 15 horas depois de postos, os ovos do *Ae. aegypti* formam uma película protetora com uma camada transparente e impermeável, que os fazem resistentes a cloro e a inseticidas. Assim que depositados, os ovos passam a absorver água, aumentam de volume, desenvolvem uma casca escura e rígida e tornam-se impermeáveis, adquirindo grande resistência em ambientes pouco favoráveis, onde não existe água. Dessa forma, por exemplo, podem sobreviver durante a época seca do ano



e se desenvolver em larvas somente no início do verão seguinte, com a chegada de condições ambientais mais favoráveis. Os ovos se tornam rígidos e escuros em cerca de três horas após a postura. (Rezende et al., 2008). A eclosão larvária é auxiliada pelo atrito de um “dente” quitinoso situado dorsalmente na cabeça da larva de 1º estágio contra a casca do ovo e ainda ao seu engurgitamento e aos movimentos pulsáteis no interior do ovo (Secretaria Estadual de Saúde, 1998).

A fase 2 - a eclosão de larvas de 1º ínstar ocorre a partir de dois a três dias até vários meses após a postura dos ovos, que eclodem quando em contato com a água. As larvas possuem sifão respiratório, os espiráculos se abrem na extremidade desse órgão e posiciona-se em ângulo com a superfície líquida. As larvas são providas de grande mobilidade e têm como função primária o crescimento. As larvas se alimentam indistintamente do microplâncton existente nos seus habitats constituído por algas, rotíferos, bactérias, esporos de fungos ou quaisquer partículas de matéria orgânica. O movimento das escovas orais faz com que a água flua em direção à cabeça, trazendo as partículas de alimento para a parte inicial do aparelho digestivo onde será filtrada em uma proporção de até 2 litros por dia. Não selecionam alimentos, o que facilita a ação dos larvicidas, bem como não toleram elevadas concentrações de matéria orgânica na água (Consoli e Oliveira, 1998).

A duração da fase larval, em condições favoráveis de temperatura (25 a 29° C) e de boa oferta de alimentos, é de 5 a 10 dias, podendo se prolongar por algumas semanas em ambiente adequado (Consoli e Oliveira, 1998).

As larvas passam por quatro estádios de desenvolvimento, sendo o último destes o mais prolongado. Os machos têm em média um desenvolvimento larvário mais rápido do que as fêmeas (Consoli e Oliveira 1998). A duração desses estágios depende da temperatura, da disponibilidade de alimentos e da densidade larvária no recipiente. Em condições ótimas, o período entre a eclosão do ovo e a pupação pode não exceder cinco dias, ou, em condições mais adversas, com baixas temperaturas ou alimentação insuficiente, pode se estender por várias semanas (Silva Junior e Pimenta Junior, 2008).

As larvas nadam até a superfície para respirar e descansar, utilizando, além das nadadeiras, o sifão respiratório situado na extremidade do abdômen para auxiliar o movimento em “S” característico dessa etapa. A larva assume uma

posição vertical em relação ao nível aquático e apresenta fotofobia, reagindo imediatamente à presença da luz (Secretaria Estadual de Saúde, 1998).

Embora aquáticas, as larvas respiram sempre o oxigênio do ar, necessitando para isso chegar à superfície da água aspirando o ar através do seu sifão respiratório. O tempo que as larvas suportam longe da superfície da água varia com a espécie, idade e estado fisiológico (Clements, 1963).

A presença de substâncias oleosas na água é prejudicial às larvas por dificultar ou impedir mecanicamente a sua respiração e por essa característica vários tipos de óleos minerais e vegetais combinados ou não com detergentes foram utilizados para controle das larvas de mosquito na primeira metade do século passado (Rosen, 1994).

A temperatura ótima para o desenvolvimento larvário situa-se entre 24 e 28°C e *Ae. aegypti* pode desenvolver-se em lugares onde haja pouca ou nenhuma luz como as galerias de água ou de esgoto, preferindo entretanto coleções de água com concentrações salinas muito baixas (Consoli e Oliveira 1998).

Após, aproximadamente, 7 a 10 dias as larvas se desenvolvem em pupas. São bastante móveis quando perturbadas, mas estão quase sempre paradas em contato com a superfície da água. A pupa possui trombeta alongada, geralmente de forma cilíndrica e de abertura estreita, possui sifões na extremidade da cabeça e palhetas natatórias na extremidade abdominal. Não se alimenta e movimenta-se apenas por contrações. Inicialmente tem a mesma cor da larva que lhe deu origem, mas escurece a medida que se aproxima o momento da emergência do adulto. Esta fase dura de dois a três dias (FUNASA, 2000).

O adulto, além das características morfológicas citadas anteriormente apresenta uma tromba longa chamada probóscida, que a fêmea usa para sugar o sangue necessário à maturação de seus ovos, e os machos a utilizam para se alimentar do néctar das plantas. Essa fase tem duração de 30 a 35 dias. *Ae. aegypti* adulto pousa paralelamente ao plano (mesa, parede, etc). Assim, contabilizando a duração das diversas formas, a vida média de uma geração de *Ae. aegypti* duraria em torno de 5 a 7 semanas, desde a postura do ovo até o fim da fase adulta (FUNASA, 2000).

Outro mosquito existente no Estado do Rio de Janeiro e que tem participação crescente na transmissão da dengue é *Aedes albopictus*, que também se faz presente em outros Estados, como Minas Gerais e Espírito Santo.

Seu ciclo biológico é semelhante ao de *Ae. aegypti*, e exerce um papel de fundamental importância no mecanismo de transmissão da dengue (FUNASA, 2000) pois é até hoje um importante vetor desses ciclos naturais com a participação de primatas e, ocasionalmente, do homem. Todos os quatro sorotipos de dengue foram demonstrados nesses ciclos silvestres na Ásia enquanto que apenas o sorotipo 2 foi encontrado na África, o que reforça o conceito da origem asiática do vírus (Schatzmayr, 2008).

O *Aedes albopictus* é uma espécie silvestre, que se adaptou aos ambientes rurais, suburbanos e urbanos. É muito menos relacionado ao homem que o *Ae. aegypti*, pois se alimenta e faz oviposição no ambiente peridomiciliar, sendo a sua dispersão pelo vôo maior que a de *Ae. aegypti*, em média 500 metros, adaptando-se melhor às regiões frias, como o norte da Ásia, onde seus ovos passam o inverno em diapausa (Silva Junior e Pimenta Junior, 2008).

Percentuais próximos de 1% de infestação domiciliar são considerados suficientes para o surgimento de epidemias ou surtos de dengue. Percentuais próximos de 4% são considerados condição predisponente para epidemias, ou surtos de febre amarela, caso haja importação para essa área de casos alóctones originários de áreas de febre amarela silvestre (SES-RJ, 1999).

Assim, permanece fortalecida a convicção de que a eliminação do vetor é, até o presente momento, a maneira mais eficaz para controlar e erradicar a dengue de uma região ou de um país.

## 2.2 - Características do vírus

O vírus causador da dengue é do tipo RNA, da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus* (Figura 2). Existem quatro sorotipos da dengue: DENV 1, 2, 3 e 4. Segundo Figueiredo e Fonseca (1996), o gênero *Flavivirus* compreende 60 vírus diferentes, entre os quais se destacam por sua importância epidemiológica o vírus da dengue, da febre amarela, o vírus rocio e o vírus da encefalite de Saint Louis (FUNASA, 2000).

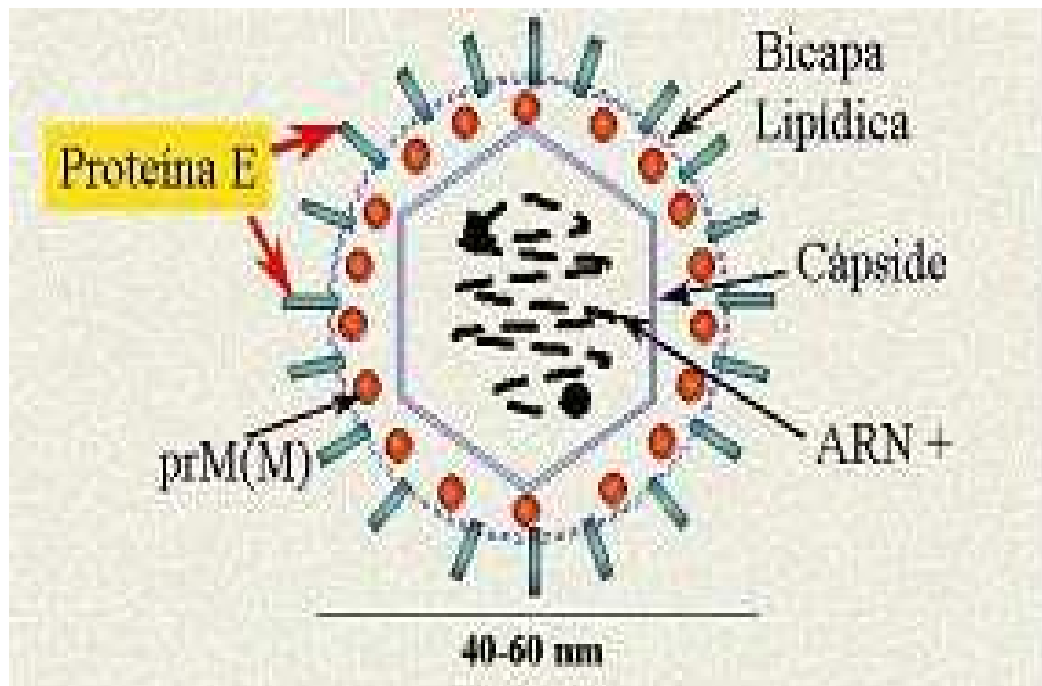
O período de transmissibilidade viral ocorre em dois ciclos:

Intrínseco - é o que se passa no homem. Começa um dia antes do aparecimento dos sintomas e vai até o 6º dia da doença. Durante esse período, o vírus está presente no sangue e os mosquitos que o sugarem podem se infectar.

Extrínseco - é o que se dá no mosquito. Os vírus ingeridos juntamente com o sangue multiplicam-se nas glândulas salivares de 8 a 12 dias após um repasto de sangue infectado, os mosquitos se tornam infectantes, isto é, capazes de transmitir a doença e assim continuarão por toda a sua vida (FUNASA, 2000).

O vírus da dengue não se transmite de pessoa a pessoa, nem por qualquer outro mecanismo que não seja através da picada dos mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente, de *Ae. aegypti*. Portanto, só é possível interromper o ciclo da doença com o controle ou erradicação do mosquito transmissor (FUNASA, 2000).

Quando acontece a primeira infecção por qualquer sorotipo, habitualmente o paciente apresenta uma forma benigna da doença chamada de “dengue clássica”. Quando ocorre a convivência simultânea, ou seqüencial, de dois ou mais sorotipos de vírus e o paciente é reinfestado por um sorotipo diferente do que o infectou a primeira vez, particularmente pelo sorotipo 2, podem ocorrer formas mais graves da doença, como a “dengue hemorrágica”, que tem maior potencial de letalidade (FUNASA, 1998).



**Figura 2** - Estrutura de *Flavivirus sp.* da dengue

Fonte: Silva Júnior, J.B. & Pimenta J.F.G. (2008)

Basicamente, o vírus da dengue necessita do mosquito para sobreviver e assim poder infectar os indivíduos. O mosquito fêmea, ao picar um indivíduo infectado, se contamina ao sugar seu sangue onde há vírus circulando. A partir daí, o vírus migra para as glândulas salivares da fêmea e para seus ovos, caso já tenham sido fecundados. A transmissão pode ocorrer a partir de dois mecanismos: 1) a fêmea contaminada pica um indivíduo sadio para obter mais sangue e sustentar seus ovos, contaminando então a pessoa picada com o vírus que está alojado nas glândulas salivares; ou 2) a fêmea ao picar um indivíduo contaminado, transmite o vírus para os seus ovos fecundados (mecanismo transovariano), contaminando a geração seguinte cujas larvas eclodirão já possuindo em seu interior, o vírus da dengue. Esse mecanismo de transmissão é também denominado de transmissão vertical (SES-RJ, 1999).

A Dengue é transmitida por picada de mosquitos infectados. Assim, o conhecimento acerca da interação entre o mosquito e o vírus pode revelar elementos críticos para o controle desta doença. O período de incubação da doença no homem, ou seja, o período entre a picada infectante e o aparecimento de sintomas, pode variar de 3 a 15 dias, sendo, em média, de 5 a 6 dias e o período de transmissibilidade ocorre enquanto houver vírus no sangue (período de viremia). Este período começa um dia antes do aparecimento dos sintomas e vai até o 6º dia da doença (FUNASA, 2002).

Para infectar uma célula é necessária a interação de proteínas virais com moléculas presentes na superfície celular que funcionam como receptores. No caso do gênero *Flavivirus*, o papel de adesão e fusão é desempenhado pela proteína E (Figura 2). No entanto, o receptor celular utilizado ainda não é conhecido (Martinez, 1999).

Diferentes linhagens de *Ae. aegypti* apresentam diferentes níveis de susceptibilidade e refratariedade à infecção. Um candidato a mediar esta susceptibilidade/refratariedade, seria o sistema imune do vetor (Silva, 2008).

Os *Flavivirus* podem ter a capacidade de escapar dos sistemas celulares de defesa anti-virais do mosquito, possibilitando a infecção persistente e a transmissão do vírus. RNAi é um mecanismo de defesa do genoma contra genes aberrantes que podem ser gerados por transposons, transgenese ou ainda durante a replicação viral. Este mecanismo tem sido descrito nos últimos anos em um grande número de modelos, incluindo insetos. É possível que exista uma associação entre virulência de diferentes cepas de dengue e sua capacidade de suprimir a resposta celular mediada por RNAi em *Ae. aegypti*. Existe a hipótese de trabalho de que populações de insetos refratários ao vírus provavelmente apresentam uma forte resposta celular à

presença dos mesmos. Em contrapartida, o vírus pode ter desenvolvido mecanismos para escapar desta resposta celular. Assim, o ciclo do vírus no inseto e, conseqüentemente, o comportamento cíclico da endemia, pode estar relacionado às alterações dos mecanismos de escape do vírus às respostas celulares do inseto ou às alterações primárias dessas respostas celulares do inseto ou, até mesmo, a concomitância de ambos os mecanismos (Petretski et al., 2009).

A epidemia de dengue sorotipo 1 na América do Sul começou em 1978, afetando inicialmente Venezuela, Colômbia e as Guianas. Cerca de 702 mil casos foram reportados à Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), no período de 1977-1980, mas calcula-se, com base em dados da Colômbia e da Venezuela, que mais de 5 milhões de pessoas se infectaram nesses anos. Essa mesma amostra de dengue 1 espalhou-se posteriormente, para outros países da América do Sul, chegando ao Brasil por Roraima em 1981/1982 e no Rio de Janeiro em 1986. Casos de dengue hemorrágica surgiram, quando da entrada posterior da dengue sorotipo 2 em países como Bolívia, Paraguai, Equador, Peru e Argentina e, em 1990, no Brasil (Schatzmayr, 2008).

No Brasil, o primeiro registro da doença foi no Rio de Janeiro, em 1846, citada por e denominava-se polka pela maneira desajeitada de caminhar provocada pelas mialgias e artralguas típicas da dengue (Figueredo & Fonseca, 1996). A campanha de erradicação do *Ae. aegypti*, motivada pela epidemia de febre amarela, começou em 1903 com Emílio Ribas e Osvaldo Cruz e, em 1953, o mosquito foi considerado erradicado do país, sendo reintroduzido em 1967 e eliminado em 1973. Reapareceu em 1976, na Bahia, em 1977, no Rio de Janeiro, e, em Roraima, em 1981-1982. O mosquito disseminou-se nacionalmente a partir de 1986-1987, 1990-1991, comportando-se em progressão ascendente desde 1994. Em 1995 o Brasil apresentava 1753 municípios infestados enquanto que no ano de 2008 já totalizavam 4006 municípios com presença de *A. aegypti* confirmada (Aguilar, 2009).

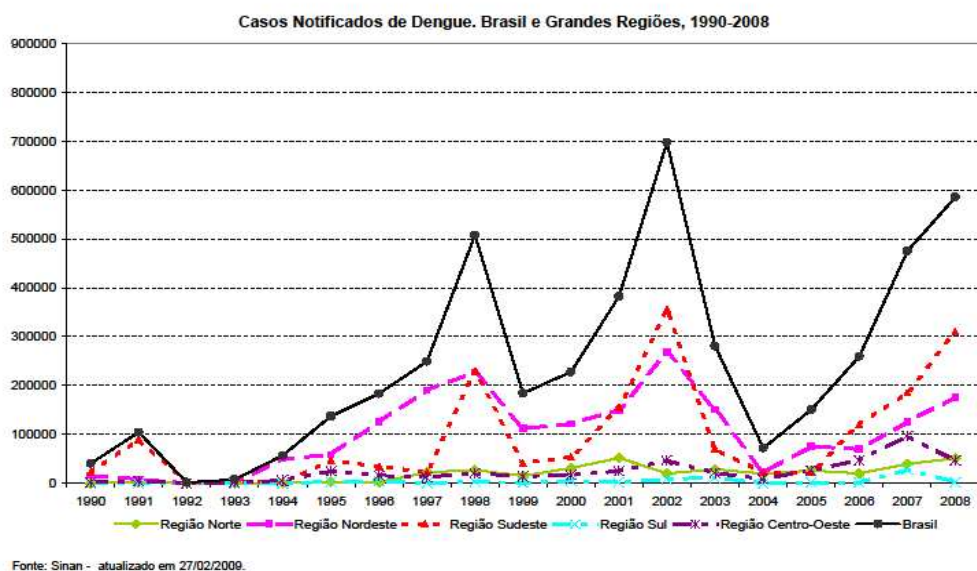
A incidência da doença apresentou comportamento ascendente, hiperendêmico, em concordância com a expansão do vetor, com variações cíclicas, entretanto, dependentes de outros fatores como sorotipos circulantes, disponibilidade de populações suscetíveis, pluviosidade sazonal e outros fatores.

A incidência de casos da dengue notificados no Brasil saiu de patamares das duas epidemias anteriores, de 1987, com 89.394 casos notificados e de 1991, com 97.209 casos notificados, para 56.621 casos notificados em 1994. De 1995 a

1998 o número de casos notificados saiu de 128.619 para 528.000 até que em 2002 794.219 casos foram notificados, o que representou na época um estado hiperendêmico<sup>2</sup> de dengue em nível nacional, sem precedentes na história do Brasil (FUNASA, 2008).

No Brasil, desde 1986 vêm ocorrendo epidemias de dengue nos principais centros urbanos do país foram notificados cerca de 3 milhões de casos (SESDEC-RJ/SVS/SVEA/CVE/DTI/SDTVZ – 2008).

Esse aumento descrito anteriormente se deu basicamente por um aumento acentuado da incidência de casos notificados nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil conforme a figura 3. Do total de 528.000 casos em 1998, o Nordeste contribuiu com 259.574 casos e o Sudeste com 250.065 casos notificados.



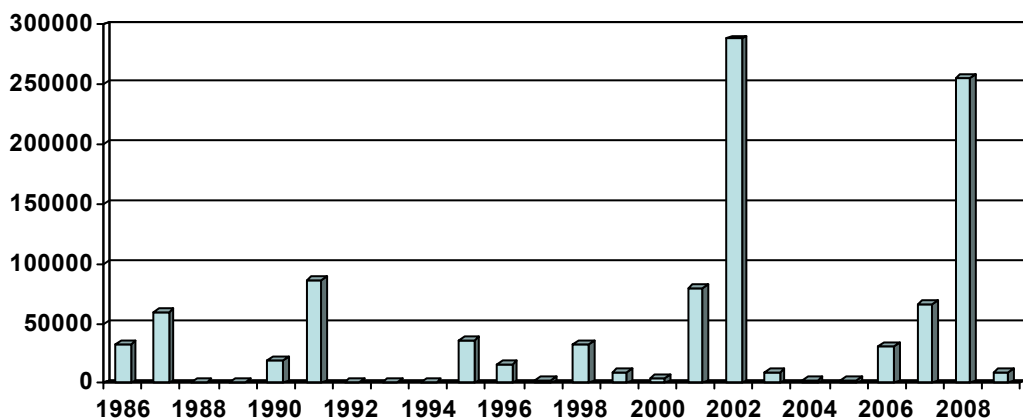
**Figura 3** - Notificações de dengue no Brasil de 1990 a 2008 (Fonte: PNCD, 2009)

A maioria dos casos de dengue notificados refere-se àqueles que procuram algum serviço médico, implicando, em média, em 3 dias de afastamento do trabalho. Embora nem todos os casos notificados digam respeito a pessoas da faixa etária produtiva, a maioria deles é notificada exatamente por circunstâncias laborais (Figueiredo e Fonseca, 2006).

---

2- Hiperendêmico é a presença habitual da doença, porém com incidência muito elevada.

O Estado do Rio de Janeiro nos anos de 1986 e 1987 apresentou respectivamente uma epidemia de dengue sorotipo 1, com 50.000 e 96.000 casos notificados (Figura 4). No inquérito sorológico realizado no ano seguinte pelo Ministério da Saúde, constatou-se a presença de um milhão de pessoas sensibilizadas para o sorotipo responsável pela epidemia. Essa observação permite deduzir que para cada caso de dengue notificado, provavelmente ocorreram outros nove casos assintomáticos ou oligossintomáticos, porém não notificados e, conseqüentemente, não contabilizados (Secretaria Estadual de Saúde, 1998).



**Figura 4** – Casos de dengue notificados no Estado do Rio de Janeiro de 1986 a 2009 (SESDEC, 2009).

Esses índices elevados de infestação estão ocorrendo em uma comunidade que atualmente registra um altíssimo percentual de pessoas com a presença de anticorpos IgG e presença de células de memórias específicas para vírus da dengue, concausa imprescindível para eventos de dengue hemorrágica. Segundo Martinez (1999), Guimarães (1999) e Figueredo & Fonseca (1996), a primoinfecção geralmente provoca a presença de células de memória por um período mínimo de cinco anos, podendo significar que a população imunologicamente predisposta a contrair dengue hemorrágica é a soma da população primoinfectada nos últimos cinco anos. De acordo com pesquisas realizadas em Cuba e publicadas em 1999, acredita-se que a primoinfecção deixa a memória imunológica sensibilizada para o resto da vida das pessoas infectadas (Martinez, 1999).



Na Região Sudeste, o Estado do Rio de Janeiro apresenta há mais tempo a convivência simultânea de dois sorotipos diferentes de vírus desde 1990, com uma única interrupção na simultaneidade dessa co-ocorrência em 1997, sendo retomada em 1998. No ano 2000 foi registrada a presença do sorotipo 3 pela primeira vez na Baixada Fluminense, o que contribuiu para agravar o quadro epidemiológico do Estado (SES-RJ 2001).

Os primeiros casos de dengue hemorrágica no Estado do Rio de Janeiro foram notificados no ano de 1990, devido a presença dos dois sorotipos diferentes simultânea no mesmo período (FUNASA, 2000).

O Estado do Rio de Janeiro reúne o maior número de variáveis pré-disponentes a uma epidemia de dengue do tipo hemorrágica na Região Sudeste, caso não sejam revertidas essas condições, particularmente aquelas que dizem respeito aos níveis de infestação domiciliar do mosquito. O Estado do Rio de Janeiro é composto de 92 municípios, dos quais 90 apresentavam no ano 2001 infestações domiciliares confirmadas pela Fundação Nacional de Saúde, conforme boletim epidemiológico oficial (FUNASA, 2001).

## 2.3 - Controle Químico e Biológico de Vetores de Doenças

### 2.3.1 - Controle de *Aedes aegypti*

As práticas para controle de insetos são muito antigas. Há registro de seu uso na China há mais de 2.000 anos. No final do século XIX, descobriu-se que certas espécies de insetos e outros artrópodes eram responsáveis pela transmissão de algumas das mais importantes doenças. Vacinas ou medicamentos efetivos contra a maioria delas ainda não estavam disponíveis e o controle da transmissão era, todavia, fortemente centralizado no combate ao vetor.

O manejo integrado trata do planejamento unificado de controle, de acordo com as condições ambientais e a dinâmica populacional do vetor. O manejo ambiental lança mão de medidas para eliminar o vetor ou seus focos, ou, ainda, para impedir o contato homem-vetor, como a eliminação de criadouros, a drenagem e a instalação de telas em portas e janelas. São selecionados os

métodos de controle apropriados e as populações do vetor são mantidas em níveis que não causam dano à saúde (Braga & Valle, 2007).

Os componentes do controle integrado de vetores incluem vigilância, redução da fonte (ou manejo ambiental), controle biológico, controle químico com uso de inseticidas e repelentes, armadilhas e manejo da resistência a inseticidas. O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (Rose, 2001).

Desde o começo do século XX, os agentes químicos têm sido usados para combater e controlar as populações do mosquito *Ae. aegypti*. Durante as primeiras campanhas, diferentes tipos de óleos eram colocados em recipientes com água com a finalidade de inibir o desenvolvimento e matar as larvas que já haviam eclodido. Com a descoberta do composto Diclorodifeniltricloroetano (DDT) o mosquito transmissor da dengue foi erradicado de muitos países, principalmente do Brasil. No entanto, países vizinhos ao Brasil não erradicaram o mosquito o que resultou na reinvasão desse vetor em alguns estados brasileiros. Fato que corroborou com o uso intensivo e indiscriminado do DDT e conseqüentemente para o aparecimento de populações de *Ae. aegypti* resistentes a este composto. Observado a resistência dos mosquitos ao DDT o organofosforado passou a ser utilizado para o combate a este vetor. Porém, semelhante ao DDT, os inseticidas organofosforados causaram o surgimento de populações resistentes de *Ae. aegypti* (Consoli et al., 1986).

O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos no século XX. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido em 1939, que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (Rozendaal, 1997).

Inseticidas sintéticos como os piretroides têm sido usados para o controle dos mosquitos adultos enquanto os organofosforados, como o temefós, estão sendo usados para o controle da fase larval. Uma alternativa ao controle químico da fase larval está baseada na eliminação física dos criadouros e o uso de bactérias entomopatogênicas. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) tem sido

usados com sucesso desde os anos 80 para controle dos mosquitos e simúlideos (Lacey & Undeen, 1986).

Os inseticidas têm sido bastante usados na agricultura, agropecuária e na saúde pública. Seu uso continuado tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores. Resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando direta e profundamente a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (Brogdon et al., 1998). Por esse motivo, a partir de 2009 está sendo introduzido o diflubenzuron que é um inibidor da síntese de quitina, nas atividades de controle das larvas de *Ae. aegypti* (PNCD, 2009).

A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte. A resistência a inseticidas pode ser pensada como um processo de evolução acelerada de uma população que responde a uma intensa pressão seletiva, com a conseqüente sobrevivência dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência. A resistência é pré-adaptativa, resultado de mutações (Braga & Valle, 2007).

Além de provocar resistência o uso indiscriminado dos inseticidas clorados e organoclorados causa à formação de resíduos tóxicos a saúde humana (D'Amato, 2002). Resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando, a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (Brogdon & McAllister 1998). Apesar dos importantes avanços alcançados no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos continuam sendo uma importante ferramenta dos programas integrados de controle (Rose, 2001). Nesse contexto, o monitoramento e o manejo da resistência, assim como o uso de substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais, são elementos de suma importância em qualquer programa de controle de vetores (Ferrari, 1996).

Os mecanismos que têm provocado a resistência de insetos aos patógenos incluem mudanças no comportamento, na cutícula, mudança no ciclo das células do intestino médio, redução da afinidade de proteínas no intestino médio e imunidade à maturação. O desenvolvimento da resistência aos patógenos, em especial aos que não atuam por meio de uma toxina, deverá ser de natureza diferente da resistência aos inseticidas químicos e poderá progredir mais

lentamente. Desse modo, populações de insetos, ácaros e outros artrópodes, naturalmente, apresentam uma proporção de indivíduos que tenham alelos que lhes confirmam resistência a um determinado produto químico. Populações resistentes podem surgir como resultado do uso persistente de pesticidas que matam indivíduos com alelos suscetíveis e não matam aqueles que possuam alelos resistentes. Assim, um pequeno número de indivíduos possui características que permitem sua sobrevivência sob doses de inseticidas normalmente letais. O próprio inseticida não produz uma mudança genética; seu uso continuado, entretanto, pode selecionar indivíduos resistentes. Apesar dos vários estudos documentados sobre a resistência, o número de mecanismos envolvidos é bastante pequeno e inclui diminuição da taxa de penetração pela cutícula, detoxificação metabólica aumentada e diminuição da sensibilidade do sítio alvo. (Braga & Valle, 2007).

O manejo por ataque múltiplo envolve a utilização de dois ou mais produtos em rotação ou mistura. O princípio da rotação de produtos é baseado no fato de que a frequência de resistência a um produto (A) diminui quando produtos alternativos (por ex. B e C) são utilizados (Georghiou, 1983; Tabashnik, 1989; Roush, 1989). Sendo assim, para o sucesso da rotação há a necessidade de assumir que existe custo adaptativo dos indivíduos resistentes na ausência da pressão de seleção e que não existe resistência cruzada entre os componentes da rotação. O princípio da mistura de dois produtos (A e B) se baseia no fato que os indivíduos resistentes ao produto A serão controlados pelo produto B e vice-versa. Porém existe a possibilidade de se encontrarem indivíduos resistentes ao produto A e B através da resistência múltipla. Dentre as várias condições para o sucesso da mistura estão: baixa frequência de resistência, ausência de resistência cruzada e persistência biológica semelhante para os dois compostos. O surgimento de populações resistentes tem ocasionado sérios problemas para o controle de mosquitos. Alteração na susceptibilidade tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando diretamente a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (Brogdon & McAllister, 1998). Apesar de importantes avanços em metodologias alternativas, os inseticidas químicos são uma poderosa ferramenta contra vetores e continuarão desempenhando papel importante no controle integrado. Porém, eles possuem desvantagens, como o custo elevado, riscos a saúde humana e a organismos não alvo, bioacumulação e

desenvolvimento de resistência dos organismos alvo (Thattheyus 2007 apud Fonseca et al, 2009), pelo menos até a descoberta de métodos alternativos sustentáveis que permitam um controle rápido e seguro de vetores. Com a alta densidade e dispersão de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, muitas vezes coexistindo, em diversos estados brasileiros, faz-se necessário, na vigilância entomológica, o monitoramento de mudanças comportamentais que favoreçam o surgimento de resistência destes vetores, fornecendo informações importantes na transmissão de arboviroses, como a dengue e a febre amarela. Sobretudo, pensando em contribuir efetivamente no controle destas espécies de Culicidae ( WHO 1990; Braks et al. 2003).

Além dos inseticidas químicos propriamente ditos, outros produtos vêm sendo usados no controle de vetores. Eles pertencem, principalmente, aos grupos dos inseticidas biológicos e com isso foi dada grande importância ao uso de microrganismos biológicos patogênicos e virulentos contra populações de mosquitos vetores de doenças humanas. Isolados de fungos, bactérias e vírus entomopatogênicos apresentam baixa contaminação ao ambiente especificidade aos organismos-alvo, baixa probabilidade do mosquito tornar-se resistente, e ademais possibilita a auto-dispersão (Giannini, 2001).

#### 2.4 - Ecologia de Fungos na Agricultura e Saúde Humana

Os fungos constituem um grupo de seres vivos muito numerosos e heterogêneos e são encontrados nos mais diversos nichos ecológicos do planeta. Excluindo-se os insetos, os fungos constituem um dos mais numerosos seres vivos existentes (Esposito & Azevedo, 2004).

Os fungos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, pela produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico, destacando-se as celulases, lacases, xilanasas, pectinases e amilases, pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura, pelo controle de inúmeras moléstias que atacam plantas cultivadas e pela produção de etanol. Mais ainda, são eles que tornam a vida no planeta mais agradável, pois sem os fungos não existiriam bebidas fermentadas como as cervejas e vinhos e queijos dos mais diversos tipos e em ecossistemas florestais

os fungos são os principais decompositores de celulose e lignina, os componentes primários da madeira (Esposito & Azevedo, 2004).

Fungos ligninolíticos, como *Phanerochaete chrysosporium*, são capazes de degradar vários poluentes, incluindo o DDT, diferentes PCbs, dioxina, lindane e benzo[a]pireno (Bumpus et al., 1985). Degradam também plásticos biodegradáveis incluindo poliidroxibutirato. Com relação aos metais tóxicos, fungos filamentosos introduzidos em solos contaminados por metais pesados e radioativos, absorveriam esses metais e, por meio de translocação, os concentrariam nos basidiocarpos, que, eventualmente, seriam colhidos e os metais extraído e reutilizados, ou ainda, eliminados de maneira apropriada (Gray, 1998). Os fungos têm potencial de serem utilizados também na remoção de corantes e na decomposição de matéria orgânica em lagos e córregos de uso humano.

## 2.5 - Fungos Entomopatogênicos

Os fungos foram os primeiros agentes patogênicos de insetos a serem utilizados no controle de pragas. Em condições naturais a ocorrência de fungos entomopatogênicos tem sido, no Brasil e em outros países, um fator importante para reduzir as populações de pragas. Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes à cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies (Alves, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são mais empregados para o controle de pragas agrícolas, o interesse no uso destes fungos para o controle de artrópodes vetores de doenças tem sido crescente devido à aumento de incidência de doenças, tais como a dengue, e pelos altos níveis de resistência dos mosquitos aos inseticidas atualmente disponíveis no mercado (French-Constant, 2005).

O uso de fungos entomopatogênicos para o controle de larvas de mosquitos tem sido tema de vários estudos (Clark et al., 1968; Goettel, 1988; Alves et al., 2002), porém somente um produto baseado na espécie *Lagenidium giganteum* foi comercializado até agora (Laginex), embora fosse retirado em 1999 (Scholte et al., 2004).

Pesquisas com o uso de fungos entomopatogênicos para o controle dos mosquitos transmissores da malária *Anopheles gambiae* e *A. stephensi* demonstrou que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foram patogênicos e virulentos contra a forma adulta desse vetor (Scholte et al., 2003; Blanford et al., 2005; Scholte et al., 2005). Scholte et al. (2007) mostrou que o fungo *M. anisopliae* foi patogênico contra o mosquito adulto de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, vetores da dengue e da febre amarela. Recentes estudos demonstraram que vários isolados de *M. anisopliae* são virulentos contra adultos de *Ae. aegypti* (Paula et al., 2008) com potencial para serem usados em programas de controle desse vetor.

A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos. Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos (Hajek & St. Leger 1994).

Essa característica dos fungos tem despertado interesse crescente no ambiente científico na utilização dos fungos como agentes de controle microbiano. Mais de 50% dos trabalhos de patologia de insetos e controle microbiano publicados no Brasil são sobre fungos entomopatogênicos, sendo que 90% deles foi desenvolvido nas duas últimas décadas (Alves, 1998).

As espécies que parasitam insetos estão presentes em todos os grupos taxonômicos de fungos conhecidos. Esses parasitos apresentam, dois modos de colonização do hospedeiro: ectoparasitismo e endoparasitismo. Os ectoparasitas provocam infecções superficiais no hospedeiro, crescendo sobre os tecidos do inseto e penetrando-o, geralmente, por meio de uma estrutura especializada, o haustório, para obtenção de alimento. Os fungos endoparasitas são aqueles que crescem dentro do inseto hospedeiro e tem característica de matar o hospedeiro em poucas semanas ou dias (Alves, 1998).

*M. anisopliae*, conhecido anteriormente como *anisopliae* de *Entomophthora*, é distribuído habitando o solo. O primeiro uso de *M. anisopliae* como um agente microbiano para combater insetos realizou-se em 1879, quando Elie Metchnikoff o usou em testes experimentais para controlar o besouro do grão do trigo, austríaca de Anisoplia. Foi usado mais tarde para controlar o gorgulho da beterraba de açúcar. Um membro da classe de Hyphomycetes dos fungos, *M.*

*anisopliae* é categorizado como um fungo verde do muscardine devido à cor verde das colônias em esporulação. *M. anisopliae* encontra-se naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens (Alves, 1998).

*M. anisopliae* penetra nos insetos através da cutícula. Uma vez dentro do inseto, o fungo produz uma extensão lateral das hifas que eventualmente proliferam e consomem os tecidos dos órgãos internos do inseto. O crescimento das hifas continua até que o inseto esteja totalmente colonizado por micélios (Cole, 2003)

Foram realizados estudos de toxicidade/patogenicidade em ratos compreendendo estudos de toxicidade/patogenicidade pulmonar aguda, estudos de toxicidade/patogenicidade aguda com aplicação intravenosa, toxicidade dermatológica e de irritação conjuntival em coelhos. Os estudos indicaram que *M. anisopliae* é incapaz de crescer em temperaturas acima de 35°C. Os resultados dos estudos de toxicidade/patogenicidade não mostraram nenhum efeito tóxico, patogênico ou adverso. Esses estudos demonstraram que os roedores neutralizam eficazmente os fungos de seus corpos mesmo depois de inoculados em quantidades elevadas. Os resultados do estudo do crescimento da temperatura mostram em que o *M. anisopliae* não pode crescer em temperaturas dos corpos dos mamíferos e, conseqüentemente, não crescem em órgãos ou tecidos humanos (Cole, 2003).

Embora *M. anisopliae* não seja infeccioso ou tóxico para mamíferos, a inalação dos esporos pode causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis (Alves, 1998). A maioria dos produtos resultantes da transformação fúngica é menos mutagênica do que os compostos originais, e no caso de poluentes em geral, a transformação de compostos precursores tóxicos resulta em compostos intermediários mais polares, portanto, mais disponíveis, e que serão facilmente eliminados do ambiente. Como exemplo, os epóxidos e as quinonas formados a partir de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são compostos muito instáveis que são fácil e rapidamente eliminados biótica e abioticamente (Silva e Espósito, 2004).

A ocorrência desses fungos, em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente, tem sido, aqui e em outros países, um fator importante na redução das populações de pragas (Alves, 1998).



## 2.6 - Utilização de Fungos Entomopatogênicos para o Controle de Vetores de Doenças Humanas

Além de causarem incômodo, sensação de repulsa, aflição, algumas espécies de insetos são causadores de doenças que comprometem a saúde humana, o que agrava são os altos índices de pessoas acometidas por essas doenças e o elevado nível de mortalidade entre a população. A mosca *flebótomo* transmite para o homem, através de sua picada, a doença leishimaniose (WHO, 1990). Estudos laboratoriais têm demonstrado que os fungos entomopatogênicos são virulentos a estas moscas (Reithinger et al., 1997).

A doença de Chagas, um dos mais graves problemas de saúde pública no Brasil, tem como causa de infecção a presença do parasito *Trypanosoma cruzi* transmitido pelos insetos triatomídeos. Os vetores mais importantes desta doença são *Triatoma infestans*, *T. brasilienses*, *Rhodnius prolixus* e *T. dimidiata*, que tem sido combatido com o uso de fungos entomopatogênicos (Costa et al., 2003).

Mosquitos do gênero *Culex* são vetores da filariose humana, doença endêmica no nordeste do Brasil. A partir de 1970 vários casos de resistência deste tem sido evidenciado neste mosquito como consequência do uso excessivo de inseticidas químicos (Consoli et al., 1986). Por esses motivos fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* e *Lagenidium giganteum*, e também bactérias do gênero *Bacillus* tem sido testados como tentativa de controle biológico desses insetos.

Daoust & Roberts (1982) testaram o fungo *M. anisopliae* observando alta virulência para larvas de *Culex pipiens*, *Ae. aegypti* e *Anopheles stephens*. De acordo com Riba et al., (1986), o segundo estágio de *Ae. aegypti* é o de maior resistência à infecção pelo fungo; porém, quando testado, o fungo *Penicillium* spp. foi altamente patogênico e virulento às larvas de *Ae. aegypti*.

Scholte et al., (2004a), observou em laboratório que fêmeas adultas de *Anopheles gambiae* infectadas com *M. anisopliae* infectam o macho durante a cópula. E que, possivelmente, o macho infectado dissemina o fungo para outras fêmeas. Scholte et al., (2005) testaram tecidos pretos, impregnado com o fungo *M. anisopliae* suspensas em habitações humanas na África, e observaram a redução da população de *Anopheles*.

Blanford et al., (2005) usando *B. bassiana*, infectou fêmeas de *Anopheles stephensi*, previamente inoculadas com *Plasmodium chaboudi*, e constatou que durante a infecção as fêmeas param de se alimentar. Com isso, conseqüentemente, ocorre a redução da transmissão do *Plasmodium*, o que diminui a incidência de malária na população.

A partir de tais pesquisas pode-se observar no ambiente acadêmico um maior interesse na busca de fungos entomopatogênicos virulentos e que infecte todos os estágios de desenvolvimento: ovo, larva e adultos de mosquitos vetores de doenças humanas.

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 - Objetivo geral

Elaborar estratégias de aplicação de fungos entomopatogênicos em possíveis criadouros do mosquito.

#### 3.2 - Objetivos específicos

- Determinar em condições de laboratório a virulência de isolados de fungos entomopatogênicos para larvas de segundo e terceiro instar de *Ae. aegypti*.
- Avaliar a persistência ou efeito residual dos isolados mais virulentos para larvas de segundo e terceiro instar de *Ae. aegypti* em condições de semi-campo.
- Avaliar o efeito da infecção fungica no desenvolvimento do ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

### 4.1 - Criação das Larvas de *Aedes aegypti* Linhagem Rockefeller

As larvas do mosquito *Ae. aegypti* (Linhagem Rockefeller) foram criadas no insetário do Laboratório de Biotecnologia (CBB/UENF).

Para a criação, mosquitos machos e fêmeas foram mantidos em uma gaiola de plástico (30 cm x 20 cm x 20 cm) a fim que ocorresse o acasalamento. As fêmeas foram nutridas com sangue de camundongo, o que propiciou a maturação dos ovos.

Para oviposição, copos plásticos de volume de 100 mL, contendo papel-filtro em seu interior como sítio de oviposição e mantidos com 50 mL de água, foram colocados dentro da gaiola para que a fêmea ovipositasse. O papel-filtro contendo os ovos foi retirado e colocado dentro de uma bandeja (10 cm x 30 cm x 20 cm) com água estimulando a eclosão das larvas. As larvas foram alimentadas com ração de camundongo no primeiro dia de eclosão.

A temperatura usada para criação foi de 25°C, com Umidade Relativa (UR) de 70 ± 10 %.

### 4.2 – Bioensaio 1: Teste de Virulência larval

Foram testados dois isolados de *B. bassiana* e oito isolados de *M. anisopliae* oriundos de diferentes regiões do Brasil para selecionar aqueles com maior virulência. (Tabela1).

**Tabela 1** – Isolados de fungos entomopatogênicos usados para virulência contra larvas de *Ae. aegypti*

| Numeração | Espécies             | Hospedeiro   | Origem Geográfica                           |
|-----------|----------------------|--|---|
| CG 24     | <i>B. bassiana</i>   | <i>Euschistus heros</i> Fabr.<br>(Heteroptera: Pentatomidae) | Londrina, Parana                            |
| CG 494    | <i>B. bassiana</i>   | Díptera  | Rio do Pomba, Bahia,                        |
| CG 144    | <i>M. anisopliae</i> | <i>Piezodorus guildinii</i><br>(Heteroptera: Pentatomidae)   | Goiania, Goias                              |
| ESALQ 818 | <i>M. anisopliae</i> | Isolado de solo  | Piracicaba, São Paulo                       |
| LPP 96    | <i>M. anisopliae</i> | Isolado de solo  | São Francisco de Itabapoana, Rio de Janeiro |
| LPP 137   | <i>M. anisopliae</i> | Isolado de solo  | Campos, Rio de Janeiro.                     |
| LPP 87    | <i>M. anisopliae</i> | Isolado de solo  | Rondônia, Roraima                           |
| LPP 45    | <i>M. anisopliae</i> | Isolado de solo  | Rondônia, Roraima                           |
| LPP 128   | <i>M. anisopliae</i> | Isolado de solo  | Rondônia, Roraima,                          |
| LPP 133   | <i>M. anisopliae</i> | Isolado de solo  | Montenegro, Roraima                         |

Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram obtidos da coleção do CENARGEN (CG) em Brasília, ESALQ 818 em Piracicaba (São Paulo) e os isolados denominados “LPP”, do LEF da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Os fungos foram cultivados em Dextrose Agar (dextrose 10g; peptona 2,5g; extrato de levedura 2,5g; agar 20g em 1L H<sub>2</sub>O) a 27<sup>o</sup> C por 15 dias para depois serem usados nos experimentos.

Isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram testados contra larvas de *Ae. aegypti* adicionando-se a suspensão de fungo em copos de plásticos descartáveis de 200 mL contendo 50 mL de água e 10 larvas por copo. Foram usados 50 larvas para cada tratamento e os experimentos foram repetidos 3 vezes. Cada copo foi inoculado com 1 mL da suspensão de fungo com  $1 \times 10^8$

conídios  $\text{ml}^{-1}$  (Tween 80 0,05% em água destilada) sendo a concentração final de  $5 \times 10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . As larvas foram alimentadas com 0,5 g da ração animal a cada copo no início do experimento. Os copos foram mantidos em BOD em  $25^\circ\text{C}$ ; UR de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12:12 (L/E).

Os ensaios foram realizados com larvas de 2º e 3º instar e descartadas aquelas que se transformaram em pupas.

Como tratamento controle foram usados cinco copos plásticos contendo cada um 50 mL de água destilada e 10 larvas de *Ae. aegypti* em cada copo aos quais foi adicionado 1 mL de Tween sem a presença de conídios para avaliação da mortalidade natural, se possa aferir a presença de possíveis variáveis intervenientes.

Em experimento preliminar conídios in-ativados com radiação ultravioleta por 10 minutos em câmara de fluxo foram usados nos controles para testar os possíveis efeitos físicos dos conídios suspensos na água na sobrevivência das larvas. Um mL de suspensão desses conídios de *M. anisopliae* na concentração de  $10^8$  conídios/mL foi adicionado a cada frasco.

#### 4.3 – Preparo das Suspensões de Fungo para os Experimentos de Laboratório e de Semi-campo

Todo o processo da coleta de conídios do fungo crescidos no arroz foi feito em câmara de fluxo laminar devidamente desinfetada com álcool 70% e 15 minutos de exposição à UV. A quantificação dos conídios foi feita em Câmara de Neubauer e uma vez estabelecida foi realizada diluição consecutiva usando Tween 80 a 0,05% até a obtenção da concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ $\text{mL}^{-1}$ , suspensão padrão usada nos testes. Os tratamentos controles foram feitos somente com Tween 80 (TW) a 0,05%.

Também foram feitos testes usando grãos de arroz com conídios do fungo aderidos; Neste caso o tratamento controle foi feito com grãos de arroz sem conídios do fungo e devidamente autoclavado durante 15 minutos a 1 atm ( $121^\circ\text{C}$ ).

As suspensões do fungo foram preparadas com Tween 80 (0,05%) em água destilada estéril. Os conídios dos isolados dos fungos foram coletados das

placas de cultivo utilizando-se uma alça de platina esterilizada para serem utilizados como fonte dos inóculos. A concentração de conídios foi avaliada por contagem na câmara de Neubauer. O Tween atua como um dispersante diminuindo a hidrofobicidade dos conídios. Essa suspensão estoque foi preparada à uma concentração de  $10^9$  conídios/mL, e diluída e agitada em Vortex de modo a obter-se uma concentração final de  $10^8$  conídios/mL no dia de sua utilização nos experimentos

#### 4.4 – Bioensaio 2: Persistência da virulência da Suspensão do Fungo ESALQ 818 em Água.

Para verificar a persistência do fungo na água, 1 mL da suspensão ESALQ 818 + TW ( $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ ) foi adicionada em um copo de plástico com 50 mL de água destilada. O copo foi armazenado em BOD a  $25^\circ\text{C}$ ; UR  $70 \pm 10\%$ ; fotofase de 12:12 (L/E) nos períodos de tempo: zero, 3, 5 e 10 dias. Completados os dias de armazenamento as larvas foram colocadas e a mortalidade foi avaliada durante os próximos 8 dias. O tratamento controle consistiu de Tween 80 a 0,05%.

Utilizou-se 3 repetições de 1 copo plástico com 10 larvas 2º e 3º instar de *Ae. aegypti*.

#### 4.5 – Bioensaio 3: Infecção das Larvas com conídios aderidos ao Arroz

Foram utilizados os conídios do isolado ESALQ 818 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  $27^\circ \text{C}$ , em câmara climatizada e depois armazenados a  $4^\circ \text{C}$  em refrigerador.

Para a produção massal do fungo foram usados Erlemeyers de 250 mL contendo 25 g de arroz parboilizado cru + 10 mL de água destilada como meio de cultura, autoclavados durante 15 minutos a 1 atm ( $121^\circ \text{C}$ ).

Após a autoclavagem os conídios foram adicionados ao meio com o auxílio de uma colher estéril. Movimentos circulares foram feitos para homogeneizar os conídios entre os grãos de arroz.

Os Erlemeyers com o fungo crescido no arroz foram mantidos em câmara climatizada a 27 °C.

#### 4.6 – Persistência da virulência do Fungo Crescidos e Aderidos no Grão de Arroz.

Para a determinação da persistência da virulência do fungo crescidos e aderidos nos grãos de arroz, foram usados copos plástico com 50 mL de água e adicionados 1 grão de arroz contendo conídios do isolado ESALQ 818, com concentração final de  $59 \times 10^4$ . O tratamento controle foi feito com 1 grão de arroz autoclavado sem fungo.

#### 4.7 – Virulência do Fungo Crescido e Aplicado em Grão de Arroz em Condições de Semi-campo para Larvas de *Aedes aegypti*

Este trabalho foi conduzido na varanda do insetário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ. Os testes ficaram protegidos contra luminosidade solar direta e chuva por uma cobertura de alvenaria e telha.

Foram utilizados baldes de oito litros tampados com organza nesse teste para verificar a virulência do fungo ESALQ 818 aderidos em grãos de arroz contra larvas de *Ae. aegypti* (linhagem Rockefeller). Dentro de cada balde foi 1 L de água e 50 larvas do 2º e 3º instar de *Ae. aegypti*. Foram adicionados 10 ou 20 grãos de arroz em cada balde.

A concentração final do isolado ESALQ 818 nos baldes contendo 10 grãos arroz foi  $2,9 \times 10^5$ . A concentração final do isolado ESALQ 818 nos baldes contendo 20 grãos arroz foi  $5,9 \times 10^5$ .

#### 4.8 – Persistência da virulência do Fungo Crescido e Aderido em Grãos de Arroz

Foi usado o mesmo procedimento do item 4.7, porém somente 20 grãos de arroz com o fungo foram adicionados nos baldes de 8L contendo 1 L de água e



deixados em condições de semi-campo. Foram realizados três testes com diferentes períodos de tempo de inoculação do fungo na água: Tempo zero, 5, 10 e 20 dias. Completados os dias de inoculação do fungo na água, as larvas foram colocadas então iniciando a avaliação da mortalidade.

#### 4.9 – Efeitos do Fungo ESALQ 818 e LPP 133 no Desenvolvimento de *Aedes aegypti*

Vinte grãos de arroz contendo fungo foram adicionados nos baldes contendo 1L de água e 50 larvas do 2º e 3º instar de *Ae. aegypti*. Durante 14 dias foi avaliada a mortalidade das larvas e também coletada e quantificada o número de pupas que emergiram durante o teste. Estas pupas foram colocadas em copos plásticos com 100 mL de água. Os copos com as pupas ficaram dentro de uma gaiola coberta com tecido de organza até a eclosão dos mosquitos adultos que foram observados durante 8 dias com o intuito de avaliar a possível mortalidade decorrente da exposição das larvas ao fungo. Os mosquitos adultos foram alimentados com uma solução de sacarose (10%). Os mosquitos mortos foram submersos em álcool 70% por 30 segundos, depois colocados dentro de uma câmara úmida por 10 dias para observar a ocorrência do processo de conidiogênese, com a finalidade de confirmar a mortalidade do mosquito pela infecção do fungo.

Em todos os testes feitos em condições de semi-campo foram montados 3 baldes para o tratamento com fungo e 3 baldes para o controle.

O fungo LPP 133 que no primeiro experimento havia apresentado baixa virulência, foi submetido à sucessivas passagens por larvas de *Ae. aegypti* e melhorou sua eficiência diminuindo a taxa de sobrevivência larval.

A concentração final do isolado ESALQ 818 (20 grãos arroz) inoculado em 1000 mL de água foi de  $5,9 \times 10^5$  conídios. A concentração final do isolado LPP 133 (20 grãos arroz) inoculado em 1000 mL de água foi de  $6,5 \times 10^5$  conídios.

#### 4.10 – Virulência em Condições de Laboratório do Isolado ESALQ 818 Contra Larvas Selvagens de *Aedes aegypti* oriundas de Ovos Colhidos no Campo

Armadilhas para oviposição foram confeccionadas com um recipiente (vaso) de plástico preto de 500 mL, com uma palheta de madeira de 3 x 12 cm presa na borda do vaso por um elástico. A madeira foi colocada na parte interna do vaso, em contato com a água limpa, de forma possibilitar a oviposição dos mosquitos fêmeas.

As armadilhas permaneceram 5 dias no campus da UENF e eram vistoriadas diariamente. No quinto dia, as palhetas foram retiradas das armadilhas, e acondicionadas em câmara climatizada a 25 °C, por 48 horas a fim que secassem totalmente. Depois de secas, através de uma lupa, foram quantificados os ovos dos mosquitos aderidos nas palhetas e, imediatamente, estas foram colocadas dentro de uma bandeja (10 cm x 30 cm x 20 cm) com água destilada para propiciar a eclosão das larvas.

Grupos de 10 larvas dos estágios L2 e L3 foram mantidas dentro dos copos (9 cm de largura e 7 cm de altura), com 50 mL de água destilada e 0,5g de ração de camundongo.

A infecção de larvas com o isolado ESALQ 818 ocorreu quando 1 mL da suspensão fungica foi adicionado em cada copo. O tratamento controle consistiu do mesmo procedimento, porém sem adição do fungo.

Foram montados 3 parcelas para o tratamento com fungo e 3 parcelas para o tratamento controle. Foram feitos três repetições deste teste. O valor total da mortalidade, formação de pupa e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) foram avaliados.

#### 4.11 – Virulência do Fungo ESALQ 818 Crescido e Aplicado em Grão de Arroz em Condições de Semi-campo para Larvas Selvagens de *Aedes aegypti*

Foi feito o mesmo procedimento que o item 4.8, porém as larvas usadas foram oriundas de ovos coletadas no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

#### 4.12 – Avaliação da mortalidade das larvas

Nos experimentos realizados, a mortalidade das larvas foi avaliada diariamente por 8 dias. As larvas mortas foram removidas, esterilizadas em álcool 70% por 30 segundos e enxaguadas imediatamente na água destilada estéril e, em seguida transferida para placas de Petri que eram mantidas a 25°C para estimular o conídio-gênese.

#### 4.13 – Forma de Análise dos Resultados

O valor médio de sobrevivência foi calculado pelo método de Kaplan-Meier (Blanford et al., 2005). As curvas de sobrevivência foram comparadas usando o Log-Rank Test a 95% de nível de significância. Este método foi conduzido pelo GraphPad Prism 3.0 Software. Primeiramente foram analisadas as repetições de cada tratamento, com o objetivo de verificar se as curvas de sobrevivência entre as repetições foram estatisticamente diferentes. Não ocorrendo diferenças significativas entre repetições, as repetições de cada experimento foram agrupadas (“pooled”), dando-se início à análise das curvas de sobrevivência entre os tratamentos. O tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) das larvas também foi avaliado pelo GraphPad Prism.

Os grupos controles que não apresentaram diferenças significativas em suas curvas de sobrevivência foram agrupados, calculadas as médias e apresentada somente uma curva de sobrevivência.

A Anova com teste de Duncan das mortalidades totais foi feita para comparar a significância das médias de mortalidade entre os tratamentos.

O teste de Duncan também foi usado para verificar a significância da mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* no trabalho de campo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 – Seleção em Laboratório de Fungos Virulentos Para Lavas de *Aedes aegypti* (Rockefeller)

Dos dez isolados testados contra as larvas de 2º e 3º instar, somente três (CG24, CG 144 e ESALQ 818) foram considerados mais virulentos contra as larvas, apresentando porcentagens de mortalidade maiores que 80%. A maior porcentagem de mortalidade ocorreu quando foi utilizado o isolado CG 144 de *M. anisopliae* (90%). A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa quanto à mortalidade entre esses três isolados (CG24, CG 144 e ESALQ 818) com  $F_{(2,6)} = 0.80$ ;  $p > 0.05$ .

A Tabela 2 mostra a porcentagem de mortalidade causada pelos isolados de fungos testados. A porcentagem de mosquitos mortos no controle variou de 0 – 10%. A menor porcentagem de mortalidade (6%) ocorreu quando o isolado CG 494 de *Beauveria bassiana* foi testado contra as larvas de *Ae. aegypti*.

**Tabela 2** – Média de mortalidade (%)  $\pm$  desvio padrão das larvas expostas por 8 dias a dois isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e oito isolados de *Metarhizum anisopliae* (Ma).

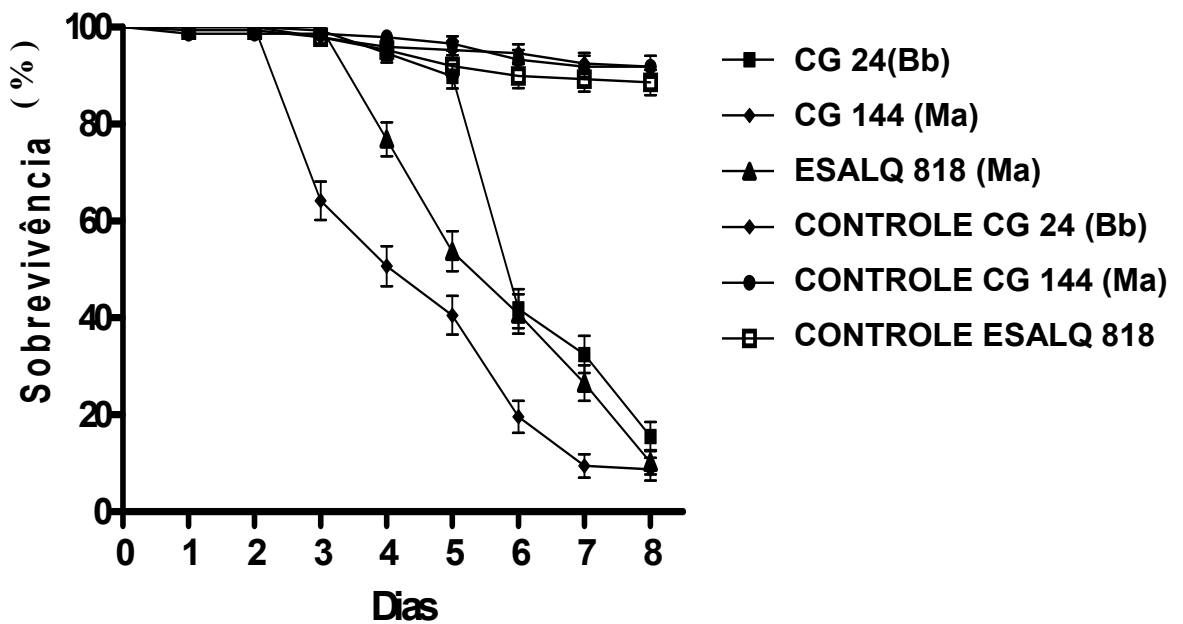
| <b>Isolado</b>   | <b>Mortalidade</b>   | <b>S<sub>50</sub></b> | <b>Mortalidade</b> |
|------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| <b>(espécie)</b> | <b>(% media) e</b>   | <b>(dias)</b>         | <b>Controle</b>    |
|                  | <b>desvio padrão</b> |                       | <b>(%)</b>         |
| CG 24*           | (Bb) 82,7 $\pm$ 23,9 | 6                     | 8                  |
| CG 494           | (Bb) 6 $\pm$ 0,5     | NA                    | 2                  |
| CG 144*          | (Ma) 90 $\pm$ 17,4   | 5                     | 8                  |
| ESALQ 818*       | (Ma) 88 $\pm$ 14,7   | 6                     | 10                 |
| LPP 96           | (Ma) 22 $\pm$ 1,8    | NA                    | 4                  |
| LPP 137          | (Ma) 20 $\pm$ 1,5    | NA                    | 0                  |
| LPP 87           | (Ma) 20 $\pm$ 1,4    | NA                    | 3                  |
| LPP 45*          | (Ma) 14 $\pm$ 3,2    | NA                    | 4,6                |
| LPP 128          | (Ma) 14 $\pm$ 1,6    | NA                    | 0                  |
| LPP 133*         | (Ma) 8 $\pm$ 2       | NA                    | 0                  |

S<sub>50</sub>= Tempo médio de sobrevivência

NA: Análise não apropriada.

\* experimentos repetidos 3 vezes com 50 larvas por repetição.

Foi possível calcular somente o tempo médio de sobrevivência (S<sub>50</sub>) destes três isolados, os demais apresentaram mortalidade de larvas menor de 50%. O isolado mais virulento foi o CG 144 causando 50% de mortalidade das larvas em 5 dias de exposição ao fungo. Os outros dois isolados CG 24 e ESALQ 818 causaram 50% de mortalidade das larvas em 6 dias.



**Figura 5** - Sobrevivência das larvas tratadas com fungos entomopatogênicos e dos grupos controle com desvio padrão.

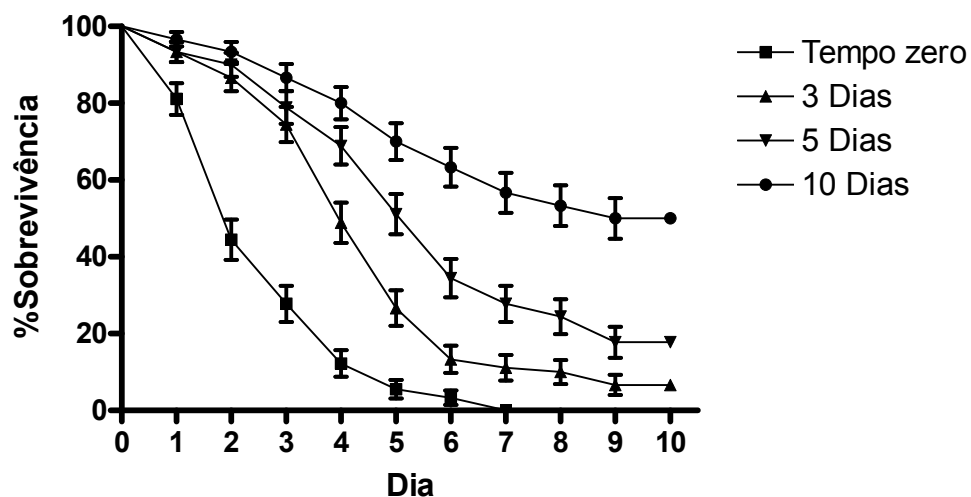
Os insetos submetidos a infecção com os três isolados mais virulentos (Figura 5) mostraram similaridade entre as porcentagens de mortalidades, contudo, a sobrevivência dos insetos submetidos aos isolado CG144 (*M. anisopliae*) apresentaram mortalidade mais precoce. A análise de Probit mostrou que a  $CL_{50}$  para CG 144 foi de  $3,16 \times 10^5$  conídios  $mL^{-1}$

#### 5.1.1 – Persistência em Água da Suspensão de Fungo ESALQ 818 para Larvas de *Aedes aegypti* (Rockefeller)

Foi escolhido o fungo ESALQ 818 por apresentar maior facilidade de produção em laboratório e menor desvio padrão nos resultados das parcelas de acordo com a Tabela 2.

A menor sobrevivência larval ocorreu quando as larvas foram expostas a infecção no mesmo instante em que o fungo foi inoculado na água (Tempo zero). A maior taxa de sobrevivência larval (53%) foi observada quando o fungo permaneceu por 10 dias na água antes da colocação das larvas.

A Figura 6 mostra as curvas de sobrevivência das larvas expostas ao fungo inoculado em água por diferentes períodos (0, 3, 5, 10 dias) avaliando então a persistência da virulência do fungo em meio líquido. Foi observado que as larvas expostas imediatamente à inoculação do fungo (0 dia) apresentaram, em 7 dias, 0 % de sobrevivência e também o menor  $S_{50}$  (2 dias). A maior  $S_{50}$  (9 dias) ocorreu quando o fungo ficou inoculado na água por 10 dias.



**Figura 6** – Sobrevivência com desvio padrão das larvas expostas ao Fungo ESALQ 818+Tween armazenado em água por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5 e 10 dias) para a avaliação da patogenicidade do fungo.

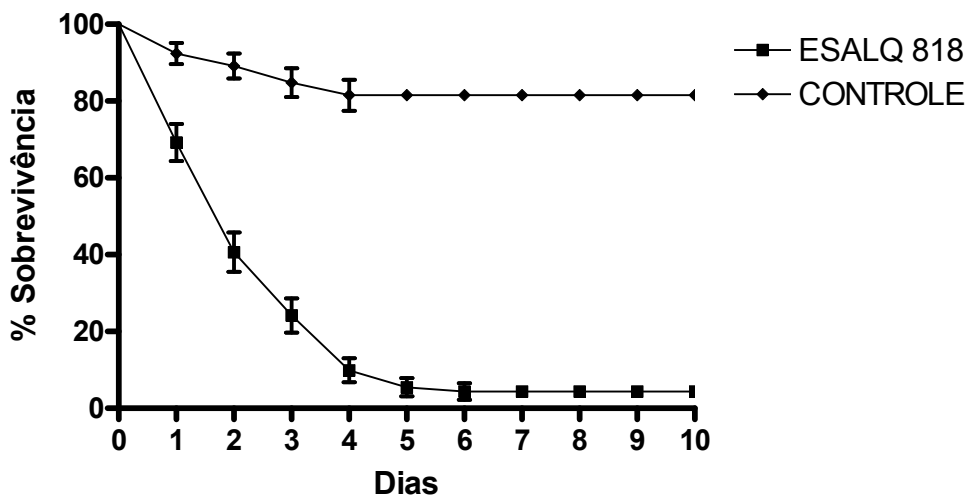
**Tabela 3** – Sobrevivência (SOBR)  $\pm$  desvio padrão (DP) e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) das larvas expostas ao Fungo ESALQ 818+Tween inoculado na água por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5, 10 dias). O tratamento controle foi feito somente com Tween.

| DIAS DO FUNGO NA ÁGUA | TEMPO ZERO    | 3 DIAS       | 5 DIAS        | 10 DIAS       |
|-----------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| SOBR. TRAT .FUNGO     | 0 $\pm$ 11,28 | 7 $\pm$ 7,98 | 17 $\pm$ 5,01 | 54 $\pm$ 2,47 |
| $S_{50}$              | 2             | 4            | 6             | 9             |
| SOBR. TRAT .CONTROLE  | 77,7          | 81           | 80            | 79            |

### 5.1.2 – Virulência do Fungo ESALQ 818 Crescido e Aderido no Grão de Arroz para Larvas Rockefeller

Neste teste apenas um grão de arroz com conídios do fungo ESALQ 818 foi usado para verificar a virulência do fungo contra larvas de *Aedes aegypti*. O tratamento controle foi feito com um grão de arroz sem fungo e autoclavado, verificando possíveis efeitos desse substrato na sobrevivência das larvas.

No tratamento feito com fungo as larvas apresentaram 4% de sobrevivência com o valor do  $S_{50}$  de 2 dias. O controle manteve-se estável apresentando 82% de sobrevivência das larvas.

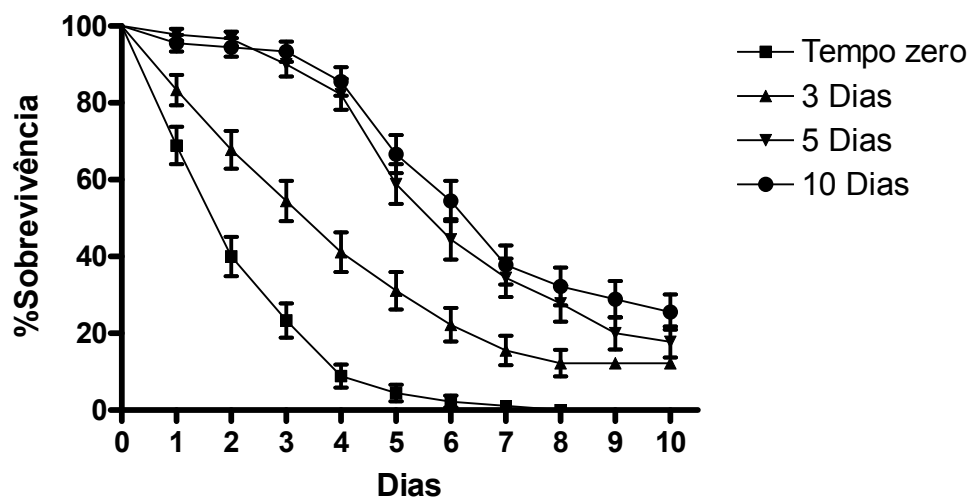


**Figura 7** – Sobrevivência com desvio padrão das larvas colocadas na água com um grão de arroz do isolado ESALQ 818. O tratamento controle foi feito com um grão de arroz sem conídios e autoclavado.

### 5.1.3 –Persistência em Água do Fungo ESALQ 818 Crescidos e Aderidos no Grão de Arroz

A menor sobrevivência larval (0%) ocorreu quando as larvas foram expostas a infecção no mesmo instante em que o grão de arroz com o fungo foi inoculado na água (Tempo zero). A maior taxa de sobrevivência das larvas (25%) foi observada quando o grão de arroz com o fungo foi inoculado na água por 10 dias (Figura 8) com  $S_{50}$  das larvas de 7 dias (Tabela 5).





**Figura 8** –Curvas de sobrevivência com desvio padrão das larvas expostas ao grão de arroz com o fungo ESALQ 818 por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5, 10 dias).

**Tabela 4** – Taxa de sobrevivência  $\pm$  desvio padrão (DP) e tempo médio sobrevivência ( $S_{50}$ ) das larvas expostas ao grão de arroz com ESALQ 818 inoculado em água por diferentes períodos (Tempo zero, 3, 5, 10 dias). O tratamento controle foi feito da mesma forma com arroz autoclavado mas sem fungo.

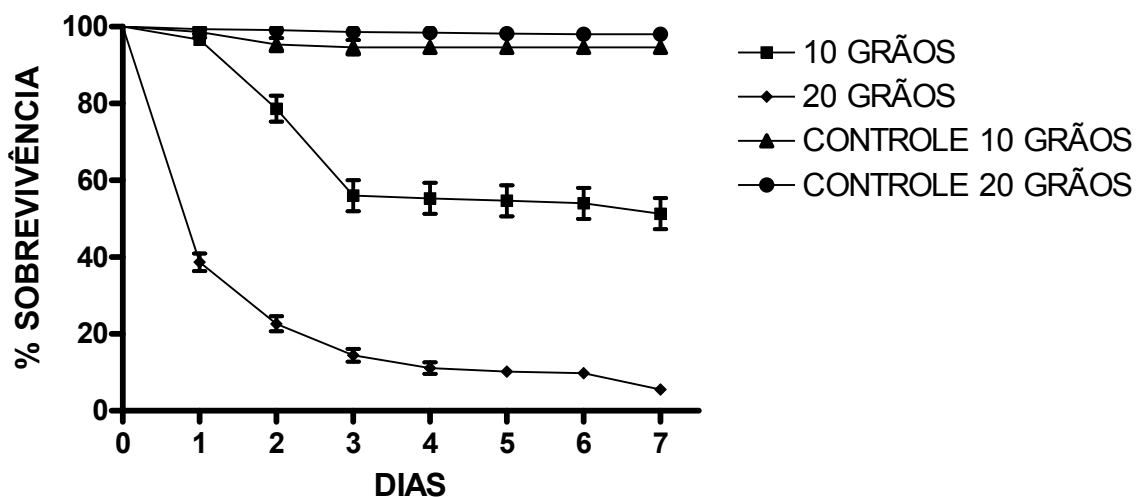
| % SOBREVIVÊNCIA       | TEMPO ZERO    | 3 DIAS        | 5 DIAS        | 10 DIAS       |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| GRÃOS ARROZ COM FUNGO | $0 \pm 11,15$ | $11 \pm 5,37$ | $18 \pm 5,98$ | $25 \pm 5,73$ |
| $S_{50}$ (dias)       | 2             | 4             | 6             | 7             |
| Tratamento controle   | 79            | 86            | 81            | 86            |

## 5.2 – Testes de Semi-Campo com Larvas de *Aedes aegypti* (Rockefeller)

### 5.2.1 Virulência do ESALQ 818 Crescido e Aderido em duas Quantidades de Grão de Arroz para Larvas de *Aedes aegypti* (Rockefeller).

Nos testes feitos em condições de semi-campo diferentes quantidades de grãos de arroz (10, 20 grãos) com conídios aderidos foram usados para verificar a virulência do isolado ESALQ 818 contra larvas de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller

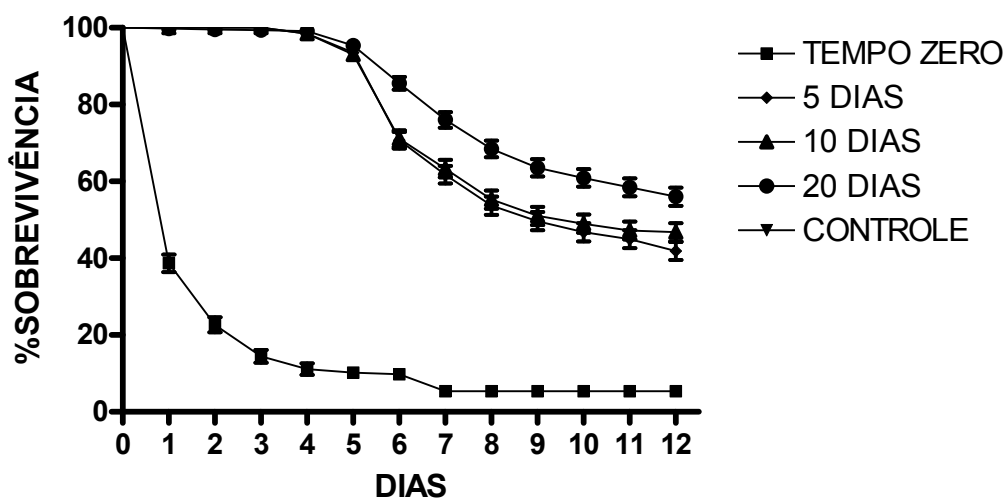
No tratamento feito com 10 grãos de arroz com fungo foi verificado em 7 dias 52% de sobrevivência das larvas. Aumentando a quantidade de arroz (20 grãos), foi observado 5% de sobrevivência das larvas e um valor de  $S_{50}$  de 1 dia. (Figura 9).



**Figura 9-** Curvas de Sobrevivência com desvio padrão das larvas da linhagem Rockefeller expostas a diferentes quantidades de grãos de arroz (10 e 20 grãos) com fungos ESALQ 818.

### 5.2.2 Persistência em Água da Virulência do Fungo ESALQ 818 Crescidos e Aderidos em 20 Grãos de Arroz para Larvas de *Aedes aegypti* (Rockefeller).

As larvas que entraram em contato com os grãos de arroz no Tempo zero apresentaram 5% de sobrevivência (Figura 10), com valor do  $S_{50}$  de 1 dia. Os demais tempos de permanência do fungo na água (5, 10 e 20 dias) apresentam 42%, 54% e 58% de sobrevivência das larvas respectivamente (Tabela 7).



**Figura 10** – Sobrevivência com desvio padrão das larvas expostas ao fungo inoculado em grãos de arroz que permaneceram em água por diferentes tempos (tempo zero, 5, 10, e 20 dias)

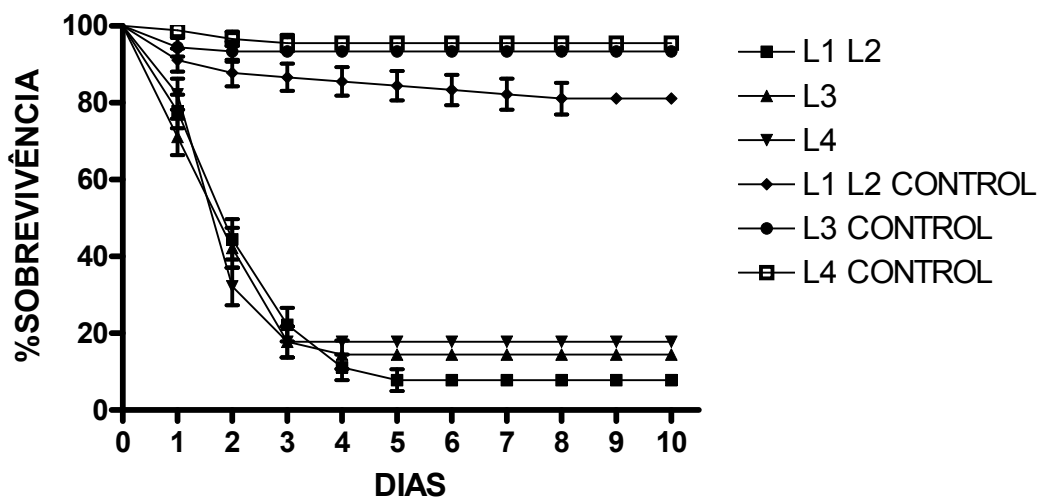
**Tabela 5** – Sobrevivência  $\pm$  desvio padrão (DP) e tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) das larvas exposta aos grãos de arroz com fungo mantidos em água por (Tempo zero, 5, 10 e 20 dias).

|                 | TEMPO ZERO    | 5 DIAS         | 10 DIAS        | 20 DIAS        |
|-----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| % SOBREV.       | 5 $\pm$ 78,79 | 42 $\pm$ 28,59 | 54 $\pm$ 26,61 | 58 $\pm$ 19,35 |
| $S_{50}$ (dias) | 1             | 9              | 10             | -              |

### 5.3 - Virulência do ESALQ 818 e LPP 133 Contra População Natural de Larvas *Aedes aegypti* em Laboratório

#### 5.3.1 – Virulência do ESALQ 818 para os Diversos Instares Larvais de *Aedes aegypti*

Foi observado que todos os instares larvais foram susceptíveis ao isolado ESALQ 818. A menor porcentagem de sobrevivência do tratamento fungo ocorreu quando os instares larvais L1/L2 foram infectados com o fungo entomopatogênico (ESALQ 818) com 8% de sobrevivência (Figura 11). Para todos as fases larvais, o tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) foi de 2 dias.

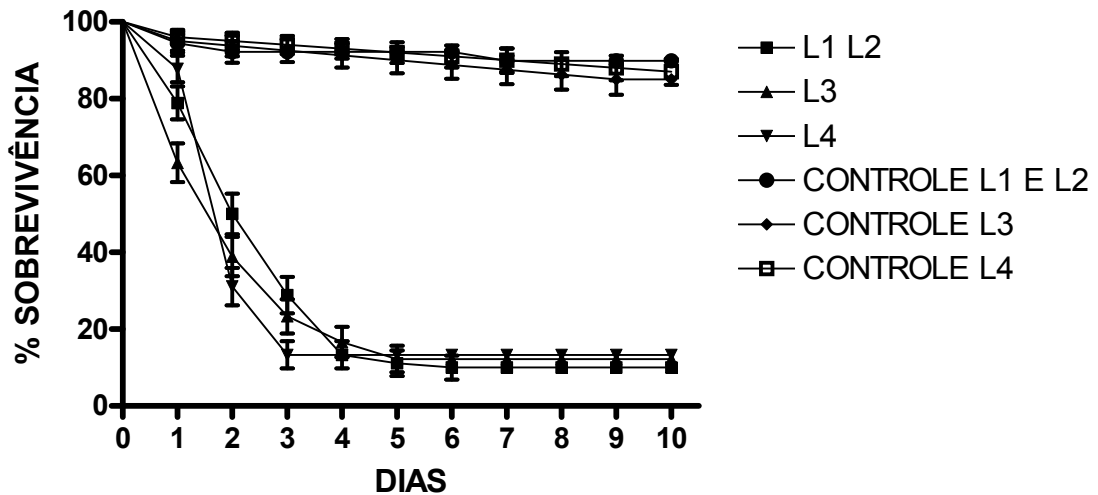


**Figura 11** – Sobrevivência (%) dos diferentes instars larvais infectados com o isolado ESALQ 818. Os tratamentos controle foram feitos apenas com 0,05% Tween 80.

#### 5.3.2 – Virulência de LPP 133 para os Diversos Instares Larvais de *Aedes aegypti*

Observou-se que todos os instares larvais foram susceptíveis ao isolado LPP 133 (submetido à sucessivas passagens por larvas de *Ae. aegypti*). A menor porcentagem de sobrevivência do tratamento fungo ocorreu quando os instares larvais L1/L2 foram infectados com o fungo entomopatogênico (10% de sobrevivência). Os instars L3 e L4 tiveram 11% e 13% de sobrevivência das

larvas respectivamente (Figura 12). Para todos as fases larvais, o tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ) foi de 2 dias.

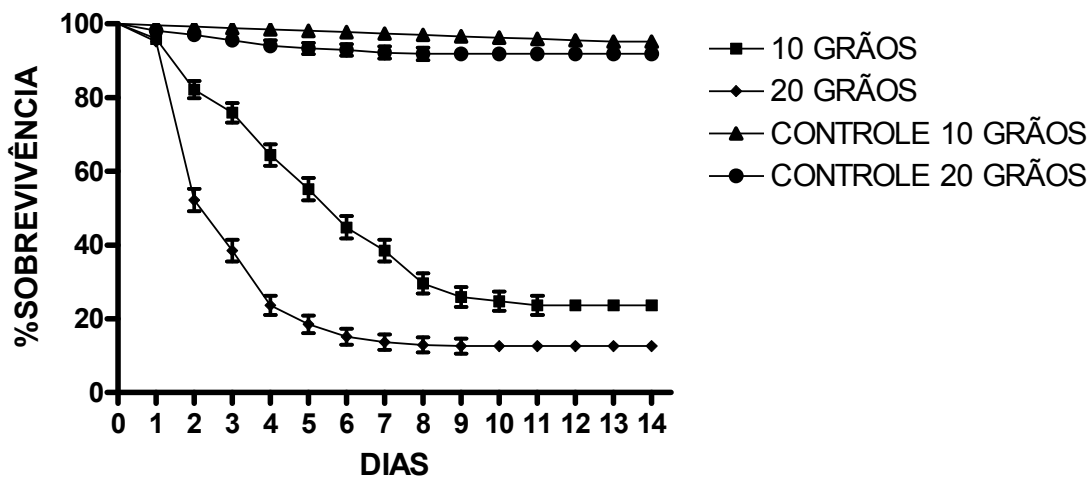


**Figura 12** - Porcentagem de sobrevivência dos diferentes instars larvais infectados com o isolado LPP 133 A + 0,05% Tween 80. O tratamento controle foi feito apenas com 0,05% Tween 80.

#### 5.4 Virulência de Diferentes Quantidades de ESALQ 818 Crescidos e Aderidos em Grão de Arroz Contra uma População Natural de Larvas de *Aedes aegypti* em condições de Semi-campo

Nos testes feitos com larvas de população natural de *Ae. aegypti* em condições de semi-campo diferentes quantidade de grãos de arroz com o fungo foi usado para verificar a virulência do isolado ESALQ 818 contra as larvas desse inseto.

Em 14 dias as larvas expostas a 1 L de água com 10 grãos de arroz com fungo tiveram sobrevivência de 23%. As larvas expostas a 20 grãos de arroz com fungo tiveram sobrevivência de 15% (Figura 13).



**Figura 13** - Sobrevivência com desvio padrão de uma população de larvas do município de Campos dos Goytacazes, expostas a diferentes quantidades de grãos de arroz (10 – 20 grãos de arroz).

A Tabela 10 mostra a porcentagem das larvas que formaram pupas nos tratamento com arroz/fungo.

**Tabela 6** - Porcentagens de mortalidade das larvas expostas a 10 e 20 grãos de arroz com fungo (% MORT. LARVAL) ± desvio padrão (DP) da mortalidade de larvas, porcentagem da formação de pupas das larvas que não foram mortas pelo fungo.

|                    | 10<br>GRÃOS | CONTROLE<br>10 GRÃOS | 20<br>GRÃOS | CONTROLE<br>20 GRÃOS |
|--------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|
| % MORT. LARVAL     | 77 ± 12,8   | 2 ± 0,65             | 85 ± 31,1   | 8 ± 1,91             |
| % FORMAÇÃO<br>PUPA | 23%         | 98%                  | 15%         | 92%                  |

## 5.5 – Influência da Infecção do ESALQ 818 no desenvolvimento de *Aedes aegypti*

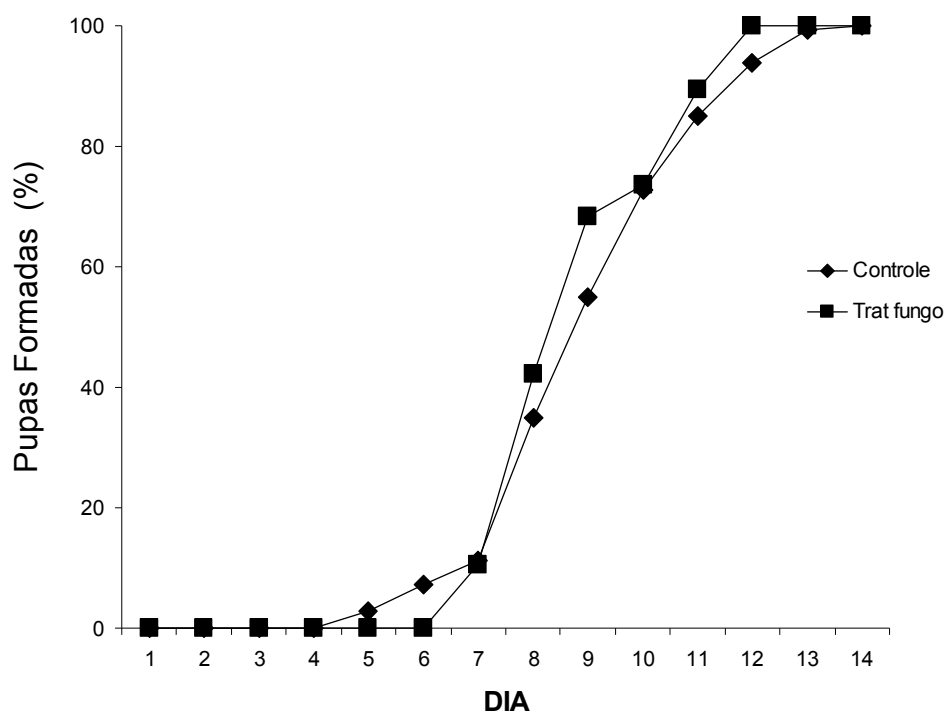
Para verificar se o fungo apresentaria efeito residual nas diferentes fases do inseto *Ae. aegypti* as larvas foram expostas a 1L de água com 20 grãos de arroz (com conídios do fungo aderidos). O tratamento controle foi feito da mesma forma, porém com os grãos de arroz sem fungo.

Neste teste foi avaliado as porcentagens de mortalidade das larvas, formação de pupas, mortalidade de pupas, emergência dos adultos e mortalidade dos adultos.

O teste apresentou 60% de larvas mortas e 40% de pupas formadas. Das pupas formadas 20% morreram e 80% formaram mosquitos adultos. Não ocorreu mortalidade dos mosquitos adultos durante 8 dias de observação.

O desvio padrão (DP) da quantidade de pupas mortas devido o efeito residual do fungo e as porcentagens de mortalidade do tratamento controle são apresentados na Tabela 11.

O desenvolvimento das pupas oriundas das larvas expostas ao arroz com fungo foi ligeiramente mais rápido quando comparado com o tratamento controle (Figura 14).



**Figura 14** – Desenvolvimento das larvas em pupas nos tratamentos feitos com o isolado ESALQ 818 e os tratamentos controle.

**Tabela 7** - Porcentagem de mortalidade das larvas, pupas e adultos; formação de pupas e adultos e desvio padrão (DP) do tratamento fungo ESALQ 8181 e tratamento controle.

|                    | TRATAMENTO FUNGO | TRATAMENTO CONTROLE |
|--------------------|------------------|---------------------|
| % LARVAS MORTAS    | 60 ± 29,4        | 0                   |
| % PUPAS FORMADAS   | 40 ± 17,8        | 100                 |
| % PUPAS MORTAS     | 20 ± 1,56        | 0                   |
| % ADULTOS FORMADOS | 80               | 100                 |
| % ADULTOS MORTOS   | 0                | 0                   |

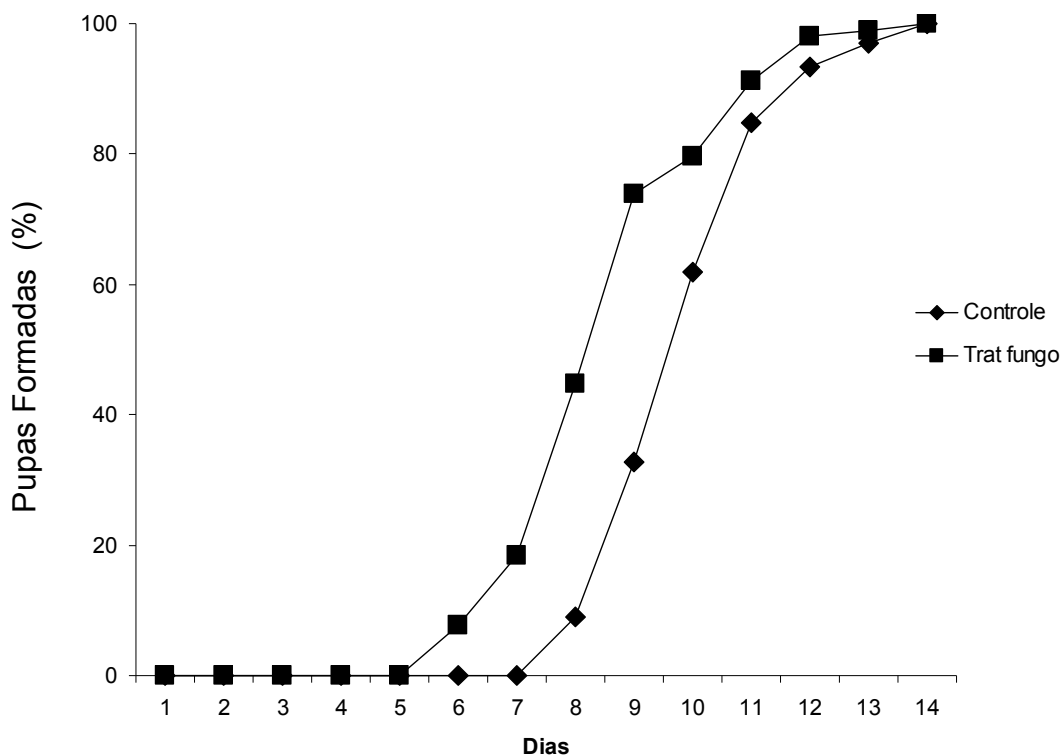
#### 5.6 Influência da Infecção do LPP 133 no desenvolvimento de *Aedes aegypti*

O teste apresentou 62% de larvas mortas e 38% de pupas formadas. Das pupas formadas 58% morreram e 42% formaram mosquito adulto. Não ocorreu mortalidade dos mosquitos adultos durante 8 dias de observação.

Os números médios das pupas mortas devido ao efeito residual do fungo e as porcentagens de mortalidade do tratamento controle são apresentados na Tabela 12.

O desenvolvimento das pupas oriundas das larvas expostas ao arroz com fungo foi novamente um pouco mais rápido quando comparado com o tratamento controle.





**Figura 15** Desenvolvimento das larvas em pupas nos tratamentos feitos com o isolado LPP 133 e os tratamentos Controle.

**Tabela 8** - Porcentagem de mortalidade das larvas, pupas e adultos; formação de pupas e adultos de insetos tratamentos com fungo LPP 133 e os tratamentos controles.

|                    | TRAT FUNGO | TRAT CONT |
|--------------------|------------|-----------|
| % LARVAS MORTAS    | 62 ± 9,65  | 0         |
| % PUPAS FORMADAS   | 38 ± 9,95  | 100       |
| % PUPAS MORTAS     | 58         | 0         |
| % ADULTOS FORMADOS | 42         | 100       |
| % ADULTOS MORTOS   | 0          | 0         |

## 6 - DISCUSSÃO

Neste estudo foram selecionados isolados de fungos entomopatogênicos para investigar a patogenicidade e virulência contra larvas de *Ae. aegypti*, com a finalidade de reduzir as populações de adultos desse vetor e portanto a incidência da dengue.

Os resultados iniciais mostraram que somente dois isolados de *M. anisopliae* e um de *B. bassiana* foram virulentos contra as larvas do 2° e 3° instar do mosquito *Ae. aegypti*. Similar resultado foi demonstrado em estudo usando *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra larvas de mosquitos onde somente um dos oito isolados testados por Alves et al. (2002) foi considerado virulento. Já foi documentado que a variabilidade genética dessas duas espécies de fungo resulta em significativas diferenças na virulência (Hajek & St. Leger, 1994).

Recentemente Luz et al. (2007) mostrou que algumas espécies de fungos entomopatogênicos são capazes de colonizar ovos de *Ae. aegypti* quando em contato prolongado com o fungo, contudo, 11 espécies de fungo testadas não foram capazes de infectar o estágio de ovo.

Neste estudo, os três isolados mais virulentos contra larvas de *Ae. aegypti* não tiveram diferenças significativas quanto a porcentagem de mortalidade, porém uma pequena diferença no valor do  $S_{50}$  foi observado, indicando diferenças entre a virulência dos isolados. Estas diferenças podem ser consideradas importantes, pois a alteração no tempo médio de mortalidade tem como consequência a redução da população adulta do mosquito *Ae. aegypti* e conseqüentemente na transmissão da dengue.

Um isolado de *M. anisopliae* usado por Alves et al. (2002) contra larvas de *Culex quinquefasciatus* causou 50% de mortalidade em 24 horas quando aplicado sobre a superfície de água contendo as larvas. Entretanto, esse fungo perdeu rapidamente a viabilidade dois dias depois da aplicação. O presente estudo

mostra que o fungo ESLQ 818 manteve-se viável por 10 dias depois de inoculados em copos plásticos com água. É possível que a larva sobreviva a infecção e forme a pupa, porém pode ser que a pupa torne-se inviável e não emergem os adultos (Tabela 7 e 8).

As larvas que sobreviveram à exposição ao fungo e se desenvolveram em pupas ainda assim podem sofrer os efeitos tardios do patógeno. Neste caso, as pupas infectadas com o fungo não concluiriam o seu desenvolvimento, ou seja, as pupas não se desenvolveriam em adultos.

O fungo foi re-isolado de larvas mortas de *Ae. aegypti* e um aumento na virulência foi subsequentemente observado. *M. anisopliae* ESALQ 818 demonstrou um aumento de virulência depois desse procedimento, com uma redução no tempo médio de sobrevivência das larvas. O isolado originalmente demonstrou valores de  $S_{50}$  de 6 dias (Tabela 2), enquanto após o re-isolamento, o fungo causou 50% mortalidade em 2 dias (Tabela 3). Posteriormente, esse isolado veio ser usado para os outros experimentos. O fenômeno de aumento de virulência após a passagem no hospedeiro tem sido relatado anteriormente em larvas de mosquito por Daoust & Roberts (1982).

Com a finalidade de aplicar os fungos contra larvas de *Ae. aegypti* de modo mais conveniente e dispensar a necessidade de uma formulação, investigamos a virulência de conídios inoculados na água junto com as larvas diretamente aderidos nos grãos de arroz, no intuito de ter uma forma de liberação lenta (*slow release*) dos conídios, similar ao processo de encapsulação, já usado na formulação de fungos entomopatogênicos (Feng et al. 1994). A Figura 7 mostra a sobrevivência das larvas na presença de um grão de arroz com conídios de ESALQ 818. As larvas morreram rapidamente e o valor de  $S_{50}$  de dois dias (Tabela 4) foi melhor do que no experimento anterior (Figura 6) que consistiu na inoculação do fungo +Tween na água.

Devido ao resultado positivo desse experimento, foi montado outro experimento para monitorar a persistência dos conídios inoculados em arroz contra larvas de *Ae. aegypti* em condições de laboratório. Os resultados desse experimento (Figura 8) mostram a virulência dos conídios depois de diferentes tempos de permanência na água antes de adicionar as larvas. O tempo zero representa o controle “positivo” no sentido que as larvas são expostas ao fungo imediatamente, como foi feito no experimento anterior. Esperava-se, portanto um

resultado igual de Figura 7, confirmado pelo valor de  $S_{50}$  de 2 dias. Pode-se observar, entretanto, uma queda na mortalidade conforme a passagem do tempo entre a inoculação do fungo na água e a adição das larvas. Os valores de  $S_{50}$  aumentam gradativamente, sendo de sete dias quando o fungo foi deixado na água por 10 dias antes de colocar as larvas. Porém, a mortalidade ainda foi considerada alta, com somente 25% das larvas sobrevivendo no final do experimento (Tabela 4).

Os próximos experimentos foram feitos para testar o uso do fungo aplicado nos grãos de arroz numa simulação de campo, chamado “semi-campo” quando os baldes foram colocados na varanda coberta do insetário. Devido o aumento no volume de água usado (1 litro nas baldes ao invés de 50 ml usado nos copos plásticos) foi testado o efeito da inoculação de 10 e 20 grãos de arroz. A Figura 9 mostra as curvas de sobrevivência das larvas expostas as diferentes concentrações de conídios liberados na água depois da inoculação com arroz. O uso de 20 grãos de arroz foi mais eficiente do que 10 grãos, com somente 5% das larvas sobreviventes até dia 7 do experimento. O valor de  $S_{50}$  foi o menor de todos os experimentos até agora, sendo de um dia.

Os efeitos prejudiciais do UV sobre o fungo (Morley-Davis et al., 1995) devem ser levados em consideração quando este for usado em recipientes propícios para o desenvolvimento do mosquito. Os efeitos deletérios da luz solar sobre o BTi já foi demonstrado por Vilarinhos et al. (2003).

A maioria dos experimentos descritos aqui foi feita com larvas da linhagem de laboratório chamada Rockfeller. Entretanto, essa linhagem depois de muitos anos de cruzamentos entre si e muitos anos vivendo em condições de laboratório, poderia não responder do mesmo jeito do que *Ae. aegypti* selvagem. Portanto, decidimos testar a virulências do isolado ESALQ 818 contra larvas de *Ae. aegypti* oriundas de ovos coletado no campo. A Figura 13 mostra a sobrevivência das larvas selvagens expostas a 10 e 20 grãos de arroz em condições de semi-campo. Em comparação com as curvas de sobrevivência da linhagem Rockfeller (Figura 10), não houve grandes diferenças, embora a mortalidade da linhagem de campo foi mas acentuada do que a de Rockfeller com 20 grãos de arroz.

Testamos também a persistência dos conídios aplicados em grãos de arroz em condições de semi-campo, numa forma similar ao experimento feito em laboratório, adicionando o fungo na água primeiro e posteriormente colocando as

larvas (Figura 10). No controle “positivo” (tempo zero) as larvas morreram rapidamente, entretanto, as mortalidades registradas depois de 5, 10 e 20 dias de permanência do fungo na água foram bastante reduzidas, com sobrevivência final em torno de 50%. Os resultados de 5 ou 10 dias de persistência foram similares. Foi observado durante o experimento que a água nos baldes ficou turva, possivelmente devido de crescimento de bactérias, se nutrindo do arroz. Portanto, a microbiota da água poderia ter inibido a ação do fungo. A possível ocorrência de competição entre bactérias e fungos entomopatogênicos tem sido relatada em alguns trabalhos de controle microbiano de pragas, mostrando a necessidade de levar em consideração essas interações (Meyling & Eilenberg, 2007).

Para verificar se a virulência dos isolados ESALQ 818 e LPP 133 seriam iguais para as três fases do desenvolvimento larval de *Ae. aegypti*, dois experimentos foram montadas em condições de laboratório, inoculando larvas de L1+L2 (instares difícil de diferenciar e separar), L3 e L4 separadamente. As Figuras 11 e 12 mostram que não houve diferenças entre os dois fungos quanto à sobrevivência das três fases larvais, com 8 a 18% sobrevivência e 10 a 13% sobrevivência observada respectivamente. Os valores de  $S_{50}$  para as três fases de desenvolvimento foram iguais (2 dias) usando os dois isolados.

Há diferenças na susceptibilidade ao fungo de diferentes fases de desenvolvimento de insetos. Tem sido relatado que as fases imaturas são mais susceptíveis do que a fase de pupa e adulta, entretanto, também existe diferenças entre os instares larvais/ninfais, sendo considerado normal que os primeiros instares são mais susceptíveis (Alves, 1998). Porém, a fase ninfal do percevejo do gênero *Blissus* (Hemiptera: Lygeidae) foi mais resistente à infecção de *Beauveria bassiana* do que os adultos da mesma espécie (Samuels & Coracini, 2004).

A infecção pelo fungo pode não somente resultar em mortalidade das larvas, mas também poderia ter um efeito na formação das pupas (tempo de formação e número formado), mortalidade das pupas e viabilidade das mesmas, ou seja, o desenvolvimento normal/emergência de adultos. A Tabela 7 e 8 demonstram esse efeito no desenvolvimento das pupas e adultos. Exposição ao fungo ESALQ 818 nesse experimento causou 60% de mortalidade das larvas. Das larvas sobrevivendo o contato com o fungo, todas formaram pupas, entretanto, 20% dessas pupas não desenvolveram em adultos, ou seja, as pupas foram consideradas mortas pela infecção tardia do fungo ou por causas ligadas a

exposição ao fungo. Seguindo o ciclo de vida dos insetos, os adultos emergindo das pupas viáveis (80%), foram observados para sinais de infecção ou efeitos do fungo na sobrevivência deles. Não foi observado mortalidade dos adultos durante um período de 10 dias. O mesmo experimento com o LPP 133 (Figura 15) demonstrou resultados semelhantes ao experimento do ESALQ 818.

Outros fatores como a capacidade reprodutiva e locomotora não foram observadas, contudo, os adultos se comportaram normalmente. Esses resultados são importantes para a hipótese de que o fungo inoculado na fase larval possa ter efeitos ainda depois da metamorfose e processo de muda, e a simples contagem de mortalidade de larvas poderia subestimar o efeito total do fungo na população de mosquitos.

Um outro aspecto de efeitos no desenvolvimento das larvas causado pelo fungo poderia ser no tempo que a larva leva para formar a pupa. Mudanças no tempo de desenvolvimento larva-pupa podem ser causadas pela depleção de nutrientes que acontece enquanto o fungo coloniza o hospedeiro ou por causa da liberação de toxinas na hemolinfa pelo fungo (Samuels et. al. 1988). Os dois isolados foram utilizados para a avaliação de tempo de desenvolvimento. Interessantemente, as curvas dos números de pupas formadas, mostraram que as larvas expostas ao fungo produziram as primeiras pupas no mesmo dia do grupo controle (dia 6), entretanto, com o dobro da quantidade de pupas. Essa tendência continuou até o final do experimento. A esperada inibição do desenvolvimento das larvas não aconteceu. Uma possível explicação desse fenômeno seria uma forma de defesa do inseto contra infecção, em que um desenvolvimento acelerado poderia resultar numa antecipada troca de cutícula durante a muda, deixando a próxima fase larval livre do fungo.

A seleção de isolados virulentos ao mosquito *Ae. aegypti* visa o desenvolvimento de um programa de controle biológico com um fungo de fácil produção e com alta persistência no ambiente. Os isolados LPP133 e ESALQ 818 foram selecionados não apenas por sua alta virulência contra as larvas de *Ae. aegypti*, mas também devido a sua fácil produção *in vitro* e a alta concentração de conídios quando cultivados em arroz. Também é importante selecionar um isolado de fungo virulento para o estágio de larva e adulto do mosquito, contudo com métodos de controle diferentes para ambos os estágios. Neste caso o ESALQ 818 seria um forte candidato, pois foi observada neste trabalho, alta virulência deste

isolado contra larvas e Paula et al. (2008) demonstrou que este isolado é altamente virulento contra os mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*.

Os estudos da persistência do fungo são considerados importantes por darem subsídios para o desenvolvimento destes e de outros fungos para uso no controle Integrado de Pragas. Inyang et al. (2000) estudaram a persistência de *M. anisopliae*, em formulações de água e de óleo e concluíram que o desenvolvimento epizoótico induzido pelo fungo, depende não somente da relação entre a densidade da população do inseto alvo e da quantidade do inóculo, mas também do tipo de formulação utilizada. Ribeiro et al. (1992) observaram a viabilidade de conídios de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, em folhas de cana-de-açúcar por 14 dias a 28,3°C e 65% de umidade.

Nos testes feitos em laboratório o isolado ESALQ 818 suspenso em Tween 80 apresentou-se virulento contra larvas de *Ae. aegypti* (linhagem Rockefeller) até 5 dias depois de inoculados na água, matando 50% das larvas. O valor do  $S_{50}$  foi de 6 dias. O grão de arroz com fungo aderido foi virulento às larvas 10 dias após sua inoculação em água. O valor do  $S_{50}$  foi de 9 dias. Resultados tais que corroboraram para posteriores experimentos feitos em condições de semi-campo larvas de *Aedes aegypti* onde 20 grãos de arroz com fungo inoculado em baldes de 8 litros com água teve virulência por 5 dias, causando mais de 50% de mortalidade. Lingg & Donaldson (1981) constatou que a sobrevivência do fungo em água depende primariamente da sua temperatura.

Os resultados obtidos confirmam que o fungo entomopatogênico é um bom candidato para ser usado em programas de controle do mosquito *Ae. aegypti*. Futuros estudos pretendem melhorar técnicas de aplicação e aumentar a eficiência e a persistência dos conídios em condições de campo.

## 7 – CONCLUSÕES

1. Dos isolados originalmente selecionados para experimentos visando o controle de larvas de *Aedes aegypti*, somente três foram considerados virulentos e subsequentemente a maior parte dos trabalhos foi conduzida com o isolado ESALQ 818 (*Metarhizium anisopliae*).
2. Um dos isolados (LPP 133), com pouca virulência originalmente, foi usado em experimentos de passagem sucessivas nas larvas e houve um aumento significativo em sua virulência.
3. Isolados ESALQ 818 e LPP 133 foram virulentos contra larvas de *Ae. aegypti*, oriundas da linhagem do laboratório (Rockefeller) e de larvas oriundas de ovos coletados no campo.
4. Em condições de laboratório os fungos persistentes causam mortalidade mesmo depois de 10 dias de incubação em água.
5. O fungo continuou virulento usando-se à metodologia de aplicação em arroz.
6. Os fungos não somente causam mortalidade diretamente das larvas, mas também são capazes de interferir no desenvolvimento dos insetos, causando a morte de 20% das pupas, e alternando o padrão de formação de pupas.
7. Os fungos entomopatogênicos se mostraram viáveis como ferramenta para programas de manejo integrado de vetores.



## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, Z.N. (2009) Dengue. In: Aguiar, Z.N., Ribeiro, M.C.S. Doenças Transmissíveis. 3. ed. São Paulo: Martinari, p. 95-109.
- Alva, E.N. (1997) *Metrópoles (In) Sustentáveis*. 1. ed. Rio de Janeiro, 149 p.
- Alves, S.B. (1998) Fungos Entomopatogênicos. In: Alves, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2. ed. Piracicaba: Editora FEALQ/USP, p.289-370.
- 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* (Dipt., Culicidae). *J. Appl. Entomol.* 126: 504–509.
- Araújo, A.P., Melo-Santos, M.A.V., Carlos, S.O., Rios, E.M.M.M., Regis, L. (2007). Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol. Cont.* 41:339–347.
- 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.
- Braga, I.A.; Valle, D. (2007) *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 16(4):279-293.
- Braks, M.A.; Honório, N.A.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Juliano, S.A.; Lounibos, L.P. (2003) Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*

- (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J. Med. Entomol.* 40: 785-794.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C. (1998) Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 605–613.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust S.D. (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. *Science*, 228(4706): 1434-1436.
- Christophers, S.R. (1960) *Aedes aegypti*, the Yellow fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure. Cambridge University Press, Cambridge.
- Clark, T.B., Kellen, W.R., Fukuda, T., Lindegren, J.E. (1968) Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 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.
- Cole, L. (2003) Programas de Pesticidas, Divisão de Prevenção, Agência de Proteção Ambiental, Washington, United States of American.
- Consoli, R.A.G.B., Pereira, J.P., da Silveira, J.N., de Castro, M.T.M. (1986) Suscetibilidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* Say e *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Díptera, Culicidae) a diversos inseticidas em laboratório. *Rev. Bras. Entomol.*, 30: 79-85.
- Consoli, R.A.G.B., de Oliveira R.L. (1998) *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. 1ª reimpressão: Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 228p.
- 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. *J. Bas. Microbiol.*, 43 (1): 3-7.

- D'Amato C., Torres, J.P.M., Malm, O. (2002) DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Quim. Nova*, 25: 995-1002.
- Daoust, R.A. & Roberts, D.W. (1982) Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larvae. *J Invertebr. Pathol.*, 40: 107-117.
- Elandt-Johnson, R.C. & Johnson, N.L. (1980) Survival models and data analysis. John Wiley and Sons, New York.
- Espósito, E. & Azevedo, J.L. (2004) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Educs - Caxias do Sul, Coleção Biotecnologia, 510p.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G. (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassinia* for insect control: current status. *Biocont. Sci. Tech.*, 4:3-34.
- Ferrari, J.A. (1996) Insecticide resistance In: *The Biology of Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado.
- Figueredo, L.T.M., & Fonseca, B.A.L. (1996) Dengue. In: Veronesi, R. & Focaccia, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Ed. Atheneu, p.201-214.
- Fonseca, F.V., da Rocha, L.C.B.P., Ávila, C.C., Silva, B.M., Prophiro, J.S. (2009) Óleo De *Carapa Guianensis* (AUBLET) (MELIACEAE) Sobre Adultos De *Aedes Aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE). Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço – MG.
- French-Constant, R.H. (2005) Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control? *Ecol. Evol.*, 20: 577-579.
- Fundação Nacional de Saúde. Informe técnico, Brasília, 1998.

Fundação Nacional de Saúde. Informe técnico, Brasília, 2000.

Fundação Nacional de Saúde. (2001). Informe Epidemiológico do SUS / Centro Nacional de Epidemiologia, coord. - Brasília : Ministério da Saúde. Dengue. Notas prévias e resumos de pesquisas, 10 (suplemento 1) Trimestral

Fundação Nacional de Saúde. Informe técnico, Brasília, 2002.

Fundação Nacional de Saúde. Informe técnico, Brasília, 2003.

Fundação Nacional de Saúde. Informe técnico, Brasília, 2008

Georghiou, G. P. (1983) Management of resistance in arthropods. In: Georghiou, G. P. & Saito, T. (eds.), *Pest resistance to pesticides*. Plenum, New York, p. 769-792.

Giannini, M. L. (2001) *Dengue hemorrágica*. 2. ed. Editora Santos, p.84.

Goettel, M.S. 1987a. Preliminary field trials with the entomopathogenic hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in central Alberta. *J. Amer. Mosq. Cont. Assoc.*, 3: 239-245.

Goettel, M.S. 1987b. Studies on bioassay of the entomopathogenic hyphomycete fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in mosquitoes. *J. Amer. Mosq. Cont. Assoc.*, 3: 561-567.

Goettel, M.S. (1988) Pathogenesis of the Hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Invertebr. Pathol.*, 51: 259–274.

Gray, (1998) Fungi as potential bioremediation agents in soil contaminated with heavy or radioactive metals. *Biochem. Soc. Trans.*, 26: 666-670.

- Guimarães, R.R. (1999) Princípios de Imunopatogenia do dengue hemorrágico. *J. Bras. Med.*, 77(1):62 – 70.
- Hajek, A.E. & Leger, R.J. St. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 39: 293-322.
- Inyang, N.; McCartney, A. H.; Oyejola, B.; Ibrahim, L.; Pye, J. B. ; Archer, S. A.; Butt, M. T. (2000) Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycol. Res.*, 104: 653-661.
- Lacey, L.A. & Undeen, A.H. (1986) Microbial control of black flies and mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.*, 31:265 – 296.
- Lemos, F.J.A., Molina, M.A.B., Silva, C.P., Almeida, J.C.A., dos Santos, A.V., de Azevedo, R.R., da Silva, S.A.C., Carneiro, C.N.B., Pessanha, L.G. (2009) Isolamento e caracterização da microbiota do trato intestinal de *Aedes aegypti*: identificação de bactérias simbióticas, sua função fisiológica e mecanismo de interação com o vírus da dengue e com bactérias entomopatogênicas. <http://www.ivdrj.ufri.br/vetores.htm#14> em 10/03/2009 página mantida pelo Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro.
- Lingg, A.J. & Donaldson, M.D. (1981) Biotic and abiotic factors affecting stability of *beauveria bassiana* conidia in soil. *J Invertebr. Pathol.*, 38(2):191-200.
- Luz, C. ; Tai, M. H. H. ; Rocha, L. F. N. ; Albernaz, D. A. S. ; Silva, H. H. G. (2007) Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) under Laboratory Conditions. *J. Med. Entomol.*, 44:799-804.
- Martinez, E. (1999) Fiebre del dengue y dengue hemorrágico en infantes con infección primaria. *Med. Trop.*, 45: 97-102.

- Meyling, N.V. & Eilenberg, J. (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol. Cont.*, 43:145 - 155.
- Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde (2004) Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. – Brasília.
- Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde. (2005) Guia de vigilância epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília, 816p.
- Ministério da Saúde, (2008) Informe Técnico sobre Febre Amarela do Ministério da Saúde.
- Miranpuri, G.S., Khachatourians, G.G. (1991) Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Ent. Exper. App.*, 59: 19-27.
- Montella, I.R., Martins, A.J., Viana-Medeiros, P.F., Lima, J.B.P., Braga, I.A., Valle, D. (2007) Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(3): 467-477. disponível em [The American Society of Tropical Medicine and Hygiene](#)
- Morley-Davies, J., Moore, D., Prior, C. (1995) Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycol. Res.*, 100: 31–38.
- Neto, A.L.R. & Oliveira, C.M. (1985) Controle Biológico de Culicídeos e Simulídeos. *Rev. Bras. Doen. Trop.* São Paulo.

- Paula, A.R., Brito, E.S., Pereira, C.R., Carrera, M.P., and Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of Adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue Vector Control. *Biocont. Sci. Tech.*, 18:1017 – 1025.
- Petretski, M.D.A., Silva Júnior, J.B.F., Mury, F.B., Pompilho, W.M., Marcelo, C.V., da Silva, J.R., Kipnis T., Kanashiro, M.M., Petretski, J.H., Valle, D. (2009) RNAi como mecanismo mediador de defesas e contra-defesas na interação entre o vírus dengue e o inseto vetor *Aedes aegypti*. <http://www.ivdrj.ufri.br/vetores.htm#14> em 10/03/2009 página mantida pelo Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro.
- Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (2009) Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde.
- 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. *J Invertebr. Pathol.*, 70:131-135.
- Rezende, G. L., Martins, A. J., Gentile, C., Farnesi, L. C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A. A., Valle, D. (2008) Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Develop. Biol.* (Online), 8(1):82.
- Riba, G., Keita, A., Soares, G. G., Jr., Ferron, P. (1986) Comparative studies for *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporium* as pathogens of mosquito larvae. *J. Mosq. Cont.*, 2: 469-473.
- Rose, R.I. (2001) Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg. Infec. Dis.*, 7(1):17-23.
- Rosen, G. (1994) Uma História da Saúde Pública. São Paulo/ Rio de Janeiro: Editora da UNESP/ HUCITEC/ ABRASCO.

- Rozendaal, J.A. (1997) Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization.
- Roush, R. T. (1989) Designing resistance management programs: how can you choose? *Pestic. Sci.* 26: 423-441.
- 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*. *Mycopathol.*, 104, 51 - 58.
- Samuels, R.I. & Coracini, D.L.A. (2004) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for the control of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Sci. Agric.*, 61:271 - 275.
- Schatzmayr, H. G. (2008) Asp ctos hist ricos do dengue e de seus vetores. In: Sousa, L.J. *Dengue - diagn stico, tratamento e preven o*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed: Rubio , p.01-10.
- Scholte E.J., Takken, W., Knols, B.G.J. (2003) Pathogenicity of five East African entomopathogenic fungi to adult *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Proceedings of the Section Experimental Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society* 14: 25–29.
- Scholte, E.J., Knols, B. G., Takken, W. (2004a) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the Malaria vector *Anoplheles gambiae*. *Malaria J.*, 3: 1-6.
- Scholte, E.J., Knols, B.G.J., Samson, R.A., and Takken, W. (2004b), ‘Entomopathogenic Fungi for Mosquito Control: A Review’, *J. Insect Sci.*, 4: 19.
- Scholte, E.J., 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 (5728): 1641– 642.



- Scholte, E.J., Takken, W., and Knols, B.G.J. (2007), Infection of Adult *Aedes aegypti* and *Ae.albopictus* Mosquitoes with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*, *Acta Trop.*, 102: 151 - 158.
- Secretaria Estadual de Saúde. (1998) Informe Técnico sobre Dengue.
- Secretaria Estadual de Saúde. (1999) Informe Técnico sobre Dengue.
- Secretaria Estadual de Saúde. (2001) Informe Técnico sobre Dengue.
- Secretaria Estadual de Saúde. (2008) Informe Técnico sobre Dengue.
- Secretaria Estadual de Saúde. (2009) Informe Técnico sobre Dengue.
- Silva, M. & Espósito, E. “O papel dos fungos na recuperação ambiental” in *Fungos*, EDUCS, 2004)
- Silva, M.C.L.N. (2008) Estudos sobre imunidade inata no mosquito *Aedes aegypti*, *Ano de Obtenção: 2008*. Doutorado em Química Biológica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- Silva Júnior, J.B. & Pimenta J.F.G. (2008) Epidemiologia da dengue. In: Sousa, L.J. *Dengue - diagnóstico, tratamento e prevenção*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed: Rubio , p.11-35.
- Tabashnik, B.E. (1989) Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendations. *J. Econ. Entomol.*, 82: 1263-1269.
- Thomas, M.B, Read, A.F. (2007) Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Rev.: Microbiol.*, 5: 377-385.
- Vilarinhos, P.T.R, Dias, J.M.C.S., Andrade, C.F.S., Araujo Coutinho, C.J.P.C. (1998) Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlideos. *In: Alves*,

S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2. ed. Piracicaba: Editora FEALQ/USP, p. 447-480.

Vilarinhos, P.T.R, Dias, D.G.S., Monnerat, R.G. (2003) Persistencia larvicida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento EMBRAPA, Brasilia, p. 1-17.

WHO - World Health Organization (1990) Control of leishmaniasis. *WHO Tech Rep Ser* 793: 54.