

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS, VISANDO O CONTROLE DE ADULTOS
DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)**

ADRIANO RODRIGUES DE PAULA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO 2007

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS, VISANDO O CONTROLE DE ADULTOS
DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)**

ADRIANO RODRIGUES DE PAULA

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

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO 2007

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

AGRADECIMENTOS

Ao professor Richard Ian Samuels, pela orientação;

Ao CNPQ e a UENF, pelo financiamento da presente pesquisa;

Ao professor Francisco Lemos e suas técnicas Telma e Rívia, pela criação dos mosquitos *Aedes aegypti*;

Aos Professores Carlos Alberto Tuão Gava, Marília Amorim Berbet de Molina e Milton Erthal Junior pela participação na comissão examinadora deste trabalho;

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

Aos companheiros do laboratório de Patologia de Insetos: Milton, Eliane, Laerciana, Dáttilo.

Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 DADOS BIOLÓGICOS DE <i>Aedes aegypti</i>	4
2.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Aedes aegypti</i>	7
2.3 MONITORAMENTO DE FOCOS DE <i>Aedes aegypti</i>	8
2.4 CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i>	10
2.4.1 USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS.....	12
3. OBJETIVO	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 CRIAÇÃO DE MOSQUITOS NO INSETÁRIO	17
4.2 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS EM ARROZ	18
4.3 PREPARO DAS FORMULAÇÕES DE FUNGO PARA O TESTE DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA.....	19
4.4 TESTE DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA	19
4.4.1 APLICAÇÃO INDIRETA DO FUNGO (CONTATO)	20
4.4.2 APLICAÇÃO DIRETA DO FUNGO (PULVERIZAÇÃO)	21

4.5 APLICAÇÃO DO FUNGO EM TECIDO	21
4.6 TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO MOSQUITO AO FUNGO.....	22
4.7 CONIDIOGÊNESE	23
4.8 CONTAGEM DO NÚMERO DE ESPOROS NOS CADÁVERES DE <i>Aedes aegypti</i>	24
4.9 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	24
5. RESULTADOS	25
5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DE QUATRO ISOLADOS DE FUNGOS CONTRA <i>Aedes aegypti</i>	25
5.2 DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> AO FUNGO	35
5.3 AVALIAÇÃO DE CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS MOSQUITOS TRATADOS COM FUNGOS IMPREGNADOS EM TECIDOS.....	36
5.4 DESENVOLVIMENTO DO FUNGO SOBRE OS CADÁVERES DOS MOSQUITOS.....	38
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

Promissoras pesquisas na África mostraram que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foram patogênicos e virulentos contra o mosquito adulto *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*, vetores da malária. No presente trabalho, isolados de *M. anisopliae* e de *B. bassiana* foram selecionados para testes de patogenicidade e virulência contra adultos (fêmeas) do mosquito *Aedes aegypti*. Os isolados foram formulados com 0,05% Tween 80 (TW) e com 0,05% Tween 80 + 8% de Óleo vegetal (TW + OL) e aplicados, nos insetos, diretamente por pulverização (Torre de Potter) ou indiretamente por contato (papel-filtro e tecido preto). Observou-se também o tempo mínimo de exposição do mosquito ao fungo para causar mortalidade. Independente da via de infecção ou formulação, três isolados de *M. anisopliae* e um isolado de *B. bassiana* foram considerados virulentos contra o adulto do mosquito *Ae. aegypti*. Em 7 dias (período de avaliação do experimento) as duas formulações e aplicações do fungo causaram altas porcentagens de mortalidade dos mosquitos, enquanto os grupos controles apresentaram de 10 a 28% de mosquitos mortos. Pela análise de variância ocorreu diferença estatística quanto à mortalidade dos mosquitos entre os dias de avaliação de cada experimento. As curvas de sobrevivência entre

os 4 isolados formulados com TW foram estatisticamente diferentes (P= 0.0001). O isolado Esalq 818 formulado em TW e aplicado por contato causou em 3 dias 90% de mortalidade dos mosquitos. O mesmo ocorreu com o isolado LPP 133, porém este foi pulverizado nesta mesma formulação sobre os mosquitos. Comparando os 4 isolados na formulação TW+OL, foi observado que o LPP 133, tanto aplicado por contato, quanto por pulverização apresentou rápida ação virulenta contra os mosquitos. Este isolado exposto aos insetos por contato causou em 3 dias 90% de mortalidade e quando pulverizado apresentou em 2 dias 80% de mortalidade. As curvas de sobrevivência entre os 4 isolados na formulação TW+OL foram estatisticamente diferentes (P= 0.0001). Selecionou-se o isolado LPP 133 (*M. anisopliae*), por sua alta virulência e fácil produção *in vitro*, como o mais virulento contra adultos fêmeas de *Ae. aegypti*. Impregnando este isolado em tecidos pretos foi observado que a única diferença estatística (P=0.0352) nas curvas de sobrevivência dos insetos ocorreu quando foi comparado o tecido Tricoline licra lisa, impregnado com a formulação do fungo em TW, e o mesmo tecido impregnado com a formulação em TW+OL. Neste experimento a formulação em óleo causou em 2 dias 40% de mortalidade, enquanto a formulação TW apresentou em 2 dias 20% de insetos mortos. Para as duas formulações do isolado foram necessárias, aproximadamente 3 horas de exposição dos mosquitos ao fungo para provocar 50% de mortalidade. Nesse trabalho foi mostrado, pela primeira vez, que a utilização de fungos entomopatogênicos contra adultos de *Ae. aegypti* pode se tornar uma alternativa promissora, contribuindo para a redução da incidência de Dengue.

Palavras chaves: Dengue, mosquito, *Aedes aegypti*, fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

ABSTRACT

Promising research in Africa has shown that the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* were pathogenic and virulent against adult mosquitoes of the species *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*, both malarial vectors. In this study isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana* were selected for pathogenicity and virulence against adult female *Ae. aegypti*, with the aim of developing a control strategy for this insect. Fungal isolates were formulated in 0.05% Tween 80 (TW) or 0.05% Tween 80 + 8% vegetable oil (TW + OL) and insects inoculated directly by spraying (Potter tower) or indirectly by contact with a fungus-impregnated support material (filter paper or black cloths). The minimum exposure time of the mosquitoes to the fungus impregnated support to cause death was also investigated. Independent of the infection method used or the formulation, three isolates of *M. anisopliae* and one *B. bassiana* isolate were considered virulent against adult female *Ae. aegypti*. Over a 7-day period (experimental evaluation time) the two formulations used caused high levels of mortality, whilst control mortality ranged from 10 – 28%. Using Analysis of Variance there were statistical differences between mortalities caused by the different isolates and treatments only when comparing evaluation days. The survival curves seen as a result of using the four isolates formulated in TW were statistically different (P= 0.0001). Isolate Esalq 818 formulated in TW via contact, caused 90% mortality in 3 days. The same result was seen for LPP133 when

sprayed directly onto the mosquitoes. When comparing the 4 isolates formulated in TW + OL it was observed that LPP133 applied by contact or by spray was highly virulent to the mosquitoes. Insect exposed to this isolate by contact showed 90% mortality in 3 days, whilst spraying caused 80% mortality in 2 days. The survival curves of mosquitoes treated with the four isolates formulated in TW+OL were statistically different ($P= 0.0001$). Isolate LPP133 (*M. anisopliae*), due to its facility to produce *in vitro* and virulence to adult female *Ae. aegypti*, was chosen for further studies. Different exposure times to the two formulations showed that a 3h exposure to the fungus resulted in 50% mortality. LPP133 was impregnated on two different types of black cloths, however a statistical difference was only seen when comparing survival curves of fungi formulated in TW and in TW+OL applied to Trycoline smooth lycra ($P=0.0352$). In this experiment the oil formulation caused 40% mortality in 2 days, whilst in TW only 20% mortality was seen over the same time period. These results show for the first time that entomopathogenic fungi could be promising biological control agents against adult *Ae. aegypti*, thereby reducing the populations of this insect and concurrently reducing the incidence of Dengue.

Key words: Dengue, mosquitoes, *Aedes aegypti*, entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

1. INTRODUÇÃO

Dengue é uma doença virótica febril e aguda que se sobressai como a mais importante arbovirose a afetar o homem, constituindo sério problema de saúde pública em todo o mundo (Giannini, 2001). Esta situação se agrava em países tropicais, onde as condições do ambiente, associadas à ineficácia das políticas públicas de saúde favorecem o desenvolvimento e a proliferação de *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor da doença (Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica, 1998).

A maioria dos casos notificados de dengue refere-se àquelas pessoas que procuram algum serviço médico, geralmente implicando em um afastamento do trabalho por um período médio de três dias, embora nem todos os casos digam respeito a pessoas da faixa etária produtiva, já que a doença acomete também crianças e idosos (Veronesi, 1996).

Ae. aegypti, além de vetor da dengue, também é o transmissor da febre amarela, as duas doenças são causadas por um vírus *Flavivirus* (Família Flaviridae) (Consoli et al., 1998). A febre amarela pode se manifestar, epidemiologicamente, de duas formas: febre amarela silvestre e febre amarela urbana (Vianna, 2001). A forma silvestre ocorre em florestas por meio da ação de mosquitos que aí vivem e que se alimentam do sangue de animais suscetíveis ao vírus, especialmente macacos. A forma urbana da febre amarela é veiculada dentro das cidades e vilas, de homem para homem (Vianna, 2001).

Conhecem-se atualmente quatro sorotipos distintos do vírus da dengue 1, 2, 3 e 4 (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, respectivamente), que pode se apresentar como: Dengue Clássico ou Dengue Hemorrágico. A Dengue Clássico, em geral, é de início abrupto, com febre alta (39 a 40 °C), seguida de cefaléia, anorexia, náuseas, vômitos, prurido cutâneo. Dengue hemorrágica é uma doença febril aguda caracterizada por plaqueta diminuída e hemoconcentração em pacientes infectados com qualquer um dos quatro sorotipos de vírus de dengue. A Dengue Hemorrágica pode levar a pessoa à morte e ainda sem nenhuma vacina para a doença, o controle do vetor é a maneira mais eficaz de combate e prevenção (Kaur et al., 2003).

O mosquito *Ae. aegypti* é holometabólico, ou seja, desenvolve-se através de metamorfose completa. Seu ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os ovos são postos pela fêmea, individualmente, aderidos a um substrato úmido próximo à superfície da água. A larva é dividida em cabeça, tórax e abdômen e passa por quatro mudas. A pupa é dividida em cefalotórax e abdômen. O adulto é escuro, possuem faixas brancas, nas bases dos segmentos tarsais, e um desenho em forma de lira no mesonoto (FUNASA, 2001).

Desde o começo do século XX, os agentes químicos têm sido usados para combater e controlar a população de *Ae. aegypti*. Durante as primeiras campanhas, os mosquitos eram tratados com óleo colocados em recipientes propícios ao desenvolvimento dos ovos. Piretrina era passada nas casas com a finalidade de combater o mosquito adulto. Após a descoberta do composto Diclorodifeniltricloroetano (DDT), este se tornou o principal método utilizado em programas tendentes à erradicação do mosquito. O uso intensivo do DDT, no entanto, provocou o aparecimento de resistência na população de *Ae. aegypti* e, com isso, passou a se utilizar inseticidas organofosforados. Que também com o uso intensivo levou ao surgimento de resistência na população deste mosquito (Giannini, 2001).

Por ser necessário um novo método de combate do vetor da dengue, deu-se uma grande importância ao uso de organismos que combatessem *Ae. aegypti* de forma eficaz. O uso de parasitas ou predadores tem a vantagem de não implicar na contaminação química do ambiente. Os microrganismos patogênicos

(fungo, bactéria e vírus) apresentam especificidade aos organismos-alvo, baixa probabilidade do mosquito tornar-se resistente; ademais, ainda têm a possibilidade da autodispersão (Giannini, 2001).

Dentre estes microrganismos as bactérias são os agentes de controle biológico de 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 por produzirem endotoxinas protéicas as quais, quando ingeridas pelas larvas, atacam e destroem as células epiteliais (intestino médio), levando-as à morte (Neto et al., 1985). *Bacillus thuringiensis israelensis* é eficiente contra espécies dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, e *B. sphaericus* mostrou-se especialmente eficaz contra larvas de *Culex*. Apesar disso, as bactérias são somente eficientes na fase larval do mosquito, não combatendo suas outras fases: ovo, pupa e adulto (Consoli et al., 1998).

Os fungos entomopatogênicos têm sido usados com eficácia para o controle de pragas agrícolas. Diferentemente das bactérias, a ação dos fungos não está restrita somente às larvas, e a possibilidade de infecção desde o ovo até o estágio adulto do inseto tem despertado o interesse dos pesquisadores no controle biológico de vetores com o uso de isolados virulentos destes entomopatogênicos (Ffrench-Constant, 2005).

Pesquisas na África mostraram que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foram patogênicos e virulentos contra o mosquito adulto *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*, vetores da malária (Scholt et al., 2004; Scholt et al., 2005 Blanford et al., 2005), o que motivou a investigação, no presente trabalho, sobre a ação patogênica e virulenta destas espécies de fungo contra o mosquito adulto *Ae. aegypti*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DADOS BIOLÓGICOS DE *Aedes aegypti*

Os mosquitos são insetos dípteros, pertencentes à Família Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas, sendo a grande maioria das fêmeas hematófagas (Consoli et al., 1998).

O ciclo biológico de *Ae. aegypti* compreende as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). O ovo tem forma alíptica 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 (meso e metatorax). No abdome existem espinhos no oitavo segmento abdominal, formado por 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 et al., 1998).

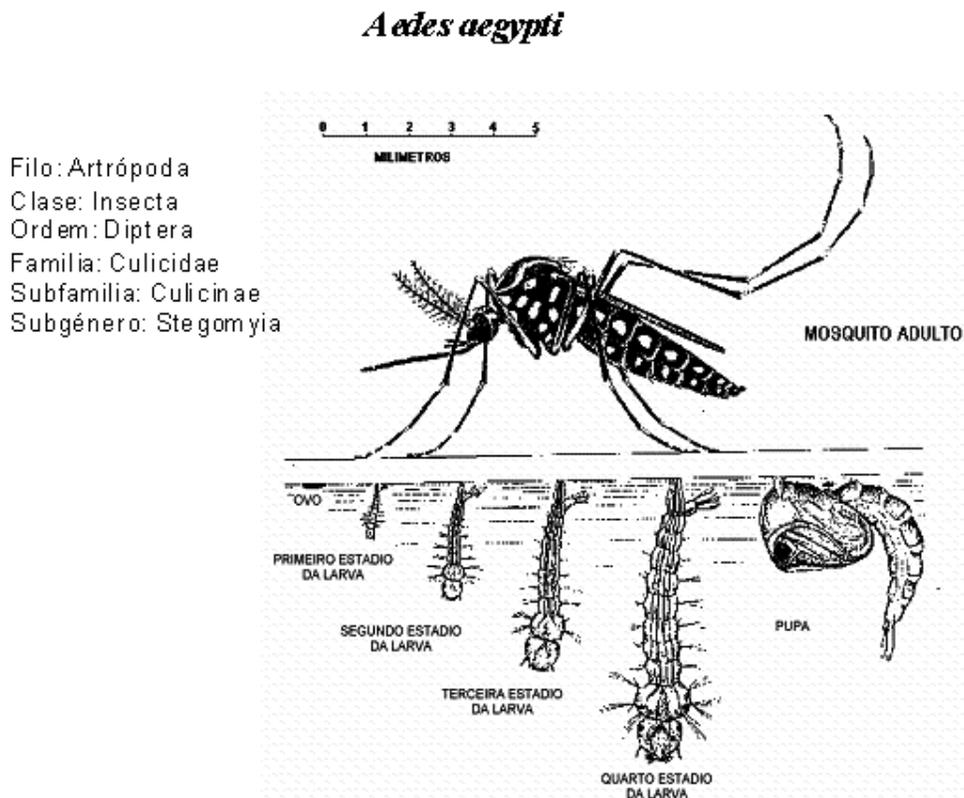


FIGURA 1 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. O estágio ovo, larva e pupa são aquáticos.

O tamanho de um adulto de *Ae. aegypti* é de, aproximadamente, 4,5 milímetros. O adulto possui tórax com o mesonoto recoberto de escamas escuras, prateadas depositadas em linhas longitudinais formando o desenho clássico de uma lira. As faixas externas são constituídas por escamas largas e as internas são formadas por um par de linhas finas sendo prateadas estreitas. As pernas são escuras com manchas claras nas articulações e os artículos tarsais possuem anéis claros nas extremidades basais. As asas possuem escamas escuras. O abdômen possui escamas brancas nos tergitos e a partir do 2º segmento existem faixas basais e basolaterais de escamas claras. O macho pode ser identificado macroscopicamente por possuir antenas plumosas, enquanto as fêmeas possuem antenas lisas. O raio de vôo do mosquito adulto é limitado, em torno de 200 metros. O metabolismo energético de machos e fêmeas depende da ingestão de carboidratos, provenientes de seivas de flores e frutos. O repasto sanguíneo, exclusivo das fêmeas, está relacionado primordialmente ao desenvolvimento dos

ovos, podendo igualmente contribuir para o aumento de sua longevidade (Clements, 1963 ; Consoli et al., 1998).

A fêmea de *Ae. aegypti* pode selecionar o local de oviposição influenciada pela luz, cor do recipiente, temperatura, grau de salinidade e outras características favoráveis. Os criadouros preferenciais são aqueles que têm água limpa, pobres em matéria orgânica em estado de decomposição, acumulada em recipientes sombreados de fundo e paredes escuras (Vianna, 2001). Tanto no Brasil quanto em outros países sul-americanos tem-se observado a criação de *Ae. aegypti* em recipientes naturais como bromélias, buracos de árvores, escavações em rocha e bambu. A densidade populacional de *Ae. aegypti* aumenta na época das chuvas, mas a população é mantida fora desta época em número considerável em razão de recipientes artificiais com água que possibilitam o desenvolvimento do mosquito (Consoli et al., 1998).

Os ovos são colocados diretamente sobre a água ou na parede dos recipientes próximos à linha d'água. Em ambiente úmido o desenvolvimento embrionário ocorre entre 30 a 40 horas, entretanto o ovo pode resistir prolongadamente ao ressecamento até mais de um ano. Assim, se ocorrer a evaporação da água o ovo pode permanecer viável até que tenha condições adequadas para seu desenvolvimento (Vianna, 2001).

Após a eclosão, as larvas nadam até a superfície para respirar e descansar, fazendo uso das nadadeiras e do sifão respiratório. A larva assume uma posição vertical em relação ao nível aquático e apresenta fotofobia, reagindo imediatamente à presença da luz. Tanto as larvas, quanto as pupas são aquáticas (Strieder, 2005). A longevidade de uma fêmea adulta é de, aproximadamente, 45 dias, sendo constatado que o macho vive menos em comparação à correspondente fêmea (Consoli et al., 1998).

O hábito hematófago das fêmeas de *Ae. aegypti* ocorre nos horários diurnos. O pico de maior atividade de vôo das fêmeas situa-se ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, mas o ataque ao homem e aos animais domésticos pode ocorrer a qualquer hora do dia. À noite, embora raramente, podem ser oportunistas, atacando o homem se este se aproxima de seu abrigo. O hábito diurno também é o demonstrado pelos machos. Embora tal mosquito demonstre certo ecletismo em relação à fonte sanguínea para fins de

alimentação, o homem é a sua principal vítima. O ataque a outros animais ocorre quando estes estão próximos a seus criadouros e abrigos (Hagedorn et al., 1975).

Uma só fêmea de *Ae. aegypti* infectada com o vírus da dengue pode, para se alimentar satisfatoriamente de sangue, realizar diversas alimentações curtas em diferentes hospedeiros, resultando na disseminação da dengue ou da febre amarela. Saliente-se ainda que, uma vez infectada, a fêmea permanecerá assim até o fim de sua vida (Rodrigues, 2006).

A infecção da fêmea pelo vírus ocorre quando esta pica um indivíduo em fase de viremia. A replicação do vírus acontece nas suas glândulas salivares e a fêmea se torna infectante. Após ser picado por um mosquito infectado com o vírus, o homem passa por um período de incubação de 3 a 15 dias. O período de transmissibilidade do homem para o mosquito inicia um dia antes do início da febre, prosseguindo até o sexto dia da doença; período que corresponde à fase de viremia, fase quando surgem os anticorpos da classe IgG e IgM. Uma vez infectado, o inseto é incapaz de combater a invasão do vírus em todas as partes de seu corpo. Assim, os ovários também podem ser atingidos e, não raramente, certas proporções dos ovos produzirão adultos que já nascerão naturalmente infectados com o vírus. Isto é conhecido como transmissão transovariana ou vertical (Cruz, 2006).

2.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Aedes aegypti*

O primeiro relato da doença dengue foi feito em uma enciclopédia chinesa da dinastia Chin (265 a 420 anos a.C.). Em 1903, Graham forneceu pela primeira vez evidências da transmissão da dengue por mosquito e, em 1906, Bancroft concluiu que o *Ae. aegypti* era vetor da doença dengue. Em 1977 o sorotipo 1 foi introduzido nas Américas, sendo isolado primeiramente na Jamaica, mas, logo após, causou epidemias nas ilhas caribenhas; concomitantemente, atingiu também a América Central e a região norte da América do Sul. Na década de 80, o problema aumentou consideravelmente, com epidemias no Brasil, na Bolívia, no Paraguai, no Equador e no Peru. Em 1981 ocorreu uma epidemia de dengue

hemorrágica em Cuba, sendo este o evento mais importante na história da dengue nas Américas (Instituto Virtual da Dengue, 2006).

O mosquito *Ae. aegypti* foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos. Devido à sua importância como vetor da febre amarela e dengue, foi intensamente combatido em nosso território, tendo sido considerado erradicado em 1955. Contudo, países vizinhos, como as Guianas e a Venezuela, dentre outros Sul-Americanos, e igualmente Estados Unidos da América, Cuba e vários países Centro-Americanos, não o erradicaram. Esse descuido provocou a reinvasão do Brasil pelo *Ae. aegypti* em Belém do Pará no ano de 1967, no Estado do Rio de Janeiro em 1977 e Roraima no início da década de 80. O fenômeno ocorreu nos Estados litorâneos: do Maranhão ao Paraná, bem como na região Centro-Oeste, somados aos Estados de Minas Gerais e Tocantins (Consoli et al., 1998).

Em 2006 constatou-se que a dengue foi um dos principais problemas de saúde pública no mundo. No Brasil, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 80 milhões de pessoas são infectadas anualmente em 100 países de todos os continentes, exceto a Europa. E que cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue (Ministério da Saúde, 2006).

2.3 MONITORAMENTO DE FOCOS DE *Aedes aegypti*

O monitoramento do mosquito *Ae. aegypti* pode ser feito nas fases de ovo, larva, pupa e adulto através da utilização de armadilhas específicas para cada uma dessas fases.

A armadilha para ovos, embora seja método eficiente e de baixo custo, requer mão-de-obra em laboratório a fim de contar o número de ovos depositados nos substratos de oviposição, e também de identificar a(s) espécie(s) de mosquitos coletados. A positividade das armadilhas, determinada pela presença de ovos, fornece informações sobre as áreas infestadas de uma localidade, além de inferir sobre a abundância de fêmeas. Todavia, a confiabilidade destes índices

ainda é muito questionada. A maior dificuldade em interpretar os resultados de campo com o uso de armadilhas de oviposição reside no fato de esta armadilha não permitir quantificar o número de fêmeas que a visitaram, ou ainda o número de ovos depositados por fêmea. Portanto, a carência destes valores infere diretamente nas conclusões sobre o tamanho da população do vetor em uma determinada área (Lima et al., 1989).

O uso de armadilhas para larvas também não é um método eficiente de monitoramento, uma vez que, da mesma forma não permite a quantificação do número de fêmeas que visitaram a armadilha. Além do mais, estes dois tipos de armadilhas, para ovos e larvas, são incapazes de capturar o mosquito, não contribuindo para reduzir a densidade do vetor na região (Monitoramento Inteligente do Mosquito da Dengue, 2006).

Para Ritchie et al., (2004), um recipiente de plástico preto com fita adesiva e um atrativo para fêmeas de *Ae. aegypti* foi uma eficaz armadilha para capturar este vetor, já que as fêmeas adultas, no momento em que vão ovipositar, ficam presas nas fitas adesivas. Em 2006 no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foi desenvolvido um novo modelo de armadilha para adultos de mosquitos. Esta armadilha permite capturar mosquitos adultos (fêmeas) de *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus*. As fêmeas são capturadas devido à presença de um atraente de oviposição dentro da armadilha. Um fator importante na armadilha para adultos é que a identificação do inseto capturado ocorre no momento da inspeção da armadilha no campo, evitando assim a mão-de-obra e o tempo gasto para identificação do inseto em laboratório. Capturando o mosquito adulto é possível quantificar o número de fêmeas que visitaram a armadilha em busca de sítio de oviposição, estimar a população de adultos em uma determinada área e ainda reduzir a população de vetores na região (Monitoramento Inteligente do Mosquito da Dengue, 2006).

2.4 CONTROLE DE *Aedes aegypti*

Em 1996 o Ministério da Saúde brasileiro decidiu rever a estratégia empregada contra o mosquito transmissor da dengue, propondo o Programa de Erradicação de *Ae. aegypti* (PEAa). Ao longo do processo de implantação deste programa, observou-se a inviabilidade técnica de erradicação do mosquito a curto e médio prazo. Porém a implementação do PEAa resultou no fortalecimento de ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades, mas ainda com as ações de prevenção centradas quase exclusivamente em atividades de campo de combate ao mosquito *Ae. aegypti* com o uso de inseticidas (Ministério da Saúde, 2002).

O uso de inseticidas piretróides tem sido o principal meio de controle para mosquitos vetores de doenças. Na África, esta forma de controle ainda é intensamente usada no combate do mosquito adulto vetor da malária (Mabaso et al., 2004). Entretanto, algumas formas de resistência a produtos químicos já vêm sendo evidenciadas ao longo de todo o processo de controle (Brooke, 2001). Em vista das constantes dificuldades enfrentadas no controle de mosquitos com inseticidas químicos, em função do surgimento de resistência, tem sido dada uma crescente importância aos agentes de controle biológico (WHO, 1984). Vários pesquisadores têm investigado o uso de agentes microbianos para o controle de mosquitos (Scholte et al., 2004).

Organismos capazes de parasitar ou predação mosquitos em suas várias fases evolutivas vêm sendo estudados há bastante tempo. Jenkins (1964), citado por Consoli et al (1998), menciona 220 predadores invertebrados de larvas de mosquitos entre rotíferos, celenterados, platelmintos invertebrados, moluscos, anelídeos, crustáceos, aracnídeos e insetos. Chapman (1974) amplia esta lista, incluindo os patógenos como vírus, bactérias e fungos. A maioria dos vírus patogênicos para artrópodes vetores de doenças foi isolada de início em espécies da ordem Díptera, normalmente larvas de mosquitos. Entretanto poucos vírus tem demonstrado um potencial promissor como agente do controle biológico em culicídeos (WHO, 1984). Becnel, 2001 demonstrou o potencial patogênico de baculovírus contra larvas do mosquito *Culex nigripalpus* e *Culex quinquefasciatus*.

Este baculovírus (CuniNPV) infecta e destrói o intestino médio das larvas causando a infecção e a morte em 72 – 96 horas.

Antes de 1976, a bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* era usada no controle de insetos-praga na agricultura, mas a descoberta de um isolado patogênico para dípteros chamado *B. thuringiensis israelensis* (*Bti*) estimulou o uso dessa bactéria no controle de vetores de doenças. Desde então, vêm sendo realizados inúmeros programas de seleção, visando o isolamento de variedades mosquitocidas (Delecluse et al., 2000). *Bti* foi usado com grande sucesso no Peru, Equador e na região Amazônica do Peru, local onde após dez semanas da aplicação foi observada uma redução média de 60% na população de adultos do vetor da malária, o mosquito do gênero *Anopheles* (Kroeger et al., 1995). E também com bastante sucesso em campanhas intensivas realizadas nos EUA e na Alemanha para o controle de pernilongos e na África logrando êxito quando usado no combate de simúlideos vetores da Oncocercose (Glare & O'Callaghan, 2000).

No Brasil, devido aos resultados promissores, iniciou-se a substituição dos organofosforados por produtos à base de *Bti*, que se tornou uma tática para o controle de simúlideos (Vilarinhos et al., 1998). De acordo com Becker (2000), todos os estudos feitos após a introdução de *Bti* mostraram que ocorreu um controle eficaz sem que ocorressem danos ao ambiente, não havendo redução da biodiversidade e dos locais tratados.

Apesar dos avanços nessa área de controle biológico, ainda há muitos impedimentos quanto ao uso de *Bti* em grande escala: especificamente, pode-se apontar os custos altos de produção e o baixo efeito residual, devido principalmente à exposição direta à luz solar (inativação da toxina pela radiação ultravioleta), como dois destes impedimentos. Além disso, de acordo com Vilarinhos et al., (1998), uma grande quantidade de partículas sólidas e coliformes fecais compete com os cristais da *Bti*, reduzindo as taxas relativas de ingestão da toxina. Conforme os mesmos autores, os diferentes estágios larvais da mesma espécie geram variações na Concentração Letal (CL₅₀) e no Tempo Letal (TL₅₀). Para otimizar o efeito da *Bti* pode-se utilizar este bioinseticida em combinação com organofosforados (Polanczyk et al., 2003).

2.4.1 USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

Estudos feitos com diferentes microrganismos entomopatogênicos mostram que os fungos são os mais promissores para o controle biológico de mosquitos (Messias, 1989). Diferentemente das bactérias e vírus, os fungos podem infectar não apenas através do intestino, como também através da superfície do tegumento. Assim, nota-se que os fungos entomopatogênicos não ficam limitados a insetos mastigadores, atuando igualmente sobre outros insetos, como aqueles dotados de aparelhos bucais tipo sugador (Leathers et al., 1993).

Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos fungos pertencentes à cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. Normalmente, eles apresentam uma grande variabilidade genética, a qual resulta em variados graus de especificidade ao hospedeiro. De um modo geral, os fungos entomopatogênicos são organismos de tamanho e forma variáveis, podendo ser unicelulares ou constituídos por um conjunto filamentoso de micélio, que é composto por células denominadas hifas, cujas paredes são ricas em quitina, celulose e outros açúcares (Alves, 1998). Dentre os gêneros mais importantes de fungos entomopatogênicos encontram-se: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (Ferron, 1978). Segundo Goettel et al (1995), estes gêneros têm apresentado grande potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas.

O gênero *Beauveria* pertence à classe dos deuteromicetos e é encontrado, com freqüência e generalizadamente, em todos os países. Sua infecção geralmente se dá via tegumento, onde o fungo germina entre 12 a 18 horas. Pode ocorrer também a infecção oral e via sistema respiratório através dos espiráculos. A penetração tegumentar ocorre devido a uma ação física e química (enzimática), tendo a duração de 12 horas. O inseto infectado se encontra totalmente colonizado, com o tecido gorduroso, tecido intestinal e tubos de Malpighi bastante atacados. Ocorre, então, a perda de nutrientes e o acúmulo de substâncias tóxicas e a morte do inseto. Haverá sobre o cadáver a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie

(conidiogênese). Os indivíduos atacados apresentam-se cobertos por micélio branco, o qual esporula em condições adequadas: umidade relativa em torno de 90% e temperatura na faixa de 23 a 28° C (Alves, 1998).

O gênero *Metarhizium* também pertence à classe dos deuteromicetos, sendo facilmente encontrado em solos, onde sobrevive por longo tempo. Os insetos atacados por ele tornam-se duros e cobertos por uma fina camada pulverulenta de conídios. No final da conidiogênese o cadáver apresenta coloração verde, que varia de claro a escuro, e acinzentado ou mais esbranquiçado com pontos verdes. A doença é conhecida como muscardine verde, contrastando com a muscardine branca provocada por *B. bassiana*. Os conídios são, geralmente, uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre conidióforos simples os quais, justapostos, resultam em uma massa regular sobre o inseto (mononematosa). Os conídios podem formar, sobre o inseto, ramificações compostas de um conjunto de micélio (Alves, 1998).

Os insetos, como moscas, mosquitos e percevejos, além de provocarem incômodo ao homem quando estão se alimentando de sangue, também são vetores de doenças como: Leishmaniose, Chagas, Filariose, Febre amarela, Malária, Encefalites e, entre outros, a Dengue (Costa et al., 1998). A leishmaniose tem como agente etiológico os parasitas protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Esta doença é transmitida para o homem através da picada da mosca pheboto mine (WHO, 1990). Estudos têm mostrado que fungos entomopatogênicos são potenciais agentes no controle do *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae), insetos vetores da leishmaniose (Reithinger et al., 1997).

A doença de Chagas constitui um sério problema de saúde pública na América Latina, com particular prevalência no Brasil. As causas da infecção devem-se à ação do parasita *Trypanosoma cruzi*, transmitido pelos insetos triatomine. Os vetores mais importantes desta doença são *Triatoma infestans*, no sudeste do Brasil, *T. brasilienses*, no nordeste, *Rhodnius prolixus* e *T. dimidiata*, combatidos, em laboratório, com o uso de fungos entomopatogênicos (Costa et al., 2003).

Altos níveis de mortalidade foram obtidos quando Luz et al (1999) infectou *T. infestans* com *B. bassiana* impregnado em papel-filtro. A infecção, por

pulverização, de ninfas de primeiro estágio e ninfas de quarto estágio de *T. infestans* e *Panstrongylus megistus* com *Aspergillus giganteus* e *Penicillium corylophilum* foram muito virulentos tornando estes fungos promissores para o controle deste inseto (Costa et al., 2003).

Mosquitos do gênero *Culex* são vetores da filariose humana, doença que acomete muitas pessoas na região nordeste do Brasil. Por todo o mundo, inseticidas químicos têm sido usados para o controle deste mosquito. No entanto, desde 1970, por causa do demasiado uso dos inseticidas químicos vários casos de resistência têm sido evidenciados neste mosquito (Consoli et al., 1986). Logo após a observância de casos de resistência dos mosquitos a inseticidas químicos, entomopatógenos como *M. anisopliae* e *Lagenidium giganteum*, e também bactérias do gênero *Bacillus* foram testados visando implantar o controle biológico como meio de combate a estes insetos.

Moraes et al (2001) avaliaram 11 isolados de *Aspergillus* sp. contra larvas de *Aedes fluviatilis* e *Culex quinquefasciatus*. Os isolados *A. ochraceus*, *A. kanagawaensis* e *A. sulphureus* foram os mais eficientes, causando taxa de mortalidade de 80% nas duas espécies de mosquitos.

O fungo *M. anisopliae* testado por Daoust (1982), foi virulento tanto para larvas de *Culex pipiens*, quanto para larvas de *Ae. aegypti* e *Anopheles stephens*. De acordo com Riba et al (1986), o segundo estágio de *Ae. aegypti* é o de menos susceptibilidade à infecção pelo fungo; porém, quando testado, o fungo *Penicillium* spp. foi altamente patógeno e virulento para as larvas de segundo estágio de *Ae. aegypti*.

Scholte et al (2004), em condições de laboratório, observaram, que fêmeas do mosquito *Anopheles gambiae* infectadas com o fungo *M. anisopliae* poderiam infectar o macho durante a cópula, e que, possivelmente, o macho infectado dissemina o fungo para outras fêmeas.

Em um trabalho de campo na África, Scholte et al (2005) colocaram tecidos pretos, impregnados com o fungo *M. anisopliae*, em habitações humanas, e observaram a morte e a redução da população de *Anopheles*. Estes insetos se infectaram quando pousaram sobre o tecido preto. Concluiu-se também que o tecido preto é um atrativo para estes mosquitos.

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

A partir de tais pesquisas nota-se grande interesse à procura de fungos entomopatogênicos virulentos e que infecte todos os estágios de desenvolvimento de mosquitos vetores de doenças humanas: ovo, larva e adultos.

3. OBJETIVO

- Determinar em condições de laboratório a patogenicidade e virulência de isolados de fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em adultos (fêmeas) 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 DE MOSQUITOS NO INSETÁRIO

Os adultos do mosquito *Ae. aegypti* (Linhagem Rockefeller) foram criados no insetário do Laboratório de Biotecnologia (CBB/UENF), mantidos em gaiolas (30 cm x 20 cm x 20 cm) e alimentados com uma solução de sacarose (10%).

Para a criação, copos de plástico com água foram mantidos dentro da gaiola, juntamente com mosquitos machos e fêmeas, a fim de servirem como depositários destinados à oviposição. O sangue, necessário para que as fêmeas ovipositassem, foi ofertado usando um camundongo preso à gaiola. Logo após a postura, os ovos foram coletados e colocados dentro de um recipiente com água para propiciar a eclosão das larvas. Após a eclosão, o recipiente com as larvas foi mantido em gaiola de plástico (30 cm x 20 cm x 20 cm), coberta com tecido de organza até a emergência do mosquito adulto.

As gaiolas foram mantidas em câmara climatizada a uma temperatura de 25°C, 70 ± 10 % UR no escuro.

4.2 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS EM ARROZ

Foram utilizados isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, obtido da coleção do LEF/UENF, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 Isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* usados nos testes de patogenicidade e virulência contra fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

Isolado	Espécies	Hospedeiro/fonte	Origem
Esalq 818	<i>M. anisopliae</i>	solo	Piracicaba - SP
LPP 133	<i>M. anisopliae</i>	solo	Montenegro - RO
LPP 45	<i>M. anisopliae</i>	solo	Rondônia - RO
CG 494	<i>B. bassiana</i>	Diptera	R. do Pomba - BA

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido SDA ¼ (Dextrose 10g; Peptona 2,5g; Extrato de levedura 2,5g; Ágar 20g e Água destilada 1 L), por duas semanas, a 27° C, em câmara climatizada (marca: FANEM) e subseqüentemente armazenados a 4 °C.

Para a multiplicação dos fungos cultivados em placas de Petri, foram adotados os seguintes procedimentos: Erlemeyers de 250 mL contendo 25 g de arroz parboilizado cru + 10 mL de água destilada; fechados com algodão, foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121° C). Logo após, com o auxílio de uma colher estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados nos Erlemeyers com o arroz autoclavado. Movimentos circulares foram feitos, de modo a obter uma distribuição uniforme dos conídios entre os grãos de arroz.

Os Erlemeyers foram mantidos em câmara climatizada, a 27 °C, e a produção dos conídios foi avaliada na câmara de Neubauer por 5, 10 e 15 dias após a inoculação.

4.3 PREPARO DAS FORMULAÇÕES DE FUNGO PARA O TESTE DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

Para os testes de patogenicidade e virulência, dos fungos contra *Ae aegypti*, foram preparadas duas formulações para cada isolado:

1. Fungo + 0,05% de Tween 80 (TW).
2. Fungo + 0,05% de Tween 80 + 8% de Óleo vegetal (TW+OL).

Todo o processo de coleta de conídios do fungo foi feito em câmara de fluxo previamente 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 até a obtenção da concentração desejada nas formulações.

O tratamento controle consistiu nas duas formulações mostradas acima, porém sem a adição de fungo.

4.4 TESTE DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

Foram testados isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra adultos (fêmeas) de *Ae. aegypti* através da aplicação indireta, via contato, usando um suporte impregnado com conídios e por aplicação direta, via pulverização usando a Torre de Potter. A concentração foi de 1×10^9 conídios ml^{-1} para a aplicação por contato e de 1×10^8 conídios ml^{-1} na aplicação por pulverização.

4.4.1 APLICAÇÃO INDIRETA DO FUNGO (CONTATO)

Papéis-filtro impregnados com cada formulação de cada isolado foram usados para testar se apenas o contato das pernas (tarsos), asas ou outras partes do corpo de *Ae. aegypti* com a superfície do papel causaria uma infecção e a morte do mosquito.

Primeiramente, o papel-filtro foi cortado em pedaços de 8 cm de largura e 6 cm de comprimento, sendo esterilizados em autoclave durante 15 min. a 1 atm (121° C). Após a esterilização, os pedaços de papel-filtro foram umedecidos em 30 mL da formulação do isolado na concentração de 1×10^9 conídios ml^{-1} e colocado dentro de um pote de plástico (gaiola) de 9 cm de largura e 7 cm de altura. Esta gaiola foi deixada dentro de uma câmara climatizada a 25 °C, $70 \pm 10\%$ UR de 16 – 18 h até a total secagem do papel-filtro. O papel-filtro seco foi colocado, no sentido vertical, dentro da gaiola.

Para melhor manipulação, os mosquitos foram adormecidos pela exposição a uma corrente de dióxido de carbono durante 30 seg. e, com auxílio de uma pinça fina, 10 fêmeas de *Ae. aegypti* foram colocadas em cada gaiola com o papel-filtro impregnado com a formulação do isolado.

Para os grupos controle os papéis-filtro foram tratados somente com a formulação Tween 80 e colocados juntamente com 10 fêmeas de *Ae. aegypti* em cada gaiola.

Todos os papéis-filtro foram cuidadosamente retirados das gaiolas após 48 h do início do experimento.

Foram montadas 5 gaiolas para os mosquitos tratados com a formulação com fungos (n=50 mosquitos) e 2 gaiolas para os mosquitos tratados com a formulação sem adição do fungo (n=20 mosquitos).

Realizaram-se 3 repetições deste experimento.

4.4.2 APLICAÇÃO DIRETA DO FUNGO (PULVERIZAÇÃO)

Neste método utilizou-se um equipamento denominado Torre de Potter, que consisti em um pulverizador de alta precisão.

Para a aplicação do isolado, por pulverização, as fêmeas adultas de *Ae. aegypti* foram adormecidas pela exposição de uma corrente de dióxido de carbono durante 30 segundos. Depois de adormecidos, grupos de 10 mosquitos foram colocados em um disco de papel-filtro esterilizado e logo após foram pulverizados com 1 mL da formulação em teste utilizando a Torre de Potter. Com o auxílio de uma pinça fina as 10 fêmeas foram retiradas do papel-filtro e postas dentro de uma gaiola. A concentração dos isolados usados neste método foi de 1×10^8 conídios ml^{-1} .

Para os tratamentos controle, grupos de 10 mosquitos foram pulverizados com 1 mL de Tween 80, com e sem adição de óleo vegetal, e colocados dentro de uma gaiola.

Foram montadas 5 gaiolas para os tratamentos com os fungos (n=50 mosquitos) e 2 gaiolas para os tratamentos com a formulação sem adição do fungo (n=20 mosquitos).

Realizaram-se 3 repetições deste experimento.

Os resultados obtidos nestes ensaios permitiram selecionar um isolado com maior potencial virulento, sendo este usado nos estudos subseqüentes.

4.5 APLICAÇÃO DO FUNGO EM TECIDO

O isolado com melhor virulência nos experimentos anteriores foi testado para avaliar se os mosquitos se infectariam pousando sobre um tecido preto impregnado com a formulação do fungo. Foram utilizados tecidos Tricoline Lycra Lisa e Cedro-brim, escolhidos, entre vários tecidos pretos, por suas propriedades hidrofílicas.

O isolado foi preparado em duas formulações (TW e TW+OL) e pulverizado sobre os tecidos. A concentração usada foi de 1×10^9 conídios ml^{-1} .

Primeiramente, o tecido foi cortado em pedaços de 8 cm de largura e 6 cm de altura e esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 1 atm (120°C). Após a esterilização, o tecido foi pulverizado, de cada lado, com 1 mL da formulação do fungo e suspenso, verticalmente, dentro da gaiola.

Os mosquitos foram adormecidos pela exposição a uma corrente de dióxido de carbono durante 30 seg. e, com auxílio de uma pinça fina, 10 fêmeas foram colocadas na gaiola. Passadas 48 h, o tecido foi, cuidadosamente, retirado da gaiola.

Foram montadas 3 gaiolas para os tecidos impregnados com a formulação do fungo. Cada gaiola continha 10 mosquitos ($n=30$ mosquitos).

Nos grupos controle os tecidos pretos foram pulverizados com as formulações TW e TW+OL, sem adição do fungo. Foram feitas 2 gaiolas contendo 10 mosquitos cada ($n=20$ mosquitos).

Fizeram 3 repetições deste experimento.

4.6 TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO MOSQUITO AO FUNGO

Este experimento visou avaliar se diferentes tempos de exposição dos insetos à formulação do fungo influenciariam na taxa de mortalidade dos mosquitos. Utilizaram-se as formulações TW e TW+OL, aplicados em papel-filtro. A concentração usada para este experimento foi de 1×10^9 conídios ml^{-1} .

Os períodos estipulados para retirada do papel-filtro foram: 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24, 48 h. O papel-filtro foi tratado conforme citado no item 3.4.1. Os mosquitos foram adormecidos por uma corrente de dióxido de carbono pelo período de 30 seg. e, com auxílio de uma pinça fina, 10 fêmeas de *Ae. aegypti* foram colocadas na gaiola.

Para cada período de exposição (horas) foram montados três gaiolas com 10 mosquitos ($n=30$ mosquitos) para o tratamento com os fungos e uma gaiola

com 10 mosquitos (n=10 mosquitos) para o grupo controle. Os grupos controle foram tratados sem adição de fungo nas formulações.

Foram feitas 2 repetições deste experimento.

Em todos os experimentos as gaiolas foram tampadas com organza para melhor visualização dos cadáveres. Os cadáveres foram retirados por um furo feito na lateral da gaiola. Tal furo foi tampado com papel esterilizado e fita adesiva. As gaiolas foram mantidas em câmara climatizada a 25 °C, 70 ± 10% UR e a mortalidade dos mosquitos foi avaliada, diariamente, durante o período de 7 dias. Durante todo o experimento os mosquitos foram alimentados diariamente com uma solução de sacarose 10% impregnado em um disco de papel-filtro esterilizado e colocado sobre o organza.

4.7 CONIDIOGÊNESE

A infecção do inseto foi confirmada pela observação das estruturas fúngicas do patógeno sobre os cadáveres. Para isso, os insetos mortos foram transferidos para placas de plástico, forradas com papel de filtro umedecido com água esterilizada, e expostos por 20 seg. à luz UV, a uma distância de 90 cm da fonte. Tal procedimento foi feito para eliminação de possíveis contaminantes, como fungos saprófitos, sobre os cadáveres. Em seqüência as placas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas e, logo após, por um período de 15 dias em câmara climatizada a 25°C, 90 ± 10% UR.

4.8 CONTAGEM DO NÚMERO DE ESPOROS NOS CADÁVERES DE *Aedes aegypti*

Os insetos mortos foram mantidos em câmara climatizada (BOD) a uma temperatura de 25°C, 70 ± 10% UR e fotofase de 12h, durante quinze dias para a verificação da conidiogênese. Foram coletados, ao acaso, cinco insetos por tratamento (contato e pulverização) e realizada a contagem de conídios de cada mosquito. Para isto, cada inseto foi imerso em um tubo de ensaio contendo 1 mL de 0,05% Tween 80 e em seguida foi realizada a agitação deste tubo em vortex. A avaliação da concentração de conídios foi feita no microscópio através da câmera de Neubauer.

4.9 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 em 95% de nível de significância. Este método foi conduzido pelo GraphPad Prism 3.0 Software (Motulsky, 1995). Primeiramente foram analisadas as repetições de cada tratamento, com o objetivo de verificar se as curvas de sobrevivência entre as repetições não eram estatisticamente diferentes. Não ocorrendo diferenças significativas entre repetições, as três repetições de cada experimento foram juntadas (“pooled”), dando-se início à análise das curvas de sobrevivência entre os tratamentos. O tempo médio de sobrevivência (S_{50}) dos mosquitos também foi avaliado pelo GraphPad Prism.

A análise de Próbit (Sokal, 1958) foi utilizada para obter o tempo médio de sobrevivência dos mosquitos *Ae. aegypti* no experimento de avaliar os efeitos de diferentes tempos de exposição ao fungo.

Os primeiros experimentos foram ajustados usando a fórmula do Abbott (Abbott, 1925).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DE QUATRO ISOLADOS DE FUNGOS CONTRA *Aedes aegypti*

Primeiramente foi avaliada a taxa de mortalidade causada por quatro isolados de fungos entomopatogênicos contra o mosquito *Ae. aegypti*. Para isto optou-se pela aplicação da fórmula de Abbott visando eliminar os efeitos de mortalidade natural (10% a 28%) daquela causada pela infecção com os fungos entomopatogênicos.

A Figura 1 mostra a mortalidade (%) de *Ae. aegypti* tratados com os isolados Esalq 818, LPP 45, LPP 133 e CG 494, formulados em TW ou TW+OL aplicados por contato ou por pulverização. Para a análise estatística usou-se o número total de insetos mortos, independente dos dias de aplicação das formulações. A análise de variância de 2 fatores (tratamento = fungos e formulação = forma de aplicação com ou sem adição de óleo vegetal) mostrou que houve efeito somente de formulação ($F_{3,32}=3,42;P<0,05$), não havendo efeito dos tratamentos ($F_{3,32}=1,32;P>0,05$) e nem interação tratamentos *versus* formulação ($F_{9,32}=1,55;P>0,05$). O teste de comparações múltiplas Duncan mostrou que as formulações contato com óleo e pulverização com óleo apresentaram mortalidade significativamente maior do que a formulação contato sem óleo ($P<0,05$), sendo que a pulverização sem óleo não foi significativamente

diferente a todas outras formas de aplicação do fungo com ou sem adição de óleo ($P>0,05$).

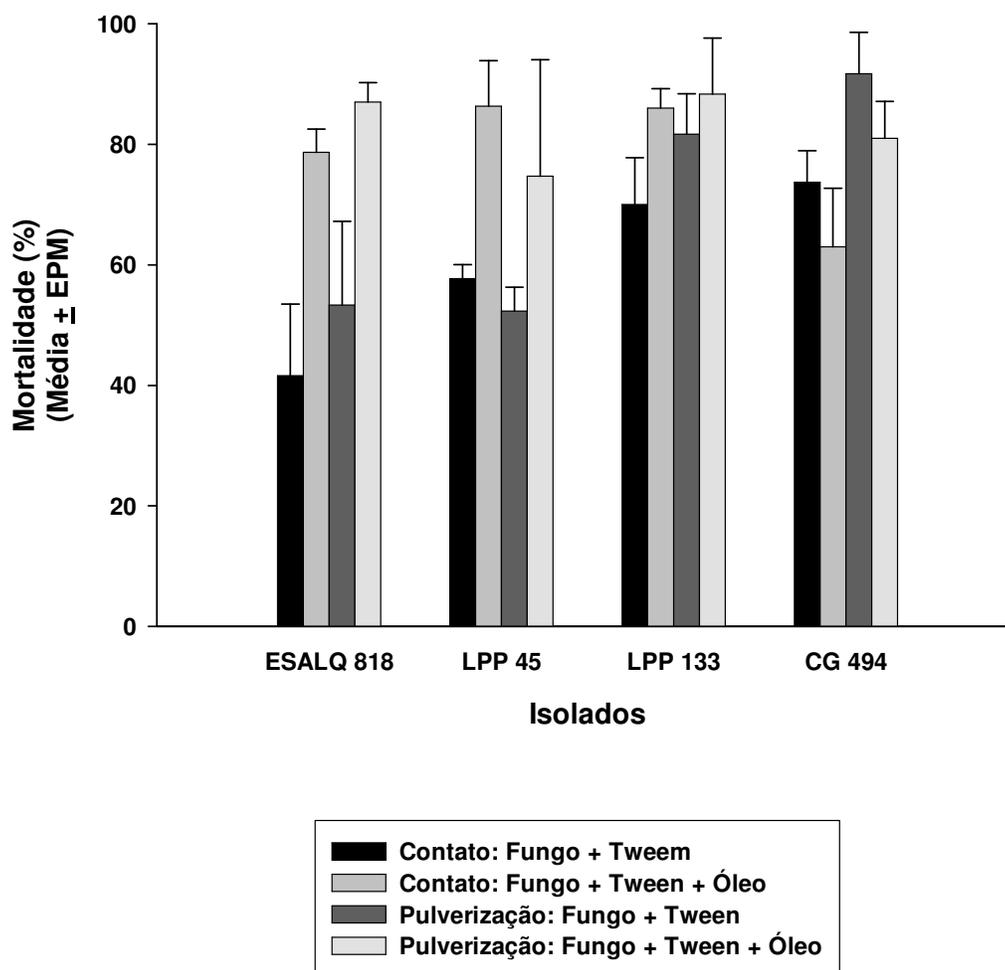


Figura 1 – Mortalidade de *Ae. aegypti* tratados com os isolados Esalq 818, LPP 45, LPP 133 e CG 494, formulados em TW ou TW+OL e aplicados por contato ou por pulverização (n=50 mosquitos por repetição). Foram montadas 3 repetições. Os resultados foram ajustados usando a fórmula de Abbot.

Aos 7 dias, sem aplicação da fórmula de Abbott, observou-se que os tratamentos com fungo provocaram altas porcentagens de mortalidade de *Ae. aegypti*. Na Figura 2 são apresentadas as curvas de sobrevivência dos mosquitos

tratados com os quatros isolados, aplicados por meio de contato ou pulverização, formulados em TW ou TW+OL.

Os isolados que apresentaram altas taxas de mortalidade quando feito o tratamento Fungo + TW, impregnado no papel filtro, foram Esalq 818 e LPP 133. Em 3 dias restavam ~15% de mosquitos sobreviventes no tratamento com Esalq 818 e 20% no tratamento com LPP 133.

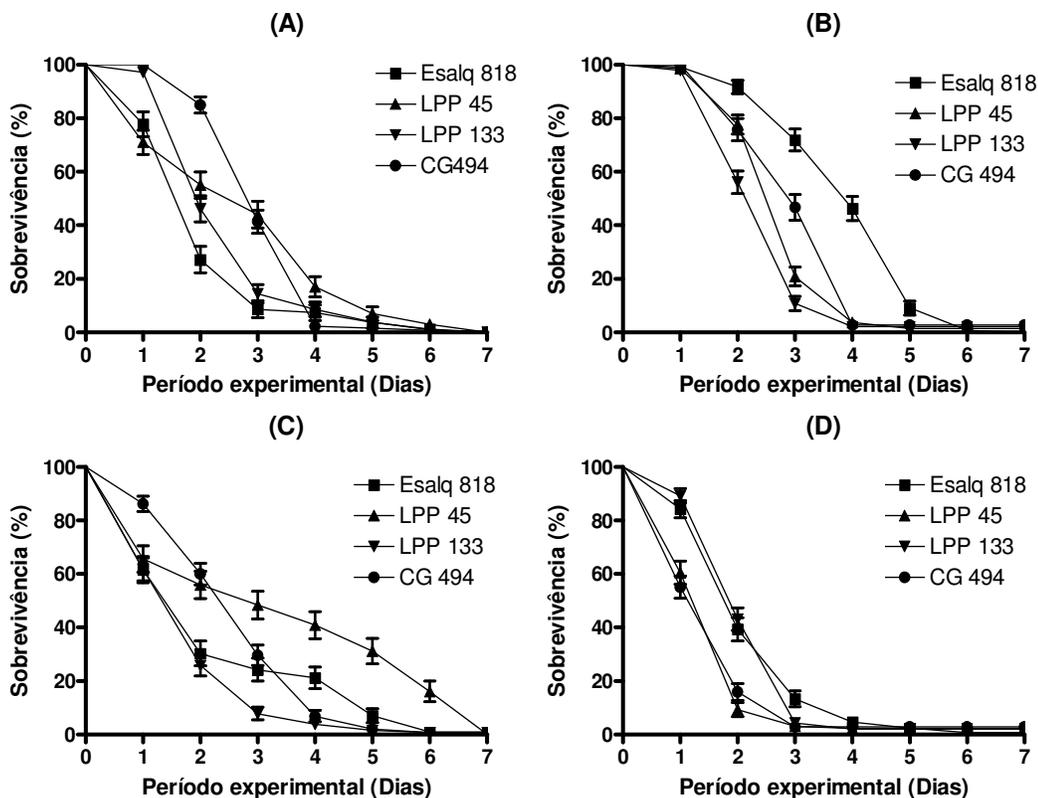


Figura 2 – Sobrevivência de *Aedes aegypti* tratados com Esalq 818, LPP 45, LPP 133 e CG 494. (A) Isolado+TW aplicado por contato. (B) Isolado+TW+OL aplicado por contato. (C) Isolado+TW aplicado por pulverização. (D) Isolado+TW+OL aplicado por pulverização. (n=50 mosquitos por repetição). Foram montadas 3 repetições.

Já os isolados LPP 45 e CG 494 apresentaram, em 3 dias, ~40% de mosquitos sobreviventes. As curvas de sobrevivência, entre o isolado Esalq 818 e LPP 133, foram estatisticamente diferentes ($P=0,0047$), entretanto o tempo médio de sobrevivência dos mosquitos (S_{50}) foi igual (2 dias).

Seguindo a mesma forma de aplicação, mas com o fungo formulado em TW+OL, os isolados LPP 133 e LPP 45 provocaram em 3 dias 80% de mortalidade. As curvas de sobrevivência, entre estes 2 isolados, foram estatisticamente diferentes ($P=0,0001$), mas, apesar disto, o valor do S_{50} foi igual, 3 dias (Figura 2 B).

Na Figura 2 (C) são apresentadas as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com a formulação do fungo em TW aplicada por pulverização. Neste experimento, os isolados LPP 133 e Esalq 818 apresentaram em 2 dias 30% de insetos sobreviventes e os demais isolados apresentaram 60%. Apesar das curvas de sobrevivência, entre o LPP 133 e Esalq 818 terem sido estatisticamente diferentes ($P=0,0243$), o valor do S_{50} foi igual (2 dias).

Mantendo-se a mesma forma de aplicação, mas com o isolado formulado em TW+OL, os isolados LPP 45 e CG 494 provocaram em 2 dias mortalidade de ~80%. As curvas de sobrevivência destes isolados não foram estatisticamente diferentes, e o valor do S_{50} foi de 2 dias para os dois isolados (Figura 2 D).

A fim de facilitar a análise dos resultados, as Figuras 3, 4, 5, e 6 mostram, separadamente, as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com cada um dos isolados submetidos a diferentes tratamentos.

A Figura 3 compara as curvas de sobrevivência dos tratamentos com o isolado Esalq 818 formulado em TW e TW+OL aplicados por contato e pulverização.

Os mosquitos dos grupos controle que entraram em contato com a formulação TW tiveram mortalidade de 21%, enquanto que os mosquitos tratados com a formulação em TW+OL apresentaram mortalidade de 17,2%. Já os mosquitos dos grupos controle tratados por pulverização apresentaram mortalidade de 18% na formulação TW e 19% na formulação TW+OL.

A Figura 3 (A) mostra as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o fungo Esalq 818 na formulação TW e TW+OL, aplicado por contato. As curvas de sobrevivência, entre estas formulações, foram estatisticamente diferentes ($P= 0,0001$). A formulação TW provocou em 3 dias mortalidade de 90%, enquanto que para o mesmo percentual de mortalidade, do tratamento feito com TW+OL, foram necessários 5 dias. O valor do S_{50} foi de 2 dias para os mosquitos tratados com Esalq 818 + TW, e de 4 dias para os mosquitos tratados com Esalq 818 +TW+OL.

A Figura 3 (B) mostra as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o fungo *Esalq 818*, pulverizado na formulação TW e TW+OL. Em 2 dias restaram na formulação em TW 25% de insetos sobreviventes, enquanto que na formulação TW+OL restavam 40% de mosquitos vivos. As curvas de sobrevivência, entre as formulações, não foram estatisticamente diferentes, sendo o valor do S_{50} igual há 2 dias.

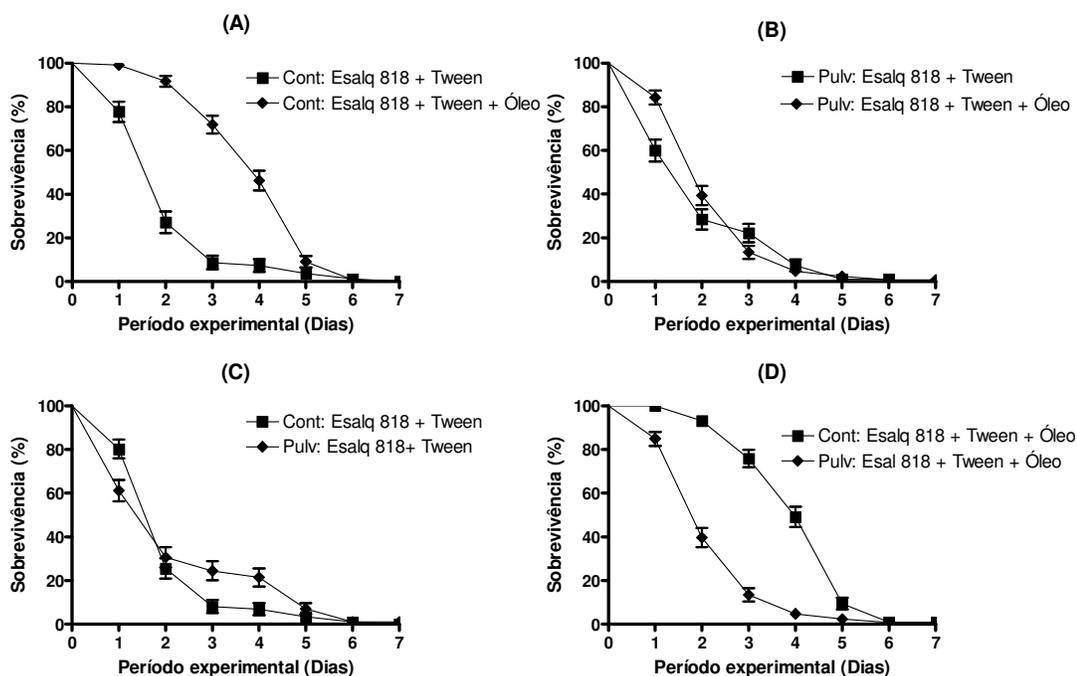


Figura 3 – Sobrevivência de *Aedes aegypti* tratados com o isolado *Esalq 818* na formulação TW ou TW+OL, aplicado por contato ou por pulverização. (A) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por contato. (B) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por pulverização. (C) Isolado+TW aplicado por contato e por pulverização. (D) Isolado+TW+OL aplicado por contato e por pulverização. (n=50 mosquitos por repetição). Foram montadas 3 repetições.

As curvas de sobrevivência do isolado *Esalq 818* formulado com TW e aplicado por contato e pulverização não diferiram estatisticamente. O valor do S_{50} foi de 2 dias para as duas aplicações (Figura 3 C).

Ao comparar as duas formas de aplicações, contato e pulverização, porém usando a formulação do *Esalq 818* em TW+OL, observou-se diferença significativa entre as curvas de sobrevivência ($P= 0,0001$). Em 3 dias restavam

apenas 10% de mosquitos sobreviventes no tratamento por pulverização e 80% no tratamento por contato. O S_{50} foi de 2 dias para a aplicação por pulverização e de 4 dias para aplicação por contato (Figura 3 D).

A Figura 4 compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o isolado LPP 45 formulado em TW ou TW+OL aplicados por contato ou pulverização. Neste ensaio, os mosquitos dos grupos controle tratados por contato na formulação TW tiveram mortalidade de 14%, e na formulação TW+OL apresentaram mortalidade de 10%. Os mosquitos dos grupos controle tratados por pulverização apresentaram mortalidade de 13,3% na formulação TW, e de 18% na formulação TW+OL.

Conforme demonstradas na Figura 4 (A), as curvas de sobrevivência não foram estatisticamente diferentes no tratamento dos insetos com o isolado LPP 45 formulado em TW e TW+OL e aplicado por contato. Apesar da formulação TW ter tido alta ação virulenta (em 2 dias restavam ~60% de mosquitos vivos), o valor do S_{50} foi igual para ambas formulações sendo de 3 dias.

As curvas de sobrevivência foram estatisticamente diferentes ($P= 0,0001$) quando comparado os mosquitos tratados em duas formulações do LPP 45, TW e TW+OL aplicados via pulverização. No tratamento TW+OL, 2 dias foram suficientes para matar 90% dos insetos, enquanto no tratamento TW matou 40%. O valor do S_{50} foi de 2 dias para a formulação TW+OL e de 3 dias para formulação do isolado somente em TW (Figura 4 B).

A Figura 4 (C) compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com a formulação do fungo em TW, aplicado tanto por contato, quanto por pulverização. As curvas de sobrevivência, entre estas duas aplicações, foram estatisticamente diferentes ($P= 0,0070$). Para o tratamento contato foram necessários 4 dias para matar 80% dos insetos. Nos mesmos 4 dias o tratamento por pulverização matou apenas ~60% dos mosquitos. No entanto, o valor do S_{50} foi de 3 dias para as duas aplicações.

As curvas de sobrevivência também foram estatisticamente diferentes ($P=0,0084$) quando comparado à aplicação por contato e a aplicação por pulverização, ambas utilizando o isolado formulado em TW+OL. Neste caso, a formulação pulverizada sobre os insetos provocou 40% de mortalidade no primeiro dia de avaliação, enquanto 100% dos mosquitos tratados por contato

permaneciam vivos. Apesar disso o valor do S_{50} foi igual para as duas aplicações, 3 dias (Figura 4 D).

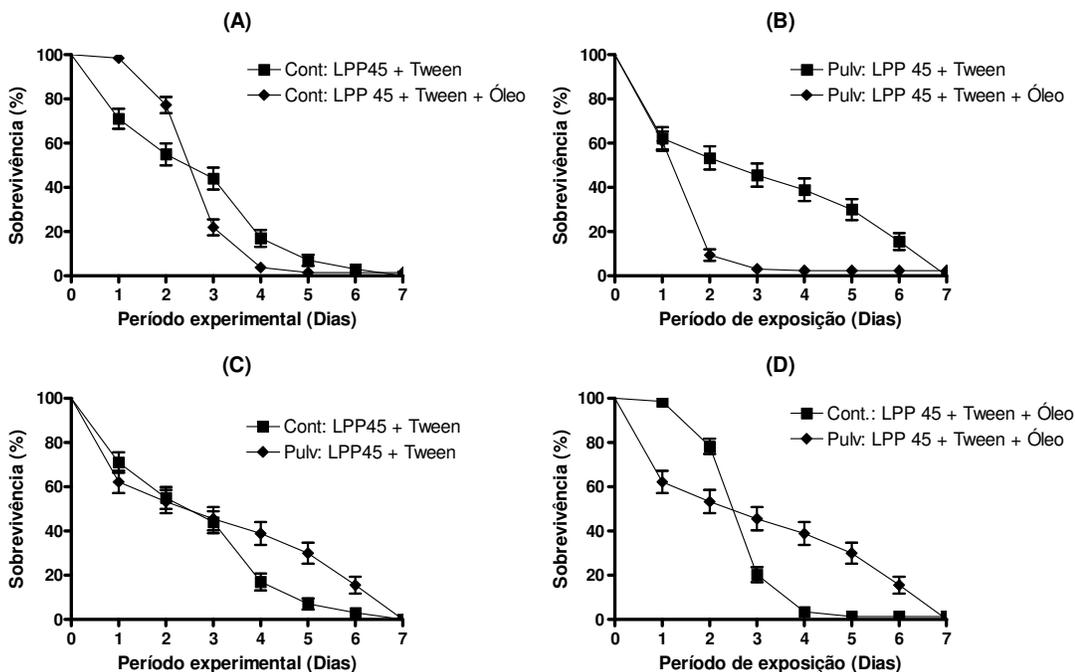


Figura 4 – Taxas de sobrevivência de *Aedes aegypti* tratados com o isolado LPP 45 formulado em TW ou TW+OL e aplicados por contato ou por pulverização. (A) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por contato. (B) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por pulverização. (C) Isolado+TW aplicado por contato e por pulverização. (D) Isolado+TW+OL aplicado por contato e por pulverização. (n=50 mosquitos por repetição). Foram montadas 3 repetições.

A Figura 5 compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o isolado LPP 133 formulado em TW ou TW+OL e aplicados por contato e por pulverização. Os mosquitos dos grupos controle, tratados por contato, tiveram mortalidade de 16% na formulação TW e de 15,6% na formulação TW+OL. Já os mosquitos dos grupos controle tratados por pulverização, usando a formulação TW, apresentaram mortalidade de 12,6% e quando usada a formulação TW+OL a mortalidade foi de 28,3%.

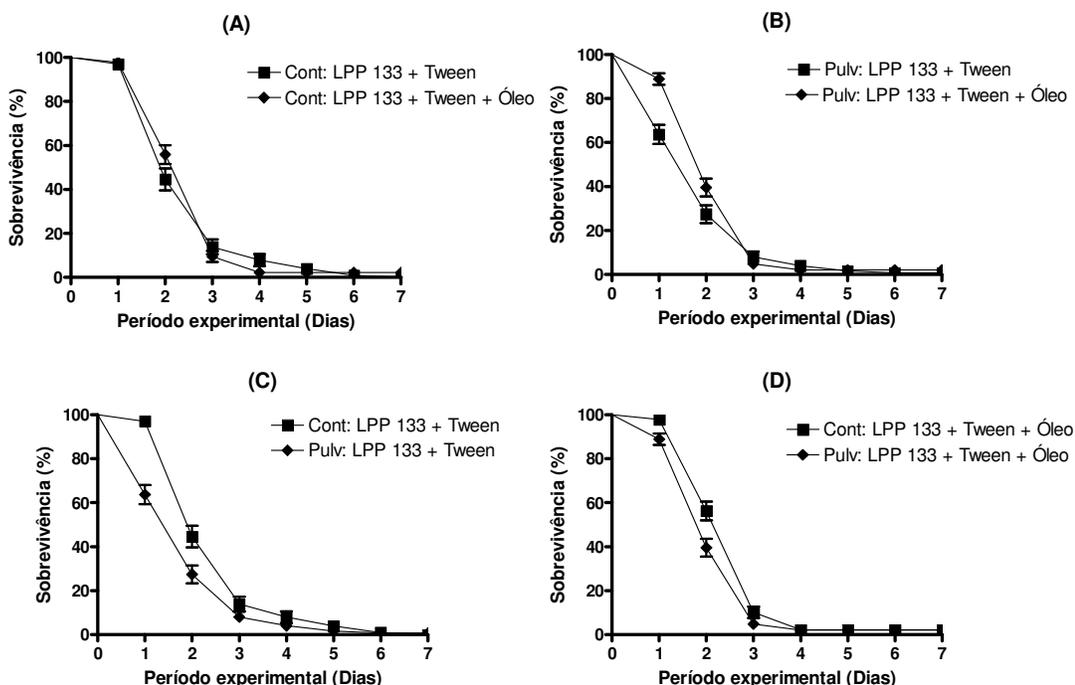


Figura 5 – Sobrevivência de *Aedes aegypti* tratados com o isolado LPP 133 na formulação TW ou TW+OL aplicado por contato ou por pulverização. (A) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por contato. (B) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por pulverização. (C) Isolado+TW aplicado por contato e por pulverização. (D) Isolado+TW+OL aplicado por contato e por pulverização. (n=50 mosquitos por repetição). Foram montadas 3 repetições.

As curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com a formulação do LPP 133 em TW e TW+OL aplicados por contato não foram estatisticamente diferentes. O valor de S_{50} foi de 2 dias para a formulação TW e de 3 dias para a formulação TW+OL (Figura 5 A).

A Figura 5 (B) compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados, por pulverização, com o LPP 133 formulado em TW e TW+OL. As curvas de sobrevivência, entre estas formulações, foram estatisticamente diferentes ($P=0,0048$). O isolado LPP 133 formulado em TW apresentou em apenas 1 dia maior virulência (~40% de mortalidade) do que a formulação TW+OL, que causou apenas 10% de mortalidade no primeiro dia. O valor do S_{50} foi de 2 dias para ambas formulações.

Conforme mostra a Figura 5 (C), as curvas de sobrevivência foram estatisticamente diferentes ($P= 0.0001$) quando os mosquitos foram tratados com a formulação TW, aplicado por contato e pulverização. O valor do S_{50} foi de 2 dias para as duas aplicações, porém no primeiro dia de avaliação a formulação pulverizada sobre os insetos causou 40% de mortalidade, enquanto que a mesma formulação exposta por contato aos mosquitos teve 5% de mortalidade.

Mantendo os mesmos meios de aplicação, porém usando a formulação do isolado em TW+OL, foi verificado que as curvas de sobrevivência dos mosquitos foram estatisticamente diferentes ($P= 0.0022$). O valor do S_{50} foi de 2 dias para ambas aplicações. (Figura 5 D).

A Figura 6 compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o isolado CG 494 formulado em TW ou TW+OL e aplicados por contato ou por pulverização. Nestes testes os mosquitos dos grupos controle tratados por contato na formulação TW tiveram mortalidade de 15%, e na formulação TW+OL apresentaram mortalidade de 13,2%. Já os mosquitos do grupo controle tratados por pulverização apresentaram mortalidade de 11,5% na formulação TW, e de 12% na formulação TW+OL.

A Figura 6 (A) compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados por contato com duas formulações do isolado CG 494, TW e TW+OL. As curvas de sobrevivência, entre estas formulações, não foram estatisticamente diferentes e o valor do S_{50} foi de 3 dias para as duas formulações.

As curvas de sobrevivência foram estatisticamente diferentes ($P= 0.0001$), quando comparado os mosquitos pulverizados com o isolado CG 494 formulado em TW e TW+OL. O valor de S_{50} foi de 3 dias para a formulação TW e 2 dias para TW+OL, formulação esta que apresentou em 2 dias 80% de mortalidade, enquanto a formulação TW em 2 dias apresentava 40% de mosquitos mortos (Figura 6 B).

A Figura 6 (C) compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o isolado CG 494 formulado em TW e aplicados por dois meios de contato e pulverização. As curvas de sobrevivência, entre estas duas aplicações, foram estatisticamente diferentes ($P= 0.0054$), porém o valor de S_{50} foi de 3 dias para as duas aplicações, apresentando 100% de mortalidade no quarto dia de avaliação.

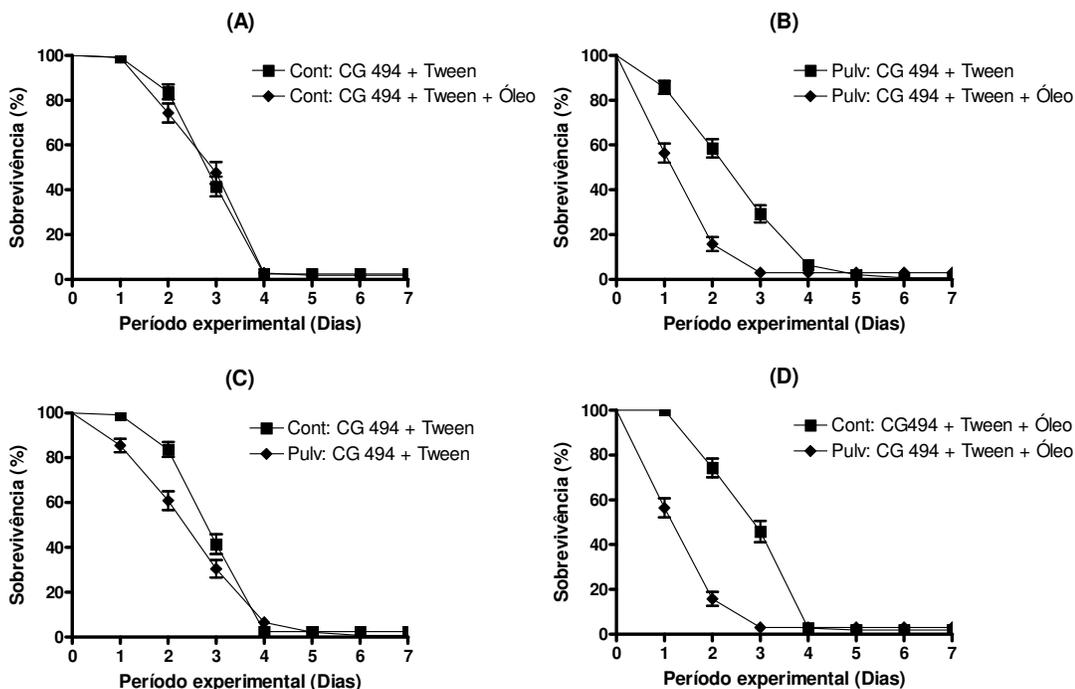


Figura 6 – Sobrevivência de *Aedes aegypti* tratados com o isolado CG 494 na formulação TW ou TW+OL aplicado por contato ou por pulverização. (A) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por contato. (B) Isolado+TW e Isolado+TW+OL aplicados por pulverização. (C) Isolado+TW aplicado por contato e por pulverização. (D) Isolado+TW+OL aplicado por contato e por pulverização. (n=50 mosquitos por repetição). Foram montadas 3 repetições.

As curvas de sobrevivência também foram estatisticamente diferentes ($P=0,0001$) quando usada a aplicação por contato e por pulverização para o tratamento dos mosquitos com o CG 494 formulado em TW+OL. O valor do S_{50} do tratamento por pulverização foi de 2 dias, e por contato, foi de 3 dias. No primeiro dia de avaliação o fungo pulverizado nos insetos causou 40% de mortalidade, enquanto os insetos tratados por contato mantiveram 100% dos mosquitos vivos (Figura 6 D).

O isolado LPP 133 foi selecionado para os demais testes por sua fácil produção *in vitro* e alta virulência contra os mosquitos *Ae. aegypti* (Figura 2 – A, B e C).

5.2 DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti* AO FUNGO

A Figura 8 mostra a mortalidade dos mosquitos expostos por diferentes tempos (h) ao isolado LPP 133 formulado em TW ou TW+OL. Os mosquitos se infectaram com os conídios quando pousaram sobre o papel-filtro impregnado com a suspensão do fungo.

A mortalidade dos mosquitos seguiu uma curva sigmoidal, aumentando gradativamente durante as primeiras seis horas de exposição e, subseqüentemente, atingindo um patamar de quase 100% de mortalidade de 12 a 48 horas.

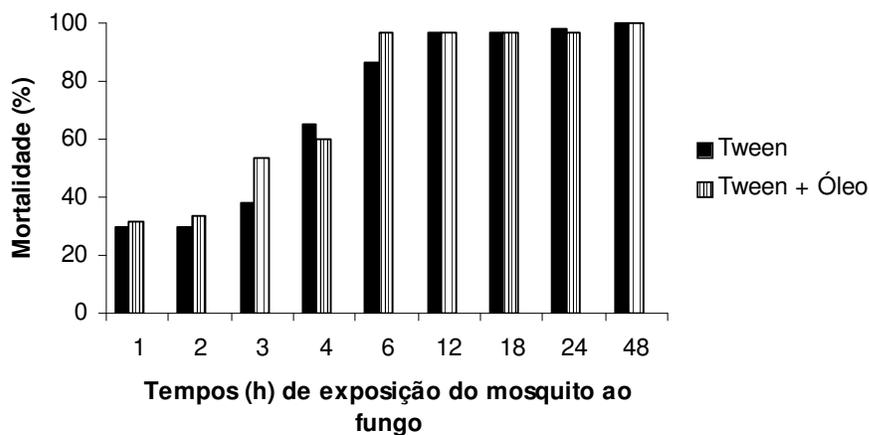


Figura 8 – Tempos (h) de exposição do mosquito ao fungo. As formulações do isolado foram com TW e TW+OL (n=30 mosquitos). Foram montadas 2 repetições.

A formulação do isolado LPP 133 em TW +OL mostrou-se ligeiramente mais virulenta do que a formulação do mesmo isolado em somente TW. A exceção ocorreu quando os mosquitos foram expostos por 4h ao isolado LPP133, na qual a formulação TW causou maior mortalidade.

Para Análise de Probit foram usados os 6 primeiros períodos de exposição (1 a 12 h). O Tempo Letal (TL₅₀) para a formulação em TW foi de 3,49 e de 3,39 para a formulação TW+OL (Tabela 2).

Tabela 2 Tempo Letal (TL₅₀) para os mosquitos expostos por diferentes tempos ao isolado LPP 133 formulado em TW ou TW+OL.

Formulação	TL ₅₀ (h)	LC min (h)	LC max (h)
Tween 80	3,49	2,41	4,43
Tween 80 + Óleo	3,39	1,47	4,09

5.3 AVALIAÇÃO DE CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS MOSQUITOS TRATADOS COM FUNGOS IMPREGNADOS EM TECIDOS

Os tecidos Tricoline lycra lisa e Cedro-brim foram selecionados para os demais estudos por ter baixa hidrofobicidade. Esses tecidos possuem altas porcentagens de algodão, o que facilita a absorção da suspensão do fungo e a aderência dos conídios entre seus fios. O tecido preto foi pulverizado com o isolado LPP 133 e suspenso, verticalmente, na gaiola teste. Os mosquitos entraram em contato com os conídios do fungo quando pousaram na superfície plana do tecido.

A Figura 7 compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o isolado LPP 133 formulado em TW e TW+OL pulverizados sobre os tecidos pretos Tricoline lycra lisa e Cedro-brim.

As curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com o fungo formulado em TW e TW+OL, pulverizados no tecido Tricoline, foram estatisticamente diferentes ($P=0.0352$), mas os valores de S₅₀ foram iguais (3 dias). A formulação TW+OL causou em 2 dias 40% de mortalidade dos mosquitos, enquanto a formulação TW apresentava apenas 20% de mortalidade (Figura 7 A).

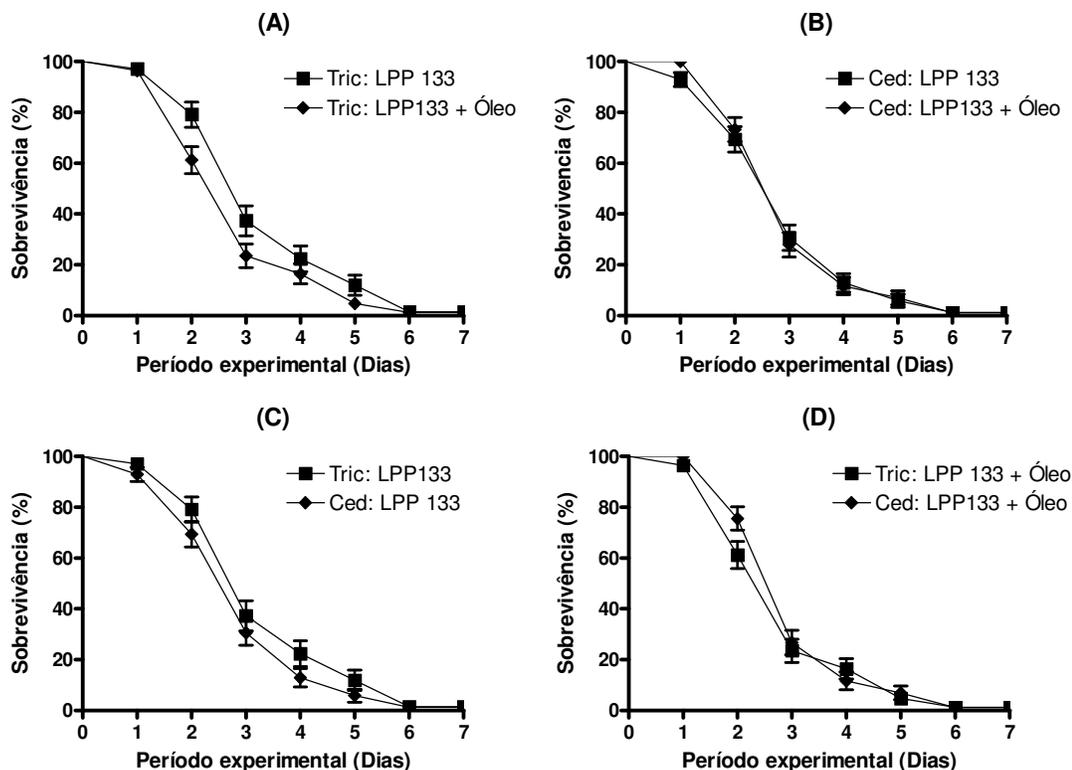


Figura 7 – Sobrevivência dos mosquitos tratados com o isolado LPP 133 na formulação TW ou TW+OL pulverizados sobre o tecido Tricoline lycra lisa e Cedro-brim. (A) Tecido Tricoline pulverizado com a formulação do LPP 133 em TW e TW+OL. (B) Tecido Cedro-brim pulverizado com a formulação do LPP 133 em TW e TW+OL. (C) LPP 133 formulado em TW e pulverizado sobre os tecidos Tricoline e Cedro-brim. (D) LPP 133 formulado em TW+OL e pulverizados sobre os tecidos Tricoline e Cedro-brim (n=30 mosquitos por repetição). Foram montadas 3 repetições de cada experimento.

Estas mesmas formulações, porém pulverizadas sobre o tecido Cedro-brim não apresentaram diferenças significativas. O valor do S_{50} foi de 3 dias para as duas formulações (Figura 7 B).

A Figura 7 (C) compara as curvas de sobrevivência dos mosquitos tratados com a formulação do isolado em TW pulverizado sobre o tecido Tricoline lycra lisa, e sobre o tecido Cedro-brim. As curvas de sobrevivência dos mosquitos, nos dois tecidos, não foram estatisticamente diferentes, e o valor do S_{50} foi de 3 dias para ambos tecidos.

Mantendo estes dois tecidos, mas utilizando a formulação do LPP 133 em TW+OL, foi verificado que as curvas de sobrevivência também não foram estatisticamente diferentes e que o valor do S_{50} foi igual a 3 dias (Figura 7D).

Nestes ensaios, os mosquitos dos grupos controle tratados com o tecido Tricoline lycra lisa impregnado somente com TW apresentaram mortalidade de 15% e com TW+OL apresentaram mortalidade de 16,6%. Já os mosquitos dos grupos controle tratados com TW pulverizado sobre tecido Cedro-brim apresentaram mortalidade de 14,2% e com TW+OL, no mesmo tecido, tiveram mortalidade de 13,6%.

5.4 DESENVOLVIMENTO DO FUNGO SOBRE OS CADÁVERES DOS MOSQUITOS

A Tabela 3 mostra a quantidade de conídios produzidos sobre os cadáveres de *Ae. aegypti* (Figura 9) após a infecção com os 4 isolados formulados em TW ou TW+OL. Essas duas formulações foram aplicadas no mosquito por contato (papel-filtro) ou por pulverização (Torre de Potter).

Foi observado que, aproximadamente, 50% dos mosquitos não apresentaram conídios do fungo durante o período estipulado para a conidiogênese devido a contaminações por bactérias e fungos saprófitos.

O maior número de conídios sobre os cadáveres, nos tratamentos feitos com o isolado Esalq 818, foi encontrado usando a formulação TW aplicada por pulverização ($8,2 \times 10^7$).

O isolado LPP 45, formulado em TW+OL e aplicado por contato, apresentou o maior número de conídios sobre os cadáveres ($4,6 \times 10^6$) quando comparado com os outros ensaios feitos com LPP 45.

Nos tratamentos feitos com LPP 133, o maior número de conídios sobre os cadáveres ($7,5 \times 10^6$) ocorreu quando este isolado foi formulado em TW+OL e aplicado por pulverização.

O isolado CG 494, formulado em TW+OL, apresentou o maior número de conídios sobre os cadáveres quando aplicado por pulverização ($7,4 \times 10^6$).

O menor número de conídios sobre os cadáveres ocorreu quando os mosquitos foram tratados por pulverização com o isolado LPP 45 formulado em TW ($1,2 \times 10^6$).

Tabela 3 - Quantidade de conídios produzidos sobre os cadáveres de *Ae. aegypti*, nos tratamentos feitos com Esalq 818, LPP 45, LPP 133 e CG 494. DP= Desvio Padrão (n= 5 insetos por tratamento).

Tratamento e Formulação do Fungo	Média de conídios nos cadáveres (DP)
Contato – Esalq 818 + TW	$5,6 \times 10^6 \pm 8,2 \times 10^5$
Contato – Esalq 818 + TW + OL	$2,2 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^5$
Pulverização – Esalq 818 + TW	$8,2 \times 10^7 \pm 3,5 \times 10^7$
Pulverização – Esalq 818 + TW+OL	$4,8 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^5$
Contato – LPP 45 + TW	$2,3 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$
Contato – LPP 45 + TW + OL	$4,6 \times 10^6 \pm 3,1 \times 10^6$
Pulverização – LPP 45 + TW	$1,2 \times 10^6 \pm 3,9 \times 10^5$
Pulverização – LPP 45 + TW + OL	$1,4 \times 10^6 \pm 4,7 \times 10^5$
Contato – LPP 133 + TW	$1,8 \times 10^6 \pm 9,1 \times 10^5$
Contato – LPP 133 + TW + OL	$3,1 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$
Pulverização – LPP 133 + TW	$7,5 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$
Pulverização – LPP 133 + TW+OL	$2,9 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$
Contato – CG 494 + TW	$2,1 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$
Contato – CG 494 + TW+OL	$1,8 \times 10^7 \pm 6,0 \times 10^7$
Pulverização – CG 494 + TW	$6,3 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^8$
Pulverização – CG 494 + TW+OL	$7,4 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^5$

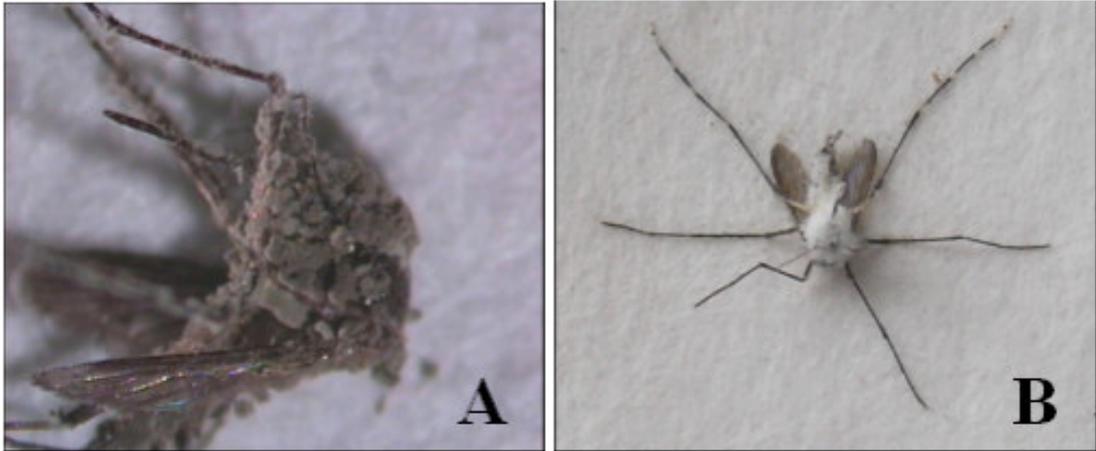


Figura 9 – Mosquito *Aedes aegypti* infectado com: (A) *Metarhizium anisopliae* e (B) *Beauveria bassiana*.

6. DISCUSSÃO

Poucos trabalhos têm sido feitos para investigar o possível uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos vetores de doenças. Além disso, os estudos feitos com fungos infectando vetores visam o controle do estágio larval destes insetos e não outros estágios do seu desenvolvimento. Costa et. al., (1998) avaliaram a patogenicidade e a virulência de 13 isolados de *Penicillium* sp. contra larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis*, *Anopheles aquasalis* e *Culex quinquefasciatus*. Apenas dois isolados *P. corylophilum* e *P. janthinellum* causaram, em 24 horas, altos níveis de mortalidades dessas larvas (84%). Moraes (2001) avaliou a patogenicidade e a virulência de 11 isolados de *Aspergillus* sp. contra larvas *Ae. fluviatilis* e *C. quinquefasciatus*. Os fungos mais efetivos contra esses insetos foram *A. ochraceus*, *A. kanagawaensis* e *A. sulphureus*, causando 80% de mortalidade das larvas. Alves et al., (2002) demonstraram que o CL₅₀, do fungo *M. anisopliae* usado contra larvas de *C. quinquefasciatus*, foi de $1,97 \times 10^4$ conídios ml⁻¹, e TL₅₀ foi de 1 dia.

No presente trabalho, um isolado de *B. bassiana* (CG 494) e três isolados de *M. anisopliae* (Esalq 818, LPP 133 e LPP 45) estudados, independente da via de infecção ou formulação, foram considerados virulentos contra adultos de *Ae. aegypti*. No entanto, os isolados mostraram variações entre si quanto ao grau de virulência. Alguns isolados mataram elevadas porcentagens dos mosquitos (\pm 50%) em poucos dias (2 a 3 dias), outros levaram de 4 a 5 dias para provocar tais

taxas de mortalidade. Essas variações provavelmente ocorrem por diferenças genéticas e fisiológicas entre os isolados, mesmo pertencendo à mesma espécie do fungo (Butt et al., 1992; Khachatourians, 1992) e também pode estar relacionado ao sistema imunológico do mosquito que tenta combater a ação patogênica do fungo. O esporo penetra nos insetos através dos espiráculos, poros ou tegumento. Dentro do inseto, o fungo produz extensão lateral das hifas que eventualmente proliferam e degradam os tecidos dos órgãos internos do mosquito. O crescimento das hifas e a toxidade do fungo continuam até que o inseto esteja morto e totalmente colonizado por micélios (Cole, 2003).

A alta porcentagem de mortalidade nos experimentos pode estar relacionada à metodologia empregada. O papel-filtro usado para infecção dos mosquitos foi de cor branca, sempre esterilizado e emerso em 30 mL da suspensão do fungo. A aplicação por pulverização banhava o corpo do mosquito com conídios do fungo, facilitando assim a penetração do esporo e, conseqüentemente, a infecção do mosquito.

O fungo *B. bassiana*, apesar de ter sido isolado de um díptero, não foi o mais virulento contra *Ae. aegypti*. O isolado mais promissor contra o *Ae. aegypti* foi o LPP 133 (*M. anisopliae*) isolado com uma isca (*Diatraea*) do solo.

O fungo *B. bassiana* aplicado por contato (papel-filtro impregnado com fungo) causou altas taxas de mortalidade em ninfas *T. infestans* (80%) (Luz, et al., 1999). O valor do CL₅₀ foi de $2,4 \times 10^6$ conídios ml⁻¹. Um emulsificante a base de óleo mineral (2%) não afetou a germinação dos conídios de *B. bassiana in vitro*, contudo os conídios não formulados com o emulsificante foram mais efetivos do que conídios formulados. A aplicação desse fungo (1×10^7 conídios/cm²) em pequenas casas experimentais de madeira seguidas de liberação de ninfas de terceiro estágio de *T. infestans* provocou 93,8% de mortalidade do inseto.

Scholte et al., (2004) demonstraram, em condições de laboratório, que o fungo *M. anisopliae* foi virulento contra adultos do mosquito *Anopheles gambiae*. Também mostraram que as fêmeas previamente infectadas com o *M. anisopliae* passam conídios deste fungo aos machos durante a cópula. Estes conídios podem se aderir no macho pela região da cabeça, tórax, abdômen e/ou pernas.

Em nossos experimentos todos os isolados testados contra *Ae. aegypti* foram aplicados por contato e por pulverização em duas formulações, TW e TW+OL. O menor valor do S₅₀ observado foi de 2 dias. Um valor de S₅₀ de 5 dias

foi observado quando Blanford et al., (2005) submeteram adultos de *A. stephensi* a tratamento com *B. bassiana* formulado em óleo. Foi observado que o óleo facilita a aderência dos conídios no interior de residências, uma vez que fica impregnada em cortinas, tecidos e outros lugares onde as fêmeas dos mosquitos costumam pousar quando não estão à procura de sangue.

Nossos resultados mostraram que os adultos de *Ae. aegypti*, tratados com a formulação do fungo em TW+OL, apresentaram uma maior mortalidade do que quando tratados com a formulação TW. Prior et al., (1988) e Batta (2003) sugeriram que formulações a base de óleo vegetal aumentam a eficiência do fungo, facilitam a aderência dos conídios no tegumento do inseto e propiciam um microambiente para os conídios, protegendo-os contra raios ultravioletas e desidratação, além de poderem ser aplicadas em ultrabaixo volume UBV tornando a sua utilização prática e econômica.

A aplicação por pulverização dos fungos *Aspergillus giganteus* e *Penicillium corylophilum* causou, em 48 horas, altas taxas de mortalidade de ninfas de primeiro e quarto estágio de *T. infestans*. (Costa et al., 2003). Os equipamentos comumente usados na aplicação dos produtos químicos contra o *Ae. aegypti* são pulverizadores de alta pressão, pneumático costal motorizado, pneumático montado em base móvel, termonebulizador manual ou montado em base móvel (Junior et al., 2004). Usando estes equipamentos poder-se-ia substituir o uso dos produtos químicos por formulações a base de fungos entomopatogênicos virulentos a esses mosquitos, exceto o termonebulizador devido às temperaturas altas, que inviabilizaria o fungo.

Na aplicação por contato os conídios se aderiram no corpo dos mosquitos *Ae. aegypti* quando este pousou sobre uma superfície (papel-filtro ou tecido) tratada com a suspensão do fungo. Os conídios provavelmente aderiram nos tarsos (pernas) dos insetos, como também nas asas ou outra parte do corpo.

Dentro de residências os mosquitos da família Culicidae têm preferência de pousar em ambientes escuros ou tecidos pretos (Comunicação Pessoal: Dr. Álvaro Eiras). Com isso, após uma triagem de um gama de tecidos pretos, os tecidos Tricoline lycra lisa e Cedro-brim foram selecionados para os estudos de infecção por contato com os tecidos impregnados com fungo. Esses tecidos possuem 97% e 95% de algodão, respectivamente, o que facilita a absorção da suspensão do fungo e a aderência dos conídios entre seus fios entrelaçados. Em

nostros experimentos, a única diferença significativa ocorreu nas curvas de sobrevivência do tecido Tricoline licra lisa pulverizado com a formulação TW e o mesmo tecido, porém pulverizado com a formulação em óleo, entretanto, o S_{50} foi de 3 dias para as duas formulações. Os demais testes feitos com os dois tecidos não apresentaram diferença significativa usando o Log-Rank teste. Com isso foi confirmado que os fungos pulverizados nos tecidos foram eficientes para causar a infecção, em laboratório, do mosquito *Ae. aegypti* e, provavelmente, apresentarão bons resultados quando testados em condições de campo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Scholte et al., (2005) que demonstraram, em experimento em uma vila rural na Tanzânia, África, que um isolado de *M. anisopliae* pulverizado em tecido preto de algodão suspenso no forro (teto) das casas, reduziu a população do mosquito *Anopheles*, e também diminuiu a transmissão do protozoário causador da malária nos humanos. A infecção causada pelo fungo ocorreu a partir do contato das pernas (tarsos) dos insetos com os conídios impregnados no tecido.

Esses dados corroboram para o possível uso de tecidos pretos, impregnados com fungo e com o AtrAedes®, um atraente usado nas armadilhas MosquiTrap® que visam capturar fêmeas de *Ae. aegypti*. Esses tecidos poderiam ser suspensos em lugares onde os mosquitos têm a preferência de ficar, como banheiros, quartos, atrás de guarda-roupas ou embaixo de camas, causando a infecção do mosquito e sua posterior morte. Este tipo de armadilha não capturaria o inseto, mas, por causar infecção e morte do mosquito, diminuiria a incidência da doença dengue e também, possivelmente, o incômodo causado pela picada de outras espécies da família Culicidae.

Além de o fungo causar a infecção e provocar a mortalidade dos mosquitos, Blanford et al., (2005) observaram que o mosquito adulto *Anopheles stephensi*, infectado com o fungo *B. bassiana*, perde a habilidade de se alimentar de sangue, o que, conseqüentemente, reduz a transmissão do protozoário causador da malária. Foi verificado também que o fungo causa danos a maturação do *Plasmodium*, ou seja, mesmo se um inseto picar uma pessoa o protozoário estará na sua forma atenuada não sendo prejudicial ao homem. Futuras pesquisas poderão elucidar se o *Flavivirus* também tem seu desenvolvimento afetado quando o mosquito *Ae. aegypti* está infectado com o fungo entomopatogênico.

Somente um curto tempo de exposição do mosquito *Ae. aegypti* ao LPP 133 (*M. anisopliae*), formulado em TW ou TW+OL, foi necessário para matar 50% destes insetos ($TL_{50} \sim 3$ h). Contrapondo este dado, os mosquitos *A. stephensi* necessitaram de 6 horas de exposição ao *B. bassiana* para que ocorressem altos níveis de mortalidade destes insetos (Blanford et al, 2005).

A maioria dos grupos controle dos experimentos com *Ae. aegypti* teve mortalidade em torno de 10 a 28%. Costa et al (2003) citaram que o estresse causado pela manipulação, em laboratório, do inseto *T. infestans*, provavelmente, foi responsável pela mortalidade dos indivíduos dos grupos controle. Blanford et al., (2005) também constataram taxas de mortalidade consideradas elevadas (34%) para os grupos controle do mosquito *A. stephensi*.

Apenas cerca de 50% dos cadáveres mostraram esporulação do fungo entomopatogênico durante o período normal para a conidiogênese, o restante se contaminou com bactérias ou fungos saprófitos. Os altos níveis de contaminação dos cadáveres poderiam ser um resultado do modo de criação e manutenção dos mosquitos *Ae. aegypti*. A baixa esporulação dos cadáveres também ocorreu quando Blanford et al., (2005) infectaram o mosquito *A. stephensi* com *B. bassiana*. Foi observado 80% de mortalidade deste inseto, porém apenas 70% apresentaram esporulação do fungo entomopatógeno.

O maior número de conídios encontrados sobre os cadáveres de *Ae. aegypti* foi de $8,2 \times 10^7$ conídios ml^{-1} quando usado Esalq 818 e de $7,5 \times 10^6$ conídios ml^{-1} quando usado LPP 133, ambos fungos formulados em TW e aplicado por pulverização. A menor quantidade de conídios sobre os cadáveres de *Ae. aegypti* ocorreu com o isolado LPP 45 formulado em TW e aplicado por pulverização ($1,2 \times 10^6$ conídios ml^{-1}). Uma taxa similar de esporulação foi observada por Luz et al., (1998) usando o fungo *B. bassiana* para infecção de diversas espécies de triatomíneos. As maiores quantidades de conídios foram $8,30 \times 10^7$ conídios ml^{-1} e de $1,77 \times 10^7$ conídios ml^{-1} sobre os cadáveres de *Tiatoma williami* e *Rhodnius prolixus*, respectivamente. Avaliou-se ainda que o isolado CG 306 (*B. bassiana*) foi virulento para várias espécies de triatomíneos, vetores da doença de chagas.

A infecção secundária através da disseminação dos conídios oriundos dos corpos dos mosquitos mortos para outros insetos, poderia ser importante para a redução populacional dos vetores, após a aplicação inicial dos fungos. A

importância de infecção secundária já foi demonstrada no programa de controle de gafanhotos na África (Thomas et al., 1996).

Os fungos entomopatogênicos mostraram-se eficazes no controle de mosquitos vetores de doenças humanas. Até hoje não foi evidenciado nenhum inseto resistente ao fungo (Alves, 1998). Apesar do *Ae. aegypti* infectado levar de 2 a 3 dias para morrer é possível que durante o processo de infecção o mosquito pare de se alimentar de sangue e pare de transmitir o vírus da dengue, o que, conseqüentemente, diminuirá o número de indivíduos acometidos pela doença.

7. CONCLUSÕES

- Os 4 isolados testados foram virulentos contra o mosquito *Ae. Aegypti*;
- A formulação TW+OL causou maior porcentagem de mosquitos mortos do que a formulação TW;
 - As duas formas de aplicações, contato e pulverização foram eficientes causando altas taxas de mortalidade do mosquito;
 - O isolado LPP 133 foi considerado o mais promissor contra estes insetos, por ser muito virulento e de fácil produção *in vitro*. E por isso este isolado foi selecionado para os demais estudos;
 - Pouco tempo de exposição do mosquito ao fungo, aproximadamente 3 horas, foi o suficiente para provocar 50% de mortalidade do mosquito;
 - Os dois tecidos impregnados com o fungo LPP 133 foram testados para que no futuro seja desenvolvida armadilha de “não” captura de *Ae. Aegypti* ;
 - Apesar do *Ae. aegypti* infectado levar de 2 a 3 dias para morrer é possível que durante o processo de infecção o mosquito pare de se alimentar de sangue e pare de transmitir o vírus da dengue, o que, conseqüentemente, diminuirá o número de indivíduos acometidos pela doença.

Assim foi constatado o potencial patogênico e virulento dos fungos contra o adulto do mosquito *Ae. aegypti* como uma possível base para o desenvolvimento de um programa de controle de *Ae. aegypti* visando à redução na incidência de Dengue no Brasil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, W. S. (1925) *A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal Entomology* 18: 265-267.

Alves, S. B. (1998) *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba. 1163p.

Alves, S. B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R. M. Vieira, S. A. (2002) Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *Journal Entomology* 126: 504-509.

Batta, Y. A. (2003) Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphmycetes). *Crop Protection* 22: 415-422.

Becker, N. (2000) Bacterial control of vector mosquitoes and black flies. In: Charles J.F., Delécluse A., Leroux C.N., *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers*. 383-398.

- 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.
- Brooke, B.D., Kloke, G., Hunt, R.H., Koekemoer, L.L., Temu, E.A., Taylor, M.E., Small, G., Hemingway, J. & Coetzee, M. (2001) Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 91: 265-272.
- Butt, T. M., Barrisever, M., Drummond, J., Schuler, T.H., Tillemans, F.T., Wilding, N. (1992). Patogenicity of the entomopatogenous hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae* against the chrysomelid beetles *Psylliodes chyocephala* and *Phaedon cochleariae*. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 327-334.
- Chapman, H. C. (1974) Biological control of mosquito larvae. *Annual Review of Entomology*. 19: 33–59.
- 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. *Revista Brasileira de Entomologia*. 30: 79-85.
- Consoli, R. A. G. B., Oliveira R. L. (1998) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Reimpressão. 225p.

- Costa, G. L., Moraes, A. M. L., Oliveira, P. C. (1998) Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases. *Journal of Microbiology*, 38: 337-341.
- Costa, G. L., Moraes, A. M. L., Galvão, C. (2003) Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. *Journal Basic Microbiology*, 43 (1): 3-7.
- Cruz, C. R. (2006) Comitê Infectologia Sociedade Paranaense de Pediatria. Publicado no(a): <http://www.spp.org.br/dengue.asp>. Acessado: 24/1/2006.
- Delécluse, A., Pérez V., Berry, C. (2000) Vector active toxins: structure and diversity. In: Charles, J.F., Delecluse, A., Leroux, C.N. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. *Kluwer Academic Publishers*. 101-126.
- Daoust, R. A., Roberts, D. W. (1982) Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 107-117.
- Ferron, P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23: 409-442.
- Ffrench-Constant, R. H. (2005) Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control. *Ecology and Evolution* 20: 577-579.
- Fundação Nacional de Saúde (2001) Dengue Instruções de Combate ao Vetor- Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Giannini, M. L. (2001) *Dengue hemorrágica*. 2^o ed. Editora Santos. 84p.
- Glare, T. R., O'Callaghan, M. (2000) *Bacillus thuringiensis biology, ecology and safety* Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350p.

Goettel, M. S., Johnson, D. L., Inglis, G. D. (1995) The role of fungi in the control of grasshoppers. *Canadian Journal of Botany*, 73: 71-75.

Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica (1998) 5 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.

Hagedorn, H. H., O'Connort, J. O., Fuchsf, M. S. Becky, S., Schlaegers, D. A. Bohm, M. K. (1975) The ovary as a source of α -ecdysone in an adult mosquito. *Science*. 72: (8) 3255-3259.

Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro (2006) www.ivdrj.ufrj.br Histórico. Acessado: 03/04/2006.

Junior, C. D. G., Costa, M. A. F., Milan, M. (2004) Desempenho do pulverizador pneumático costal motorizado sob diferentes condições. Jaboticabal. *Engenharia Agrícola*, 24: 712-719.

Kaur, J. S., Lai, Y. L., Giger, A. D. (2003) Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 457-460.

Khachatourians, G. G., (1992) Virulence of five *Beauveria* strains, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii* against the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal Invertebrate Pathology*, 59: 212-214.

Kroeger, A., Horstick, O., Riedl, C., Kaiser, A., Becker, N. (1995) The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in Peru and Ecuador. *Acta Tropical*, 60: 47-57.

Leathers, T. D.; Subhash, C. G. & Alexander, N. J. (1993) Mycopesticides: status, challengers and potencial. *Journal of Microbiology*, 12: 69-75.

- Lima, M. M., Amaral, R. S., Aragão, M. B. (1989) Estudo comparativo da eficácia de armadilhas para *Aedes aegypti*. *Caderno de Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 5: 143 –150.
- Luz, C., Silvia, I. G., Magalhães, B. P., Cordeiro, C. M. T., Tigano, M. S. (1999) Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidar: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary Assays on Formulation and Application in the Field. *Anais Sociedade de Entomologia Brasileira* 28: 101 – 110.
- Luz, C., Silvia, I. G., cordeira, C. M. T., Tigano, M. S. (1998) *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for the biological control of Chagas disease vectors. *Entomological Society of America* 35: 977-979.
- Mabaso, M. L., Sharp, B., Lingeler, C. (2004) *Tropical Medicine Health*. 846p.
- Messias, C. L., (1989) Fungos: sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. *Instituto Oswaldo Cruz*, 84: 57-59.
- Ministério da Saúde – Funasa (2002) *Programa Nacional de Controle da Dengue*. 32p.
- Ministério da Saúde – Funasa (2006) *Programa nacional de controle da dengue*. 38p.
- Monitoramento inteligente do mosquito da dengue (2006) www.midenque.com.br
Acessado 12/03/2006.
- Motulsky, H. (1995) Comparing survival curves. In: Motulsky, H. (Ed.) *Intuitive biostatistics*. New York Oxford University Press, pp. 272 – 276.
- Moraes, A. G. M. L., Costa G. L., Barcelos M. Z. C., Oliveira R. L., Oliveira P. C. (2001) The entomopathogenic potential of *Aspergillus* ssp. In mosquitoes vectors of tropical diseases *Journal of Basic Microbiology*, 1: 45-49.

- Neto, A L. R., Oliveira, C. M. (1985) Controle biológico de culicídeos e simúlídeos inseticidas bacterianos. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 37: 67-75.
- Polanczyk, R. A., Garcia, M. O., Alvez, S. B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*. 6: 813-816.
- Prior, C., Jollands, P., Le Patourel, G. (1988) Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae) *Journal of Invertebrate Pathology* 52:66-72.
- Reithinger, R., Davies, C. R., Cadena, H., Alexander, B. (1997) Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against Phebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70:131-135.
- Riba, G., Keita, A., Soares, G. G. Jr. and Ferron, P., (1986) Comparative studies for *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. *Journal of Mosquito Control*, 2: 469-473.
- Ritchie, S. A., Long, S., Smith, G., Pyke, A., Kmox, T. B. (2004) Entomological Investigation in a Focus of Dengue Transmission in Cairn, Queensland, Australia, by using the Stichey ovitraps. *Entomological Society of America*. 41: 1-4.
- Rodrigues P. M. M. (2006) Escola de Saúde Pública do Ceará <http://www.esp.ce.gov.br/espce/paginas/saude/dengue/index.asp> Acessado: 19/05/2006
- Scholte, E., Knols, B. G., Takken, W. (2004) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the Malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal* 3: 1-6.

- Scholte, E., Ng`habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G. F., Knols, B. G. J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308: 1641– 642.
- Strieder, M. N. (2005) Controle eficiente dos borrachudos. *Ciência Hoje*. 36: 70–71.
- Sokal, R. (1958) Probit analysis. *Journal of Entomology*. 51: 738 -739.
- Thomas MB, Gbongboui C e Lomer CJ (1996) Between-season survival of the grasshopper pathogen *Metarhizium flavoviride* in the Sahel. *Biocontrol Science and Technology* 6, 569-573
- Veronesi, R. (1996) Doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Guanabara Koogan. 1082p.
- Vianna, M. S. R. (2001) A transmissão urbana da febre amarela e dengue. *Saúde Rio*. Rio de Janeiro. 5p.
- Vilarinhos, P. T. R., Dias, J. M. C. S., Andrade, C. F. S., Araújo-Coutinho, C. J. P. C. (1998) Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlideos. In: Alves, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 447p.
- WHO. (1984) *Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of vectors*. 33p.
- WHO. (1990) *Control of Leishmaniosis*. 793p.