

**ENCAPSULAMENTO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae*
(Metschnikoff) Sorokin FORMULADO COM ÓLEO DE NIM
VISANDO O CONTROLE LARVAL DE *Aedes aegypti* (Linnaeus,
1762)**

MARIANA BORGES CERQUEIRA CYPRIANO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2015**

**ENCAPSULAMENTO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae*
(Metschnikoff) Sorokin FORMULADO COM ÓLEO DE NIM
VISANDO O CONTROLE LARVAL DE *Aedes aegypti* (Linnaeus,
1762)**

MARIANA BORGES CERQUEIRA CYPRIANO

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

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 169/2015

Cypriano, Mariana Borges Cerqueira

Encapsulamento de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin formulado com óleo de Nim visando o controle larval de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) / Mariana Borges Cerqueira Cypriano. – 2015.

70 f. : il.

Orientador: Richard Ian Samuels.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 60 – 70.

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

CDD– 632.9

**ENCAPSULAMENTO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae*
(Metschnikoff) Sorokin FORMULADO COM ÓLEO DE NIM
VISANDO O CONTROLE LARVAL DE *Aedes aegypti* (Linnaeus,
1762)**

MARIANA BORGES CERQUEIRA CYPRIANO

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

Aprovada em 26 de Maio de 2015.

Comissão Examinadora

Adão Valmir dos Santos (D.Sc., Produção vegetal) - UENF

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

Prof^a. Laerciana Pereira Vieira (D.Sc., Produção vegetal) - IFFES

Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc., Produção vegetal) - UENF
Coorientadora

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

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia pela oportunidade de realização deste curso;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Richard Ian Samuels pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança;

Ao professor Francisco José Alves Lemos pelos mosquitos cedidos;

Aos professores, a Rita do LEF, a Patrícia e a Fátima da secretaria da PGPV por toda ajuda e paciência;

A Denise, pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio e pelas palavras de carinho em momentos difíceis;

A Cátia e Aline, a quem devo meus primeiros passos no laboratório. Obrigada pelos sorrisos, pelo conhecimento e experiências compartilhados e, acima de tudo, a cumplicidade;

A Arli, Thalles e Verônica, pelo carinho, pelo apoio, pela experiência e pelos bons momentos compartilhados em laboratório;

Aos meus pais, pelo amor incondicional, respeito e por sempre acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditava;

A Thaís e Marcos Alberto, por dividirem a casa e a vida comigo, pelos sorrisos sinceros e abraços roubados;

A Carolina Torres, minha irmã de coração e alma, pela presença constante e amizade incondicional;

Ao amigo Charlles Panisset, por sempre ser o que eu mais precisava;

Às amigas, Adélia, Camila, Gilmara e Isabela, por terem feito felicidade virar rotina.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Histórico de dengue nas Américas e no Brasil	4
2.2 <i>Aedes aegypti</i> : Aspectos da bioecologia do vetor	6
2.3 Controle do <i>Aedes aegypti</i>	8
2.3.1 Controle Químico	9
2.3.2 Controle Biológico	10
2.3.2.1 Bactérias entomopatogênicas	10
2.3.2.2 Fungos entomopatogênicos	11
2.4 Óleo de Nim: Caracterização e utilização no controle de insetos	14
2.5 Microencapsulamento de agentes biológicos	15
3. OBJETIVO.....	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Criação das larvas	19
4.2 Cultivo do fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>	20
4.3 Separação dos conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	20
4.4 Preparação das cápsulas	21
4.5 Exposição das larvas ao fungo encapsulado com Nim	23
4.6 Testes de persistência	24
4.7 Ensaio experimental no semicampo	24
4.8 Análise dos resultados	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Avaliação do efeito de diferentes concentrações de óleo vegetal de Nim encapsulado sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i>	1 25
5.2 Avaliação da sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao fungo encapsulado	1 26

5.3 Avaliação do efeito da combinação de fungo encapsulado com óleo de Nim sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i>	0 27
5.3.1 Fungo encapsulado com Nim a 1%	27
5.3.2 Fungo encapsulado com Nim a 5%	29
5.3.3 Fungo encapsulado com Nim a 10%	30
5.4 Avaliação da persistência do fungo encapsulado com diferentes concentrações de Nim nos períodos de 3, 5, 7 e 10 dias sobre a sobrevivência das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	1 31
5.4.1 Fungo encapsulado com Nim a 1%	31
5.4.2 Fungo encapsulado com Nim a 5%	34
5.4.3 Fungo encapsulado com Nim a 10%	37
5.5 Avaliação de sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao Fungo encapsulado com óleo de Nim a 10% em condições de semicampo	1 1 40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

Cypriano, M. B. C. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio de 2015. ENCAPSULAMENTO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin FORMULADO EM ÓLEO DE NIM VISANDO O CONTROLE LARVAL DE *Aedes aegypti*(Linnaeus, 1762). Orientador: Richard Ian Samuels.

Bioinseticidas são considerados potenciais candidatos para utilização no controle integrado de vetores. A combinação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* junto com óleo de Nim (extraído da planta *Azadirachta indica*) mostrou que a interação entre eles foi altamente eficaz no controle de larvas de *Aedes aegypti*. O objetivo deste trabalho foi o encapsulamento de conídios de *M. anisopliae* junto com óleo de Nim a fim de facilitar seu armazenamento, manipulação e aplicabilidade, aumentando assim sua vida útil e permitindo sua utilização em larga escala. Cápsulas à base de alginato de sódio e ágar foram produzidas contendo conídios de *M. anisopliae* na concentração de $2,5 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ e óleo de Nim em diferentes concentrações. Larvas de *A. aegypti* foram expostas às cápsulas em condições de laboratório e semicampo a fim de se avaliar a sobrevivência. Foi avaliada também a persistência do material encapsulado durante os períodos de três, cinco, sete e 10 dias (T3, T5, T7 e T10) sobre a sobrevivência larval. Após sete dias de avaliação, os tratamentos com cápsulas contendo fungo + Nim a 1%, 5% e 10% apresentaram 71.9%, 48.33% e 0% de sobrevivência, respectivamente. Durante os períodos de persistência constatou-se que as taxas de sobrevivência mantiveram-se iguais (83,33%) durante T3 e T5 para tratamentos com fungo + Nim a 1%. Para os tratamentos

com fungo encapsulado com Nim a 5%, a média de sobrevivência foi de 70% durante T3, e cerca de 88% durante T5, T7 e T10. Para os tratamentos com cápsulas contendo fungo + Nim a 10%, a resposta aos tratamentos ainda foi significativa após os períodos de três e cinco dias, apresentando 27.5% e 36.37% de sobrevivência, respectivamente. Em condições de semicampo, larvas foram expostas a cápsulas com fungo + Nim a 10%, apresentando 8.33% de sobrevivência após sete dias de avaliação. A alta mortalidade de larvas expostas ao fungo encapsulado com óleo de Nim a 10% demonstra que o encapsulamento destes bioinseticidas pode vir a ser uma metodologia utilizada no combate de vetores.

ABSTRACT

CYPRIANO, M. B. C. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. May, 2011. ENCAPSULATION OF *Metarhizium anisopliae* conidia (Metschnikoff) Sorokin FORMULATED IN NIM OIL with the aim of controlling *Aedes aegypti*(Linnaeus, 1762) larvae. Advisor: Prof. Richard Ian Samuels.

Biopesticides are considered potential candidates for use in integrated vector management. The preparation of *Metarhizium anisopliae* with neem oil (extracted from the plant *Azadirachta indica*) showed that the interaction between the two agents was highly effective in controlling *Aedes aegypti*. The objective of present study was the encapsulation of *M. anisopliae* conidia with neem oil, in order to facilitate storage, handling and applicability, thus increasing its shelf life and allowing its use on a large scale. Capsules containing sodium alginate and agar were produced with *M. anisopliae* conidia at a concentration of 2.5×10^8 conidia ml⁻¹ and neem oil at different concentrations. *A. aegypti* larvae were exposed to capsules in the laboratory and semi-field conditions in order to assess survival. Conidial persistence was also assessed for encapsulated material during the periods of three, five, seven and 10 days (T3, T5, T7 and T10) as measured by larval survival. After seven days of evaluation, treatment with capsules containing fungus and neem 1%, 5% and 10% presented 71.9%, 48.33% and 0% survival respectively. During the different periods evaluated for persistence, was found that survival rates remained the same (83.33%) during T3 and T5 to treatments with the fungus and neem 1%. For the treatments with the fungus encapsulated with 5% neem, median survival was 70% for T3, and approximately 88% for T5, T7 and T10. For treatments with capsules containing fungus and 10% neem, the response

to treatment was still significant after three and five days, with 27.5% and 36.37% survival respectively. Under semi-field conditions, larvae were exposed to capsules with fungal and 10% neem and presenting 8.33% survival after seven days of assessment. The high mortality of larvae exposed to the fungus encapsulated with 10% neem oil shows that the encapsulation of these two agents could be a new vector combat methodology.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa transmitida através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes*, tendo sido considerada uma das mais importantes doenças epidêmicas registradas em países em desenvolvimento, sendo causadora de grande impacto econômico, social e de saúde pública para as comunidades onde ocorre (Gubler, 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência global da dengue cresceu exponencialmente nas últimas décadas, sugerindo que ocorram de 50 a 100 milhões de casos anuais da doença (WHO, 2015).

O inseto vetor do vírus da dengue no Brasil é o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (1762), espécie hematófaga, predominantemente doméstica e antropofílica, cuja oviposição ocorre geralmente em paredes internas de recipientes como caixas d'água, tonéis, pneus e vasos de plantas. Tal diversidade e disponibilidade de criadouros encontradas no peri- e intradomicílio, locais considerados importantes do ponto de vista epidemiológico, garantem a manutenção de altas densidades de *A. aegypti* no meio urbano, potencializando os riscos de transmissão da doença (Forattini, 1962; Consoli & Oliveira, 1994).

Caracterizada como uma doença infecciosa aguda, a dengue é causada por vírus (DENV), de genoma RNA, pertencente à família Flaviviridae e ao gênero

Flavivirus. Os sorotipos conhecidos são denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler, 1998; Halstead, 2008), presentes em vários países tropicais e subtropicais (Figura 1), e o mais recente sorotipo descrito, o DENV-5, isolado em regiões da Malásia (Mustafa *et al.*, 2015).

A ausência de uma vacina eficaz contra o vírus, a intensa movimentação das populações humanas e a adaptação do vetor às atuais condições dos centros urbanos, são consideradas os elementos responsáveis pela velocidade de propagação da doença, sendo consenso que a alternativa mais viável para prevenir a doença é o controle do seu principal vetor (Gubler & Clark, 1995).



Figura 1. Mapa da área de distribuição de dengue e de *Aedes aegypti* no mundo. As linhas azuis definem os limites da área tropical e subtropical. Fonte: OMS 2015.

As estratégias utilizadas atualmente no controle do mosquito baseiam-se em atividades preventivas, como a eliminação de criadouros, adoção de medidas comunitárias de conscientização e, principalmente, aplicação estratégica ou emergencial de inseticidas químicos. Pensando em maiores possibilidades, tem-se desenvolvido métodos de controle biológico, alternativa considerada promissora e necessária no combate à doença (Kogler *et al.*, 2001).

Dentre os métodos de controle biológico desenvolvidos e aplicados atualmente, a utilização de fungos filamentosos tem apresentado vantagem em relação a outros métodos devido, principalmente, à presença de um mecanismo especializado de penetração ativa que garante ao fungo a infecção do hospedeiro

sem a necessidade de sua ingestão para o início do processo infeccioso (Kogler *et al.*, 2001). Como destaque apresenta-se o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, cuja patogenicidade já foi comprovada contra *Aedes aegypti* (Luz *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2008; Albernaz *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Carolino *et al.*, 2014), contra o vetor da filariose humana, *Culex quinquefasciatus* (Alves *et al.*, 2002; Mohanty *et al.*, 2008) e também contra as espécies transmissoras de malária *Anopheles gambiae*, *A. funestus* e *A. stephensi* (Farenhorst *et al.*, 2008; Mohanty *et al.*, 2008; Mnyone *et al.*, 2009; Bukhari *et al.*, 2010).

Apesar de considerados potenciais candidatos para a utilização no manejo integrado de vetores, metodologias de administração e aplicação de fungos entomopatogênicos precisam ser investigadas. Gomes (2012) avaliou o efeito da combinação de doses subletais de óleo de Nim e *M. anisopliae* sobre a sobrevivência de larvas de *A. aegypti*, sendo constatado que um efeito sinérgico entre tais agentes de controle biológico os torna promissores para o desenvolvimento de uma nova estratégia de controle do vetor.

Nesse sentido, na busca pelo desenvolvimento de uma metodologia para sua aplicação, propõe-se neste trabalho o encapsulamento dos conídios de *M. anisopliae* junto com óleo de Nim, a fim de facilitar seu armazenamento, manipulação e aplicabilidade, aumentando assim sua vida útil e permitindo sua utilização em larga escala.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico de dengue nas Américas e no Brasil

A circulação do vírus da dengue nas Américas tem sido reportada desde o século XIX até meados do século XX quando o *A. aegypti* foi considerado erradicado em grande parte de América Central e do Sul por meio do programa coordenado pela organização Pan-americana de Saúde (Consoli & Oliveira, 1994). Entretanto, devido à falta de manutenção das medidas de combate e negligência dos países que erradicaram o vetor, foi detectada em 1963 a reemergência dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 vinculada à ocorrência de inúmeras epidemias de dengue clássica. Durante esta década, apenas quatro países anunciaram a ocorrência de casos da doença, aumentando para nove o número de países no ano de 1979. A partir de então a reincidência de dengue tornou-se inevitável, com 25 países apresentando circulação viral em 1980, alcançando 69 nações americanas em 2002, na considerada maior pandemia do continente. A dengue encontra-se amplamente disseminada, estando estabelecida desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, apesar de ocorrer com maior intensidade entre os paralelos 35° N e 35° S (Barreto & Teixeira, 2008; WHO, 2009).

No Brasil, casos com sintomas semelhantes à dengue são notificados desde o século XIX, com relatos de epidemias em São Paulo e Rio de Janeiro entre 1846 e 1853, embora as primeiras referências na literatura sejam de 1916, na cidade de São Paulo e em Niterói no ano de 1923 (Barreto & Teixeira, 2008).

Décadas se passaram até que novos registros de dengue ocorreram no país. A primeira evidência de circulação de dengue no Brasil ocorreu durante os anos de 1981 e 1982 em Boa Vista, Roraima, onde foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, com notificação de cerca de 11 mil casos da doença (Osanai *et al.*, 1983). Apesar da aplicação de medidas de controle e prevenção contra o *A. aegypti* em Roraima, quatro anos mais tarde, o estado do Rio de Janeiro registrou sua primeira epidemia causada pelo vírus DENV-1 (Schatzmayr *et al.*, 1986). A partir desse episódio, a doença propagou-se para outras regiões do país, sendo considerado um sério problema de saúde pública e de extrema relevância para as autoridades no âmbito nacional (Nogueira *et al.*, 1999).

A reemergência do sorotipo DENV-1 no Rio de Janeiro no ano de 1986 deu início à reinfestação no estado e no país, com subsequente introdução de novos sorotipos, ocorrendo em 1990 a entrada do sorotipo DENV-2 (Nogueira *et al.*, 1990) e DENV-3 em dezembro de 2000 (Nogueira *et al.*, 2001), em Nova Iguaçu, no Rio de Janeiro e, posteriormente, a reemergência do DENV-4 em Roraima (Nota Técnica, 2010) e sua introdução, em 2011, na cidade de Niterói, Rio de Janeiro (Nogueira & Eppinghaus, 2011).

Atualmente, os quatro sorotipos circulam no Rio de Janeiro, reforçando este como o estado mais suscetível à introdução e disseminação de novos sorotipos de dengue no país. Foi observado que as principais epidemias foram antecedidas pela introdução de um novo sorotipo viral ou pela reintrodução de um sorotipo após um determinado período sem ser detectado (Honório *et al.*, 2009; Boletim epidemiológico, 2015).

Em 2014 foram registrados 591.080 casos prováveis de dengue no país, apresentando 60% de redução quando comparado ao ano de 2013, com 1.452.489 casos prováveis da doença. Nestes dois últimos anos a região sudeste apresentou o maior número de casos em relação ao total do país, sendo responsável por 63,2% e 52,8% das notificações nos anos de 2013 e 2014, respectivamente (Boletim Epidemiológico, 2015).

2.2 *Aedes aegypti*: Aspectos da bioecologia do vetor

Mosquitos são insetos pertencentes à ordem Diptera e à família Culicidae, sendo encontrados, principalmente, em zonas tropicais e subtropicais do globo, regiões onde as condições ambientais propiciam seu desenvolvimento ideal. Os culicídeos possuem grande importância médica principalmente por poderem atuar como vetores de agentes causadores de doenças a humanos, como os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Forattini, 1962; Clements, 1999; Eldridge & Edman, 2000).

O mosquito *A. aegypti* teve sua origem na África, sendo, atualmente, encontrado em locais onde a atividade antrópica é intensa, o que favorece a sua propagação. Durante seu processo de seleção adaptativa para sobrevivência, desenvolveu um comportamento sinantrópico e antropofílico, sendo reconhecido entre os culicídeos como a espécie mais associada ao homem (Natal, 2002). Recipientes artificiais, encontrados tão facilmente nos atuais centros urbanos, são seus criadouros preferenciais, tornando-os essenciais para a produção e manutenção de grandes populações. *A. aegypti* possui um curto ciclo de vida com espaço de tempo entre 15 a 30 dias em regiões tropicais (Fernandes *et al.*, 2006), compreendendo as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 2).

As fêmeas desta espécie apresentam elevado grau de antropofilia, alimentando-se preferencialmente do homem, sendo os períodos matutino e vespertino os de maior atividade hematofágica (Consoli & Oliveira, 1994). Após a alimentação sanguínea, que ocorre entre 48 e 72 horas, as fêmeas buscam locais ou recipientes com água acumulada, frequentemente pobre em matéria orgânica, onde depositam seus ovos, isoladamente, nas paredes internas, próximos à lâmina d'água (Clements, 1999). Após um período embrionário de aproximadamente três dias, as larvas emergem dando início ao desenvolvimento das formas imaturas. Porém, em condições ambientais adversas, principalmente relacionadas à ausência de água, os ovos podem entrar em quiescência, período de interrupção do processo final de maturação embrionária promovida pela redução da umidade relativa do microambiente, e permanecer viáveis no ambiente por mais de um ano (Sota & Mogi, 1992a; Sota & Mogi, 1992b; Silva &

Silva, 1999). A quiescência é considerada de grande importância por representar a principal forma de permanência e dispersão passiva desta espécie no ambiente. (Briegel, 1990; Canyon *et al.*, 1999).

Ao aumentar o nível de água no interior dos criadouros, após uma chuva por exemplo, atingindo os ovos, surge a primeira das quatro fases larvais. As larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se e podem ser reconhecidas por seus movimentos sinuosos ao nadar, por evitarem a luz e por apresentarem o sifão, utilizado para respiração na superfície da água (Martínez, 2008). O desenvolvimento larval dura, normalmente, de cinco a sete dias. Dados experimentais indicam que temperaturas específicas limitam esse crescimento, estando os limites entre 8 e 41°C. A temperatura ótima para o desenvolvimento varia para cada espécie, encontrando-se entre 24°C e 28°C para a maioria dos mosquitos tropicais (Consoli & Oliveira, 1994).

As larvas alimentam-se de algas, bactérias, esporos de fungos ou quaisquer outras partículas de matéria orgânica que constituam o microplâncton de seus habitats (Christopher, 1960; Consoli & Oliveira, 1994). A ingestão não seletiva de partículas facilita a utilização de larvicidas com sítio de ação no intestino, para seu controle (Forattini, 1962). A filtração constitui a forma mais comum de alimentação, podendo o movimento das escovas orais fazer com que a água flua em direção à cabeça, trazendo as partículas de alimento (Christopher, 1960).



Figura 2. Fases do ciclo de desenvolvimento de *Aedes aegypti*. (A) Ovos; (B) Larvas e pupas; (C) Adulto.

O período larval termina quando o último estágio alcança a fase de pupa, que deixa de se alimentar, passando-se mais dois ou três dias para o desenvolvimento do adulto (Clements, 1992).

O acasalamento ocorre poucas horas após emergirem como adultos. As fêmeas, uma vez inseminadas, ovipõem, desde que estejam previamente alimentadas com sangue. Embora o potencial reprodutivo das fêmeas de *A. aegypti* seja influenciado pela nutrição larval, seu pleno aproveitamento depende das condições nutricionais durante a vida adulta (Clements, 1992). Assim, as fêmeas necessitam realizar um repasto sanguíneo para completar a maturação dos ovos. A hematofagia, portanto, determina o nível de fecundidade e sua frequência é um dos principais fatores para se estimar a capacidade vetorial e, conseqüentemente, a circulação do vírus (Canyon *et al.*, 1999).

2.3 Controle de *Aedes aegypti*

O controle populacional de vetores é uma ferramenta efetiva para interromper o ciclo de transmissão de doenças. Porém, devido a certas características biológicas peculiares dos culicídeos, como elevada taxa reprodutiva, curto ciclo biológico e capacidade elevada de colonizar habitats temporários, sua redução populacional torna-se um desafio para os programas de controle de doenças como a dengue (Barreto & Teixeira, 2008).

Desde a descoberta e aplicação de inseticidas sintéticos de ação residual na década de 40, foi possível controlar algumas doenças transmitidas por vetores e o diclorodifeniltricloroetano (DDT), da classe dos organoclorados, foi o primeiro inseticida a ser amplamente utilizado nesse sentido. As restrições desses químicos, como o mecanismo de ação inespecífico, a ação em organismos não-alvo, além da seleção de populações de insetos resistentes (Hemingway & Ranson, 2000), promoveram a busca por métodos mais seletivos de controle. O controle biológico tende a ser uma alternativa, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e à baixa incidência do desenvolvimento de resistência, e baseia-se na utilização de organismos vivos ou de suas toxinas para reduzir a densidade populacional dos insetos. Dentre estes organismos,

destacam-se as bactérias entomopatógenas, importantes agentes de controle biológico e amplamente utilizadas em programas de controle de vetores (Regis *et al.*, 2001) e fungos filamentosos, micro-organismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico (Kogler *et al.*, 2001).

Alternativa também considerada importante para o controle de insetos é a utilização de produtos naturais, principalmente por serem biodegradáveis. Algumas espécies vegetais têm demonstrado potencial no controle de insetos praga e vetores, destacando-se o óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), cujas propriedades inseticidas foram observadas sob uma gama de espécies de insetos incluindo vetores de doenças (Schmutterer, 2002; Isman, 2006).

2.3.1 Controle Químico

A utilização de substâncias químicas, de origem orgânica e inorgânica, para o controle de mosquitos e outros insetos, vem sendo adotada de forma intensa ao longo dos séculos (Forattini, 1962), e é uma das metodologias mais empregadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (Rose, 2001). Um dos maiores avanços no controle de insetos ocorridos no século XX foi o desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por longos períodos. O primeiro deles foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT), químico com propriedade residual, considerado um fator de grande importância para as autoridades de saúde, alcançando sucesso no controle de doenças transmitidas por insetos vetores. Entretanto, seu uso contínuo e indiscriminado levou ao primeiro caso de resistência em 1946, observado em moscas na Itália e Suécia (Aragão, 1972). Em mosquitos, o aparecimento de resistência é datado em período semelhante, sendo o primeiro caso observado em *Culex pipens* (Ranson *et al.*, 2001; Wondji *et al.*, 2008).

No Brasil, os anos 90 foram marcados por um aumento considerável na incidência de dengue, consequência da dispersão do *A. aegypti* por todo o território nacional, tornando ainda mais evidente a necessidade de melhorias na vigilância e no combate ao vetor. Entre os anos de 1997 e 1998, teve início a utilização do organofosforado Temefós, recomendado pela OMS para uso em água potável, para o controle químico de formas imaturas do *A. aegypti*, sendo o principal larvicida utilizado para o controle desse vetor nas últimas décadas

(Braga & Valle, 2007). No entanto, menos de dois anos após o início de sua utilização, casos de resistência ao químico e diminuição de persistência foram reportados (Horta *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Prophiro *et al.*, 2011), chegando a ser recomendada a interrupção de seu uso por especialistas em 2012 e tendo seu uso restrito em 2013 (Ministério da Saúde, 2015).

Considerados inseticidas alternativos, os reguladores de crescimento, atuantes no desenvolvimento e na reprodução dos insetos, começaram a ser utilizados no controle larvário de dengue no ano de 2012 (Ministério da Saúde, 2015). Entre estes, o mais utilizado foi o Diflubenzuron, sendo observado por Borges *et al.* (2004) mudanças no corpo gorduroso das larvas e inibição da formação de uma nova cutícula durante o processo de muda e redução significativa nas taxas de sobrevivência das larvas tratadas ao utilizar 0,1 e 1ppm, mostrando-se, deste modo, altamente eficaz em baixas concentrações.

Os inseticidas químicos continuam sendo uma importante ferramenta dos programas integrados de controle. Porém, seu uso contínuo, vem gerando o aparecimento de populações resistentes, tendo sido detectada resistência para todas as classes de inseticidas (Brogdon & McAllister, 1998). Mediante tais circunstâncias, tem-se intensificado a busca pelo desenvolvimento de métodos alternativos de controle de insetos vetores (Scholte *et al.*, 2004; Paula *et al.*, 2011, Paula *et al.*, 2013; Carolino *et al.*, 2014).

2.3.2 Controle Biológico

O controle biológico pode ser definido como qualquer medida que envolva a utilização de inimigos naturais (parasitoides, patógenos ou predadores) visando reduzir ou suprimir a população de um inseto praga ou vetor (Lenteren & Godfray, 2004).

2.3.2.1 Bactérias entomopatogênicas

Atualmente, inúmeras espécies de bactérias associadas a insetos são conhecidas, com algumas destas apresentando características potencialmente aplicáveis ao controle microbiano de insetos, como alta virulência, elevada

capacidade invasora e produção de toxinas causadoras de toxemias nos insetos alvo. Com tais características, na categoria de bactérias esporulantes, destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* como os de maior importância (Costa *et al.*, 2009).

O gênero *Bacillus* apresenta grande relevância no controle biológico de pragas, destacando-se o *Bacillus sphaericus* (Bs) e o *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti)(Priest, 1992, 2000; Rabinovitch, 2000; Brighenti *et al.*, 2005; Capalbo *et al.*, 2005). Bti e Bs são bactérias entomopatogênicas cujos esporos apresentam cristais, que ao serem ingeridos pelas larvas de culicídeos são dissolvidos no intestino alcalino do inseto. Proteases digestivas do inseto clivam as pró-toxinas presentes nos cristais e ativam seu componente inseticida, agindo sobre o epitélio intestinal das formas imaturas do vetor, promovendo a interrupção da alimentação e a morte da larva (Gill *et al.*, 1992). Bti é um dos larvicidas recomendados pela OMS para uso em água potável a fim de controlar larvas do *A. aegypti* (Chavasse & Yap, 1997), sendo, portanto, um dos substitutos para o Temefós.

Desde a sua descoberta, Bti tornou-se o principal larvicida biológico utilizado no controle de formas imaturas de mosquito (Priest *et al.*, 2000). Teve seu emprego iniciado no Brasil entre os anos 2000-2001, quando a Fundação Nacional de Saúde (Funasa) optou por implantar o uso desta bactéria no controle de *A. aegypti* (Braga & Valle, 2007).

2.3.2.2 Fungos entomopatogênicos

Doenças causadas por fungos são comuns e altamente difundidas entre os insetos (Scholte *et al.*, 2004). Extensa pesquisa tem sido realizada sobre espécies de fungos Deuteromicetos como *Culicinomyces* spp, *Beauveria* spp, *Metarhizium* spp e *Tolypocladium* spp, para aplicação no controle biológico de pragas agrícolas (Shah & Pell, 2003), e, apesar de demonstrarem ter impacto limitado sobre populações de mosquito em situações de campo, há crescente evidência sobre o potencial de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de vetores (Scholte *et al.*, 2003; Farenhorst *et al.*, 2009).

M. anisopliae e *B. bassiana* são fungos entomopatogênicos cujos conídios podem infectar os insetos através da penetração da cutícula, sem necessidade de ingestão, levando-os à morte em poucos dias (Roy *et al.*, 2006). São espécies consideradas endêmicas em todo mundo e não prejudiciais a aves, peixes ou mamíferos, tendo sido comprovado por testes de toxicidade não haver riscos para seres humanos (Zimmermann, 1993). Seu mecanismo especializado de infecção, através de penetração ativa, confere a estes fungos vantagem em relação a outros métodos de controle biológico baseados em bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, visto que o contato direto dos conídios com a cutícula do hospedeiro já permite o início do processo de infecção, podendo, deste modo, afetar todos os estágios de desenvolvimento do inseto, desde o ovo até o adulto (Alves, 1998).

Desde o aparecimento de insetos resistentes aos compostos químicos e por isso da necessidade de alternativas para o controle de vetores, pesquisadores vêm dedicando a busca por isolados de fungos a serem utilizados em manejo integrado. Alves *et al.* (2002) avaliaram o potencial de *M. anisopliae* contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, vetor de filariose humana no Brasil, observando mortalidade de aproximadamente 90% das larvas. Também foi testada sua capacidade infectiva sobre as espécies transmissoras de malária, *Anopheles gambiae*, *A. funestus* e *A. stephensi* (Farenhorst *et al.*, 2008; Mohanty *et al.*, 2008; Mnyone *et al.*, 2009; Bukhari *et al.*, 2010), alcançando significativa redução na longevidade dos mosquitos.

Além da mortalidade, efeitos secundários do agente patogênico podem desempenhar um importante papel na redução do dano acarretado pelo vetor (Thomas *et al.*, 1997). Scholte *et al.* (2005) demonstraram que fêmeas de *A. gambiae* inoculadas com uma dose elevada de conídios de *M. anisopliae*, exibiram uma redução na alimentação, além de produzirem menor quantidade de ovos, sugerindo sua possível utilização para o controle de doenças transmitidas por vetores.

A atividade ovicida de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos foi descrita por Luz *et al.* (2007), constatando que ovos de *A. aegypti* imersos na formulação do fungo tiveram significativa redução da eclosão de larvas. Nos tratamentos com *M. anisopliae*, apenas 11% de larvas eclodiram, enquanto nos tratamentos com *B. bassiana* a taxa de eclosão foi de 28%. Albernaz *et al.* (2009)

também constataram redução na taxa de eclosão quando ovos de *A. aegypti* foram expostos a uma combinação da cepa IP 46 do *M. anisopliae* com óleo vegetal de girassol, mantendo os tratamentos em umidade relativa acima ou igual a 90%. Tais resultados apontam, assim como os de Santos *et al.* (2009), a dependência de alta umidade relativa para atividade ovicida de *M. anisopliae*.

Para o controle de larvas do *A. aegypti*, Pereira *et al.* (2009) constataram a atividade patogênica de uma série de isolados de fungos, tendo sido realizados testes com dois isolados de *B. bassiana* e oito isolados de *M. anisopliae* contra larvas de segundo e terceiro instar. Três isolados apresentaram alta virulência, apresentando 82% de mortalidade de larvas expostas ao isolado CG 24 (*B. bassiana*), 90 e 88 % de mortalidade de larvas tratadas com os isolados CG 144 e o ESALQ 818, de *M. anisopliae*. O mesmo trabalho investigou a longevidade de pupas oriundas de larvas expostas aos diferentes tratamentos, sendo observado que 20% destas não completaram o ciclo de vida, diferente das pupas do controle que demonstraram 100% de viabilidade.

Um dos maiores obstáculos para o uso de fungos filamentosos no controle biológico é o intervalo de tempo entre a sua aplicação e a morte dos hospedeiros, se comparados com os pesticidas químicos. Um dos objetivos comuns no estudo desses micro-organismos tem por objetivo aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros e assim melhorar a eficiência do biocontrolador. Nesse sentido, esforços têm sido feitos no intuito de melhorar a produção, a estabilidade e a aplicação de inóculos desses fungos (Kogler *et al.*, 2001).

Com o objetivo de desenvolver uma estratégia de controle baseada na aplicação desses fungos, Paula *et al.* (2008) investigaram a ação de alguns isolados contra fêmeas de *A. aegypti*, causando mortalidade entre 70 e 89% como resultado de uma infecção ao longo de sete dias de teste. Buscando uma maneira eficiente de aplicação do entomopatógeno como instrumento do manejo em campo, foi testada a eficiência de *M. anisopliae* impregnado em panos pretos em uma sala simulando um cômodo residencial, assim como a persistência do fungo formulado em óleo e impregnado em panos pretos em condições de semicampo (Paula *et al.*, 2013; Carolino *et al.*, 2014).

2.4 Óleo de Nim: Caracterização e utilização no controle de insetos

Pesticidas baseados em produtos da árvore de Nim vêm sendo utilizados com sucesso contra insetos praga na agricultura (Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Isoptera) por mais de duas décadas (Mordue & Blackwell, 1993; Brahmachari, 2004; Mondego, 2011). Além desta aplicação, pesquisas têm sido realizadas a fim de explorar o potencial inseticida de derivados de Nim no controle de vetores de importância médica e veterinária (Mulla & Su, 1999; Nathan *et al.*, 2005; Anjali *et al.*, 2012).

A árvore de Nim, botanicamente conhecida como *Azadirachta indica* A.Juss. é nativa da Índia e pertence à família *Meliaceae*, sendo uma espécie de crescimento rápido, amplamente distribuída no Sul e Sudeste da Ásia, entre outras áreas tropicais e subtropicais, como Filipinas, Ilhas do Pacífico, Austrália e Américas (Schmutterer, 1990; National Research Council, 1995, Martínez, 2002).

Mais de 135 compostos foram isolados a partir de diferentes partes do Nim, sendo 99 destes encontrados na semente (Siddiqui *et al.*, 1992; Kraus *et al.*, 1995). Por apresentar diversos compostos com diferentes propriedades, os extratos de Nim apresentam a importante característica de ter reduzida a probabilidade do inseto desenvolver resistência, além de apresentarem baixa toxicidade a vertebrados e curta persistência no ambiente (Ciociola Jr. & Martínez, 2002; Carneiro, 2008).

Dentre os compostos encontrados na semente, a azadiractina é o principal componente biologicamente ativo, cujo conteúdo em óleo de Nim foi altamente correlacionado com sua bioatividade contra insetos (Mulla & Su, 1999). Em nível fisiológico, foi constatado que a azadiractina bloqueou a síntese e liberação de hormônios de muda (ecdisteroides), levando a ecdise incompleta em insetos imaturos. Sua ação como regulador de crescimento enfraquece o sistema de defesa da cutícula das larvas, facilitando a penetração de organismos patogênicos no inseto (Su & Mulla, 1998). Em fêmeas adultas, um mecanismo de ação semelhante leva à esterelidade, além de apresentar propriedade antialimentar (Schmutterer, 1990; Isman, 2006; Lucantoni *et al.*, 2006).

Devido a eficácia pesticida, segurança ambiental e aceitação pública de produtos à base de Nim para o controle de pragas de culturas, tem sido argumentada sua possível aprovação em programas de controle de mosquitos, e

para isso pesquisas vêm sendo realizadas sobre o Nim e a ação de seus metabólitos secundários contra insetos (Su & Mulla, 1998).

O efeito letal de produtos à base de Nim foi avaliado contra larvas de *A. aegypti*, sendo constatado seu efeito no desenvolvimento desta fase imatura do inseto, apresentando significativa redução de emergência de adultos (Ndione *et al.*, 2007; Dua *et al.*, 2009). Sobre os anofelinos transmissores de malária, *Anopheles stephensi* e *A. gambiae*, a administração de doses preestabelecidas de Nim gerou a inibição de alimentação e redução na oviposição, assim como significativa redução na formação de pupas e de emergência de adultos (Nathan *et al.*, 2005; Lucantoni *et al.*, 2006; Okumu *et al.*, 2007). Estudos também avaliaram o potencial larvicida de produtos de Nim sobre o transmissor de filariose humana, *Culex quinquefasciatus*, sendo observadas expressivas taxas de mortalidade em larvas de 3^o e 4^o instar sob condições naturais de campo (Dua *et al.*, 2009).

Em 2012, Gomes avaliou o efeito do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* junto com óleo de Nim, buscando o desenvolvimento de uma alternativa ao controle larvário de *A. aegypti*. Neste trabalho, o óleo de Nim formulado com o fungo apresentou efeito sinérgico, sendo considerado altamente promissor para o desenvolvimento de novas estratégias de controle do mosquito vetor da dengue e uma alternativa aos larvicidas convencionais.

2.5 Microencapsulamento de agentes biológicos

A microencapsulação é a tecnologia de acondicionamento que, com finas camadas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, forma partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas. Ao se referir o conteúdo de uma microcápsula são comumente utilizados os termos agente ativo, material do núcleo e núcleo. Enquanto o material a partir do qual a cápsula é formada é denominando de revestimento, membrana, parede ou matriz (Sparks, 1981).

Quanto ao tamanho, as cápsulas são classificadas em macro- (>5000 µm), micro- (0,2-5000 µm) e nanopartículas (<0,2 µm). Em termos de estrutura as cápsulas são divididas em duas categorias: cápsulas nas quais o núcleo é distintamente concentrado na região central, envolto por um filme contínuo de

material de parede, e cápsulas nas quais o núcleo é igualmente disperso em uma matriz. O primeiro grupo é identificado como sistema do tipo reservatório, caracterizando as “verdadeiras microcápsulas”, enquanto o segundo grupo é classificado como sistema matricial, resultando nas chamadas “microesferas” (Ré, 1998). Entre os dois grupos, a principal diferença está relacionada no fato de que, nas microesferas, uma porção do material encapsulado permanece exposto na superfície, o que não ocorre com as cápsulas verdadeiras. Porém, a expressão “encapsulação vem sendo utilizada em seu sentido mais amplo, englobando tanto a formação de microcápsulas quanto a de microesferas. As microcápsulas podem ainda apresentar mais de um núcleo, ou várias paredes para um mesmo núcleo (Park & Chang, 2000).

Um importante objetivo do encapsulamento é permitir que a liberação do material do núcleo ocorra lentamente com o tempo, ou a partir de um dado evento. Tal definição é denominada *liberação controlada*, podendo referir-se ao controle do início da liberação ou da taxa de liberação (Risch, 1995). Dentre os materiais utilizados para formação da matriz encapsulante estão o ágar, agarose, carragenina, colágeno e alginato, além de quitosana e celulose (Park & Chang, 2000). A seleção do produto encapsulante apropriado é essencial, devendo possuir a habilidade de selar e manter o material ativo dentro da estrutura da cápsula, liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação, proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos, ter solubilidade em solventes comumente utilizados, possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo, além de outras características (Shahid & Han, 1993).

Os alginatos são comumente utilizados como materiais de encapsulamento, que devido principalmente à suas propriedades gelificantes, são responsáveis por efeitos importantes sobre a estabilidade das cápsulas (Amsden, 1998). Quimicamente o alginato é composto por cadeias lineares de ácido α -L-glucurônico e β -D-mannurônico, os quais em presença de íons tais como Ca^{++} formam hidrogéis, filmes, esferas e micropartículas com alta capacidade de encapsulamento (Fravel, 1985; Tsuji, 2001; Devi & Maji, 2011; Soliman, 2013). Tem sido amplamente utilizado como encapsulante de micro-organismos devido principalmente a baixa toxicidade, biodegradabilidade, por ser econômico, de fácil

manuseio e não poluente (Chan *et al.*, 2000; Tsuji 2001, Ceausoglu & Hunkeler, 2002; Liu & Liu, 2009a).

O encapsulamento de micro-organismos confere proteção às células, proporcionando, assim, um maior tempo de prateleira. Além disso, ao utilizar tecnologias de microencapsulação e modificar a matriz polimérica, as microesferas podem ser desenvolvidas em um sistema ideal para alcançar o perfil de liberação desejado (Benita *et al.*, 1996; Sezer & Akbuga, 1999).

Pereira & Roberts (1991) avaliaram a produção de conídios dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em formulação de alginato após exposição à radiação solar artificial, verificando que este encapsulante impediu a degradação dos fungos. Em outro trabalho, microcápsulas de alginato reticuladas com cálcio e revestidas com goma de cajueiro foram preparadas e injetadas com óleo essencial de *Croton zehntneri*, de atividade larvicida, a fim de preservar o princípio ativo e prolongar a liberação do mesmo no meio. Pôde-se observar que a matriz polimérica mostrou-se efetiva para proteção do princípio ativo, preservando o material até cerca de 70 dias (Paula *et al.*, 2010). Nesse sentido, a microencapsulação pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento de biopesticidas, já que a ausência de formulação adequada tem impedido a utilização de biolarvicidas em larga escala.

3. OBJETIVO

3.1 Geral

Avaliar a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas a conídios do fungo *M. anisopliae* previamente encapsulados com ou sem óleo de Nim.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Nim encapsulado sobre larvas de *A. aegypti*;
- Avaliar a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas a conídios de *M. anisopliae* encapsulados;
- Avaliar o efeito da combinação de fungo encapsulado com óleo de Nim sobre larvas de *A. aegypti*;
- Avaliar a persistência do fungo encapsulado com Nim no período de três, cinco, sete e 10 dias sobre sobrevivência das larvas de *A. aegypti*;
- Avaliar a sobrevivência de larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim em condições de semicampo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, município de Campos dos Goytacazes.

4.1 Criação das larvas

Para o início da criação foram utilizados ovos de *A. aegypti* linhagem Rockefeller. O papel filtro contendo os ovos foi submerso em bandeja plástica (10 cm x 30 cm x 20 cm) preenchida com água potável, estimulando, assim, a eclosão das larvas. Para alimentação destas foi adicionado, por bandeja, 0.1g de ração comercial para gato triturada. As pupas originadas foram transferidas para um copo descartável contendo água e este colocado dentro de uma gaiola de criação, um pote plástico de 30 x 20 x 20 cm, recoberto com tecido organza, e mantido à temperatura de 25°C, 75% UR e 12h fotoperíodo. Os mosquitos adultos foram alimentados com solução de sacarose (10%) e após três dias foram expostos a um camundongo suíço, imobilizado em uma malha de arame, para a alimentação

sanguínea. A oviposição das fêmeas ocorreu em um copo plástico (100 mL) recoberto com papel-filtro (25 x 5 cm) contendo 50 mL de água até a altura de 2.5 cm do papel-filtro. A criação das larvas ocorreu como na descrição acima, sendo as larvas de estágio L3 final/L4 inicial utilizadas nos testes. Algumas larvas foram destinadas à manutenção da criação.

4.2 Cultivo do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

O isolado de *M. anisopliae* utilizado na condução dos experimentos foi o ESALQ 818 obtido da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, em Piracicaba (SP). Inicialmente, o fungo foi cultivado em meio de cultura SDA (Dextrose 10 g; Peptona 2,5 g; Extrato de levedura 2,5 g; Ágar 20 g e 1000 mL de água destilada) acondicionado em placa de Petri e mantido em câmara climatizada do tipo B.O.D. durante 15 dias a 27°C e 70 ± 10 % UR.

Para a produção massal do fungo os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados a 25g de arroz parboilizado (marca comercial Sepé tipo 1) previamente autoclavado em 10 ml de água destilada por 15 min a 1 atm (120°C). Os frascos contendo arroz e fungo foram então transferidos para uma BOD onde permaneceram a 27°C e 70 ± 10 % UR por 15 dias.

4.3 Separação dos conídios de *Metarhizium anisopliae*

A formulação foi preparada utilizando esporos secos do fungo. Para isso, os conídios germinados em arroz foram embalados em sacos de papel e mantidos em BOD de secagem (Nova Ética®) por 24 horas a 26 °C (Figura 3.A). Com o auxílio de uma máquina separadora de esporos (Mycoharvester, Inglaterra) (Figura 3.B), os conídios previamente secos foram retirados do arroz, colocados em sacos plásticos e armazenados em um recipiente com sílica gel.

A partir da retirada dos esporos de *M. anisopliae* do arroz, obtêm-se dois produtos: esporos com maior proporção de resíduos (fungo “grosso”) e esporos com menor proporção de resíduos (fungo ‘fino’). Para o preparo das cápsulas foi utilizado o fungo grosso.

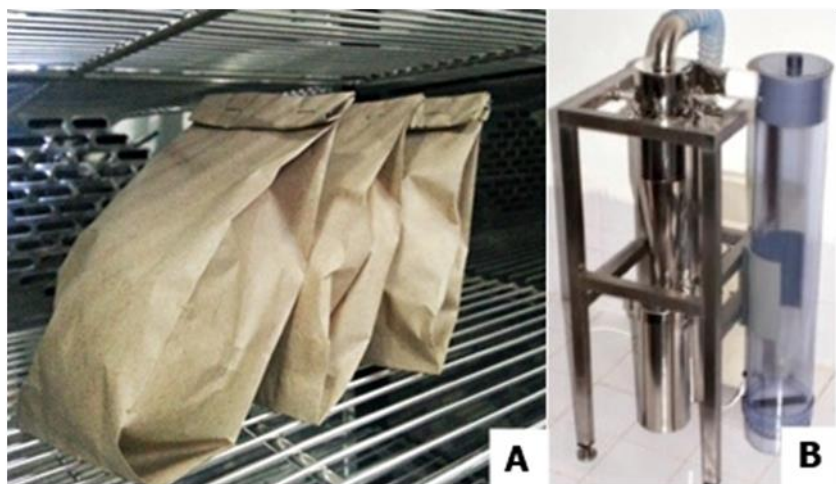


Figura 3. (A) Fungo embalado em sacos de papel e seco em B.O.D. (B) Máquina separadora de esporos.

4.4 Preparação das cápsulas

A solução matriz para formação das cápsulas foi preparada por meio da hidratação de 0,5 g de alginato de sódio (Sigma-Aldrich®) e 2 g de ágar (Proquímios) em 200 mL de água destilada e posterior aquecimento para a completa dissolução dos componentes.

Para a formulação fúngica, 0,5 g de esporo grosso foi adicionado a 10 mL de Tween 80 (0.05%), previamente autoclavado, e submetido à agitação durante 1 minuto em agitador vortex (Biomixer®). A concentração nesta formulação foi de 2.5×10^8 conídios mL^{-1} . A emulsão de Nim foi preparada utilizando um produto comercial de óleo vegetal de nim:Base Nim® (Base Fértil Comercial Agrícola Ltda., Ribeirão Preto, SP), contendo 1.200 PPM DE Azadiractina. Foram preparadas emulsões nas concentrações de 1%, 5% e 10%, na proporção de 1:1 com Tween 80 (0,05%).

A partir da matriz foram preparadas as seguintes soluções:

1. Alginato + ágar e Fungo grosso;
2. Alginato + ágar e Nim 1%;
3. Alginato + ágar e Nim 5%;
4. Alginato + ágar e Nim 10%;

5. Alginato + ágar e Fungo + Nim 1%;
6. Alginato + ágar e Fungo + Nim 5%;
7. Alginato + ágar e Fungo + Nim 10%.

Para a formação das esferas, as soluções acima descritas foram gotejadas, utilizando uma bomba peristáltica (Cole Palmer®. Modelo 07014-20) com fluxo de 2,9 mL/min, em solução de cloreto de cálcio, com agitação constante (Figura 4). A solução de cloreto de cálcio foi preparada por meio da solubilização de 1,76g do produto em 300 mL de água destilada em agitação magnética (Vulcan, MS400 Magnetic Stirrer).

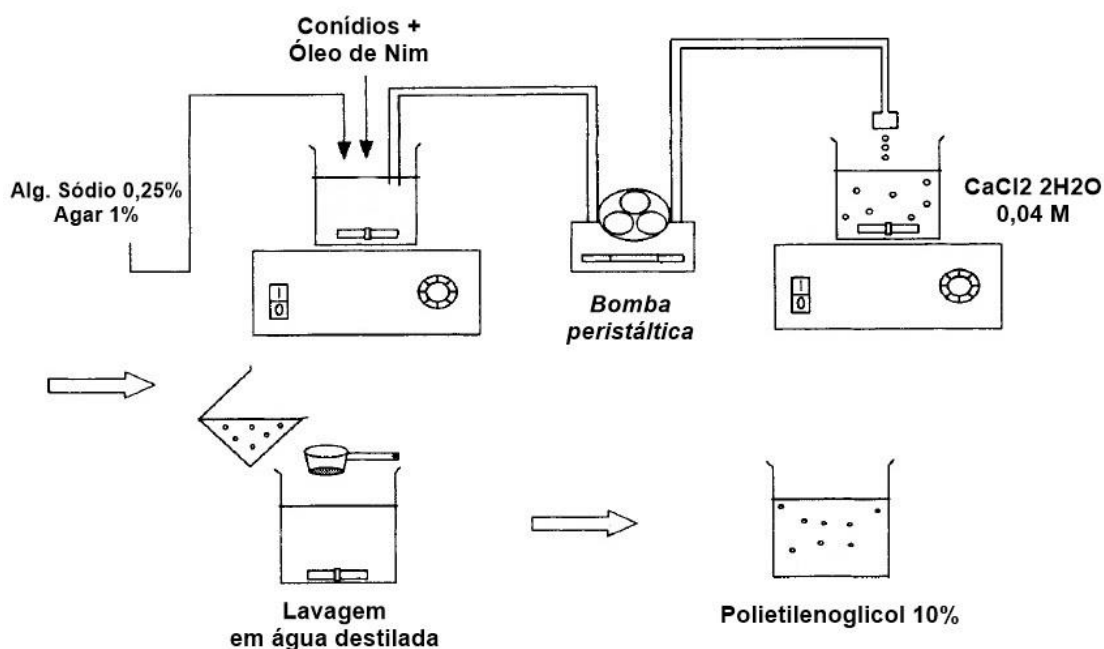


Figura 4. Diagrama esquemático do processo de preparação de cápsulas de alginato. Adaptado de Chang *et al.*, 1996.

Também foram produzidas cápsulas somente com a solução matriz. As esferas foram removidas, lavadas em água destilada e mantidas em polietilenoglicol (Sigma-Aldrich®. Massamolecular 8000) por 24 horas. Após este período foram armazenadas em placas de Petri, congeladas e liofilizadas por 24 horas (Liofilizador L 101. Liotop®) (Figura 5).

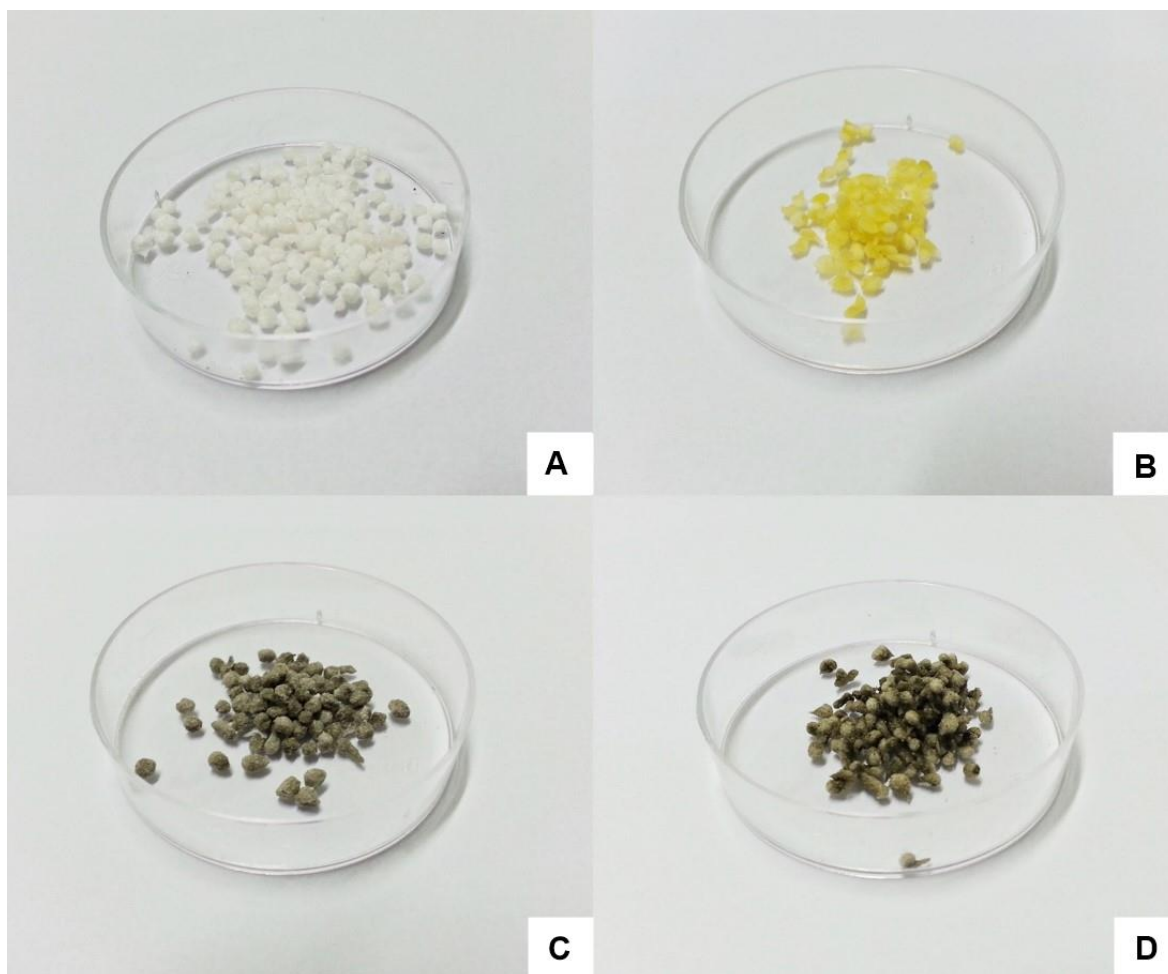


Figura 5. Cápsulas à base de alginato de sódio e ágar. (A) Alginato; (B) Nim 10%; (C) Fungo; (D) Fungo + Nim 10%.

4.5 Exposição das larvas ao fungo encapsulado com Nim

Copos plásticos contendo 100 mL de água + 0,1 g de cápsulas foram utilizados nos testes para avaliação da taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti*. Dez larvas foram adicionadas a cada copo plástico, totalizando 40 larvas para cada tratamento. Os tratamentos foram dispostos em bancadas no laboratório, em sala climatizada a 25°C e 75% UR (Figura 6). Os seguintes tratamentos foram realizados:

1. Larvas expostas a cápsulas somente com Alginato;
2. Larvas expostas a cápsulas contendo Fungo grosso;

3. Larvas expostas a cápsulas contendo Nim 1%;
4. Larvas expostas a cápsulas contendo Nim 5%;
5. Larvas expostas a cápsulas contendo Nim 10%;
6. Larvas expostas a cápsulas contendo Fungo + Nim 1%;
7. Larvas expostas a cápsulas contendo Fungo + Nim 5%;
8. Larvas expostas a cápsulas contendo Fungo + Nim 10%;
9. Controle (somente com água).

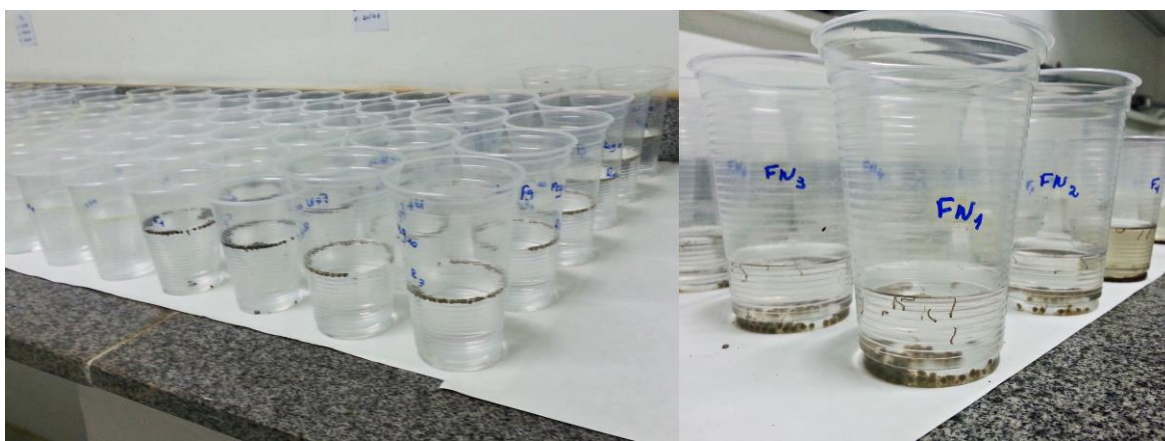


Figura 6. Larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim em tratamentos dispostos em bancadas.

4.6 Testes de persistência

Para avaliar a persistência do fungo encapsulado com Nim, as cápsulas dos tratamentos já descritos foram previamente adicionadas ao recipiente com água e após os períodos de três, cinco, sete e 10 dias foram adicionadas as larvas. A sobrevivência foi avaliada diariamente por sete dias.

4.7 Ensaio experimental no semicampo

Para a realização dos experimentos em condições de semicampo, os tratamentos Controle, Alginato, Fungo, Nim 10% e Fungo + Nim 10% foram dispostos em bandejas e estas posicionadas no interior de uma gaiola (115 x 60 x

75 cm) em ambiente externo, simulando ambiente natural (Figura 7). A sobrevivência foi avaliada diariamente por sete dias.



Figura 7. Bandejas com tratamentos dispostas no interior de uma gaiola em condições de semicampo.

4.8 Análise dos resultados

Para a obtenção das curvas e do tempo médio de sobrevivência (S_{50}) os dados foram analisados pelo Software GraphPad Prism Version 5.03.

A homogeneidade dos experimentos foi determinada usando o teste de Log-Rank em nível de significância de 95%. As comparações das médias de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* foram calculadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito de diferentes concentrações de óleo de Nim encapsulado sobre larvas de *Aedes aegypti*

Após sete dias de avaliação, o tratamento controle, contendo apenas água de torneira, apresentou sobrevivência de 100%, assim como o tratamento com cápsulas somente de alginato. Os tratamentos com cápsulas de Nim a 1%, 5% e 10% apresentaram sobrevivência de 94,95%, 95,83% e 89,17%, respectivamente (Figura 8). As curvas de sobrevivência larval foram estatisticamente diferentes pelo teste Log-rank ($P < 0,0001$), assim como os tratamentos, estatisticamente diferentes pelo *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 22,12$; $P < 0,05$) (Tabela 1).

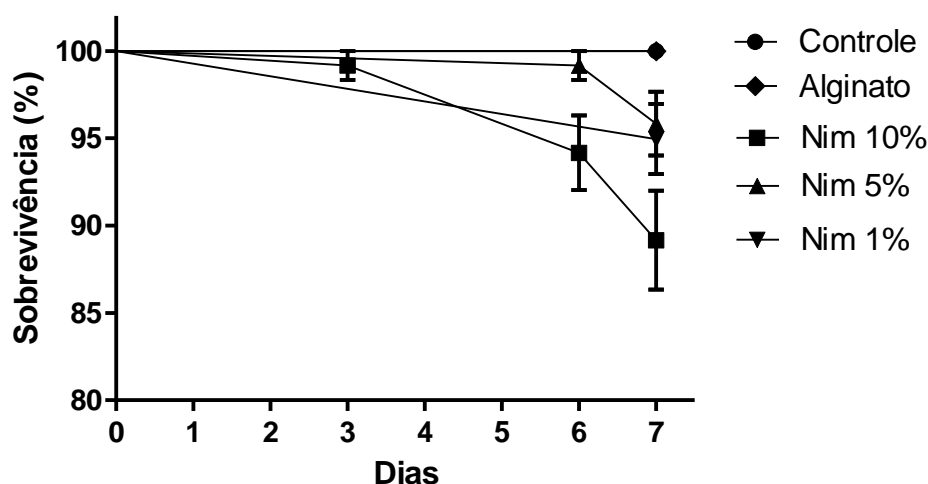


Figura 8. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao óleo de Nim encapsulado nas concentrações de 1%, 5% e 10% durante 7 dias. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição.

Tabela 1: Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência de larvas tratadas com diferentes concentrações de óleo de Nim encapsulado.

Tratamentos	% Sobrevivência \pm Desv. Pad	S ₅₀
Nim 1%	94,95 \pm 2,01b*	ND**
Nim 5%	95,83 \pm 1,82 b	ND
Nim 10%	89,17 \pm 2,83c	ND
Controle	100 a	ND
Alginato	100 a	ND

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

5.2 Avaliação da sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao fungo encapsulado

Larvas expostas ao tratamento com fungo grosso encapsulado apresentaram 82,5% de sobrevivência após sete dias de avaliação. O tratamento controle e o tratamento com cápsulas somente de alginato apresentaram 100% de sobrevivência após o mesmo período (Figura 9). As curvas de sobrevivência larval foram estatisticamente diferentes pelo teste Log-rank ($P < 0,0001$), assim

como os tratamentos, estatisticamente diferentes pelo *post-hoc* de Duncan ($F_{2,26} = 28,96$; $P < 0,01$) (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência de larvas expostas ao fungo encapsulado.

Tratamentos	% Sobrevivência \pm Desv. Pad.	S ₅₀
Fungo	82,5 \pm 2,01 b*	ND**
Controle	100 a	ND
Alginato	100 a	ND

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

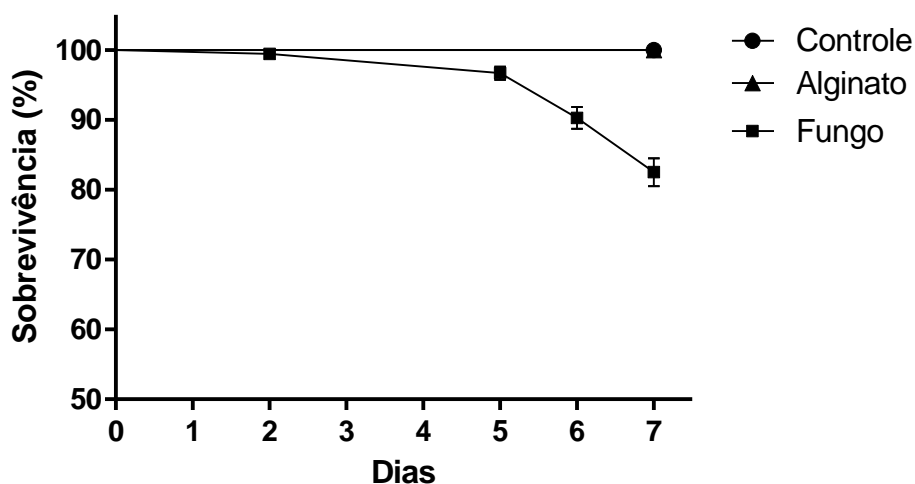


Figura 9. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao fungo encapsulado. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição. A sobrevivência foi avaliada durante 7 dias.

5.3 Avaliação do efeito da combinação de fungo encapsulado com óleo de Nim sobre larvas de *Aedes aegypti*

5.3.1 Fungo encapsulado com Nim a 1%

O tratamento com fungo encapsulado junto com Nim a 1% resultou em taxa de sobrevivência menor do que os tratamentos com fungo e Nim encapsulados separadamente. O tratamento controle apresentou sobrevivência de 100%, assim como o tratamento com cápsulas somente de alginato (Figura 10). Os tratamentos

foram estatisticamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 95,38$; $P < 0,05$) (Tabela 3).

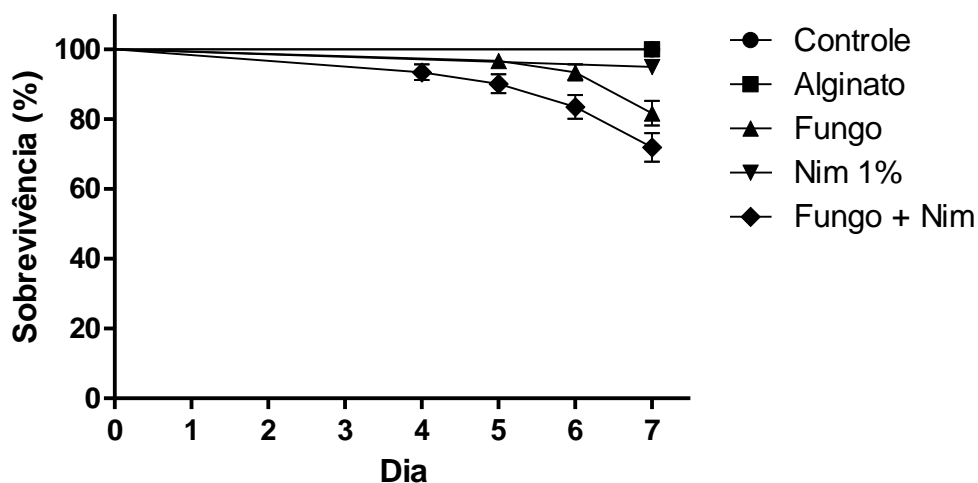


Figura 10. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cápsulas somente de alginato, cápsulas com fungo, cápsulas com Nim 1% e cápsulas com fungo + Nim 1%. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição. A sobrevivência foi avaliada durante 7 dias.

Após os sete dias de avaliação, as larvas apresentaram 71,9% para o tratamento com fungo + Nim, e 81,67% e 94,95% de sobrevivência para os tratamentos com fungo e Nim, respectivamente (Figura 3). As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com cápsulas contendo fungo, Nim 1% e fungo + Nim foram estatisticamente diferentes pelo teste Log Rank ($P < 0,0001$).

Tabela 3. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência de larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim a 1%.

Tratamentos	% Sobrevivência \pm Desv. Pad.	S ₅₀
Fungo	81,67 \pm 3,53 b*	ND**
Nim	94,95 \pm 2,01c	ND
Fungo + Nim	71,90 \pm 4,08 d	ND
Controle	100 a	ND
Alginato	100 a	ND

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

5.3.2 Fungo encapsulado com Nim a 5%

Após o período de avaliação de sete dias, o tratamento do fungo encapsulado junto com óleo de Nim a 5% apresentou sobrevivência de 48,33%, apresentando um valor de S_{50} igual a sete. Tal valor foi significativamente diferente dos tratamentos com fungo e Nim encapsulados separadamente, os quais apresentaram 85% e 95,83% de sobrevivência, respectivamente (Figura 11). As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com cápsulas contendo fungo, Nim 5% e fungo + Nim foram estatisticamente diferentes pelo teste Log Rank ($P < 0.0001$), assim como os tratamentos, estatisticamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 80,71$; $P < 0,05$) (Tabela 4). O tratamento controle, assim como o tratamento com cápsulas somente de alginato apresentou sobrevivência de 100%.

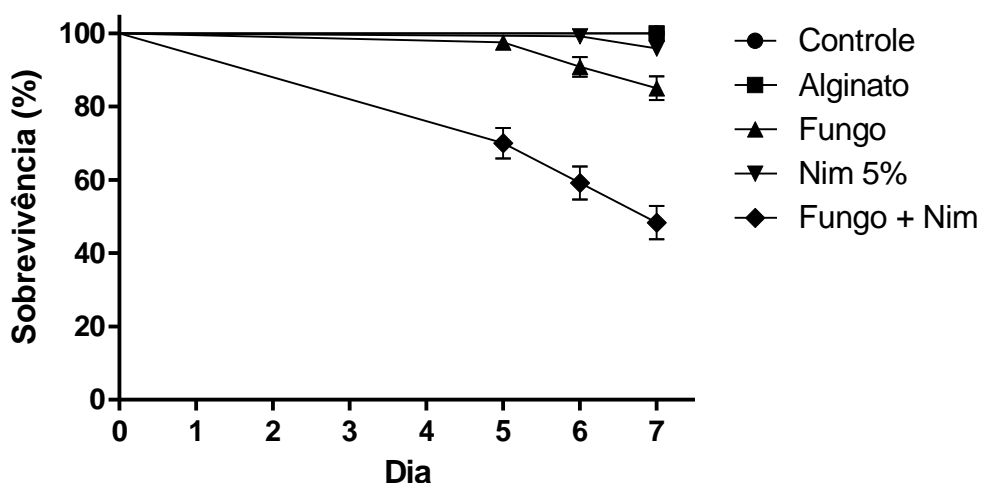


Figura 11. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cápsulas somente de alginato, cápsulas com fungo, cápsulas com Nim 5% e cápsulas com fungo + Nim 5%. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição. A sobrevivência foi avaliada durante 7 dias.

Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência de larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim a 5%

Tratamentos	% Sobrevivência ± Desv. Pad.	S ₅₀
Fungo	85 ± 3,26 b*	ND**
Nim	95,83 ± 1,82 a	ND
Fungo + Nim	48,33 ± 4,56 c	7
Controle	100 a	ND
Alginato	100 a	ND

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

5.3.3 Fungo encapsulado com Nim a 10%

Durante os sete dias de avaliação, o tratamento com fungo e óleo de Nim a 10% mostrou-se significativamente diferente dos tratamentos com fungo e Nim encapsulados separadamente. Após três dias de exposição, larvas tratadas com fungo + Nim apresentaram 20% de sobrevivência, enquanto as tratadas com fungo e Nim separadamente apresentaram 98,33% e 99,17%, respectivamente. Ao término da avaliação, não foi observada sobrevivência de larvas expostas ao tratamento com fungo + Nim a 10% (Figura 12). Os tratamentos controle e alginato apresentaram sobrevivência de 100% após o período de avaliação.

As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com cápsulas com fungo, Nim 10% e fungo + Nim 10% foram estatisticamente diferentes pelo teste Log Rank ($P < 0.0001$), sendo o tratamento com fungo + Nim o único a apresentar um valor de S₅₀ de 2 dias. Os tratamentos também se apresentaram estatisticamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 2204,41$; $P < 0,05$) (Tabela 5).

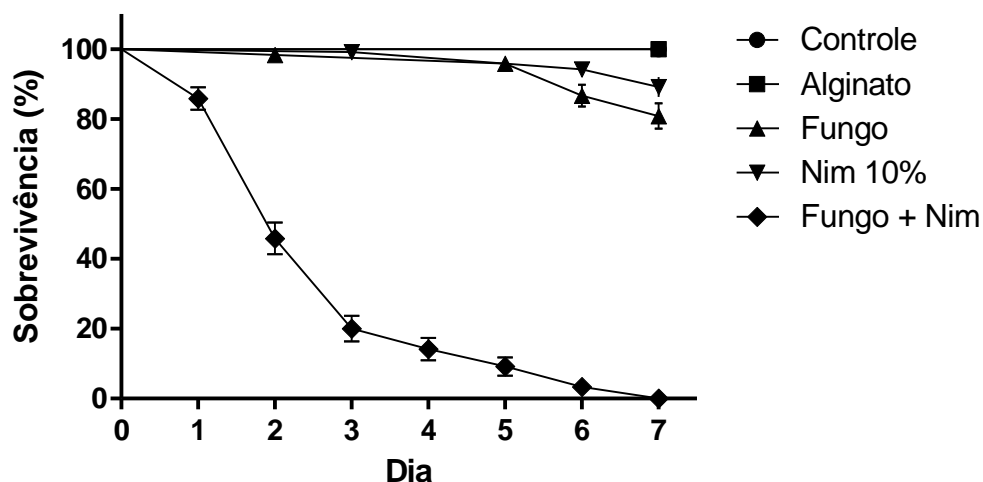


Figura 12. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cápsulas somente de alginato, cápsulas com fungo, cápsulas com Nim 10% e cápsulas com fungo + Nim 10%. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição. A sobrevivência foi avaliada durante 7 dias.

Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência de larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim a 10%

Tratamentos	% Sobrevivência ± Desv. Pad.	S ₅₀
Fungo	80,83 ± 3,59 b*	ND**
Nim	89,16 ± 2,83 c	ND
Fungo + Nim	0 d	2
Controle	100 a	ND
Alginato	100 a	ND

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

5.4 Avaliação da persistência do fungo encapsulado com diferentes concentrações de Nim nos períodos de 3, 5, 7 e 10 dias sobre a sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti*

5.4.1 Fungo encapsulado com Nim a 1%

Durante a avaliação da persistência do fungo encapsulado com óleo de Nim a 1%, observou-se que a sobrevivência das larvas foi semelhante durante os tempos 3 e 5, apresentando igualmente a taxa de 83,33%. Também se mostraram

iguais as taxas de sobrevivência para o mesmo tratamento durante os tempos 7 e 10, com 96,67% (Figura 13).

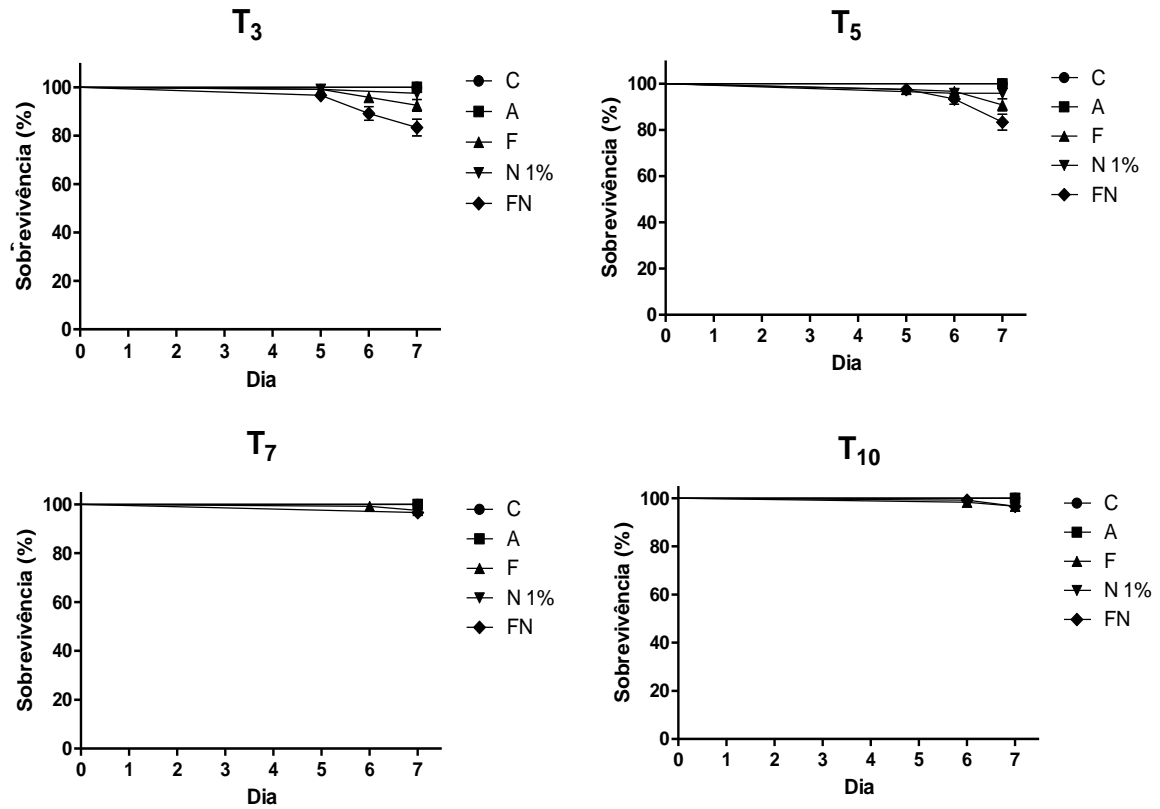


Figura 13. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cápsulas de alginato, cápsulas com fungo, cápsulas com Nim 1% e cápsulas com fungo + Nim durante os períodos de três, cinco, sete e 10 dias de persistência. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição. A sobrevivência foi avaliada durante 7 dias. (C) Controle; (A) Alginato; (N) Nim e (FN) Fungo + Nim.

Os tratamentos com fungo e Nim encapsulados separadamente oscilaram entre 90,83% e 100%, com Nim sendo estatisticamente igual ao controle durante os tempos de 5, 7 e 10 dias de persistência. Os tratamentos Controle e Alginato apresentaram sobrevivência de 100% após sete dias de avaliação durante os quatro períodos de persistência (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim a 1% durante três, cinco, sete e 10 dias de persistência.

Persistência (Dias)	Tratamentos	% Sobrevivência ± Desv. Pad.	S ₅₀
3	Fungo	92,5 ± 2,40 a*	ND**
	Nim	97,5 ± 1,42 a	ND
	Fungo + Nim	83,33 ± 3,41b	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND
5	Fungo	90,83 ± 2,63 c	ND
	Nim	95,83 ± 1,82 b	ND
	Fungo + Nim	83,33 ± 3,41d	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND
7	Fungo	97,5 ± 1,42 b	ND
	Nim	100 a	ND
	Fungo + Nim	96,67 ± 1,63 b	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND
10	Fungo	96,67 ± 1,63 b	ND
	Nim	100 a	ND
	Fungo + Nim	96,67 ± 1,63 b	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND

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

As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com cápsulas com Fungo, Nim 1% e Fungo + Nim 1% foram estatisticamente diferentes pelo teste Log Rank ($P < 0.0001$) durante os quatro períodos de persistência, assim como os tratamentos, estatisticamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 10,425; 35,29; 29,59$ e $17,23; P < 0,05$) (Tabela 6).

Com as médias de sobrevivência larval do tratamento com Fungo encapsulado junto com óleo de Nim a 1%, durante os quatro tempos de persistência mais o primeiro teste (T0), foi realizada uma análise de regressão linear. A análise foi considerada significativa ($F = 23,74; P < 0,05$), com 88,8% da

variância observada explicada pela reta de regressão $y = 2,5953x + 73,403$ (Figura 14).

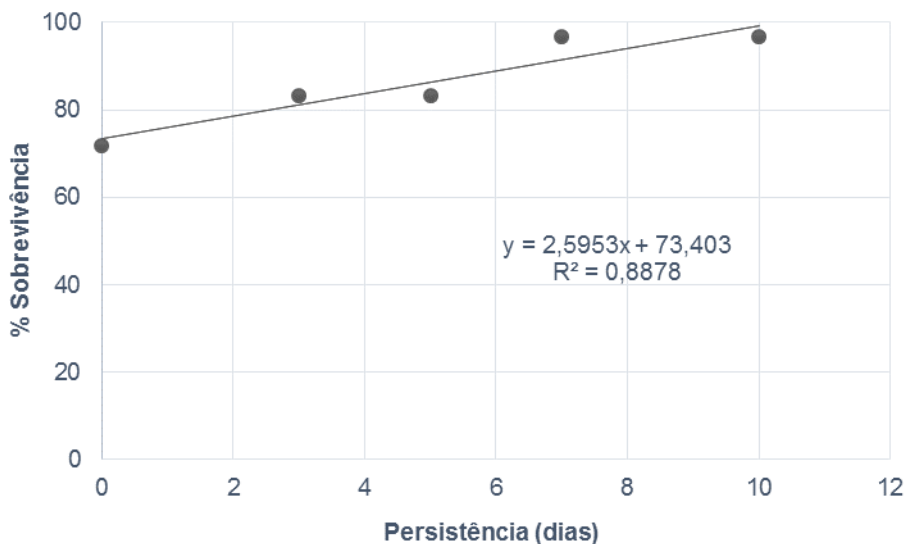


Figura 14. Análise de regressão linear entre sobrevivência de larvas de *A. aegypti* e a persistência em dias de cápsulas com Fungo + Nim a 1%.

5.4.2 Fungo encapsulado com Nim a 5%

Em resposta ao tratamento com Fungo encapsulado com Nim a 5% durante os tempos de 3 e 5 dias de persistência, foram observadas as taxas de 70% e 90,83% de sobrevivência larval, enquanto o tratamento com fungo encapsulado separadamente apresentou 88,33% e 95% de sobrevivência para os mesmos períodos. Após sete dias de avaliação para os períodos de 7 e 10 dias de persistência, verificou-se as taxas de 88,33% e 86,67% de sobrevivência das larvas de *A. aegypti*, respectivamente (Figura 15).

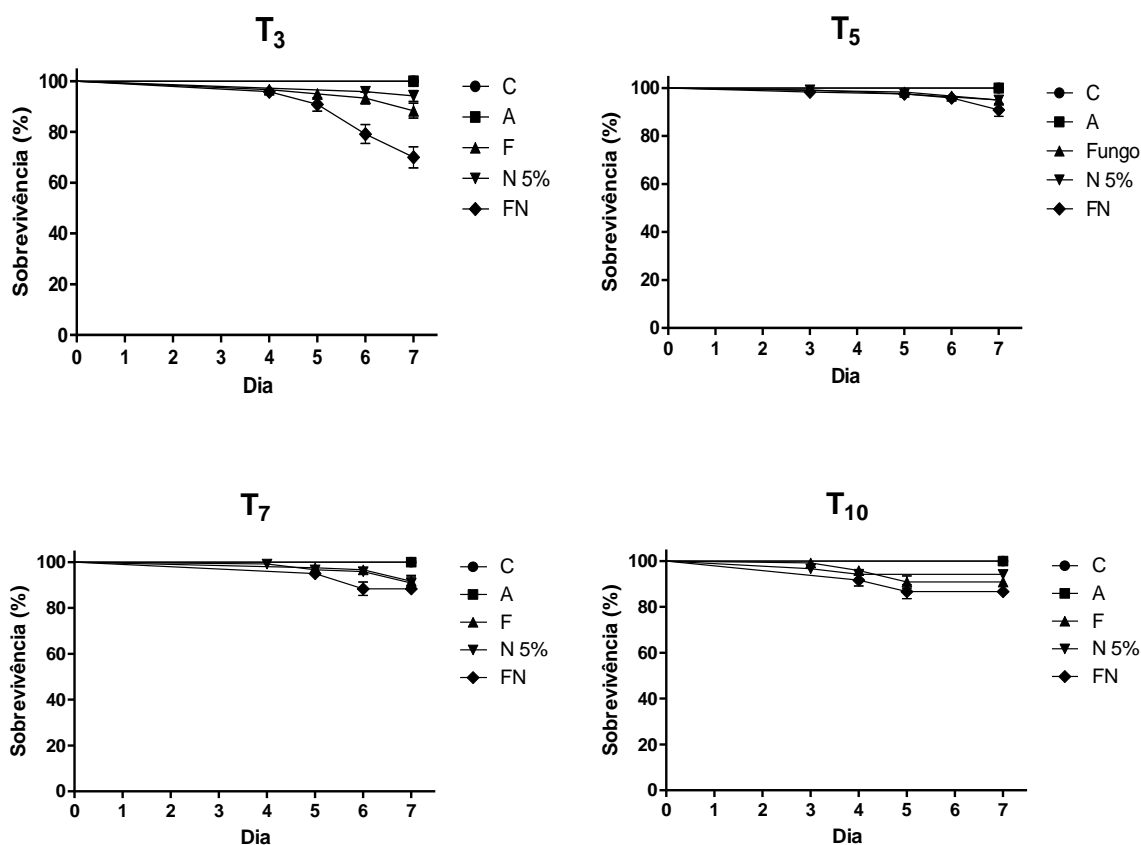


Figura 15. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cápsulas de alginato, cápsulas com fungo, cápsulas com Nim 5% e cápsulas com fungo + Nim 5% durante os períodos de três, cinco, sete e 10 dias de persistência. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição. A sobrevivência foi avaliada durante 7 dias. (C) Controle; (A) Alginato; (N) Nim e (FN) Fungo + Nim.

Os tratamentos com Nim apresentaram médias de sobrevivência entre 90,83% e 95% para os quatro tempos de persistência, apresentando-se estatisticamente diferentes do controle em todos estes. Os tratamentos Controle e Alginato apresentaram sobrevivência de 100% após sete dias de avaliação durante os quatro períodos de persistência (Tabela 7).

As curvas de sobrevivência das larvas expostas a cápsulas com Fungo, Nim 10% e Fungo + Nim 10% foram estatisticamente diferentes pelo teste Log Rank ($P < 0.0001$) durante os quatro períodos de persistência, assim como os

tratamentos, estatisticamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 154,31; 13,68; 35,12$ e $34,43; P < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim a 5% durante três, cinco, sete e 10 dias de persistência.

Persistência (Dias)	Tratamentos	% Sobrevivência ± Desv. Pad.	S ₅₀
3	Fungo	88,33 ± 2,93 c*	ND**
	Nim	94,16 ± 2,14 b	ND
	Fungo + Nim	70 ± 4,18 d	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND
5	Fungo	95 ± 1,99 b	ND
	Nim	95 ± 1,99 b	ND
	Fungo + Nim	90,83 ± 2,63 c	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND
7	Fungo	91,67 ± 2,52 b	ND
	Nim	90,83 ± 2,63 c	ND
	Fungo + Nim	88,33 ± 2,93 d	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND
10	Fungo	90,83 ± 2,63 b	ND
	Nim	94,16 ± 2,14 b	ND
	Fungo + Nim	86,67 ± 3,10 c	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND

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

A partir das médias de sobrevivência de larvas expostas ao tratamento com Fungo encapsulado junto com óleo de Nim a 5%, durante os quatro tempos de persistência mais o primeiro teste (T0), foi realizada uma análise de regressão linear. A análise não foi considerada significativa ($F = 7,01; P > 0,05$), com apenas 70% da variância observada explicada pela reta de regressão $y = 3,9372x + 57,146$ (Figura 16).

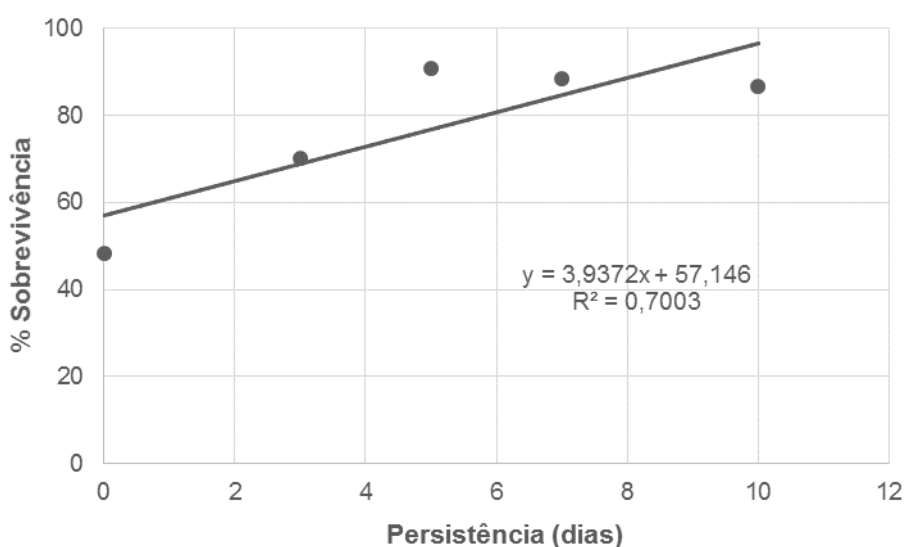


Figura 16. Análise de regressão linear entre sobrevivência de larvas de *A. aegypti* e a persistência de cápsulas com fungo + Nim a 5% em dias.

5.4.3 Fungo encapsulado com Nim a 10%

Para o período de 3 dias de persistência o tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas com Fungo encapsulado junto com óleo de Nim a 10 % foi de sete dias, apresentando 57,5% de sobrevivência no quinto dia e chegando a atingir a taxa de 27,5% no sétimo dia de avaliação. Para o período de 5 dias a taxa de sobrevivência manteve-se semelhante ao período anterior, com média de 65,83% de sobrevivência no sexto dia, atingindo a taxa de 36,67% ao término das avaliações. Para os períodos de persistência citados, os bioensaios contendo somente Fungo apresentaram 85,83% e 91,67% de sobrevivência, respectivamente, enquanto os tratamentos somente com cápsulas de alginato apresentaram 100% (Figura 17).

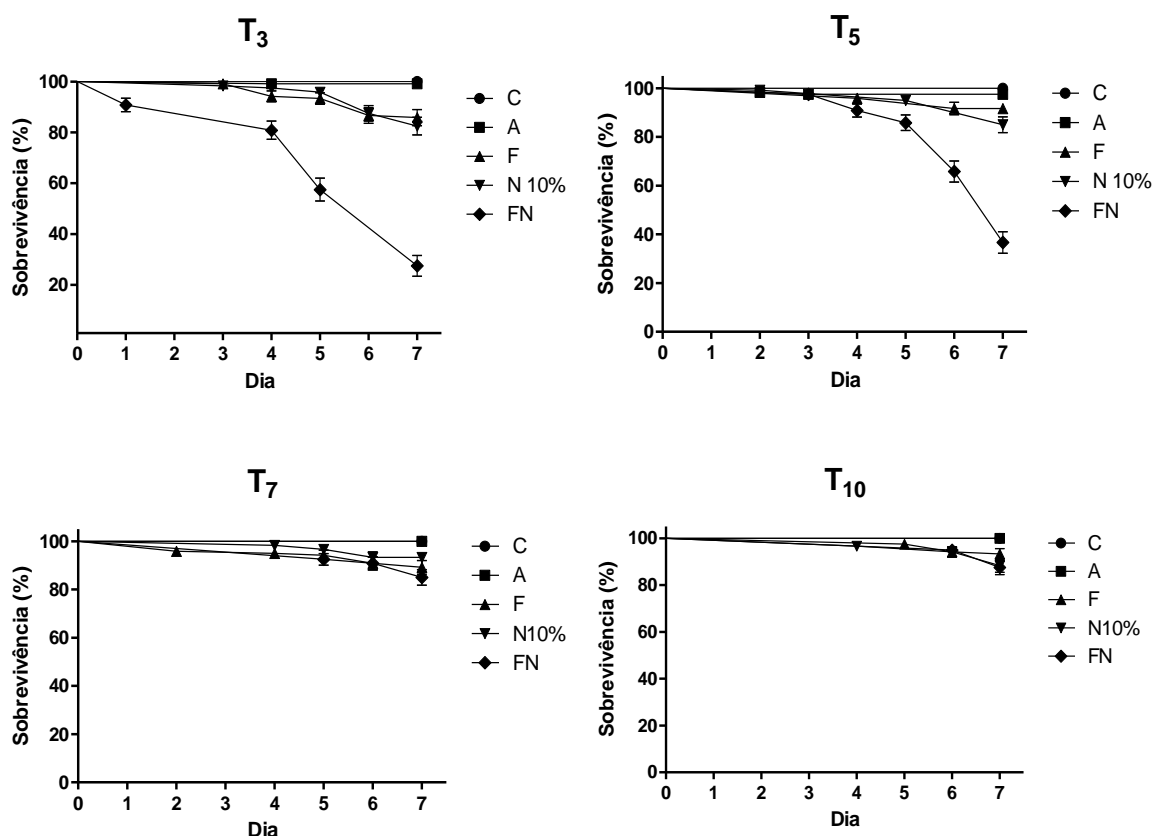


Figura 17. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas a cápsulas de alginato, cápsulas com fungo, cápsulas com Nim 10% e cápsulas com fungo + Nim 10% durante os períodos de três, cinco, sete e 10 dias de persistência. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição. A sobrevivência foi avaliada durante 7 dias. (C) Controle; (A) Alginato; (N) Nim e (FN) Fungo + Nim.

Para os períodos de 7 e 10 dias de persistência, as taxas de sobrevivência de larvas expostas ao Fungo encapsulado com Nim foram de 85% e 87,5%, enquanto os tratamentos somente com Fungo apresentaram 89,17% e 93,33% de sobrevivência para os respectivos períodos. Não foi observada mortalidade larval nos bioensaios Controle e Alginato após os sete dias de avaliação (Figura 17).

As curvas de sobrevivência das larvas expostas a cápsulas com Fungo, Nim 10% e Fungo + Nim 10% foram estatisticamente diferentes pelo teste Log Rank ($P < 0.0001$) durante os quatro períodos de persistência, assim como os tratamentos, estatisticamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 383,95; 248,91; 20,76$ e $38,68; P < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência das larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim a 10% durante três, cinco, sete e 10 dias de persistência.

Persistência (dias)	Tratamentos	% Sobrevivência ± Desv. Pad.	S ₅₀
3	Fungo	85,83 ± 3,18 b*	ND**
	Nim	82,5 ± 3,46 b	ND
	Fungo + Nim	27,5 ± 4,07 c	7
	Alginato	100 a	ND
	Controle	99,16 a	ND
5	Fungo	91,67 ± 2,52 b	ND
	Nim	85 ± 3,26 c	ND
	Fungo + Nim	36,67 ± 4,39 d	7
	Alginato	100 a	ND
	Controle	97,5 ± 1,42 a	ND
7	Fungo	89,17 ± 2,83 b	ND
	Nim	93,33 ± 2,27 b	ND
	Fungo + Nim	85 ± 3,26 c	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND
10	Fungo	93,33 ± 2,27 b	ND
	Nim	88,33 ± 2,93 c	ND
	Fungo + Nim	87,5 ± 3,01 c	ND
	Alginato	100 a	ND
	Controle	100 a	ND

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

Com as médias de sobrevivência larval de Fungo + Nim 10%, durante os quatro tempos de persistência mais o primeiro teste (T0), foi realizada uma análise de regressão linear. A análise foi considerada significativa (F= 31,65; P<0,05), com 91,34 da variância explicada pela reta de regressão $y = 9,5517x - 0,1586$ (Figura 18).

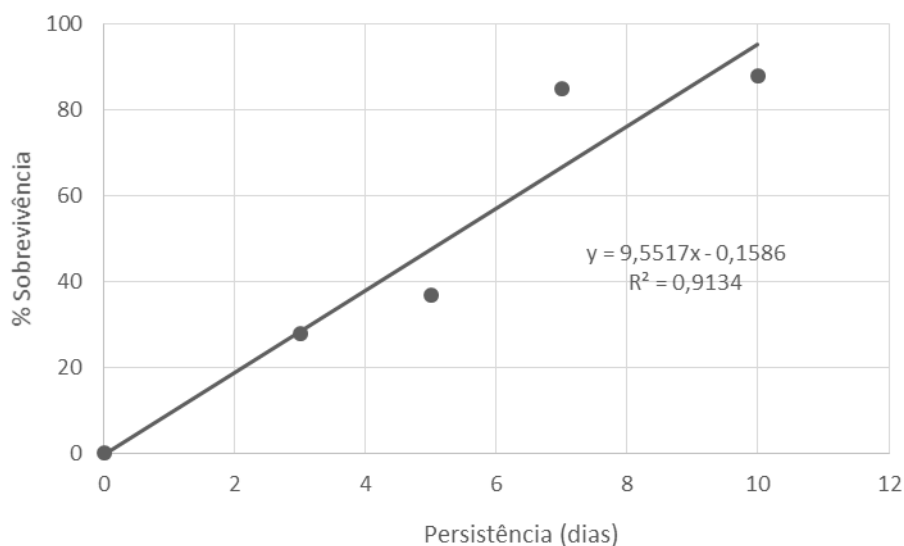


Figura 18. Análise de regressão linear entre sobrevivência de larvas de *A. aegypti* e a persistência em dias de cápsulas com fungo + Nim a 10%.

5.5 Avaliação de sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao Fungo encapsulado com óleo de Nim a 10% em condições de semicampo

A sobrevivência larval foi avaliada por sete dias consecutivos durante o ensaio de semicampo. Após o período de avaliação, o tratamento com Fungo encapsulado junto ao Nim 10% apresentou médias de 13,33% e 8,33% de sobrevivência para o sexto e sétimo dia, tendo atingido a média de sobrevivência ao quinto dia. Tal resultado mostrou-se estatisticamente diferente do tratamento apenas com Fungo, o qual apresentou médias de 75% e 65,83% para os mesmos dias (Figura 19).

No tratamento com cápsulas contendo somente óleo de Nim foi observada taxa de 93,33% de sobrevivência ao fim do ensaio, não diferindo estatisticamente dos tratamentos Controle e Alginato, com médias de 100% de sobrevivência (Tabela 9).

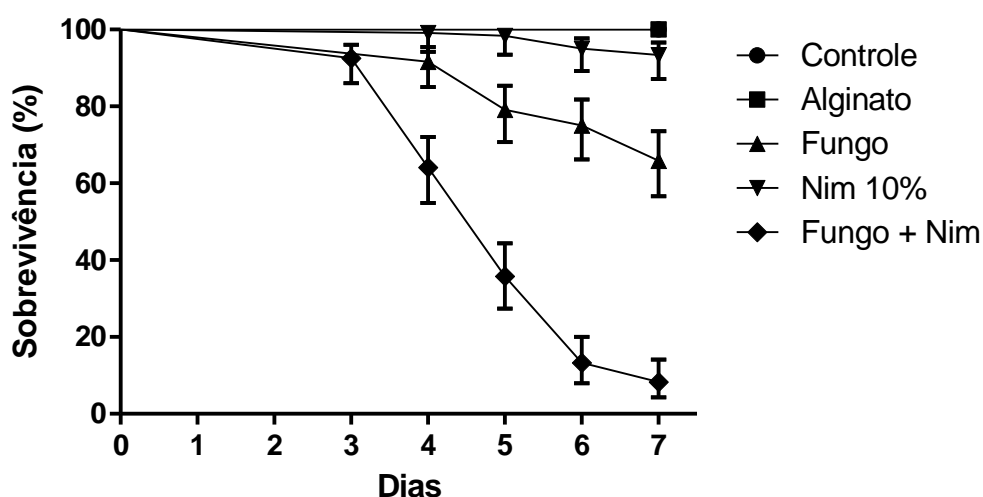


Figura 19. Sobrevivência diária (%) de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao Nim encapsulado na concentração de 10% durante 7 dias em condições de semicampo. Foram realizadas 3 repetições utilizando 40 larvas por repetição.

As curvas de sobrevivência das larvas expostas a cápsulas com Fungo, Nim 10% e Fungo + Nim 10% foram estatisticamente diferentes pelo teste Log Rank ($P < 0.0001$), assim como os tratamentos, estatisticamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{4,14} = 72,34$; $P < 0,05$).

Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência, desvio padrão e tempo médio de sobrevivência de larvas expostas ao fungo encapsulado com Nim a 10% em condições de semicampo.

Tratamentos	% Sobrevivência \pm Desv. Pad.	S ₅₀
Fungo	65,83 \pm 4,32 b*	ND**
Nim	93,33 \pm 2,27 a	ND
Fungo + Nim	8,33 \pm 2,52 c	5
Controle	100 a	ND
Alginato	100 a	ND

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

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de metodologias de intervenção sobre as populações de *A. aegypti* tornou-se o interesse de pesquisadores e organizações nacionais e internacionais de saúde pública com o objetivo de impedir a circulação viral e a disseminação da dengue. Como principal estratégia de combate ao mosquito tem sido orientado o uso integrado de várias técnicas de controle disponíveis e recomendada utilização mais ampla de produtos biológicos nos programas de combate ao vetor, a fim de reduzir ou até substituir a utilização de inseticidas químicos (Teixeira *et al.*, 1999; Barreto & Teixeira, 2008; Guirado *et al.*, 2009).

O potencial de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos vetores de doenças vem sendo evidenciado através de muitos trabalhos científicos, já tendo sido demonstrado sua virulência sobre todos os estágios de desenvolvimento de mosquitos, desde o ovo até o adulto (Scholte *et al.*, 2004; Scholte *et al.*, 2005; Luz *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2013). A fim de aumentar a eficácia de micoinseticidas e acelerar o processo infeccioso de micro-organismos entomopatogênicos, estratégias baseadas na combinação de inseticidas químicos e agentes de controle biológico surgiram como uma interessante alternativa aos métodos convencionais de controle, permitindo, deste modo, a utilização de baixas concentrações de químicos e a redução de impactos ambientais. Nesta abordagem, doses subletais de inseticidas agem como causadores de estresse,

alterando o comportamento do inseto e conduzindo a um melhor desempenho do entomopatógeno, permitindo, assim, uma diminuição do intervalo entre sua aplicação e a morte do hospedeiro, um dos maiores entraves para a aplicação de fungos filamentosos no controle biológico de insetos (Quintela & McCoy, 1998; Farenhorst *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2011).

Espécies vegetais são consideradas fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, uma vez que evoluem simultaneamente com insetos e outros micro-organismos, produzindo substâncias específicas em resposta ao ataque de patógenos (Simas *et al.*, 2004). A azadiractina, componente biologicamente ativo predominante em semente, folhas e outras partes da árvore de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), é utilizada como princípio ativo de diversos produtos comerciais para controle de insetos (Mulla & Su, 1999). Contra mosquitos, a eficácia desse metabólito foi verificada através de uma série de metodologias e ensaios, constatando-se significativa redução de sobrevivência de larvas expostas às suas diferentes formulações, com expressivos efeitos de retardamento do crescimento nos últimos estádios larvais (Nathan *et al.*, 2005; Ndione *et al.*, 2007; Dua *et al.*, 2009; Anjali *et al.*, 2012).

Diante do potencial de *M. anisopliae* e da comprovada eficácia de produtos à base de Nim sobre o desenvolvimento de mosquitos vetores de doenças, Gomes (2012) avaliou a toxicidade de diferentes concentrações de óleo de Nim sobre larvas de *A. aegypti*, assim como a sobrevivência das larvas expostas ao Nim associado ao fungo entomopatogênico em questão. Constatou-se que tanto as formulações de *M. anisopliae* quanto as de Nim foram tóxicas para larvas do mosquito, estando as maiores taxas de mortalidade relacionadas às maiores concentrações. Quando combinados, apresentaram efeito sinérgico, com taxas de mortalidade larval significativamente maiores quando comparadas aos tratamentos com fungo e Nim manipulados isoladamente.

O processo infectivo de fungos entomopatogênicos é baseado em três fases subsequentes. A primeira é caracterizada pela adesão e germinação dos conídios na cutícula do inseto, seguida da penetração do tegumento através do tubo germinativo. Por fim, após invadir a hemocele, ocorre o desenvolvimento do fungo na hemolinfa (colonização), levando à morte do hospedeiro (Charnley, 2003). Acredita-se que, ao atuar como regulador de crescimento, o óleo de Nim enfraquece o sistema de defesa da cutícula do inseto e assim facilita a

penetração de *M. anisopliae*, permitindo a interação sinérgica entre os dois agentes e reduzindo a sobrevivência de larvas expostas à combinação fungo e óleo vegetal.

Tendo como base o comprovado sinergismo entre óleo de Nim e o fungo *M. anisopliae*, buscou-se neste trabalho o desenvolvimento de uma metodologia prática e de possível aplicação em campo, baseada na produção de microcápsulas contendo diferentes concentrações do óleo vegetal e conídios do entomopatógeno. A aplicação comercial de bioinseticidas requer uma formulação compatível com seu princípio ativo e principalmente uma que o proteja contra a degradação e efeitos do ambiente externo. A técnica de liberação controlada a partir de material encapsulado permite a utilização mais eficiente dos agentes ativos, facilita a manipulação e aplicação prática desses materiais. Além disso, tal tecnologia de microencapsulação tem se mostrado, no caso de inseticidas, um dos métodos mais apropriados para redução de toxicidade para organismos não-alvos (Kumbar *et al.*, 2001; Liu & Liu, 2009b; Devi & Maji, 2011; Jerobin *et al.*, 2012).

Os resultados de sobrevivência evidenciaram que as concentrações preestabelecidas de 1%, 5% e 10% do óleo vegetal de Nim, quando encapsulado, não alteraram significativamente as taxas de sobrevivência diária ou média de sobrevivência das larvas. Também não foi considerada expressiva a queda de sobrevivência quando larvas foram expostas aos conídios encapsulados isoladamente, apresentando média de sobrevivência de 82,5% durante os bioensaios. Em contraste, a sobrevivência larval foi drasticamente reduzida após a exposição aos tratamentos contendo cápsulas dos dois agentes combinados, com maior mortalidade observada nas combinações com óleo de Nim a 5% e 10%, com média de 2 dias de sobrevivência para a última concentração. Os resultados encontrados neste trabalho vão ao encontro dos obtidos por Gomes (2012) e mostram que, mesmo encapsulado, o sinergismo entre o entomopatógeno e o óleo vegetal foi mantido.

Um dos desafios enfrentados durante a produção de bioinseticidas para o controle de insetos é a manutenção de sua atividade e sua vida útil na prateleira (Liu & Liu, 2009a; Liu & Liu, 2009b). Formulações de fungos entomopatogênicos em óleo sintético vêm sendo utilizadas com o objetivo de aumentar a persistência e a virulência dos fungos, com positivos resultados encontrados sobre larvas e

adultos de mosquitos (Mnyone *et al.*, 2010; Bukhari *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2011). A fim de monitorar a persistência de *M. anisopliae* em condições simuladas de campo e deste modo controlar fêmeas adultas de *A. aegypti*, Carolino *et al.* (2014) utilizaram panos pretos impregnados com conídios do fungo formulado em uma mistura entre óleo vegetal e sintético (isoparafina). Conídios provenientes de panos mantidos de 2 a 18 dias em área externa foram capazes de causar redução de sobrevivência entre 28% e 60%, taxas consideradas significativamente diferentes dos controles, com 76% de sobrevivência, evidenciando o considerável aumento da persistência desse entomopatógeno. Nas cápsulas produzidas com conídios e óleo de Nim, além da proteção conferida pelo biopolímero (alginato de sódio), o óleo vegetal também atua como um adjuvante, contribuindo para a manutenção da viabilidade do fungo.

Durante a avaliação da persistência do material encapsulado sobre a sobrevivência das larvas de *A. aegypti* neste trabalho, pôde-se observar que a virulência da combinação fungo e óleo vegetal decresceu com o aumento do tempo de exposição das cápsulas ao ambiente antes do contato com as larvas. Apesar de estatisticamente diferentes dos resultados obtidos dos tratamentos controle e Alginato, as taxas de sobrevivência obtidas a partir dos ensaios com cápsulas contendo fungo + Nim a 1% e 5% não foram consideradas significativas, já que não reduziram nem em 50% a sobrevivência larval. Já cápsulas com fungo + Nim a 10% mantiveram sua persistência mesmo após 3 e 5 dias de exposição em água antes do contato com as larvas, levando as taxas de sobrevivência a 27,5% e 36,67%, ambas com média de 7 dias de sobrevivência. Para efeito de persistência, a maior concentração do óleo de Nim foi essencial para manutenção da infectividade da combinação entre os dois agentes biológicos.

A concentração de conídios é geralmente relacionada às taxas de sobrevivência, sendo baixas taxas de sobrevivência correlacionadas a altas concentrações de conídios (Mnyone *et al.*, 2009; Gomes, 2012). Porém, concentrações maiores não resultam em mortalidade crescente, sendo observada máxima redução nas taxas de sobrevivência ao se utilizar 2×10^{10} conídios m^{-2} (Scholte *et al.*, 2006). O desenvolvimento de um biopesticida está estreitamente relacionado à viabilidade econômica de sua produção, assim como do princípio ativo e dos adjuvantes utilizados no processo (Bettiol & Morandi, 2009). Durante a produção das cápsulas com conídios de *M. anisopliae* optou-se pela utilização de

“esporo grosso” por ser o produto retirado em maior quantidade durante a separação dos conídios do arroz, sendo a concentração de fungo estabelecida e utilizada de $2,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1} . Enquanto a concentração do entomopatógeno manteve-se constante, diferentes concentrações do óleo de Nim foram utilizadas, com redução gradativa da sobrevivência de larvas de acordo com o aumento da porcentagem de óleo vegetal nas cápsulas.

Para o desenvolvimento de uma tecnologia de controle mais efetiva e com baixo custo é necessário conhecer os fatores bióticos e abióticos do ecossistema onde se encontra a espécie alvo, além de se fazer necessário o conhecimento de aspectos básicos sobre a biologia e ecologia do vetor (Braga & Valle, 2007). A complexidade de um controle efetivo requer que o desenvolvimento de metodologias e formulações de bioinseticidas seja associado a testes de eficiência do produto tanto em laboratório quanto em simulações e condições de campo, a fim de levar o método desenvolvido a um nível mais aproximado às condições ambientais nas quais se desenvolve o vetor (Bettiol & Morandi, 2009; Moreira & Mansur, 2012). No presente trabalho, foram realizados testes de semicampo utilizando cápsulas contendo fungo + Nim a 10%, as quais forneceram melhores resultados durante os testes em condições de laboratório, apresentando maior redução de sobrevivência larval. Durante os bioensaios no semicampo, cápsulas contendo somente conídios do fungo apresentaram desempenho superior quando comparado a testes de laboratório, com 65,83% de sobrevivência larval após o período de avaliação. Cápsulas contendo fungo e óleo de Nim a 10% mantiveram a resposta positiva encontrada nos ensaios de laboratório, reduzindo a sobrevivência a 8,33%, com média de sobrevivência de 5 dias.

O principal objetivo deste estudo foi proporcionar uma nova ferramenta de controle biológico de larvas de *A. aegypti* através da proposta de encapsulamento dos conídios com diferentes concentrações do óleo vegetal de Nim. O desenvolvimento de novas metodologias de controle de mosquitos por meio da utilização de micro-organismos deve basear-se em princípios que os tornem práticos e de possível aplicação em campo, gerando produtos economicamente viáveis, que mantenham a viabilidade do patógeno e apresentem maior tempo de prateleira. Neste sentido, trabalhos complementares devem ser realizados, a fim de ampliar o conhecimento sobre os fatores diretamente relacionados à virulência,

persistência e viabilidade de entomopatógenos quando submetidos à tecnologia de microencapsulação.

7. CONCLUSÕES

- O óleo de Nim encapsulado nas concentrações de 1%, 5% e 10% não causou significativa queda de sobrevivência de larvas de *A. aegypti*;
- Conídios de *M. anisopliae* encapsulados não causaram uma redução significativa na sobrevivência de larvas de *A. aegypti*;
- O fungo encapsulado com óleo de Nim reduziu significativamente as taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti*, com aumento de concentração do óleo vegetal diretamente relacionado ao aumento de mortalidade;
- A persistência do fungo encapsulado com óleo de Nim foi mantida após três e cinco dias de exposição com a concentração de 10% do óleo vegetal. Não foi observada persistência quando o entomopatógeno foi encapsulado com óleo de Nim a 1% e 5%;
- O fungo encapsulado com óleo de Nim a 10% reduziu significativamente as taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* em condições de semicampo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albernaz, D.A.S., Tai, M.H.H., Luz, C. (2009) Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*. 23:141–147.
- Alves, S.B. (1998). *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba. 1163p
- Alves, S.B., Alves, L.F., Lopes, R.B., Pereira, R.M., Vieira, S. (2002) A. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). *Journal of Applied Entomology*. 126:504–509.
- Amsden, B. (1998) Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules*.31(23):8382–8395.
- Anjali, C., Sharma, Y., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2012) Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Management Science*. 68:158–163.
- Aragão, M.B. (1972) A resistência aos inseticidas e sua medida em mosquitos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 6(2):99-104.
- Barreto, M.L., Teixeira, M.G. (2008) Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados*, 22(64):53–72.
- Benita, J.P., Marchais, H., Rolland, H., Velde, V.V. (1996) Biodegradable microsphere: Advances in production technology. In: Benita, S. editor,

- “Microencapsulation: Methods and industrial application”. Marcel Dekker: New York. 43–44.
- Bettiol, W., Morandi, M.A.B. (2009) Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio ambiente. 341p.
- Boletim epidemiológico. (2015) Monitoramento dos casos de dengue e febre chikungunya até a Semana Epidemiológica 9, 2015. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil, 46, 8.
- Borges, R.A. *et al.* (2004) Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista de Patologia Tropical*. 33:91-104.
- Braga, I.A., Valle, D. (2007) *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 16 (4):279–293.
- Briegel, H. (1990) Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 36 (3):165–172.
- Brighenti, D.M., Carvalho, C.F., Carvalho, A.G., Brighenti, C.R.G. (2005). Eficiência do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) no controle da traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), *Ciências Agrotecnológicas*, 29:60-68.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C. (1998) Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*. 4 (4):605-613.
- Bukhari, T., Middelmann, A., Koenraadt, C.J.M., Takken, W., Knols, B.G.J. (2010) Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal*. 9, 22.
- Bukhari, T., Takken, W., Koenraadt, C.J.M. (2011) Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors*. 4, 23.
- Canyon, D.V., Hii, J.L.K., Müller, R. (1999) Adaptation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behavior in response to humidity and diet. *Journal of Insect Physiology*. 45 (10): 959–964.
- Capalbo, D.M.F., Vilas-Bôas, G.T., Arantes, O.M.N., Suzuki, M.T. (2005) *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 34:69-85.
- Carneiro, S.M.T. (2008) Efeito do Nim (*Azadirachta indica*) sobre Oídio e Antracnose. Londrina: IAPAR. (Informe de Pesquisa, 155).
- Carolino, A.T., Paula, A.R., Silva, C.P., Butt, T.M., Samuels, R.I. (2014) Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*. 7 (1):198–204.

- Ceausoglu, I., Hunkeler, D. (2002). A new microencapsulation device for controlled membrane and capsule size distributions. *Journal of Microencapsulation*. 19:725–735.
- Chan, L.W., Lim, L.T., Heng, P.W.S. (2000) Microencapsulation of oils using sodium alginate. *Journal of Microencapsulation*. 17:757–766.
- Chang, H.N., Seong, G.H., Yoo, I.K., Park, J.K., Seo, J.H. (1996) Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering*. 51 (2):157–162.
- Charnley, A.K. (2003) Fungal Pathogens of Insects: Cuticle Degrading Enzymes and Toxins. *Advances in Botanical Research*. 40:241-321.
- Chavasse, D.C., Yap, H.H. (1997) Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: WHO.
- Christophers, S.R. (1960) *Aedes aegypti*, The Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure. Cambridge: Cambridge University Press. 739p.
- Ciociola, J.R., Martinez, S.S. (2002) Nim: alternativa no controle de pragas e doenças. Belo Horizonte: EPAMIG. 24p.
- Clements, A.N. (1999) The biology of mosquitoes, vol. II. London: Chapman & Hall. 740p.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira R.L. (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 225p.
- Costa, E.L.N, Lucho, A.P.R., Fritz, L.L., Fiuza, L.M. (2009) Biotecnologia. Edição especial: Artrópodes e bactérias entomopatogênicas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 38:4-13.
- Devi, N., Maji, T.K. (2011) Neem Seed Oil : Encapsulation and Controlled Release - Search for a Greener Alternative for Pest Control. *Pesticides in the Modern World-Pesticides Use and Management*. 60:191–232.
- Dua, V.K., Pandey, A.C., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T., Dash, A.P. (2009) Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*. 8, 124.
- Eldridge, B.F., Edman, J.D. (2000) Medical Entomology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 659p.
- Farenhorst, M., Farina, D., Scholte, E.J., Takken, W., Hunt, R.H., Coetzee, M., Knols, B.G.J. (2008) African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 78(6):910–916.

- Farenhorst, M., Mouatcho, J.C., Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Coetzee, M. (2009) Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(41):17443–17447.
- Fernandes, C., Beserra, E., Jr, F.C. (2006) Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*.35(6):853–860.
- Forattini, O.P. (1962) Entomologia Médica. V.1 São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 506p.
- Fravel, D.R. (1985) Encapsulation of Potential Biocontrol Agents in an Alginate-Clay Matrix. *Phytopathology*. 75(7): 774-777.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 37:615-636.
- Gomes, S.A. (2012) Avaliação da toxicidade de extratos da alga *Laurencia dendroideae* e de *Azadirachta indica* (Nim) e sinergismo entre o óleo de nim e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti*. 70f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.
- Gubler, D.J., Clark G.G. (1995) Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*. 1:55-57.
- Gubler, D.J. (1998) Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3):442–450.
- Gubler, D.J. (2004) The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: Full circle? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27(5): 319–330.
- Guirado, M.M., Elly, H., Campos, M. (2009) Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera , Culicidae) Some aspects of the population control and resistance to insecticides in *Aedes*. *Instituto de Biociências, Letras E Ciências Exatas*. 6 (64):5–14.
- Halstead, S.B. (2008) Dengue virus-mosquito interactions. *Annual Review of Entomology*. 53:273–291.
- Hemingway, J., Ranson, H. (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*. 45:371–391.
- Honório, N.A., Castro, M.G., Barros, F.S.M., Magalhães, M.D.A.F.M., Sabroza, P.C. (2009) The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 25(6):1203–1214.

- Horta, M.A.P., Castro, F.I., Rosa, C.S., Daniel, M.C., Melo, A.L. (2011). Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to Temephos in Brazil: A Revision and New Data for Minas Gerais State *BioAssay*, 6: 7.
- Howard, A.F.V., N'Guessan, R., Koenraadt, C.J.M., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbéto, M., Takken, W. (2011) First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *Malaria Journal*. 10:24.
- Isman, M.B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 51:45–66.
- Jerobin, J., Sureshkumar, R.S., Anjali, C.H., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2012) Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers*. 90(4):1750–1756.
- Kogler, V., Franceschini, M., Vainstein, M.H., Camassola, M., Frazzon, A.P., Nakazoto, L., Castro, L. (2001) Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 23:32-37.
- Kraus, W. (1995) Biologically active ingredients. In: Schmutterer H. The Neem tree. Weinheim: VCH. 666p.
- Kumbar, S.G., Kulkarni, A.R., Dave, A.M., Aminabhavi, T.M. (2001) Encapsulation efficiency and release kinetics of solid and liquid pesticides through urea formaldehyde crosslinked starch, guar gum, and starch + guar gum matrices. *Journal of Applied Polymer Science*. 82:2863–2866.
- Lenteren, J.C., Godfray, H.C.J. (2004). European science in the Enlightenment and the discovery of the insect parasitoid life cycle in The Netherlands and Great Britain. *Biological Control*. 32:12–24.
- Lima, E.P., Paiva, M.H.S., Araújo, A.P., Silva, E.V.G., Silva, U.M., Oliveira, L.N., Santana, A.E.G., Barbosa, C.N., Neto, C.C.P., Goulart, M., Wilding, C.S., Ayres, C.F.J., Santos, M.A.V.M. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*. 4:5.
- Liu, C.P., Liu, S.D. (2009a) Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. *Journal of Microencapsulation*. 26(5):377–384.
- Liu, C.P., Liu, S.D. (2009b) Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the *Fungus Beauveria bassiana*. *Drying Technology*. 27: 747–753.
- Lucantoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P., Habluetzel, A. (2006). Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and Cell*. 38(6):361–371.
- Luz, C., Tai, M.H.H., Santos, H., Rocha, L.F.N., Albernaz, D.S., Silva, H.H.G. (2007) Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes*

- aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*. 44:799–804.
- Martínez, E. T. (2008) Dengue. *Estudos Avançados*.22(64):33–52.
- Ministério da Saúde. (2015). Larvicidas. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/632-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/11387-larvicidas>. Acesso em: 15/03/2015
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Lwetoijera, D.W., Mpingwa, M.W., Knols, B.G.J., Takken, W., Russell, T.L. (2009) Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*. 8:309.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Lwetoijera, D.W., Mpingwa, M.W., Simfukwe, E.T., Knols, B.G.J., Russell, T.L. (2010) Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malaria Journal*. 9:246.
- Mohanty, S.S., Raghavendra, K., Mittal, P.K., Dash, A.P. (2008) Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35:1199–1202.
- Mondego, J.M. (2011) Efeito de produtos a base de óleo de nim em diferentes formulações no controle de *Plutella xylostella* (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae), em couve. 100f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias, Jaboticabal.
- Mordue, A.J., Blackwell, A. (1993) Azadirachtin: an Update. *Journal of Insect Physiology*. 39:903-924.
- Moreira, M.F., Mansur, J.F. (2012). Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, 1–23.
- Mulla, M.S., Su, T. (1999) Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association*.15 (2):133–152.
- Mustafa, M.S., Rasotgi, V., Jain, S., Gupta, V. (2015) Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*. 71:67–70.
- Natal, D. (2002) Bioecologia do *Aedes aegypti*. *O Biológico*. 64(2): 205-207.
- Nathan, S.S., Kalaivani, K., Murugan, K. (2005) Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*. 96 (1):47–55.

- National Research Council: Neem: a tree for solving global problems. (1992) In: Report of an adhoc panel of the Board on Science and Technology for International Development. Washington: National Academy Press. 140p.
- Ndione, R.D., Faye, O., Ndiaye, M., Dieye, A., Marie, J. (2007) Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A . Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *Journal of Biotechnology*. 6 (24):2846–2854.
- Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., Filippis, M., Pereira, M., Schatzmayr, H.G.(2001) Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (7):925–6.
- Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., Schatzmayr, H.G., Santos, F.B., Araújo, E.S., Filippis, M., Teixeira Filho, G. (1999) Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 94(3):297–304.
- Nogueira, R.M.R., Eppinghaus, A.L.F. (2011). Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 106 (3), 255–6. 2011.
- Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Shatzmayr, H.G. (1990) Isolation of Dengue Virus Type 2 in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 85 (2): 253.
- Nota Técnica. (2010) Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. Disponível em <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/notas-tecnicas?download=31%3Anota-tecnica-isolamento-do-sorotipo-denv-4-em-roraimaac&start=40>. Acesso em 23/03/2015.
- Osanai, C.H., Travassos da Rosa, A.P.A., Tang, A.T., Amaral, R.S., Passos, A.D.C. e Tauil, P.L. (1983) Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*. 25:53-54.
- Okumu, F.O., Knols, B.G.J., Fillinger, U. (2007) Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*. 6:63.
- Park, J.K., Chang, H.N. (2000) Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances* 18:303–319.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2013) Efficiency of fungus-impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Letters in Applied Microbiology*. 57:157–163.
- Paula, A.R., Brito, E.S., Pereira, C.R., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: : prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*. 18:1017–1025.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Paula, C.O., Samuels, R.I. (2011) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide

- Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*4:8.
- Paula, H.C.B., Oliveira, E.F., Abreu, F.O.M.S., Paula, R.C.M., Morais, S.M., Forte, M.M.C. (2010) Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Pax et Hoffm. *Polímeros*, 20: 112–120.
- Pereira, C.R., Paula, A.R., Gomes, S.A., Pedra, P.C.O., Samuels, R. I. (2009) The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*. 19:881–886.
- Pereira, R.M., Roberts, D.W. (1991), Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* . *Journal of Economic Entomology*. 84:1657-61.
- Priest, F.G. (2000). Biodiversity of the entomopathogenic, endosporeforming bacteria. In: Charles, J.F., Delecluse, A., Nielsen-Le Roux C. (Ed.) Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 524p.
- Priest, F.G. (1992) Biological Control of Mosquitoes and other Biting Flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 72:357-369.
- Prophiro, J.S., Silva, O.S., Luna, J.E.D., Piccoli, C.F., Kanis, L.A., Silva, M.A.N. (2011). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44:300-305
- Quintela, E., McCoy, C. (1998) Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: curculionidae) treated with imidacloprid. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72 (3):220–30..
- Rabinovitch, L., Silva, C.M.B. e Alves, R.S.A. (2000). Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* Entomopatogênicos. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (eds.), Controle Biológico. Jaguariúna, EMBRAPA, p.17-90.
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H., Hemingway, J. (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*. 359:295-304.
- Ré, M.I. (1998) Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*. 16:1195-1236.
- Regis, L., Silva-Filho, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F. (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*. 17 (8):377–380.

- Risch, S.J. (1995) Encapsulation: overview of uses and techniques. In: Risch, S.J., Reineccius, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS. p.2-7.
- Rose, R.I. (2001) Pesticides and public health: Integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*. 7 (1):17–23.
- Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K., (2006). Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*. 51:331–357.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 81:245-246.
- Schmutterer, H. (1990) Properties of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*.35:271-297.
- Schmutterer, H. (2002) The neem tree (*Azadirachta indica*) and other Meliceous plants. In: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and other purposes. Mumbai: Neem Foundation.
- Scholte, E.J., Knols, B.G.J., Samson, R., Takken, W. (2004) Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*. 4:19.
- Scholte, E.J., Knols, B.G. J., Takken, W. (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*.91:43–49.
- Scholte, E.J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Knols, B. G. J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*. 308:1641–1642.
- Scholte, E.J., Njiru, B.N., Smallegange, R.C., Takken, W., Knols, B.G.J. (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*. 2: 29.
- Sezer, A.D., Akbuga, J. (1999). Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. *Journal of Microencapsulation*. 16:687–696.
- Shah, P.A., Pell, J.K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61:413-423.
- Siddiqui, B.S., Siddiqui, S., Faizi, S., Ghiasuddin. (1992) Constituents of *Azadirachta indica*: isolation and structure elucidation of a new antibacterial tetranortriterpenoid, mahmoodin, and a new protolimonoid, naheedn. *Journal of Natural Products*. 55 (3):303-10.
- Silva, H.H., da Silva, I.G. (1999) Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)

- em condições de laboratório. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32(4):349–355.
- Simas, N.K., Lima, C., Conceição, R., Machado, R., Martins, A. (2004) Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - Atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*. 27 (1):46–49.
- Soliman, E. (2013) Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*. 3 (1):48–55.
- Sota, T., Mogi, M. (1992a) Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes* (*Stegomyia*) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. *Oecologia*. 90(3), 353–358.
- Sota, T., Mogi, M. (1992b) Survival-Time and Resistance To Desiccation of Diapause and Nondiapause Eggs of Temperature *Aedes* (*Stegomyia*) Mosquitos. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*. 63(2):155–161.
- Sparks, R.E. (1981) Microencapsulation. In: Kirk-Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology, 3ed. New York : John Willey and Sons, v. 15, 470p.
- Su, T., Mulla, M.S. (1998) Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14:204-209.
- Teixeira, M. D. G., Barreto, M. L., Guerra, Z. (1999). Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico Do SUS*. 8(4): 5–33.
- Thomas, M.B., Blanford, S., Lomer, C.J., (1997) Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium Xavoviride*. *Biocontrol Science and Technology*. 7:327–334.
- Tsuji, K. (2001) Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. *Journal of Microencapsulation*, 18 (2):137–147.
- Vieira, L.P., Paula, A.R., Paula, C.O., Damatta, R., Samuels, R.I. (2013) Infection of *Aedes aegypti* (Diptera :Culicidae) larvae and Adults by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. *British Microbiology Research Journal*. 3 (3):309–317.
- WHO (2015) Dengue and dengue hemorrhagic fever. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 23/03/2015
- WHO. (2009) Dengue Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. França: New Edition. 160p.
- Wondji, C.S., Silva, W.A.P.P., Hemingway, J., Ranson, H., Karunaratne, S.H.P.P. (2008) Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Tropical Medicine and International Health*. 13:548–555.

Zimmermann, G., (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science* 37:375–379.