

O POTENCIAL DE BLASTOSPOROS DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* PARA O
CONTROLE DE LARVAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

SIMONE AZEVEDO GOMES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2019

O POTENCIAL DE BLASTOSPOROS DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* PARA O
CONTROLE DE LARVAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

SIMONE AZEVEDO GOMES

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

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

G633

Gomes, Simone Azevedo.

O potencial de blastosporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle de larvas do mosquito *Aedes aegypti* / Simone Azevedo Gomes. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

73 f.: il. Bibliografia: 47 - 73.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.

Orientador: Richard Ian Samuels.

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Mosquitos. 3. Blastosporos. 4. Persistência. 5. Óleo de nim. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

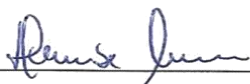
O POTENCIAL DE BLASTOSPOROS DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* PARA O
CONTROLE DE LARVAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

SIMONE AZEVEDO GOMES

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

Aprovada em 10 de abril de 2019

Comissão Examinadora:



Dr^a. Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



Prof. Milton Erthal Junior (D.Sc., Produção Vegetal) – IFFGuarus



Dr^a. Aline Teixeira Carolino (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



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

Ao Juarez Ogliari (*In Memoriam*) que sempre me incentivou e me fortalecerá nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTO

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

Aos órgãos de fomento CNPq e FAPERJ;

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

A Aline Teixeira Carolino pela coorientação e amizade;

A todos os professores que contribuíram para a minha formação com ensinamentos em disciplinas e bancas;

Aos colegas do laboratório, em especial a Aline, Cátia, Thaís, Denise, Verônica Thalles, Anderson, Adriano, Leila, Josiane, Ana Carolina, Patrícia pelos momentos de trabalho e descontração;

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

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

Ao Juarez Ogliari (*In Memoriam*), por sempre me incentivar nos estudos, sendo meu maior apoio nos momentos difíceis. Eu jamais poderia imaginar que nesse momento importante para mim você não estaria entre nós. Saudade eterna! Que seja feita a justiça Divina e dos homens!

SUMÁRIO

RESUMO.....	.vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Biologia do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	3
2.2 Doenças transmitidas por <i>Ae. aegypti</i>	5
2.3 Controle de <i>Ae. aegypti</i>	9
2.3.1 Controle Microbiano.....	10
2.3.2 Controle com inseticidas naturais.....	12
2.4 Tegumento dos insetos e atuação dos fungos entomopatogênico.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Obtenção de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	18
3.2 Produção de conídios e blastosporos de <i>M. anisopliae</i>	19
3.3 Preparação de óleo de nim e blastosporos.....	20
3.4 Montagem dos bioensaios.....	21
3.4.1 Bioensaios no laboratório.....	22
3.4.2 Bioensaios com blastosporos no campo Sol Indireto (Campo-SI) e Campo Sol Direto (Campo-SD).....	23
3.5 Encapsulamento de blastosporos e bioensaios de sobrevivência.....	24
3.6 Análise dos resultados.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Virulência de blastosporos e conídios no laboratório.....	26
4.2 Virulência de blastosporos em diferentes temperaturas no laboratório.....	27

4.3 Blastosporos no Campo-SI e Campo-SD.....	29
4.4 Persistência de blastosporos no laboratório.....	31
4.5 Persistência de blastosporos no Campo-SD.....	32
4.6 Toxicidade de diferentes concentrações do óleo de nim contra larvas em condições de laboratório.....	34
4.7 Efeito do óleo de nim no crescimento do fungo.....	35
4.8 Blastosporos suspensos com óleo de nim no Campo-SD.....	36
4.9 Encapsulamento de blastosporos.....	38
5. DISCUSSÃO.....	39
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

RESUMO

GOMES, SIMONE AZEVEDO; Blastosporos de *M. anisopliae* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2019; O potencial de blastosporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle de larvas do mosquito *Aedes aegypti*; Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels; Coorientadora: Dr^a. Aline Teixeira Carolino.

Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* transmitem os vírus que causam a dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana. Métodos alternativos de controle do vetor, como a utilização de fungos entomopatogênicos, mostram-se promissores. Este trabalho teve por objetivo verificar a virulência de blastosporos do fungo *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Ae. aegypti*. Para a realização dos bioensaios, as larvas foram obtidas de ovos coletados no campo. Dez larvas foram inseridas em copos plásticos com 50 mL de suspensões de propágulos fúngicos (1×10^7 propágulos mL⁻¹). Os bioensaios para comparar a virulência dos conídios e blastosporos foram conduzidos apenas em laboratório. As larvas expostas aos blastosporos apresentaram 100% de mortalidade no segundo dia e as expostas aos conídios no sexto dia de avaliação. Os bioensaios com blastosporos também foram conduzidos em condições de campo “sol indireto” (campo-SI) e campo “sol direto” (campo-SD). Na condição campo-SI as larvas apresentaram 100% de mortalidade no terceiro dia de avaliação. Na condição de campo-SD foi observado que apesar do estresse promovido pela exposição a altos níveis de radiação solar, o fungo manteve sua eficiência com 0,8% de

sobrevivência das larvas ao final de sete dias de avaliação. Nos bioensaios de persistência da virulência os blastosporos foram adicionados em todos os copos. No primeiro bioensaio (zero hora) as larvas foram adicionadas nos copos logo após o preparo dos blastosporos e nos demais bioensaios aos 3, 6, 9 e 12 dias após o preparo da suspensão de blastosporos. Na condição de laboratório as larvas adicionadas aos copos no bioensaio zero hora apresentaram 100% mortalidade no quinto dia. Na condição de campo-SD, a sobrevivência das larvas adicionadas logo após o preparo da suspensão fúngica foi de apenas 1% ao final de sete dias de avaliação. No campo, a sobrevivência das larvas aumentou com o passar dos dias. Para os experimentos de sinergismo com óleo de nim + fungo, uma baixa concentração de nim (0,01%) foi adicionada à suspensão dos blastosporos (1×10^5 blastosporos mL^{-1}) e os bioensaios foram realizados na condição de campo-SD. A sobrevivência das larvas foi apenas 5.8% ao final de 7 dias de avaliação. Os resultados demonstraram que blastosporos de *M. anisopliae* são mais virulentos que conídios visando o controle de larvas silvestres de *Ae. aegypti*. Blastosporos permaneceram virulentos em experimentos realizados em condições de campo-SID e campo-SD. A virulência de blastosporos na condição de campo-SD diminuiu ao longo dos dias. O uso de blastosporos junto com óleo de nim aumentou a mortalidade. A utilização de aditivos junto com as suspensões de blastosporos, como óleos emulsionáveis pode favorecer a estabilidade do fungo em condições adversas.

ABSTRACT

GOMES, SIMONE AZEVEDO; *Metarhizium anisopliae* blastospores for the control of *Aedes aegypti* larvae; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April 2019; The potential of blastospores of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* larvae; Supervisor: PhD. Richard Ian Samuels. Co-supervisor: PhD. Aline Teixeira Carolino.

Mosquitoes of the species *Aedes aegypti* transmit the viruses that cause dengue, Zika, chikungunya and urban yellow fever. Alternative methods of vector control, such as the use of entomopathogenic fungi, are promising. This work aimed to verify the virulence of blastospores of the fungus *Metarhizium anisopliae* against *Ae. aegypti*. For the bioassays, larvae were obtained from eggs collected in the field. Ten larvae were inserted into plastic cups with 50 mL suspensions of fungal propagules (1×10^7 mL⁻¹ propagules). Bioassays to compare the virulence of conidia and blastospores were conducted only in the laboratory. Larvae exposed to blastospores showed 100% mortality on the second day and those exposed to conidia 100% mortality on the sixth day of evaluation. Blastospore bioassays were also conducted under "indirect sunlight" field conditions (IS) and "direct sunlight" field (DS). In the IS field-condition, the larvae showed 100% mortality on the third day of evaluation. In the DS-field condition, it was observed that despite the stress promoted by exposure to high levels of solar radiation, the fungus maintained its efficiency with 0.8% larval survival at the end of seven days of evaluation. In the persistence of virulence bioassays, blastospores were added in all the recipients at the same time. In the first bioassay (zero hour) the larvae were added to the

flasks soon after the preparation of the blastospores and in the other bioassays larvae were added to the recipients at 3, 6, 9 and 12 days after the preparation of the blastospore suspension. In the laboratory, the larvae added to the cups at zero hours presented 100% mortality on the fifth day. In the DS-field condition, the survival of the larvae added shortly after the preparation of the fungal suspension was only 1% at the end of seven days of evaluation. In the field, the survival of the larvae increased with the passage of time. For synergism experiments, neem oil (0.01%) was added to the blastospore suspension (1×10^5 blastospore mL^{-1}) and the bioassays were performed in DS-field conditions. Survival was only 5.8% at the end of 7 days of evaluation. The results demonstrated that blastospores of *M. anisopliae* are more virulent than conidia when aiming to control field strains of *Ae. aegypti* larvae. Blastospores remained virulent in experiments performed under ID sunlight and DS-field conditions. The virulence of blastospores in the DS-field condition decreased over time. The use of blastospores together with neem oil increased mortality. The use of additives together with blastospore suspensions such as oil emulsions may aid the stability of the fungus under adverse conditions.

1. INTRODUÇÃO

A diminuição da população de mosquitos é o método mais eficaz para reduzir as incidências das doenças transmitidas por esses insetos. A estratégia global mais utilizada para o controle é a utilização de inseticidas sintéticos (Luz et al., 2009). No entanto, a forte dependência por inseticidas tem levado à seleção de mosquitos resistentes (Liu et al., 2011).

Alguns produtos naturais derivados de microrganismos e plantas são utilizados como alternativa aos inseticidas convencionais (Quesada-Moraga et al., 2006). Outra possibilidade é o uso de controle biológico. Nesse sentido, as bactérias e os fungos entomopatogênicos são os mais utilizados. No grupo das bactérias encontram-se as duas espécies mais estudadas e utilizadas, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus*, que possuem propriedades larvicidas (Polanczyk et al., 2003). Entretanto, foi mostrado que as larvas de *Ae. aegypti* podem apresentar resistência ao Bti (Paris et al., 2011).

Os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são agentes promissores para o controle biológico de insetos agrícolas e vetores de doenças para humanos. O fungo *M. anisopliae* é virulento contra larvas e adultos de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (Pereira et al., 2009; Paula et al., 2008). Além disso, este fungo também é capaz de matar adulto e estágios larvais de mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex* (Scholte et al., 2004).

O fungo *M. anisopliae* produz esporos denominados conídios que aderem à cutícula do inseto alvo, germinam na superfície e penetram o tegumento utilizando uma estrutura infecciosa chamada de apressório (Zhang, 2010). Após penetrar o apressório dá origem a hifas espessas que se ramificam dentro do

tegumento e invadem a hemocele onde as terminações das hifas dão origem aos blastosporos (Miranpuri e Khachatourians. 1990). Em condições de laboratório os fungos são capazes de formar micélios e blastosporos a partir de conídios, em meios líquidos nutritivos (Holder et al., 2007). Blastosporos possuem características hidrofílicas e, desta forma, em ambiente aquoso são capazes de dispersarem e interagir com o tegumento das larvas de mosquitos (Miranpuri e Khachatourians, 1990).

A utilização de produtos derivados de plantas também é uma alternativa para reduzir o uso de inseticidas. A planta nim (*Azadirachta indica*) é capaz de controlar grande número de pragas por meio de uma gama de compostos bioativos (Mossini e Kemmelmeier, 2005). Muitas formulações com óleo de semente de nim possuem atividade ovicida e larvicida de insetos com importância médica e veterinária (Benelli et al. 2015; Mehlhorn, 2011). O nim tem vantagem de ser não tóxico ao homem e ser rapidamente degradado no solo (Isman, 2006). Uma formulação elaborada com os óleos de neem (*Azadirachta indica*) e karanj (*Pongamia glabra*) foi testada contra larvas de *A. aegypti* e *Ae. albopictus* (Maheswaran e Ignacimuthu, 2012). Trabalho realizado por Gomes et al., (2015) também demonstrou que larvas de *Ae. aegypti* tiveram a sobrevivência reduzida quando expostas a baixas concentrações do óleo de nim.

O presente trabalho objetivou investigar a virulência de conídios e blastosporos do fungo *M. anisopliae* contra larvas de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* provenientes de ovos coletados no campo. Também foi investigada a virulência de blastosporos em condições simulando campo, com exposição indireta e direta ao sol. Foi investigada a persistência da virulência de blastosporos no laboratório e no campo e a virulência de blastosporos suspensos com óleo de nim no campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia do mosquito *Ae. aegypti*

Os mosquitos são insetos pertencentes à Ordem Diptera e à Família Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. Os mosquitos são insetos holometábolos com o ciclo de vida dividido nas fases de ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas do *Ae. aegypti* podem colocar cerca de 150 ovos ao longo da vida, distribuindo esses ovos em diversos criadouros (Figura 1).

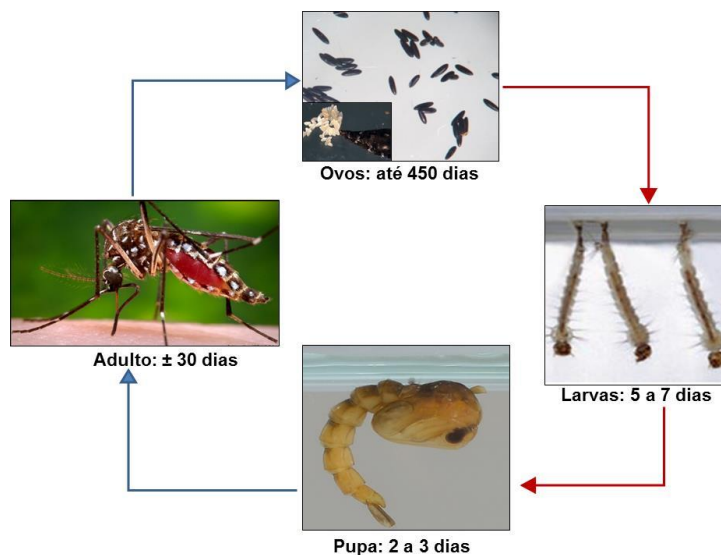


Figura 1. Ciclo de vida dos mosquitos.

Os mosquitos fêmeas após a cópula buscam sangue para obter as proteínas necessárias para a produção dos ovos e é nessa etapa que adquirem os vírus e protozoários presentes no animal que podem ser transmitidos ao ser

humano. Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* alimentam-se mais de uma vez antes de estarem totalmente ingurgitados e assim podem transmitir vírus para várias pessoas (FIOCRUZ, 2016).

Dois dias após a alimentação sanguínea os mosquitos buscam recipientes com água para oviporem e os ovos são colocados cerca de 1 a 2 milímetros acima da lâmina da água (Roberts e His, 1977). As larvas eclodem e passam por quatro estádios de desenvolvimento que duram entre 5 a 7 dias, se transformam em pupas entre 2 a 3 dias, que originam os adultos que podem viver por mais de 30 dias (Consoli e Oliveira, 1998).

A fase larval do inseto é um período de rápido desenvolvimento em que as larvas passam o maior tempo se alimentando de matéria orgânica e microrganismos presentes na água (Brasil, 2001). O tamanho dos adultos é determinado durante o estágio larval aquático e a competição entre larvas por comida influencia o tamanho da pupa e, portanto, do adulto (Steinwascher, 2018). O tamanho da fêmea adulta afeta seu sucesso, aptidão e capacidade de transmitir doenças.

As pupas possuem o aspecto de vírgula e cessam a alimentação devido ao período de metamorfose para o estágio adulto. Normalmente ficam paradas na superfície da água e somente se movimentam quando perturbadas (Mardondes, 2001). Além de ser o vetor de arboviroses, *Ae. aegypti* também perturba a vida humana com as picadas que podem acontecer principalmente ao longo do dia (Widiyanti e Muyadihardja, 2004). Mas, na falta do hospedeiro o hábito de picar pode ser estendido para o período noturno (FIOCRUZ, 2008).

O tempo do ciclo de vida de *Ae. aegypti* está relacionado diretamente com a temperatura ambiental. Segundo Silveira-Neto et al., (1976), a temperatura é um dos principais fatores ecológicos que influi sobre o desenvolvimento e a alimentação dos insetos. Em condições de laboratório, a faixa de temperatura favorável ao ciclo de vida das populações de *Ae. aegypti* encontra-se entre 22°C e 30°C, e os extremos de temperatura de 18°C e 34°C apresentaram efeitos negativos sobre o desenvolvimento e a fecundidade do inseto (Bezerra et al. 2006).

Os mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* infectaram mais de 400 milhões de pessoas por ano no mundo inteiro com patógenos virais, incluindo dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana (Matthews et al., 2018). Alguns países estão

sofrendo com uma série de surtos dessas doenças e, portanto, é preciso entender melhor as distribuições atuais dos vetores para a implantação de programas de vigilância e controles bem-sucedidos (Kamal et al., 2018).

A faixa de adequação de habitat das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* é a mais ampla de todos os tempos, ocorrendo em todos os continentes, incluindo América do Norte e Europa (Kraemer et al., 2015). O clima é determinante para o habitat dos mosquitos (Hopp e Foley, 2001) e espera-se que as mudanças climáticas alterem significativamente a distribuição geográfica desses vetores e coloque em risco novas regiões (Valdez et al., 2018). Enquanto a temperatura rege suas taxas de reprodução, maturação e mortalidade, as chuvas geram criadouros de larvas e pupas (Bar-Zeev, 1958). Os mosquitos também se alimentam de sangue de outros animais quando não encontra o ser humano, mas os mecanismos que mediam estas mudanças e as preferências por certos indivíduos dentro de uma espécie não são esclarecidos (Vinauger et al., 2018).

2.2 Doenças transmitidas por *Ae. aegypti*

Ae. aegypti é o principal vetor do vírus que causa a dengue, uma doença que é um grande problema de saúde pública em países subtropicais e tropicais (Rodrigues et al., 2015). A dengue é endêmica em mais de 100 países e sua incidência aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos (WHO, 2012). A transmissão da dengue ocorre com a interação entre pessoas, mosquitos e fatores ambientais (Stoddard et al., 2013).

No Brasil, os primeiros casos de dengue ocorreram no final do século XIX, com casos no Rio de Janeiro (RJ) e Curitiba (PR) e o vírus foi predominante por mais de 40 anos com surtos periódicos (Donalísio et al., 2017). A dengue é a arbovirose que tem maior número de casos no mundo e estima-se que a doença atinja em torno de 50 milhões de casos por ano e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas (Rodríguez-Morales, 2015). Todos os quatro sorotipos existentes no Brasil estão circulando, sendo distribuídos em praticamente todo o território (Pinto Junior, 2014).

Dengue é uma doença febril aguda e o agente etiológico é um vírus formado por RNA que possui quatro sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-

3 e DENV-4 (Brasil, 2014). O quinto sorotipo DENV-5 foi isolado em outubro de 2013 em amostras virais de um agricultor de 37 anos na Malásia. No início pensava-se que era DENV-4 silvestre que circula entre primatas e mosquitos *Aedes nivalis* nas florestas do Sudeste Asiático, mas uma análise genética demonstrou que era outro vírus (Normile, 2013). Globalmente, dengue é a arbovirose mais importante, porque a incidência de infecções tem aumentado, tem uma ampla distribuição geográfica, e pode progredir para formas graves e letais (WHO, 2015).

No ciclo de transmissão do vírus da dengue a fêmea do mosquito da espécie *Ae. aegypti* adquire o vírus ao sugar o sangue de um indivíduo infectado em estado de viremia, que corresponde ao estágio febril (Araujo, 2011). O vírus é incubado no inseto por um período que dura de 8 a 12 dias, em média (Gubler, 1998). Após esse período, a fêmea infectada, em nova refeição, transmite o vírus ao picar um novo indivíduo e a partir de então, começa o período de incubação do vírus no humano que é de aproximadamente de 5 a 6 dias, e em seguida o indivíduo entra em viremia (Araújo, 2018).

A infecção inicial por dengue pode ser assintomática (de 50 a 90% dos casos) ou pode apresentar sintomas e é denominada de dengue clássica. (Rajadhyaksha e Mehra, 2012). Os sintomas variam desde febre alta, dor em todo corpo (cabeça, músculos, fraquesa, vômito, dor de garganta, paladar alterado e manchas avermelhadas na pele) (Kanungo et al., 2008). Pequena porcentagem de pessoas que anteriormente tenham sido infectadas por um sorotipo de dengue podem apresentar sangramento quando são infectadas com outro sorotipo (Malarvizhi e Malarvizhi, 2019).

Estudos têm sido conduzidos para reduzir a incidência da doença dengue e para isso foi aprovada no Brasil, em dezembro de 2015, a primeira vacina (CYD-TDV) para prevenção da dengue, desenvolvida pela Sanofi Pasteur (Godói et al., 2017). Todavia, as melhorias nas técnicas da formulação das vacinas continuam e, assim pode-se esperar por um futuro sem o vírus da dengue (Rather et al., 2017).

Outro vírus que é transmitido por *Ae. aegypti* e que também está presente em vários países é o vírus Zika. O vírus Zika foi isolado pela primeira vez em 1947 de macacos Rhesus e em 1948 de habitantes da floresta Zika na Uganda, no Continente Africano. O vírus Zika foi descoberto quando se buscava identificar

o vírus da febre amarela que já tinha sido identificado nessa floresta onde o mosquito vetor estava presente (Dick et al., 1952). O maior surto de Zika, até a presente data, ocorreu entre outubro de 2013 e abril de 2014, na Polinésia Francesa e, no mesmo período, foi relatado um aumento na síndrome de Guillain-Barré, sugerindo uma possível associação entre o vírus Zika e essa doença (Cao-Lormeau et al., 2016).

Estudo realizado por Gourinat et al. (2015), na Polinésia Francesa, demonstrou que o RNA do vírus Zika foi detectado na urina de um homem adulto com carga mais elevada que no soro sanguíneo. O vírus Zika também foi detectado no sêmen, mas no mesmo período, não foi detectado em amostra de sangue, sugerindo que a replicação do vírus pode ocorrer no trato genital e poderia ser transmitido por contato sexual (Musso et al., 2015a). A infecção por vírus Zika pode ser confundida com outras doenças, especialmente dengue e chikungunya (Musso et al., 2015b). Os sintomas da doença Zika são erupções cutâneas, dores nas articulações, e conjuntivite (Hayes, 2009).

Segundo Tizzot (2016), existem várias hipóteses para a introdução do vírus Zika no Brasil. A vinda de participantes e visitantes na copa do mundo, campeonato mundial de canoagem no Rio de Janeiro, ambos em 2014, ou viajantes que vieram do Chile. A infecção por vírus Zika foi relatada pela primeira vez no Brasil em março de 2015 em Camaçari no Estado da Bahia, (Campos, 2015). O vírus que foi introduzido no Brasil em 2014, após estudo filogenético, demonstrou ser mais próximo do encontrado na Polinésia Francesa (Musso, 2015). Segundo Aguiar et al., (2018), estima-se que 65 milhões de pessoas no Brasil vivem em áreas de alto risco de Zika. O vírus Zika foi relacionado aos diversos casos de microcefalia em recém-nascidos (Bogoch et al., 2016; Schuler-Faccini, et al., 2016). A microcefalia é resultante do desenvolvimento anormal do cérebro em fetos de mães infectadas pelo vírus. O Ministério da Saúde do Brasil confirmou a relação entre o vírus Zika e o nascimento de crianças com microcefalia (Nunes et al., 2016) e em outubro de 2015 relatou um surto de microcefalia no Estado de Pernambuco com aumento de 26 vezes o número de casos da doença (Butler, 2016).

O vírus Zika também foi apontado como potencial causador da doença neurológica conhecida como síndrome de Guillain-Barré (Brasil et al., 2016). A doença causa fraqueza muscular e se manifesta com o ataque do sistema nervoso

por anticorpos produzidos pelo organismo após um quadro de infecção viral (Asbury et al., 1969). A síndrome de Guillain-Barré tem um prognóstico em que até 20% dos pacientes permanecem com deficiência grave e aproximadamente 5% morrem, mesmo submetidos à imunoterapia (Hughes, 2007).

Outra doença transmitida pelo mosquito *Ae. aegypti* é a chikungunya. O vírus foi isolado pela primeira vez durante um surto na Tanzânia, entre 1952 e 1953, e devido à gravidade da doença, ao aparecimento súbito e às dores nas articulações, um nome local foi aplicado e a doença se tornou conhecida como chikungunya, de significado "aquele que é contorcido" (Robinson, 1955). Desde 2013 a doença é relatada em 31 países das Américas (Staples e Fischer, 2014). A dispersão de *Aedes* pelo Sul da Europa e Continente Americano, associada à presença de indivíduos infectados procedentes de áreas endêmicas, favorece o estabelecimento de novas áreas de transmissão da doença (Tauil, 2014).

O primeiro caso da doença chikungunya relatado no Brasil foi em 2010, em um paciente após voltar de uma viagem a Sumatra (Indonésia), área endêmica para a infecção pelo vírus (Albuquerque et al., 2012). No Brasil, até 2016, ocorreram dois óbitos na Bahia e um no Sergipe, causados pela febre chikungunya. E, os indivíduos com idade avançada e com histórico de doenças crônicas preexistentes são mais susceptíveis à doença (Brasil, 2016).

Pacientes infectados com o vírus chikungunya relatam sintomas tais como dor de cabeça, fadiga, náuseas, vômitos e conjuntivite, e também manifestações neurológicas, tais como, a síndrome de Guillain-Barre (Powers, 2010). As pessoas infectadas com o vírus da chikungunya também podem apresentar artrite (Fuller et al., 2017).

Mosquitos do gênero *Aedes* também transmitem o vírus que causa a febre amarela. A febre amarela silvestre se mantém endêmica nas florestas tropicais da América e África, causando periodicamente surtos isolados ou epidemias (Monath, 2001). Na África, o vírus da febre amarela silvestre é transmitido por várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes africanus*, *Aedes furcifer* e *Aedes simpsoni*. Enquanto nas Américas os mais importantes transmissores são mosquitos das espécies *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, e *Sabethes chloropterus* (WHO, 1986).

O vírus da febre amarela pode ser transmitido através de um ciclo envolvendo primatas não-humanos e mosquitos (conhecidos como transmissão silvestre) e um ciclo envolvendo humanos e mosquitos (conhecido como transmissão urbana). O vírus que causa a febre amarela silvestre no Brasil é transmitido por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* e o da febre amarela da forma urbana está associado à participação do vetor *Ae. aegypti* (Vasconcelos 2003).

Desde 2017, o Brasil vem enfrentando um dos surtos mais graves de febre amarela nas últimas décadas. Todos os casos confirmados da doença foram adquiridos por transmissão envolvendo o ciclo selvagem de febre amarela, não sendo evidenciado ainda *Ae. aegypti* infectado com o vírus da febre amarela nas pesquisas de vigilância entomológica (Chaves et al., 2018).

Portanto, é importante a implantação de medidas sanitárias que possam reduzir a densidade populacional desses insetos e consequentemente, melhorar a qualidade de vida das pessoas (Macoris et al., 2007; Lindsay et al., 2017).

2.3 Controle de *Ae. aegypti*

No Brasil, os agentes de saúde e a população são responsáveis por realizar o controle mecânico do mosquito, promovendo a retirada de ambientes propícios, natural ou artificial, para a proliferação do mosquito vetor. No entanto, o controle mecânico é ineficiente para evitar a proliferação de mosquitos e se faz necessária a utilização de inseticidas. O controle químico é uma das metodologias mais adotadas para matar larvas e adultos de insetos vetores e esses produtos podem ser neurotóxicos, análogos de hormônio juvenil e inibidores de síntese de quitina (Braga e Valle 2007).

Porém, as consequências ambientais, as restrições legais e a resistência a inseticidas intensificaram os esforços para desenvolver agentes de controle biológico para o controle de vetores e pragas agrícolas (Lacey e Undeen, 1986). Pesticidas convencionais como DDT e piretroides são geralmente usados para controle de mosquitos, mas podem causar problemas como poluição ambiental, efeitos residuais e selecionar mosquitos resistentes (Kannathasan et al., 2011). No Brasil, o controle de *Ae. aegypti* é realizado principalmente por

organofosforados e piretroides que requerem monitoramento de resistência constante (Luna et al., 2004).

A eficácia da aplicação regular de inseticida na redução da população de mosquitos é questionável, uma vez que o horário da aplicação do inseticida nem sempre corresponde com o horário que o inseto busca por sangue e, além disso, muitos moradores não aceitam a aplicação no interior das residências devido à preocupação sobre a contaminação de itens domésticos por inseticidas (Pai e Hsu, 2013).

A utilização de forma intensiva de produtos químicos seleciona insetos resistentes a esses agentes de controle (Rose, 2001). A resistência tem base genética e precede a utilização de inseticidas. Contudo, como em geral não há pressão seletiva sobre essa característica, normalmente indivíduos resistentes são encontrados em baixa frequência nas populações. O que os inseticidas fazem é selecionar, nas populações, os indivíduos naturalmente resistentes, na medida em que eliminam os suscetíveis (Valle et al., 2015). Além disso, a alteração na membrana lipídica de mosquitos alimentados com sangue pode tornar esses mosquitos mais tolerantes aos inseticidas DDT e piretroides (Halliday e Feyereisen, 1987).

2.3.1 Controle Microbiano

Para reduzir o uso de inseticidas sintéticos, pesquisadores têm buscado bioinseticidas para o controle de larvas de mosquitos (Guirado e Bicudo, 2009). Os bioinseticidas mais utilizados são os micro-organismos que desenvolvem dentro do inseto hospedeiro, tais como vírus, bactérias, protozoários, fungos. Os nematóides, que não são micro-organismos são utilizados também como bioinseticidas (Parra et al., 2002).

A utilização de patógenos microbianos apresenta vantagens em relação aos inseticidas de largo espectro, pois não poluem o ambiente e não são tóxicos para o homem e outros animais (Alves, 1998). Entretanto, a cutícula do inseto é a primeira barreira física à infecção patogênica porque o ambiente da cutícula é inóspito para patógenos devido a baixa atividade de água, poucos nutrientes, e a presença de compostos antimicrobianos (Qu e Wang, 2018). Portanto, quando o

fungo invade o inseto, as moléculas presentes na parede celular do fungo podem ser reconhecidas por moléculas presentes no inseto e esse reconhecimento pode acarretar a formação de substâncias tóxicas que podem levar a morte do fungo (Binggeli et al., 2014). Os insetos também possuem mecanismos de defesa realizados pelos hemócitos que são células com capacidade fagocitária, que participam da cicatrização (melanização) e produzem compostos antimicrobianos (Contador e Zaragoza, 2019). Durante esse processo ocorre a destruição do patógeno invasor (Wang et al., 2017).

A bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) é um exemplo de um bioinseticida de sucesso utilizado no campo para o controle de larvas de mosquitos (Gunasekaran et al., 2004). No entanto, o uso contínuo levou a seleção de larvas de *Ae. aegypti* resistentes ao Bti (Paris et al., 2012).

Os fungos entomopatogênicos talvez sejam os mais adequados para o desenvolvimento como biopesticidas, porque eles não requerem a ingestão pelo hospedeiro, pois infectam via contato externo (Thomas e Read, 2007). Fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* e *B. bassiana* são patogênicos a várias espécies de insetos e têm sido utilizados como agente de biocontrole de pragas agrícolas (Sandhu et al., 2012). Esporos infectantes desses fungos afetam os estágios larval e adulto dos mosquitos, mas têm como limitação a baixa persistência do esporo infeccioso no ambiente (Alves et al., 2002; Scholte, et al., 2004).

A estratégia mais comum no uso de fungos entomopatogênicos para controlar insetos é a introdução inundativa, na qual se utiliza grandes quantidades do fungo para uma rápida supressão da população de insetos (Lacey et al., 2001). Um trabalho realizado por Paula et al. (2008) demonstrou que mosquitos adultos da espécie *Ae. aegypti* morreram após pousarem em tecido preto impregnado com conídios do fungo *M. anisopliae*. Machos de *Ae. aegypti* contaminados com o fungo *B. bassiana* transmitiram o fungo a fêmeas virgens durante o acasalamento e ocasionou 90% de morte em 15 dias (García-Munguía et al., 2011).

O fungo *Metarhizium spp.* é endêmico em todo o mundo e não é prejudicial para as aves, peixes e mamíferos, incluindo seres humanos (Zimmermann, 1993). Este fungo possui vários isolados de diferentes origens geográficas e diferentes hospedeiros (Roberts e St. Leger, 2004; Goettel e Inglis, 1997). Este fungo pode ser transmitido de machos para fêmeas durante tentativas

de acasalamento, o que pode ocasionar a redução da transmissão de doenças, diminuindo a longevidade de mosquitos fêmeas após o contato com machos contaminados por fungos (Reyes-Villanueva et al., 2011).

2.3.2 Controle com inseticidas naturais

Produtos naturais derivados de algas e plantas também são utilizados como alternativa a inseticidas sintéticos convencionais (Quesada-Moraga et al., 2006). O composto obtusol extraído da alga marinha *Laurencia dendroidea* foi tóxico para larvas de *Ae. aegypti*, o que comprovou que as algas são importantes fontes de bioinseticidas (Neto et al., 2016).

Produtos inseticidas de origem vegetal inibem algumas das funções vitais, tais como reprodução, alimentação, crescimento, antes de provocar a morte (Rodriguez e Vendramim, 1997). A espécie de planta *Schinus terebinthifolia*, popularmente conhecida como aroeira, tem mostrado eficiência no controle dos estádios de ovo, larva e pupa das espécies de mosquitos *Anopheles gambiae*, *Anophele sarabiensis* e *Culex quinquefasciatus* (Kweka et al., 2011). Substâncias extraídas da casca seca de *Myroxylon balsamum* possuem ação tóxica contra larvas do mosquito *Ae. aegypti* (Simas et al. (2004). O Extrato de frutos de *Pterodon polygalaeiflorus* também é um agente larvicida promissor (Pimenta et al., 2006).

Outra planta com atividade inseticida é a *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como planta de nim. O óleo de nim é extraído de sementes da planta onde os princípios ativos com atividades inseticidas são mais concentrados (Oliveira et al., 2007; Balandrin et al., 1988). A azadiractina é o composto isolado da semente de nim e é importante do ponto de vista entomológico (Mordue et al., 2000). Essa planta é nativa da Índia (Dua et al., 2009) e cresce bem em áreas de clima tropical e subtropical (Verkerk e Wright, 1993).

Produtos derivados de nim têm vantagem por não ser tóxicos ao homem e serem rapidamente degradados no solo e nas plantas (Isman, 2006). O óleo de nim possui ação repelente, reguladora de crescimento, além de atividade acaricida, fungicida e nematicida (Martinez, 2003). Estudos também relatam

efeitos do extrato de nim produzidos a partir de sementes, sobre o crescimento e desenvolvimento dos estágios sexual e assexual de *Plasmodium falciparum*, parasita causador da malária (Mossini e Kemmelmeier, 2005).

Azadiractina e o extrato aquoso de folhas também demonstram ação inibitória *in vitro* e *in vivo* sobre a replicação do vírus da Dengue tipo 2 (Parida et al., 2002). Além dos efeitos citados, o óleo de nim afeta o desenvolvimento do protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* presente no triatomíneo, que é o vetor da doença de Chagas (Dhar et al., 1998).

O óleo de nim é promissor como ferramenta de controle de mosquitos porque é mais eficaz em baixas doses do que os produtos sintéticos atualmente comercializados e é uma alternativa ambientalmente mais segura (Benelli et al., 2015). O extrato de *A. indica* foi testado contra larvas e pupas do mosquito *Culex pipiens* e foi eficiente em experimentos realizados em condições de laboratório (Alouani et al., 2009). O óleo de nim, na concentração de 1%, em associação com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* foi infectivo contra mosquitos adultos das espécies *Anopheles gambiae* e *Culex quinquefasciatus* (Seye et al., 2012). O óleo de nim na concentração de 0,001% suspenso com conídios do fungo *M. anisoplia* foi infectivo contra larvas de *Ae. aegypti* e apenas 12,2% das larvas sobreviveram ao final de sete dias de avaliação (Gomes et al., 2015).

2.4 Tegumento dos insetos e atuação dos fungos entomopatogênicos

Os insetos possuem compostos na sua estrutura que fazem parte do mecanismo de defesa contra organismos invasores (Ferron, 1978). A cutícula é formada por uma procutícula composta por filamentos de quitina dispostos dentro de uma matriz de proteína e é coberta por uma epicutícula constituída por proteínas e lipídios que funcionam como barreira contra a perda de água (Napolitano e Juárez, 1997).

A cutícula do inseto tem diferentes graus de endurecimento devido à incorporação de compostos fenólicos nas proteínas da mesma (Andersen, et al., 1995). E, também devido a precursores esclerosantes e enzimas que ajudam no endurecimento da cutícula (Andersen, 2010). A melanização (escurecimento e

endurecimento) produzida pelo inseto durante o processo de infecção pode inibir a penetração do fungo na cutícula (Avery et al., 2008).

O patógeno quando atinge a hemocele do inseto encontra a segunda linha de defesa que são os hemócitos que reconhecem o invasor e inicia uma série de eventos imunológicos como fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos e melanização (Dunn, 1986). No entanto, genes envolvidos na defesa dos insetos evoluíram à medida que os genes infectivos dos patógenos também evoluíram (Lu e St. Leger, 2016).

Para o fungo invasor, a cutícula do inseto representa uma barreira à penetração e, por isso, enzimas que têm função de degradar a cutícula são produzidas por fungos entomopatogênicos durante a penetração do hospedeiro (Samuels e Paterson, 1995). Para a infecção ser bem-sucedida, depende principalmente da capacidade de adesão e de penetração do fungo no tegumento do hospedeiro e para isso uma variedade de enzimas extracelulares é produzida durante a degradação do tegumento do inseto (Shahid et al., 2012). Por meio da ação combinada de enzimas hidrolíticas, tais como quitinase, protease e lipase, os micélios fúngicos são capazes de penetrar a cutícula dos insetos (Bidochka e Khachatourians, 1987).

Os fungos entomopatogênicos são os únicos, em comparação com outros microrganismos, que são capazes de infectar através da cutícula do inseto e não necessita ser ingerido pelo hospedeiro. A virulência do fungo é frequentemente relacionada com a rápida germinação de seus esporos, sendo o evento muito importante no processo de infecção (Pedrini et al., 2007). Os fungos entomopatogênicos alimentam-se por meio de secreção de enzimas extracelulares que digerem polissacarídeos e proteínas em seus constituintes monoméricos como açúcares e aminoácidos (Madigan et al., 2010).

Os fungos causam mortalidade de insetos por um ou mais mecanismos, tais como, deficiência nutricional, invasão e destruição dos tecidos e liberação de toxinas (Tanada e Kaya, 1993). Os fungos infectam o inseto por rompimento da cutícula do hospedeiro e também podem ser ingeridos e atravessam a parede intestinal do inseto (Hajek e St. Leger, 1994).

Os fungos entomopatogênicos degradam os hidrocarbonetos de insetos, o que pode ajudar nas etapas iniciais de infecção, pois os fungos utilizam os nutrientes presentes na cutícula para favorecer a germinação dos esporos

(Napolitano e Juárez, 1997). Muitos fungos entomopatogênicos são capazes de penetrar ativamente a cutícula dos hospedeiros, aliando pressão mecânica através de uma hifa modificada (apressório) e degradação enzimática (Silva et al., 2005).

O processo de infecção de fungos entomopatogênicos se inicia pela adesão, seguido pela germinação dos conídios na cutícula do inseto e a penetração do tubo germinativo no tegumento (Figura 2). E, depois de invadir a hemocele, o fungo desenvolve-se na hemolinfa e outros tecidos internos (colonização), levando à morte do hospedeiro (Samuels et al., 2016).

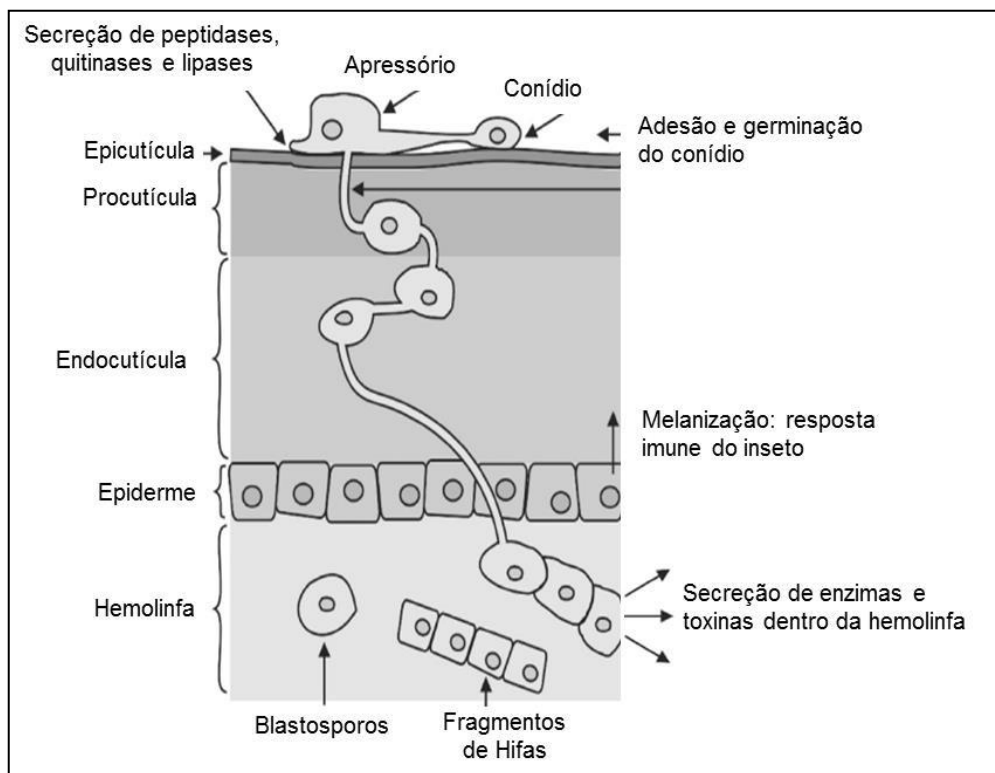


Figura 2. Processo de infecção de fungos entomopatogênicos. Fonte: Samuels et al., (2016).

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são os entomopatogênicos mais amplamente utilizados em programas de controle biológico (Faria e Wraight, 2007). Em condições naturais, os fungos *Metarhizium sp.* e *Beauveria sp.*

produzem conídios aéreos como propágulos responsáveis pela infecção e pela dispersão ambiental (Wraight et al., 2001), e produzem corpos hifais na hemolinfa do hospedeiro invertebrado (Inglis et al., 2001). Produtos a base de conídios secos podem conter hifas e produtos em meio líquido podem apresentar uma mistura de conídios, blastosporos e hifas (Leite et al., 2003).

A morte do hospedeiro infectado com fungos entomopatogênicos pode ocorrer pela ação de toxinas fúngicas, obstrução física da circulação, diminuição da nutrição e pela invasão dos órgãos (Goettel e Inglis, 1997).

No laboratório, conídios aéreos destes fungos entomopatogênicos são produzidos em substratos sólidos, enquanto em culturas líquidas eles produzem propágulos semelhantes a leveduras, denominados blastosporos (Vega et al., 2003), que são células vegetativas análogas aos corpos de hifas formados naturalmente na hemolinfa (Bernardo et al., 2018). Os blastosporos são células semelhantes a leveduras (Iwanicki et al., 2018).

Mais de 60% dos bioinseticidas a base de *B. bassiana* e *M. anisopliae* disponíveis no mercado são na forma de conídios, apenas 4% são na forma de blastosporos e os demais produtos contêm hifas, conídios e blastosporos (Faria e Wraight, 2007). A produção de conídios é mais demorada e a produção de blastosporos pode ser realizada de 3 a 4 dias dependendo do meio utilizado (Kim et al., 2013). Blastosporos podem ser produzidos em tanques de fermentação (Jackson et al., 2003), tornando seu cultivo mais fácil.

As vantagens dos blastosporos em relação aos conídios incluem a germinação, que pode ser até quatro vezes mais rápida que a dos conídios resultando em alta infectividade (Hartelt et al., 2008), e a facilidade de produção de elevadas concentrações de blastosporos (Jackson e Jaronski, 2009). Esses benefícios sobrepõem algumas das desvantagens dos blastosporos, que é a menor tolerância a fatores de estresse em relação aos conídios e menor estabilidade (Mascarin et al., 2015). No entanto, uma adequada formulação dos blastosporos pode proteger esses propágulos desses efeitos (Bernardo et al., 2018).

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* tem se mostrado altamente virulento para as larvas de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Daoust e Roberts, 1982). O fungo *M. anisopliae* foi testado como potencial agente de controle contra os mosquitos *Anopheles gambiae*, vetor do protozoário

que causa a malária (Scholte et al., 2006). O propágulo utilizado nessas pesquisas é na forma de conídio, porém os blastosporos são mais letais para as larvas que conídios, pois penetram e infectam mais rapidamente (Kirkland, et al., 2004).

A infecção com fungos entomopatogênicos começa com a fixação de conídios à cutícula do hospedeiro, seguida por germinação e penetração na cutícula (Ortiz-Urquiza e Keyhani 2013). Quando as hifas em crescimento atingem a hemolinfa elas dão origem a blastosporos, por brotamentos, que são estruturas especializadas para proliferar e explorar nutrientes, colonizar tecidos internos, e fugir do sistema imunológico do hospedeiro (Humber, 2008).

O processo de adesão entre o esporo e a cutícula do inseto é mediado pela presença de moléculas sintetizadas pelo fungo, chamado adesinas. Um tipo de adesina conhecido como MAD1, que está localizado na superfície dos conídios, foi descrito em *M. anisopliae* (Mora et al., 2017). O rompimento do gene que codifica MAD1 afeta a germinação e a formação de blastosporos, reduzindo significativamente a virulência do fungo (Wang e St. Leger, 2007).

Os blastosporos são mais eficientes que conídios devido à facilidade de absorção de nutrientes, o que aumenta a capacidade de multiplicação e também devido à ausência de parede celular, o que evita o reconhecimento desse propágulo pelos hemócitos presentes na hemolinfa do inseto (Mora et al., 2017; Vinson, 1991). Blastosporos germinam mais rapidamente do que conídios e têm maior chance de penetrar no hospedeiro (Mascarin et al., 2015). Conídios ligam-se bem a superfícies hidrofóbicas, mas fracamente a superfícies hidrofílicas; e os blastosporos ligam-se fortemente a superfícies hidrofílicas e fracamente a superfícies hidrofóbicas (Holder e Keyhani, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) no período de 2015 a 2018.

3.1 Obtenção de larvas de *Ae. aegypti*

Os ovos dos mosquitos foram coletados na UENF com a utilização de armadilhas denominadas ovitrampas (Fay e Perry, 1965; Fay e Eliason, 1966). A ovitrampa consiste de um pote preto (10 x 6 x 6 cm) com quatro palhetas de madeira aglomerada tipo Eucatex (12 x 3 cm) conforme demonstra a Figura 3A. As armadilhas foram espalhadas no bosque situado em torno do laboratório, acrescida de 200 mL de água de torneira, o que sabidamente proporciona ambiente adequado para a oviposição sobre as palhetas (Figura 3B), que ocorre após o repasto sanguíneo dos mosquitos fêmeas.

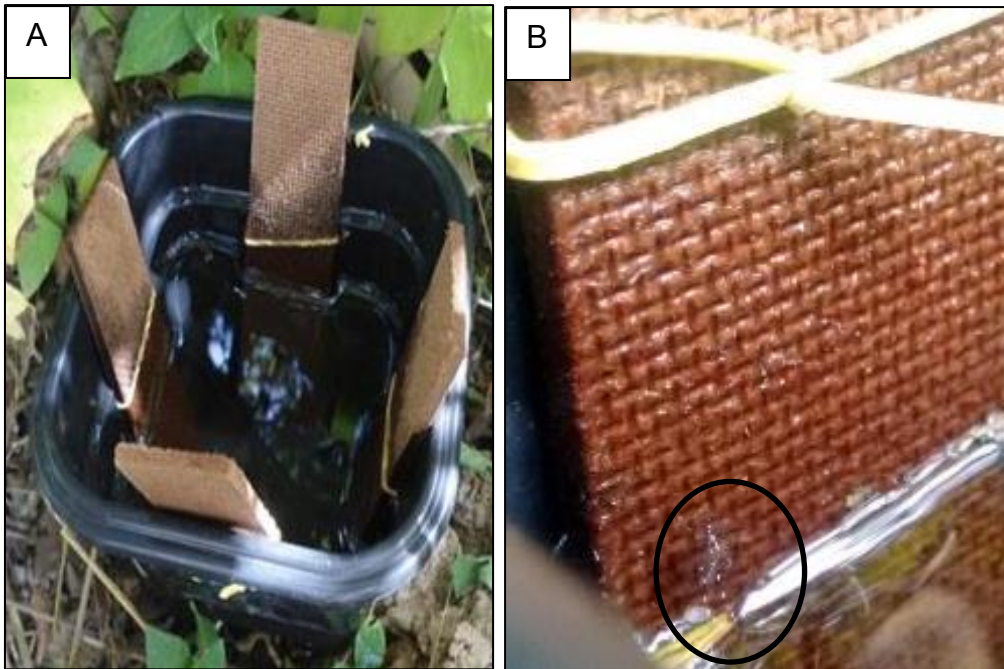


Figura 3. Armadilha de coleta de ovos (A) e repasto sanguíneo dos mosquitos fêmeas (B).

Após uma semana as palhetas contendo os ovos foram coletadas e secas em temperatura ambiente sobre a bancada do laboratório. As palhetas foram colocadas em bandeja com água limpa para a eclosão das larvas. As larvas foram transferidas para outra bandeja com água limpa e após atingirem os estágios 2 e 3 foram utilizadas nos bioensaios.

3.2 Produção de conídios e blastosporos de *M. anisopliae*

Para a realização dos bioensaios foi utilizado o isolado LEF 2000 obtido de uma amostra de solo de Campos dos Goytacazes. O fungo foi adicionado em meio de cultura BDA e isolado várias vezes até a eliminação de todos os contaminantes. Após o isolamento definitivo do fungo uma cultura monospórica foi obtida por métodos convencionais. O fungo foi então identificado a partir da morfologia dos conidióforos usando chaves taxionômicas. Este isolado é atualmente mantido na coleção de fungos no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da UENF.

Os experimentos foram realizados com propágulos do fungo na forma de conídios e blastosporos. Os conídios foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (marca HIMEDIA) e mantidos em BOD a 27 °C por 15 dias. Após esse período os conídios foram retirados das placas de Petri com o auxílio de uma espátula estéril e foram colocados em tubo Falcon contendo 0,01% de Tween 80 e a suspensão foi homogeneizada em Vórtex. Uma alíquota de 15µL da suspensão foi colocada em hemocítômetro Neubauer para a contagem dos conídios utilizando microscópio óptico com objetiva de x40. A concentração final da suspensão foi ajustada para 1×10^7 conídios mL⁻¹.

Para a produção dos blastosporos foi utilizado um meio proposto por Adamek (Adamek, 1963), que consiste na utilização de 3% de água de maceração de milho (SIGMA, Brasil), acrescido de 4% de glucose e 4% de extrato de levedura. Em 50 mL de meio líquido foram adicionados 500 µL de suspensão de conídios na concentração de 1×10^7 conídios mL⁻¹. A suspensão foi acondicionada em Erlemeyers, cobertos com um tampão feito de algodão envolto com gases, e incubada em Shaker orbital a 27°C e 152 rpm durante três dias com fotoperíodo de 12h L:12h E. Após esse período, os blastosporos foram filtrados em duas camadas de tecido “*Miracloth*” (Sigma, Brasil), adicionados em tubos Falcon (50 mL), e centrifugados a 3000 rpm (NT 815 Centrífuga Refrigerada marca Novatecnica) por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionada água destilada ao sedimento até atingir o volume de 30 mL. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e centrifugada novamente. Esse procedimento foi repetido duas vezes para a lavagem e purificação dos blastosporos, que foram suspensos em água destilada, contados em hemocítômetro Neubauer e a concentração do fungo ajustada a 1×10^7 blastosporos mL⁻¹.

3.3 Preparação de óleo de nim e blastosporos

Para os tratamentos com óleo de nim foi utilizado o óleo comercial “Base Nim” da marca Base fértil nim (São Paulo, Brasil) com 0,12% p/p de Azadiractina, principal componente com atividade inseticida. O fabricante recomenda a concentração de 1% para ser utilizada em pulverizações no campo contra pragas

agrícolas. No entanto, para este estudo essa concentração seria muito elevada conforme demonstrou um trabalho anterior realizado por Gomes et al. (2015), contra larvas de *Ae. aegypti*, em que o óleo de nim a 1% matou 100% das larvas. Portanto, essa concentração não poderia ser utilizada para verificar o sinergismo entre óleo de nim e blastosporos.

O óleo de nim foi diluído em água destilada para o preparo das concentrações de 0,001%, 0,01%, 0,1% e 1%, sendo estas mesmas concentrações utilizadas por Gomes et al. (2015). Destas concentrações, a concentração de 0,01% foi selecionada como concentração subletal (concentração que tem a mesma taxa de sobrevivência ao tratamento controle).

A concentração de blastosporos utilizada para os bioensaios de sinergismo foi de 1×10^5 blastosporos mL^{-1} , sendo a mesma utilizada com conídios do fungo *M. anisopliae* no trabalho realizado em 2015 por Gomes e colaboradores. Para o preparo da suspensão de óleo de nim + blastosporos, a solução de óleo de nim foi adicionada na suspensão de blastosporos, ambas diluídas em água destilada.

Além disso, para verificar se o óleo de nim afetaria a germinação do fungo, uma alíquota de 100 μL da suspensão do óleo de nim (0,01%) + blastosporos (1×10^5 blastosporos mL^{-1}) foi adicionada em placa de Petri com meio de cultura BDA, espalhada com alça de Drigalski e mantida em BOD a 27°C durante 15 dias. O mesmo experimento foi realizado com meio de cultura contendo apenas blastosporos suspensos em água. Após 15 dias o meio de cultura contendo blastosporos suspensos com óleo de nim e blastosporos suspensos apenas em água foi observado em microscópio óptico 40x para comparar visualmente se a presença do óleo de nim afetaria a produção de conídios do fungo.

3.4 Montagem dos bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos em laboratório e no campo com sol indireto (SD) e sol direto (SI). Para isso, dez larvas, no segundo e terceiro estágio de desenvolvimento foram adicionadas em copos de 100 mL, com 50 mL de água destilada para o tratamento controle ou 50 mL de suspensão fúngica (conídios ou blastosporos). Cada bioensaio tinha quatro parcelas (totalizando 40 larvas).

Foram realizadas três repetições (totalizando 120 larvas). Os controles do tratamento com conídios foram realizados com 0,01% de Tween 80 porque este foi utilizado para suspender os conídios. E, os controles para o tratamento dos blastosporos foram realizados apenas com água destilada porque os blastosporos foram suspensos apenas em água. Para todos os bioensaios a sobrevivência das larvas em cada parcela (cada copo) foi contabilizada a cada 24 horas durante 7 dias.

3.4.1 Bioensaios no laboratório

Foram realizados bioensaios com conídios e blastosporos em condições de laboratório (27 °C) para comparar a virulência desses dois propágulos, ambos na concentração de 1×10^7 propágulos mL⁻¹. Também, foram realizados bioensaios com blastosporos em câmara climatizada tipo BOD em três diferentes temperaturas: 25, 30 e 35 °C. Isso foi realizado para verificar se blastosporos permanecem virulentos em diferentes condições de temperatura. Essas temperaturas foram escolhidas porque estão nas faixas das temperaturas diárias registradas no Campus da UENF onde foram realizados os experimentos de campo. Os bioensaios para determinar a dose subletal do óleo de nim também foram realizados no laboratório.

Para verificar por quanto tempo a suspensão de blastosporos permaneceria virulenta contra larvas de *Ae. aegypti*, foram realizados bioensaios de persistência da virulência dos blastosporos em condições de laboratório. Nestes bioensaios a suspensão de blastosporos foi adicionada em todos os copos logo após o preparo. As larvas foram adicionadas em cada copo em tempos diferentes. No tratamento zero horas, as larvas foram adicionadas nos copos imediatamente após o preparo da suspensão de blastosporos. No tratamento 3 dias as larvas foram adicionadas nos copos 3 dias após o preparo da suspensão de blastosporos. Os demais tratamentos seguiram da adição de larvas após o período de 6, 9 e 12 dias do preparo da suspensão de blastosporos.

3.4.2 Bioensaios com blastosporos no campo Sol Indireto (Campo-SI) e Campo Sol Direto (Campo-SD)

Os bioensaios de simulação de campo foram realizados com blastosporos na concentração de 1×10^7 propágulos mL^{-1} e montados em duas varandas da Unidade de Dengue e Mirmecologia da UENF. Em uma das varandas a luz solar não incide diretamente e foi denominado de bioensaios de “Campo Sol Indireto” (Figura 3A). Na outra varanda a luz solar incidia diretamente e foi denominado de bioensaios de “Campo Sol Direto” (Figura 3 B). Os bioensaios foram montados no interior de gaiolas (15 x 60 x 75 cm) revestidas com tela. Os bioensaios para verificar o sinergismo entre óleo de nim + blastosporos foram realizados em condições de Campo-SD. Também foram realizados bioensaios de persistência da virulência de blastosporos em condições de Campo-SD e esta condição foi escolhida porque é a que mais pode atingir negativamente a virulência do fungo.

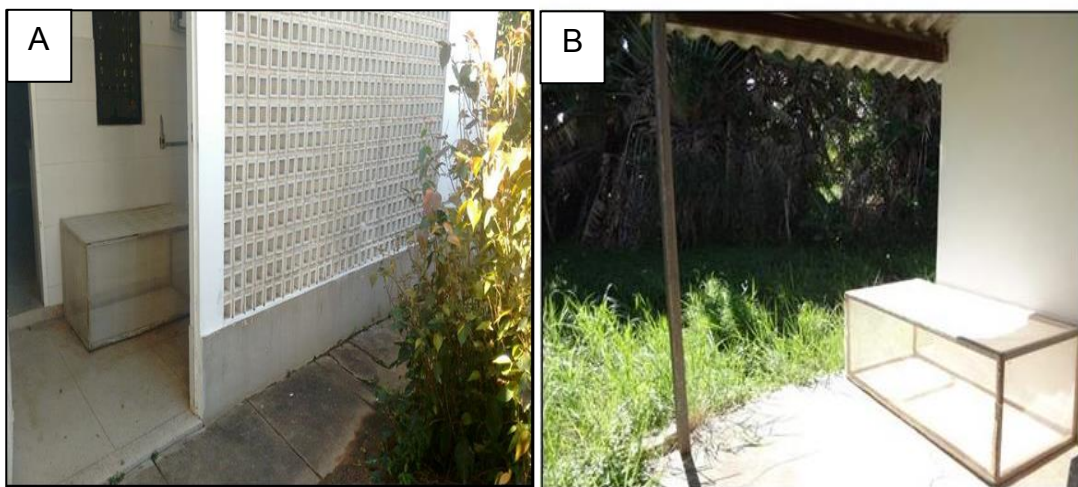


Figura 4. Bioensaios montados dentro de gaiolas, simulando condições de Campo Sol Indireto (A) e de Campos Sol Direto (B).

3.5 Encapsulamento de blastosporos e bioensaios de sobrevivência

Para o encapsulamento de blastosporos foi utilizada a metodologia elaborada para o encapsulamento de conídios de *M. anisopliae* (Morais, 2015). O método utilizado foi o de gelificação iônica, em que uma solução polimérica, contendo os blastosporos do fungo, foi extrusada sobre uma solução reticulante.

Nesse procedimento, a solução de alginato de sódio (0,25% p/v) (Sigma-Aldrich, Brasil) e ágar (1% p/v) (Protoquímicos, Brasil) foi preparada por dissolução em 100 mL de água destilada à temperatura de 35 °C em agitador magnético (Vulcan, MS400). Após a solução atingir 27 °C foi adicionada nela 100 mL da suspensão fúngica, na concentração de $7,5 \times 10^7$ blastosporos mL⁻¹ (totalizando 200 mL). A solução foi mantida em agitação e foi gotejada em 300 mL da solução de cloreto de cálcio di-hidratado a 0,04M (Sigma-Aldrich) com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex L/S). As cápsulas formadas foram retiradas da solução de cloreto de cálcio di-hidratado com auxílio de uma peneira e lavadas com água destilada. Em seguida, foram congeladas por 24 h (-18°C) e posteriormente liofilizadas (Liotop, L101). As cápsulas foram retiradas do liofilizador após 24 h do início do processo (vácuo de 1249 µHg e temperatura do condensador de -40°C).

A encapsulação dos blastosporos foi realizada usando uma concentração maior de blastosporos ($7,5 \times 10^7$ blastosporos mL⁻¹) que a utilizada nos demais bioensaios porque levou em consideração que os blastosporos pudessem apresentar dificuldades para serem liberados das cápsulas. Os bioensaios de sobrevivência larval foram realizados para verificar a virulência de blastosporos encapsulados. As cápsulas foram pesadas e 0,05g colocados em copos plásticos de 100 mL contendo 50 mL de água destilada com 10 larvas por recipiente. Para o tratamento controle foram utilizadas cápsulas sem a adição de blastosporos.

3.6 Análise dos resultados

A sobrevivência das larvas nas três repetições foi somada e utilizada no programa *GraphPad Prism* versão 7.00 para a obtenção das curvas de sobrevivência, do tempo médio de sobrevivência (S_{50}) e do desvio padrão, pelo método de Kaplan-Meier (Blanford et al., 2005). A homogeneidade dos experimentos foi determinada usando o teste de Log-Rank (Elandt e Johnson, 1980) em nível de significância de 95%. As comparações das médias de sobrevivência das larvas foram calculadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan ($P \leq 0,05$). As referidas análises estatísticas foram realizadas no programa IBM SPSS *Statistics for Windows* (versão 21).

4. RESULTADOS

4.1 Virulência de blastosporos e conídios no laboratório

Nos bioensaios realizados em condições de laboratório (27 °C), as larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos apresentaram 100% de mortalidade no segundo dia de avaliação (Figura 5). As larvas expostas aos conídios tiveram mortalidade de 100% no sexto dia de avaliação. As larvas dos controles (água e Tween 80) apresentaram sobrevivência de 100% e 97%, respectivamente, no final de sete dias de avaliação.

No laboratório foi possível verificar que a virulência por blastosporos é superior quando comparada a conídios. Larvas do tratamento com blastosporos apresentaram S_{50} de 1 dia e as larvas do tratamento com conídios apresentaram S_{50} de 3 dias. O tratamento com blastosporos e com conídios diferiu estatisticamente entre si e entre seus respectivos controles [$F_{(8,11)} = 49,976$; $p < 0,05$].

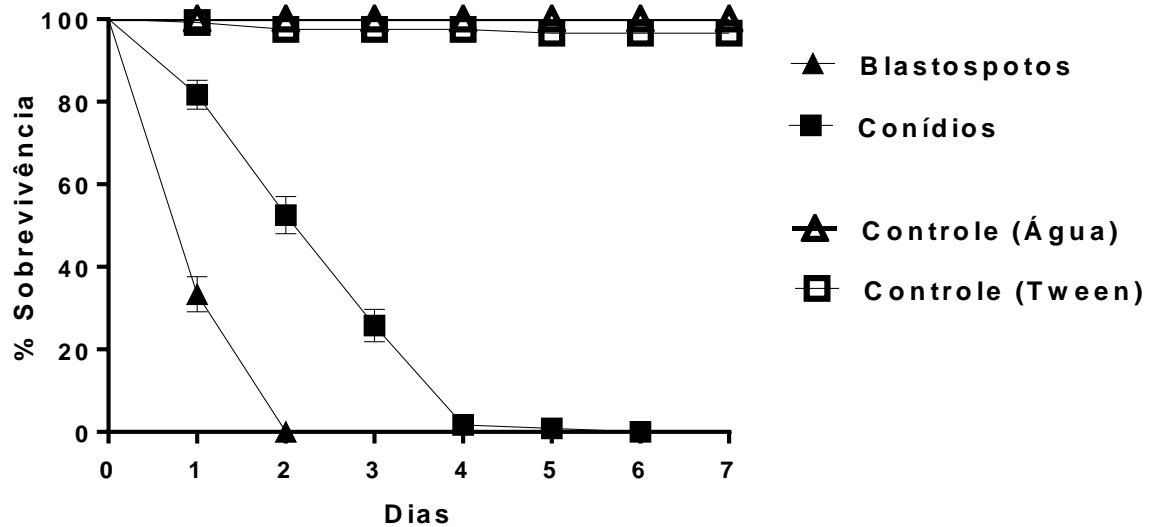


Figura 5. Sobrevivência diária de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos e conídios de *M. anisopliae* e seus respectivos controles, em condições de laboratório. A concentração de blastosporos e conídios foi de 1×10^7 propágulos mL^{-1} . O tratamento controle para blastosporos foi realizado com água destilada e para conídios foi realizado com 0,01% de Tween 80.

4.2 Virulência de blastosporos em diferentes temperaturas no laboratório

As larvas de *Ae. aegypti* tratadas com blastosporos e mantidas a 25 °C apresentaram 100% de mortalidade no terceiro dia de avaliação (Figura 6). Apenas 10% das larvas mantidas a 30 °C sobreviveram ao final de sete dias de avaliação e 85% das larvas mantidas a 35 °C sobreviveram ao final de sete dias de avaliação. A virulência dos blastosporos mantidos à temperatura de 25 °C não foi significativamente afetada, mas foi reduzida com o aumento da temperatura.

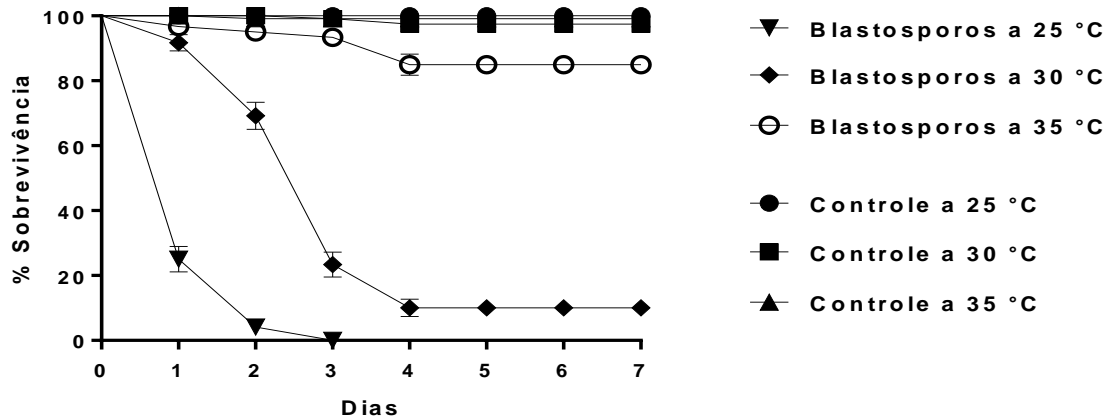


Figura 6. Sobrevivência diária de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos de *M. anisopliae*, e seus respectivos controles, em BOD nas temperaturas de 25, 30, 35°C. A concentração de blastosporos foi de 1×10^7 blastosporos mL^{-1} . O tratamento controle foi realizado com água destilada.

Em 48 horas de avaliação, a sobrevivência das larvas mantidas a 25 °C foi de 4% com S_{50} de 1 dia, obtido ao final de sete dias de avaliação (Tabela 1). A sobrevivência das larvas mantidas a 30 °C foi de 69.1% (S_{50} de 2,5 dias) e das mantidas a 35 °C foi de 95.0% no segundo dia de avaliação (Tabela 1).

Portanto, os bioensaios conduzidos em BOD, que verificaram a influência de diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C) na virulência de blastosporos, demonstraram que a virulência dos blastosporos é reduzida com o aumento da temperatura e difere estatisticamente do controle [$F_{(8,11)} = 45,101$; $p < 0,05$].

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência (\pm desvio padrão) e valores médios de sobrevivência de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos de *M. anisopliae*, e ao tratamento controle, em diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C) durante 48 horas de avaliação. O S_{50} foi obtido usando os dados de 7 dias de avaliação

Tratamentos	%Sobrevivência \pm Desvio Padrão	S_{50}
Blastosporos a 25 °C	4.1 \pm 1.8 c	1
Blastosporos a 30 °C	69.1 \pm 4.2 b	2,5
Blastosporos a 35 °C	95 \pm 1.9 a	ND
Controle a 25 °C	100 a	ND
Controle a 30 °C	100 a	ND
Controle a 35 °C	99.1 \pm 0.8 a	ND

Resultados seguidos pela mesma letra indicam que não houve diferenças significativas entre médias usando Teste post hoc de Duncan (5% de probabilidade). Os valores para S_{50} foram calculados usando análise de sobrevivência de log-rank. ND = Não determinado devido à alta taxa de sobrevivência.

4.3 Blastosporos no Campo-SI e Campo-SD

As larvas expostas aos blastosporos na condição de Campo-SI, com temperatura externa de 25-28 °C e umidade relativa de 71-82% morreram 100% no terceiro dia de avaliação (Figura 7). Na condição de Campo-SD, com temperatura externa de 25-38 °C e umidade relativa de 44-55%, apenas 0,8% das larvas sobreviveram ao final de sete dias de avaliação. Apesar do estresse promovido pela exposição à radiação solar, o fungo manteve sua virulência. As larvas dos tratamentos controle nas condições de Campo-SI e Campo-SD apresentaram 97% e 98% de sobrevivência, respectivamente.

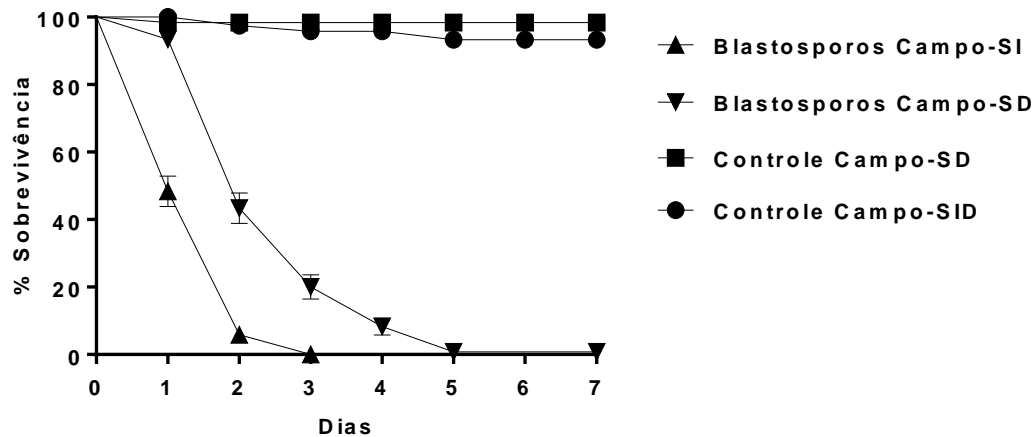


Figura 7. Sobrevivência diária de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos de *M. anisopliae* em condições de campo com sol indireto (Campo-SID) e campo com sol direto (Campo-SD) ao longo de 7 dias. A concentração de blastosporos foi de 1×10^7 blastosporos mL^{-1} . O tratamento controle foi realizado com água destilada.

Em 48 horas de avaliação foi possível observar que apenas 5,8% das larvas permaneceram vivas na condição de Campo-SI e apresentaram S_{50} de 1 dia ao final de sete dias de avaliação (Tabela 2). Na condição de Campo-SD a sobrevivência das larvas foi de 43,3% (S_{50} de 2 dias). Os bioensaios realizados nas condições de Campo-SI e Campo-SD diferiram estatisticamente entre si e entre seus respectivos controles [$F_{(8,11)} = 389,200$; $p < 0,05$].

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência (\pm desvio padrão) e valores médios de sobrevivência de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos de *M. anisopliae* em condições de campo-SI e campo-SD em 48 horas de avaliação. O S_{50} foi obtido usando os dados de 7 dias de avaliação

Tratamentos	%Sobrevivência \pm Desvio Padrão	S_{50}
Blastosporos Campo-SI	5.8 \pm 2.1 c	1
Blastosporos Campo-SD	43.3 \pm 4.5 b	2
Controle água Campo-SI	97.5 \pm 1.3 a	ND
Controle água Campo-SD	98.3 \pm 1.1 a	ND

Resultados seguidos pela mesma letra indicam que não houve diferenças significativas entre médias usando Teste post hoc de Duncan (5% de probabilidade). Os valores para S_{50} foram calculados usando análise de sobrevivência de log-rank. ND = Não determinado devido à alta taxa de sobrevivência.

4.4 Persistência de blastosporos no laboratório

Os resultados dos bioensaios de persistência da virulência de blastosporos realizados em laboratório demonstraram que as larvas de *Ae. aegypti* adicionadas aos recipientes logo após o preparo da suspensão fúngica apresentaram 100% de mortalidade no quinto dia de avaliação, com S_{50} de 1 dia (Figura 8). As larvas adicionadas após 3 dias apresentaram 4.1% de sobrevivência (S_{50} de 3 dias) e as adicionadas após 6 e 9 dias apresentaram 4.8% (S_{50} de 2 dias), e 16.6% (S_{50} de 3 dias) de sobrevivência, respectivamente, ao final de sete dias de avaliação de cada tratamento.

As larvas adicionadas após 12 dias do preparo da suspensão apresentaram 45.8% (S_{50} de 6 dias) de sobrevivência, sendo constatada a maior taxa de sobrevivência ao final de 7 dias de avaliação. A média de sobrevivência das larvas no tratamento controle foi de 95%.

Os resultados demonstraram que a sobrevivência das larvas expostas aos blastosporos nos bioensaios de persistência, diferiu estatisticamente do controle para todos os tratamentos [$F_{(12,17)} = 5,071$; $p < 0,05$].

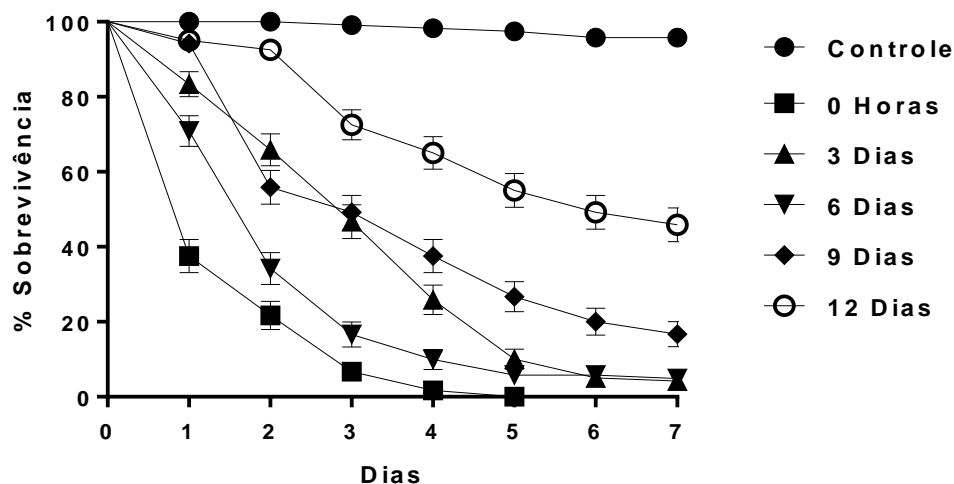


Figura 8. Sobrevivência diária de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos de *M. anisopliae* em bioensaios de persistência da virulência realizados em laboratório ao longo de 7 dias. A concentração de blastosporos foi de 1×10^7 blastosporos mL^{-1} . O tratamento controle foi realizado com água destilada.

Após três dias da montagem dos bioensaios ocorreu o surgimento de conídios na superfície da água (Figura 9A) oriundos das larvas mortas e produzidos a partir da germinação dos blastosporos (Figura 9B). Portanto, os conídios podem ter contribuído para o aumento da mortalidade das larvas adicionadas ao longo dos dias.

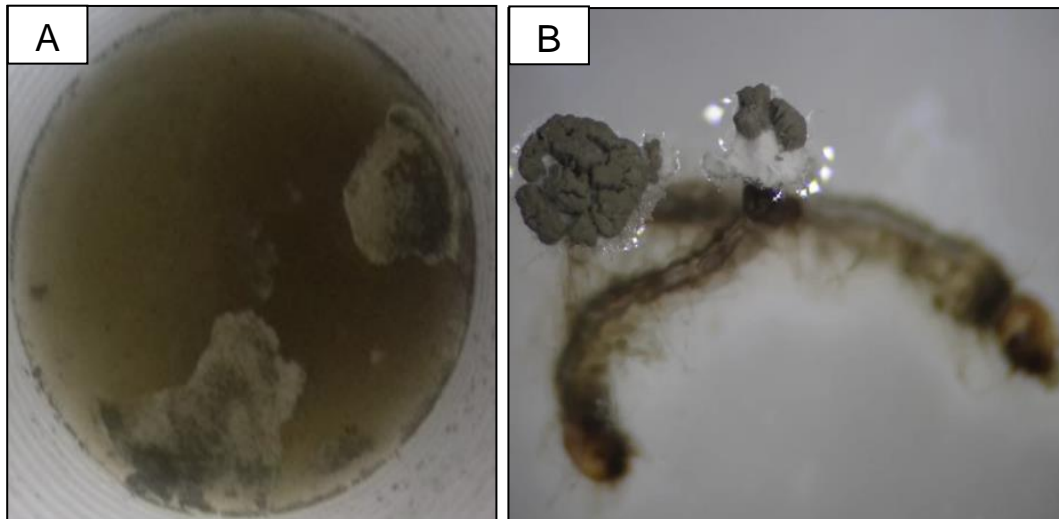


Figura 9. Conídios na água (A) e conídios emergindo de larvas mortas (B).

4.5 Persistência de blastosporos no Campo-SD

Os bioensaios de persistência da virulência dos blastosporos realizados na condição de Campo-SD demonstraram que a sobrevivência das larvas foi de apenas 1% quando adicionadas logo após o preparo dos blastosporos, ao final de sete dias de avaliação. A sobrevivência das larvas adicionadas após 3 dias foi de 17%, após 6 dias foi de 76% e após 9 dias foi de 93%. A sobrevivência das larvas adicionadas após 12 dias foi de 95%. A média da sobrevivência das larvas no tratamento controle foi de 93% (Figura 10).

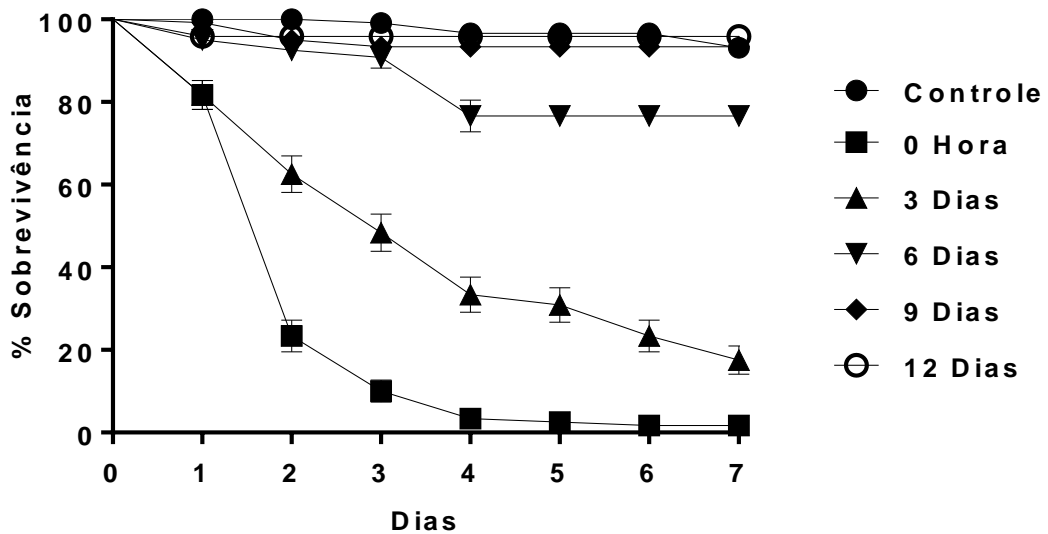


Figura 10. Sobrevivência diária de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos de *M. anisopliae* em bioensaios de persistência da virulência realizados no Campo-SD ao longo de 7 dias. A concentração de blastosporos foi de 1×10^7 blastosporos mL^{-1} . O tratamento controle foi realizado com água destilada.

Após 48 horas de observação da persistência da virulência de blastosporos na condição de Campo-SD foi possível perceber que as larvas que foram expostas a blastosporos logo após o preparo da suspensão fúngica (0 hora) apresentaram 23.3% de sobrevivência (S_{50} de 2 dias) e as expostas após 3 dias apresentaram 62.5% de sobrevivência (S_{50} de 3 dias) (Tabela 3). As larvas expostas a blastosporos após 6 dias apresentaram sobrevivência de 92.5% e as expostas aos 9 e 12 dias apresentaram sobrevivência de 95% e 95.8%, respectivamente. A média da sobrevivência das larvas no tratamento controle foi de 100%. Os tratamentos 0 hora e 3 dias diferiram estatisticamente entre si e entre o controle. Os tratamentos 6, 9 e 12 dias não diferiram entre si e entre o controle [$F_{(12,17)} = 24,006$; $p=0,00$].

Tabela 3. Porcentagem de sobrevivência \pm desvio padrão e valores médios de sobrevivência de larvas de *Ae. aegypti* expostas a bioensaios de persistência da virulência de blastosporos em condições de campo-SD. A porcentagem de sobrevivência refere-se a 48 horas de avaliação. O S_{50} foi obtido usando os dados de 7 dias de avaliação

Tratamentos	%Sobrevivência \pm Desv. Pad.	S_{50}
0 Hora	23.3 \pm 3.8 c	2
3 Dias	62.5 \pm 4.4 b	3
6 Dias	92.5 \pm 2.4 a	ND
9 Dias	95 \pm 1.9 a	ND
12 Dias	95.8 \pm 1.8 a	ND
Controle (água)	100 a	ND

Resultados seguidos pela mesma letra indicam que não houve diferenças significativas entre médias usando Teste post hoc de Duncan (5% de probabilidade). Os valores para S_{50} foram calculados usando análise de sobrevivência de log-rank. ND = Não determinado devido à alta taxa de sobrevivência.

4.6 Toxicidade de diferentes concentrações do óleo de nim contra larvas em condições de laboratório

Os bioensaios realizados em laboratório para estimar a dose subletal do óleo de nim demonstraram que a sobrevivência das larvas foi maior nas menores concentrações do óleo, após sete dias de avaliação. A sobrevivência das larvas expostas à concentração de 0,001% foi de 94.9%, a concentração de 0,01% foi de 90.6%, a concentração de 0,1% foi de 31.6% (S_{50} de 3 dias) e a concentração de 1% foi de 25% (S_{50} de 2 dias), ao final de sete dias de avaliação. A média da sobrevivência das larvas no tratamento controle foi de 96% (Figura 11).

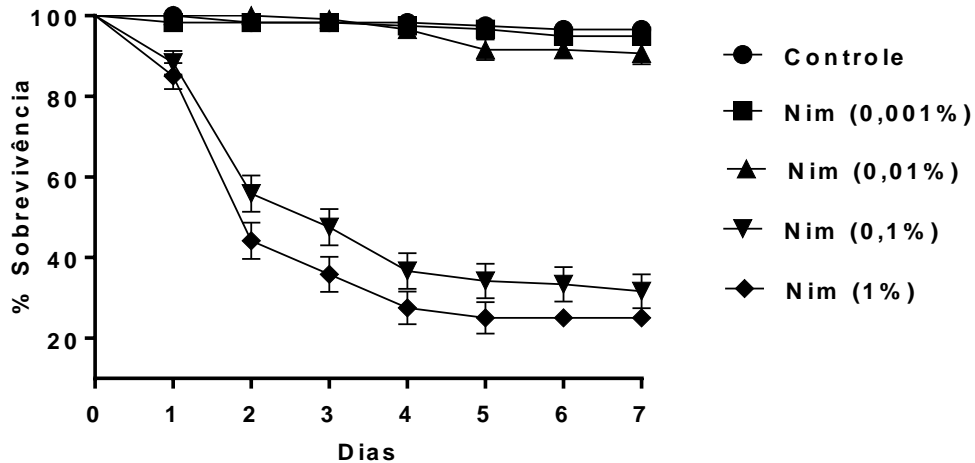


Figura 11. Sobrevivência diária de larvas de *Ae. aegypti* em bioensaios com óleo de nim realizados no laboratório para estimação da dose subletal do óleo, ao longo de 7 dias. O tratamento controle foi realizado com água destilada.

4.7 Efeito do óleo de nim no crescimento do fungo

Os bioensaios realizados em laboratório com blastosporos suspensos com óleo de nim demonstraram visualmente que o óleo de nim não afetou a germinação dos blastosporos e a produção de conídios. A Figura 12A demonstra meio de cultura BDA apenas com blastosporos na concentração 1×10^5 blastosporos mL^{-1} e a Figura 12B demonstra meio de cultura BDA com blastosporos na concentração 1×10^5 blastosporos mL^{-1} suspensos com óleo de nim na concentração 0,01%.

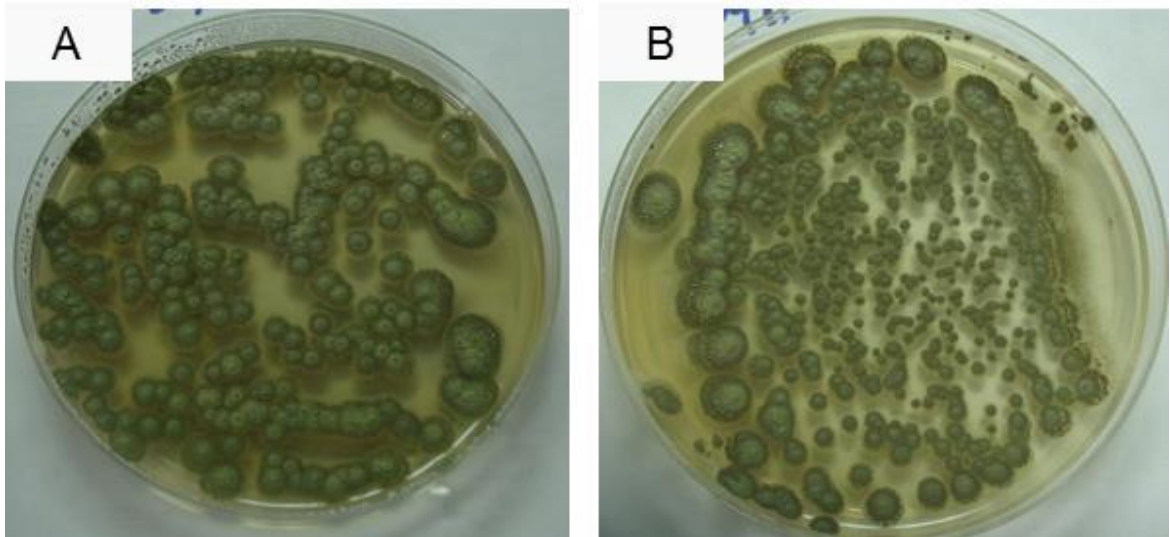


Figura 12. Apenas blastosporos (A) e blastosporos + óleo de nim (B).

4.8 Blastosporos suspensos com óleo de nim no Campo-SD

Os bioensaios realizados no Campo-SD com blastosporos (1×10^5 blastosporos mL^{-1}), suspensos em óleo de nim (0,01%) demonstraram que a sobrevivência das larvas foi de 5,8%, no final de sete dias de avaliação. A sobrevivência das larvas tratadas com blastosporos suspensos apenas em água foi de 52,5% e a sobrevivência das larvas tratadas apenas com óleo de nim a 0,01% foi de 84,8%. A sobrevivência das larvas no tratamento controle foi de 88,9% (Figura 13).

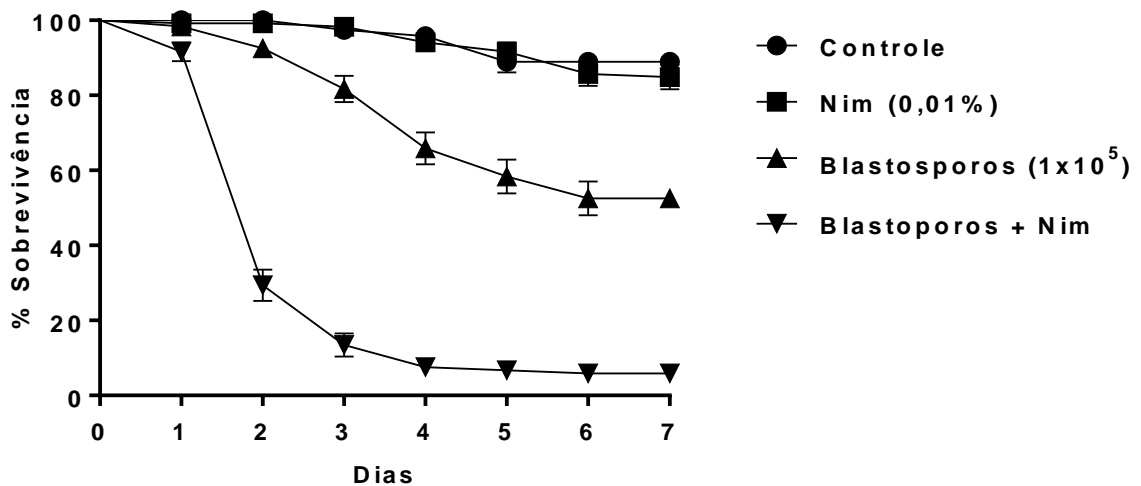


Figura 13. Sobrevivência diária de larvas de *Ae. aegypti* em bioensaios de blastosporos suspensos com ou sem óleo de nim realizados no Campo-SD ao longo de 7 dias.

Em 48 horas de observação dos bioensaios com blastosporos suspensos com óleo de nim realizados no Campo-SD, a sobrevivência das larvas foi de 29.4% (Tabela 4). Sendo estatisticamente diferente dos tratamentos apenas com óleo de nim (99.1%) e com blastosporos (92.5%), e do tratamento controle (100%) [$F_{(8,11)} = 32,515$; $p < 0,05$].

Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência \pm desvio padrão e valores médios de sobrevivência de larvas de *Ae. aegypti* expostas a blastosporos de *M. anisopliae* suspensos com óleo de nim em 48 horas de avaliação. O S_{50} foi obtido usando os dados de 7 dias de avaliação

Tratamentos	%Sobrevivência \pm Desv. Pad.		S_{50}
Nim 0,01% + Fungo	29.4 \pm 4.1	b	2
Nim 0,01%	99.1 \pm 0.8	a	ND
Fungo (Blastosporos) 10 ⁵	92.5 \pm 2.4	a	ND
Controle (água)	100	a	ND

Resultados seguidos pela mesma letra indicam que não houve diferenças significativas entre médias usando Teste post hoc de Duncan (5% de probabilidade). Os valores para S_{50} foram calculados usando análise de sobrevivência de log-rank. ND = Não determinado devido à alta taxa de sobrevivência.

4.9 Encapsulamento de blastosporos

Os blastosporos foram encapsulados em alginato de sódio e ágar após a suspensão ser gotejada em cloreto de cálcio di-hidratado. A Figura 14A mostra as cápsulas do controle e a Figura 14B mostra as cápsulas contendo os blastosporos, após serem liofilizadas por 24 horas. As cápsulas foram colocadas em meio de cultura BDA e mantidas em BOD para observar o aparecimento de colônias do fungo. Após uma semana os blastosporos contidos nas cápsulas deram origem a conídios. Entretanto, ao serem adicionados na água dos bioensaios não acarretaram mortalidade das larvas. As cápsulas controle também não acarretaram mortalidade das larvas, demonstrando que os produtos utilizados no encapsulamento não afetam a sobrevivência das larvas.

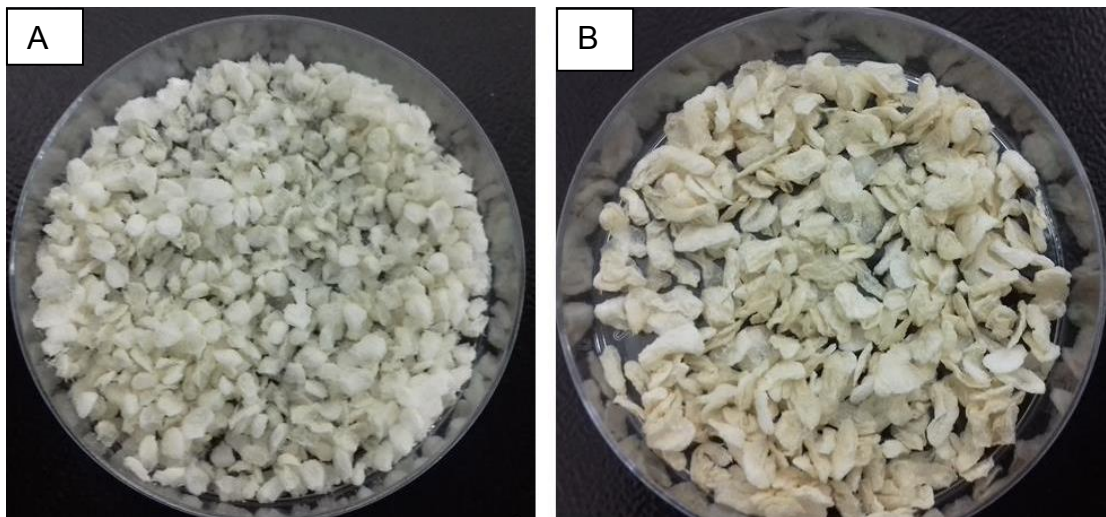


Figura 14. Cápsulas sem blastosporos (A) e cápsulas com blastosporos (B), após serem liofilizadas por 24 horas.

5. DISCUSSÃO

O aumento das arboviroses dengue, Zika e chikungunya e a volta da febre amarela em ambientes próximos a regiões urbanas amplia a necessidade de se utilizar métodos alternativos para o controle de *Ae. aegypti*. O controle desse vetor é importante para prevenir a transmissão de arbovírus, que normalmente não tem terapias antivirais específicas (Huang et al., 2017), exceto para o vírus da dengue.

Diante da prevalência e gravidade da dengue, esforços para desenvolver vacinas preventivas seguras e eficazes têm sido uma das principais prioridades de saúde pública (Feinberg e Ahmed, 2017). A vacina contra a dengue está se tornando uma realidade com a Dengvaxia desenvolvida pela Sanofi Pasteur sendo licenciada após vinte anos de desenvolvimento como a primeira vacina contra a dengue (Maier et al., 2017).

No Brasil, o controle de *Ae. aegypti* depende fortemente do uso de inseticidas contra adultos e larvas e, em consequência, a população de mosquitos no campo vem se tornando resistente a esses compostos (Martins et al., 2012). Na busca por reduzir o uso de inseticidas, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas com fungos entomopatogênicos para o controle de insetos vetores de doenças.

Os fungos das espécies *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são os mais utilizados no manejo integrado de pragas agrícolas e também são amplamente utilizados em pesquisas com insetos transmissores de doenças (Beemelmans et al., 2016).

Os agentes microbianos em combinação com inseticidas sintéticos seria uma alternativa para reduzir o impacto da resistência a inseticidas (Ambethgar, 2009). A combinação dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* com o inseticida permetrina aumentou a mortalidade de mosquitos adultos da espécie *Anopheles gambiae* quando comparou o uso desses agentes de controle isoladamente (Farenhorst et al., 2010). O fungo *M. anisopliae* foi suspenso com dose subletal do inseticida imidacloprid, aumentou a mortalidade de adultos de *Ae. aegypti* (Paula et al., 2011).

Com a perspectiva de reduzir o uso de inseticidas, esse estudo investigou a virulência de blastosporos e conídios do fungo *M. anisopliae* (isolado LEF 2000) contra larvas de *Ae. aegypti* (linhagem campo).

Nos bioensaios realizados com blastosporos e conídios no laboratório verificou-se que blastosporos foram mais eficientes para matar as larvas de *Ae. aegypti* que conídios. Todas as larvas tratadas com blastosporos morreram em 48 horas (S_{50} de 1 dia), o que demonstra que blastosporos do fungo *M. anisopliae* também são infectivos contra larvas de *Ae. aegypti* oriundas do campo.

Um estudo realizado por Alkhaibari et al. (2016) demonstrou a alta virulência de blastosporos contra larvas de *Ae. aegypti* (linhagem de laboratório). Segundo os autores, a alta virulência atribuída aos blastosporos em comparação aos conídios é devido à presença de parede celular mais fina, o que facilita a secreção de enzimas do fungo no inseto, e também devido à produção de maior quantidade de mucilagem, que facilita a adesão do fungo ao inseto, acelerando o processo de infecção. Blastosporos do fungo entomopatogênico *Tolypocladium cylindrosporum* foram mais virulentos que conídios contra larvas de mosquitos da espécie *Aedes sierrensis* (Soares e Pinnoc, 1984).

Tais resultados podem ter ocorrido porque conídios têm dificuldade em aderir à cutícula de larvas de *Ae. aegypti* devido à baixa produção de mucilagem e, portanto, em ambiente aquoso os conídios precisam ser ingeridos pelas larvas, mas eles não são capazes de atravessar o epitélio intestinal e invadir a hemocele (Butt et al., 2013). Além disso, a parede celular de conídios possui hidrofobinas que protegem o fungo contra o estresse ambiental (St. Leger, 1992), e essa proteína pode dificultar a interação do propágulo com o inseto em meio aquoso. No entanto, os blastosporos possuem características hidrofílicas, e em ambiente

aquoso são capazes de dispersar e manter interação com o tegumento das larvas (Miranpuri e Khachatourians, 1990), o que os torna mais infectivos.

A associação de fungos e insetos terrestres ocorre naturalmente no campo onde os conídios penetram o tegumento do inseto, atingem a hemolinfa e, originam hifas do tipo levedura unicelular (blastosporos), que tem a capacidade de circular livremente dentro da hemolinfa e explorar rapidamente os tecidos do hospedeiro (Wanchoo et al., 2009).

O sucesso da infecção por fungos entomopatogênicos depende das defesas imunológicas do inseto (Wraight et al., 1990). Neste sentido blastosporos parecem ter certa vantagem, uma vez que apresentam pouca ou nenhuma β -glucana na parede celular (Alkhaibari et al., 2016). Isto dificulta o sistema imunológico do inseto reconhecer o fungo na hemolinfa e, conseqüentemente, retarda o mecanismo de defesa do inseto contra o fungo (Brown e Gordon, 2005).

Além dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelo inseto contra a atuação de fungos entomopatogênicos, a eficiência destes bioinseticidas no campo também pode ser prejudicada em temperaturas elevadas. Nos bioensaios realizados em BOD nas temperaturas 25, 30 e 35 °C observou-se que a mortalidade das larvas diminuiu com o aumento da temperatura. Resultados similares foram observados por Pelizza et al. (2007), quando larvas de *Ae. aegypti* foram tratadas com zoósporos do fungo entomopatogênico *Leptolegnia chapmanii* nas mesmas temperaturas.

O resultado deste estudo demonstra que em condições de campo o aumento da temperatura poderia ser um fator limitante para a virulência de blastosporos de *M. anisopliae*. Esporos infectantes de *B. bassiana* e *M. anisopliae* têm sido testados no controle de larvas e adultos de mosquito, mas têm como limitação a falta de persistência dos esporos no ambiente (Scholte et al., 2004).

A temperatura é um fator fundamental para o desenvolvimento e atividade de todos os organismos (Mietkiewski et al., 1994). Ela afeta a germinação e a taxa de crescimento dos fungos no interior dos mosquitos hospedeiros (Kikankie et al., 2010). No entanto, segundo Kim et al. (2013), uma formulação adequada, pode proteger os blastosporos contra estresses abióticos.

Nos bioensaios de Campo-SI, realizados em local sombreado, mas em condições ambientais não controladas, foi demonstrado que 100% das larvas morreram no terceiro dia de avaliação. Já nos bioensaios de campo-SD

realizados com exposição direta a luz solar, foi possível constatar que mesmo expostos a temperaturas entre 25-38 °C os blastosporos do fungo *M. anisopliae* ainda foram capazes de apresentar eficiência com apenas 0,8% de sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* ao final de sete dias de avaliação.

A influência de radiação solar e da temperatura pode ter sido o fator que provocou um retardo na velocidade de infecção das larvas. A radiação ultravioleta (UV) é responsável por reduzir a virulência de conídios de fungos entomopatogênicos (Braga et al., 2015). A tolerância de um fungo a UV pode estar associada à virulência contra o inseto alvo, à tolerância a variações de temperatura, à formulação do fungo e ao método de aplicação (Fernandes et al., 2015).

Neste trabalho os bioensaios de persistência realizados no laboratório demonstraram que a sobrevivência das larvas adicionadas logo após o preparo da suspensão fúngica foi menor quando comparada à sobrevivência das larvas adicionadas nos bioensaios com o passar dos dias. Também foi observado que aos 6 e 9 dias ocorreu o aparecimento de conídios formados a partir dos blastosporos, o que pode ter contribuído para diminuir a sobrevivência das larvas nesses dias. O fungo emerge do inseto morto e dá origem a conídios, o que normalmente ocorre na parte externa do inseto (Shah e Pell, 2003).

No entanto, os testes de virulência de fungos entomopatogênicos em laboratório não estão necessariamente correlacionados com eficácia no campo, pois além da virulência, o isolado também deve se adaptar ao habitat do inseto alvo (Roberts e St. Leger, 2004).

A persistência da virulência de blastosporos no experimento de Campo-SD diminuiu ao longo dos dias e não ocorreu a formação de conídios nos bioensaios como aconteceu nos experimentos de persistência realizados no laboratório. Os efeitos promovidos pela radiação solar podem influenciar a capacidade de germinação do fungo e conseqüentemente a virulência (Rangel et al., 2004; Carolino et al., 2014; Falvo et al., 2016). A radiação UV-B pode bloquear o ciclo celular de forma permanente ou temporária, impedindo ou retardando consideravelmente a germinação do fungo (Braga et al., 2001).

A estabilidade dos propágulos fúngicos depende de fatores genéticos e forma de cultivo do fungo, o que pode influenciar na persistência da virulência do fungo *M. anisopliae* (Scheepmaker e Butt, 2010). O tempo em que os esporos de

fungos permanecem viáveis no campo é um indicativo do potencial como agente de controle biológico (Darbro e Thomas, 2009).

A melhoria da estabilidade e persistência de blastosporos pode ser alcançada através de melhorias nas condições de crescimento e nas formulações do fungo (Zelgere e Schweigkofler, 2001). As condições ambientais adversas prejudicam o controle microbiano com fungos entomopatogênicos e, por isso, são necessárias pesquisas que visem selecionar e melhorar linhagens de patógenos que apresentem características para serem utilizados no campo (Guerra et al., 2009).

Alguns adjuvantes podem melhorar a persistência de agentes microbianos no ambiente, protegendo-os da inativação pela luz solar (Reddy et al. 2008). O desenvolvimento das formulações de fungos entomopatogênicos à base de óleo é uma estratégia para preservá-los dos efeitos ambientais negativos (Luz et al., 1999). Formulações em óleo prolongam a sobrevivência do propágulo e diminuem a sensibilidade a radiações UV quando comparada com suspensões aquosas (Inglis et al., 1995).

A atividade inseticida da planta *Azadirachta indica* conhecida popularmente como nim tem sido reportada para mais de 400 espécies de insetos, das quais 100 destas têm ocorrência no Brasil (Penteado, 1999). O óleo de nim apresentou efeito tóxico contra larvas de *Anopheles gambiae* e inibiu o desenvolvimento das pupas (Okumu et al., 2007). E, também matou 90% de larvas de mosquitos das espécies *An. stephensi*, *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* (Gunasekaran et al., 2009).

Neste trabalho concentrações acima de 0,1% de óleo de nim foram tóxicas às larvas de *Ae. aegypti* em condições de laboratório. A associação de extratos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de insetos, reduzir custos e impactos ambientais (Marques et al. (2004).

A utilização de fungos entomopatogênicos suspensos com óleos vegetais pode ser vantajosa para aumentar a eficiência do controle de insetos vetores, entretanto, é necessário verificar se o óleo não é prejudicial à germinação do fungo. Neste trabalho verificou-se que a germinação de blastosporos (1×10^5 blastosporos mL^{-1}) do fungo *M. anisopliae* suspensos com óleo de nim (0,01%) não foi afetada.

O óleo de nim na concentração de 0,039% também não afetou o crescimento radial do fungo *M. anisopliae* (Marques et al., 2004). Conídios dos fungos *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentaram compatibilidade com o óleo de nim (Santos et al., 2009). A combinação de óleo de nim, extratos aquosos de sementes de nim e folhas, suspensos junto com *B. bassiana*, também não teve efeito negativo sobre o crescimento vegetativo do fungo ou sobre a produção e viabilidade de conídios (Depieri et al., 2005). Conídios de *M. anisopliae* suspensos com óleo vegetal + isoparafina aumentaram a persistência da virulência do fungo contra mosquitos adultos da espécie *Ae. aegypti*, em condições que simularam campo (Carolino et al., 2014).

Este trabalho foi o primeiro realizado com blastosporos suspensos com óleo de nim e pode-se verificar que nos bioensaios realizados no Campo-SD com baixa concentração de blastosporos (1×10^5 blastosporos mL^{-1}) suspensos em baixa concentração de óleo de Nim (0,01%), a sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* provenientes de ovos coletados no campo foi de apenas 5.8% ao final de 7 dias de avaliação, mostrando o efeito positivo na virulência do fungo pelo óleo de nim. A combinação de fitoquímicos com fungos entomopatogênicos além de aumentar a mortalidade total e reduzir o tempo de morte das larvas também pode aumentar a persistência dos fungos e reduzir as chances de desenvolvimento de resistências (Gomes et al., 2015),

Baixas concentrações de óleo de nim misturadas com conídios de *M. anisopliae* mantiveram efeito sinérgico com o fungo, quando a suspensão foi testada contra larvas da espécie *Ae. aegypti* provenientes de ovos coletados no campo (Gomes et al., 2015). Conídios do fungo *M. anisopliae* suspenso com óleo de nim aumentam não apenas a virulência, mas também a persistência do fungo, no controle de larvas de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* em bioensaios realizados em condições de campo (Paula et al., 2019).

O encapsulamento de propágulos fúngicos também pode ser utilizado para aumentar a persistência de fungos no ambiente. Essa técnica consiste no revestimento de partículas ou gotículas de material líquido ou gasoso, formando cápsulas em miniatura, que podem liberar seu conteúdo a taxas controladas e/ou sob determinadas condições (Fávaro-Trindade et al., 2008). Entre os polímeros mais comumente usados como material encapsulante existe o alginato de sódio,

que é capaz de formar uma matriz altamente versátil, biocompatível e não tóxica para a proteção de componentes ativos (Goh et al., 2012).

Polímeros formados a partir de alginato de sódio vêm sendo usados no encapsulamento de fungos entomopatogênicos, promovendo maior capacidade de sobrevivência dos fungos em condições de campo, além de ser solúvel em água e não tóxico ao ambiente e ao homem (Carballo, 1998). Conídios do fungo *M. anisopliae* encapsulado em alginato de sódio e expostos às condições ambientais mantiveram a virulência sobre as larvas de *Ae. aegypti* (Morais, 2015).

No entanto, no presente trabalho, os blastosporos encapsulados, apesar de terem germinado em meio de cultura BDA, não foram virulentos contra larvas de *Ae. aegypti*. Portanto, se faz necessário aprimorar a técnica de encapsulamento para que o propágulo fúngico permaneça virulento e também que possa ser liberado gradativamente das cápsulas ao entrar em contato com a água.

O presente estudo apresenta carácter relevante, pois mostra que em condições de campo, blastosporos do fungo *M. anisopliae* (isolado LEF 2000) são virulentos para larvas silvestres de mosquitos *Ae. aegypti* e apresentam potencial para serem utilizados no controle biológico deste vetor. Além disso, blastosporos podem ser produzidos em grande número mais rapidamente que os conídios (Jackson et al., 1997).

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Este estudo mostra pela primeira vez que blastosporos são virulentos contra larvas de *Ae. aegypti* provenientes de ovos coletados no campo e permanecem virulentos em experimentos realizados em condições adversas de campo.

Blastosporos de *M. anisopliae* foram mais virulentos para larvas de *Ae. aegypti* (oriundas do campo) quando comparados com conídios do mesmo fungo;

Um aumento na temperatura influenciou negativamente na virulência de blastosporos;

A persistência de blastosporos nos bioensaios realizados no laboratório foi maior que a persistência dos blastosporos nos bioensaios realizados no Campo-SD;

Blastosporos de *M. anisopliae* foram virulentos contra larvas silvestres do mosquito *Ae. aegypti* em experimentos realizados em condições de campo-SID e campo-SD;

Blastosporos suspensos junto com óleo de nim apresentaram efeito sinérgico, o que ocasionou maior mortalidade das larvas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamek, L. (1963) Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch). *Folia Microbiologica (Prah)*. 10:255-257.
- Aguiar B.S., Lorenz, C., Virginio, F., Suesdek, L., Chiaravalloti-Neto, F. (2018) Potential risks of Zika and chikungunya outbreaks in Brazil: A modeling study. *International Journal of Infectious Diseases*. 70:20-29.
- Albuquerque, I.G.C., Marandino, R., Mendonça, A.P., Nogueira, R.M.R., Vasconcelos, P.F.C., Guerra, L.R., Brandão, B.C., Mendonça, A.P.P., Aguiar, G.R., Bacco, P.A.M. (2012) Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(1):128-129.
- Alkhaibari, A.M, Carolino, A.T., Yavasoglu, S.I., Maffeis, T., Mattoso, T.C., Bull, J.C., Samuels, R.I., Butt, T.M. (2016) *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. *Plos Pathogens*. 12(7):1-19.
- Alouani, A., Rehim, N., Soltani, N. (2009) Larvicidal Activity of a Neem Tree Extract (Azadirachtin) Against Mosquito Larvae in the Republic of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2(1):15-22.

- Alves, S.B., Alves, L.F.A., Lopes, R.B., Pereira, R.M., and Vieira, S.A. (2002) Potential of Some *Metarhizium anisopliae* Isolates for Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae). *Journal of Applied Entomology*.126:504-509.
- Alves, S.B. (1998) Controle microbiano de insetos. 2 ed. Piracicaba, 1163p.
- Ambethgar, V. (2009) Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. *Journal of Biopesticides*. 2(2):177-193.
- Andersen, S.O. (2010) Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40:166-178.
- Andersen, S.O., Hojrup, P., Roepstorff, P. (1995) Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25(2):153-176.
- Araújo, M.L.V., Miranda, J.G.V., Sampaio, R., Moret, M.A., Rosário, R.S., Saba, H. (2018) Nonlocal dispersal of dengue in the state of Bahia. *Science of the Total Environment*. 631(632):40-46.
- Araújo, H.R.C. (2011) Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo Dengue. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Belo Horizonte – MG, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 191p.
- Asbury, M.D.A.K., Arnason, B.G., Adams, M.D.R.D. (1969) The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. *Medicine*. 48(3):173-215.
- Avery, P.B., Faull, J., Simmonds, M.S.J (2008) Effects of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Encarsia formosa* on the control of the greenhouse whitefly: preliminary assessment of a compatibility study. *Biocontrol*. 53(2):303–316.

- Balandrin, M.F., Mark-Lee, S., Klocke, J.A. (1988) Biologically active volatile organosulfur compounds from seeds of the neem tree, *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Journal of Agricultural and Food*. 36(5):1048-1054.
- Beemelmans, C., Guo, H., Rischer, M., Poulsen, M. (2016) Natural products from microbes associated with insects. *Beilstein J. Org. Chem.* 12:314-327.
- Benelli, G. (2015) Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitol Res.* 114:3201–3212.
- Benelli, G., Bedini, S., Cosci, F., Toniolo, C. Conti, B., Nicoletti, M. (2015) Larvicidal and ovideterrent properties of neem oil and fractions against the filariasis vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a bioactivity survey across production sites. *Parasitol Res.* 114:227-236.
- Bernardo, C.C., Barreto, L. P., Silva, C.S.R., Luz, C., Arruda, W., Fernandes, E.K. K. (2018) Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 9(5):1334-1342.
- Bezerra, E.B., Castro Jr, F.P., Santos, J.W., Santos, T.S., Fernandes, C.R.M. (2006) Biologia e Exigências Térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*. 35(6):853-860.
- Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G. (1987) Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(7):1679-1684.
- Binggeli, O., Neyen, C., Poidevin, M., Lemaitre, B., (2014). Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 10(5):1-15.

- Blanford, S., Chan, B.H.K., Jenkins, N.S.D., Turner, R.J., Read, A.F., Thomas, M. B. (2005) Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*. 308:1638-1641.
- Bogoch, I. I., Brady, O.J., Kraemer, M.U., German, M., Creatore, M.I., Kulkarni, M.A., Brownstein, J. S., Mekaru, S.R., Hay, S., Groot, E., Watts, A., Khan, K. (2016) Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *The Lancet*. 387(10016):387-335.
- Braga, G.U.L., Rangel, D.E.N., Fernandes, E.K.K., Flint, S.D., Roberts, D.W. (2015) Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Curr Genet*. 61:405-425.
- Braga. I.A., Valle, D. (2007) *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saude*. 16(4):279-93.
- Braga, G.U.L., S.D. Flint, C.D. Miller, A.J. Anderson and D. W. Roberts (2001) Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium anisopliae* isolates from sites at latitudes from 618N to 548S. *J. Invertebr. Pathol*. 78:98–108.
- Brasil (2016) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico, 2016. *Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica, 2*. 247(5):1-8.
- Brasil, P. Sequeira, P.C., Freitas, A.D.A., Zogbi, H. E., Calvet, G.A., Souza, R.V., Siqueira, A.M., Mendonça, M.C.L. Nogueira, R.M.R., Filippis, A.M.B. Solomon, T. (2016) Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *Lancet*. 387:1482.
- Brasil (2014) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância em Saúde*. Brasília, 2014. 812p.

- Brasil (2001). Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) *Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas*. 3 ed. Brasília, 2001. 84p.
- Brown, G.D., Gordon, S. (2005) Immune recognition of fungal β -glucans. *Cellular Microbiology*. 7(4):471-479.
- Butler, D. (2016) Microcephaly surge in doubt: heightened awareness of Zika virus could help to explain the reported spike in birth defects. *News In Focus, Nature*. 530:13-14.
- Butt, T.M., Greenfield, B.P.J., Greig, C., Maffei, T.G.G., Taylor, J.W.D., Piasecka, J., Dudley, E., Abdulla, A., Dubovskiy, I.M., Jurado, I.G., Moraga, E.Q., Penny, M.W., Eastwood, D.C. (2013) *Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death. *PLoS ONE*. 8(12):1-11.
- Campos, G.S., Bandeira, A.C., Sardi, S.I. (2015) Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 21(10):1885-1886.
- Cao-Lormeau, V.M., Alexandre Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.E., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S.K., Willison, H.J., Musset, L., Manuguerra, J.C., Despres, P., Fournier, E., Mallet, H. P., Musso, D., Fontanet, A., Neil, J., Ghawché, F. (2016) Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 9(387):1531-1539.
- Carballo M. (1998) Formulaci3n de hongos entomopat3genos. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. 47:1-4.
- 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(198):2-7.

- Chaves, T.S.S., Orduna, T., Lepetic, A., Macchi, A., Verbanaz, S., Risquez, A., Perret, C., Echazarreta, S., Rodríguez-Morales, A. J., Lloveras, S. C. (2018) Yellow fever in Brazil: Epidemiological aspects and implications for travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 23:1-3.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira R.L. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1.ed. FIOCRUZ, 225p.
- Contador, N.T., Zaragoza, O. (2019) Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *J. Fungi*. 5(3):1-13.
- Daoust, R.A., Roberts, D.W. (1982) Virulence stability of the formulation, but the potency of natural and insect-passaged strains of cy of the preparation can only be assessed *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 40:107-117.
- Darbro, J.M., Thomas, M.B. (2009) Spore Persistence and Likelihood of Aeroallergenicity of Entomopathogenic Fungi Used for Mosquito Control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80(6):992-997.
- Depieri, R.A., Martinez, S., Menezes, A.O. (2005) Compatibility of the Fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. *Neotropical Entomology*. 34(4):601-606.
- Dhar, R., Zhang, K., Talwar, G.P. Garg, S., Kumar, N. (1998) Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. *J. Ethnopharmacol.* 61:31-39.
- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., Haddow, A.J. (1952) Zika Virus (I). Isolations And Serological Specificity. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*. 46(5):509-520.

- Donalisio, M.R., Freitas, A.R.R., Zuben, A.P.B.V. (2017) Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev. Saúde Pública*. 51(30):1-6.
- Dua, V.K., Pandey, C.A., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T.P. Dash, A. (2009) Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*. 8(124):1-6.
- Dunn, P.E. (1986) Biochemical aspects of insect immunity. *Annual. Review of Entomology*. 31:321-339.
- Elandt, J.R.C., Johnson N.L. (1980) *Survival models and data analysis*. John Wiley & Sons, New York. 480p.
- Falvo, M.L., Pereira-Junior, R.A., Rodrigues, J., Lastra, C.C.L., García, J.J., Fernandes, E.K.K., Luz, C. (2016) UV-B radiation reduces in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* s.l. but does not affect virulence in fungustreated *Aedes aegypti* adults and development on dead Mosquitões. *Journal of Applied Microbiology*. 121(1):1710-1717.
- Farenhorst, M., Knols, B.G.J., Thomas, M.B., Howard, A.F.V., Takken, W. Rowland, M., N'Guessan, R. (2010) Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *PLoS ONE*. 5(8):1-10.
- Faria, M.R., Wraight, S.P. (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*.43:237–256.
- Fávaro-Trindade, C.S., Pinho, S.C. (2008) Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz. J. Food Technol*. 11(2):103-112.
- Fay, R.W., Eliason, D.A. (1966) A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosquito News*. 26:531–535.

- Fay, R.W., Perry, A.S. (1965) Laboratory studies of ovipositional preference of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*. 24:276–281.
- Feinberg, M.B., Ahmed, R. (2017) Advancing dengue vaccine development. *Science*. 358(6365):865-866.
- Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Roberts, D.W. (2015) Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Curr Genet*. 61:427-440.
- Ferron, P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23:409-442 *apud* Xavier, L.M.S., Ávila, C.J. (2006) Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin a *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera, Cydnidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 50(4):540-546.
- FIOCRUZ (2016) Dengue: vírus e vetor. Curiosidades sobre o *Ae. aegypti*. Instituto Oswaldo Cruz. <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html>. Acesso em junho de 2016.
- FIOCRUZ (2008) Conheça o comportamento do mosquito *Aedes aegypti*. Instituto Oswaldo Cruz. <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=571&sid=32>. Acesso em março de 2019.
- Fuller, T.L., Calvet, G., Estevam, C.G., Angelo, J.R., Abiodun, G.J., Halai, U.A., Santis, B.D., Sequeira, P.C., Araujo, E.M., Sampaio, A.S., Mendonc, M.C.L., Fabri, A., Ribeiro, R.M., Harrigan, R., Smith, T.B., Gabaglia, C.R., Brasil, P., Filippis, A.M.B., Nielsen-Saines, K. (2017) Behavioral, climatic, and environmental risk factors for Zika and Chikungunya virus infections in Rio de Janeiro, Brazil, 2015-16. *PLoS ONE*. 16:1-15.
- García-Munguía, A.M., Garza-Hernández, J.A., Rebollar-Tellez, E.A., Mario A Rodríguez-Pérez, M.A.R., Reyes-Villanueva, F. (2011) Transmission of

- Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitões. *Parasites & Vectors*. 4(24):1-6.
- Godói, I.P., Lemos, L.L.P., Araújo, V.E., Bonoto, B.C., Godman, B., Júnior, A.A. (2016) CYD-TDV dengue vaccine: systematic review and meta-analysis of efficacy, immunogenicity and safety. *J. Comp. Eff. Res.* 1:1-20.
- Goettel, M.S., Inglis, G.D., (1997). Fungi: hyphomycetes. *In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology*. 1. ed. San Diego, USA, Academic Press, p. 213-249.
- Goh, C.H., Heng, P.W.S., Chan, L.W. (2012) Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. 88:1-12.
- Gomes, S.A., Paula, A.R., Ribeiro, A., Moraes, C.O.P., Santos, J.W.A.B., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2015) Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasites & Vectors*. 8(669):1-8.
- Gourinat, A.C., Connor, O.O. Calvez, E., Goarant, C., Rouzeyrol, M.D. (2015) Detection of Zika Virus in Urine. *Emerging Infectious Diseases*. 21(1):84-86.
- Gubler, D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (3):480-496.
- Guerra, D.M.S., Pires, A.P.D., Lima, E.A.L.A. (2009) Persistência de *Metarhizium anisopliae* spp no solo sob diferentes condições de temperatura e umidade. *Revista Caatinga*. 22(2):50-54.
- Guirado, M. M. & Bicudo, H.E.C. (2009) Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). 6(64):5-14.

- Gunasekaran, K., Doss, P.S., Vaidyanathan, K. (2004) Laboratory and field evaluation of Teknar HPD, a biolarvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*, against mosquito vectors. *Acta Trop.* 92:109-118.
- Gunasekaran, K., Vijayakumar, T., Kalyanasundaram, M. (2009) Larvicidal & emergence inhibitory activities of NeemAzal T/S 1.2 per cent EC against vectors of malaria, filariasis & dengue. *Indian Journal Of Medical Research.* 130(2):138-145.
- Hajek, A.E., St. Leger, R.J. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-322
- Halliday, W.R., Feyereisen, R. (1987) Why Does DDT Toxicity Change after a Blood Meal in Adult Female *Culex pipiens*? *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 28:172-181.
- Hayes, E.B. (2009) Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases.* 15(9):1347-1350.
- Holder, D.J., Kirkland, B.H., Lewis, M.W., Keyhani, N.O. (2007) Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology.* 153:3448-3457.
- Holder, D.J., Keyhani, N.O. (2005) Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrates. *Applied and Environmental Microbiology.* 71:5260-5266.
- Hopp, M.J., Foley, J.A. (2001). Global-scale relationships between climate and the dengue fever vector, *Aedes aegypti*. *Clim. Change.* 48 (2):441-463.
- Huang, Y.J.S., Stephen Higgs, S., Vanlandingham, D.L. (2017) Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. *Insects.* 8(21):1-25.

- Hughes, R.A.C., Swan, A.V.S., Raphael, J.C., Annane, D., Koningsveld, R.V., Doorn, P.A.V. (2007) Immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: a systematic review. *Brain Advance Access published*. 130:2245-2257.
- Humber, R.A. (2008) Evolution of entomopathogenicity in fungi. *J. Invertebr Pathol.* 98:262-266.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, CABI Publishing. 23-69.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Goettel, M.S. (1995) Effects of simulated rain on the persistence of *Beauveria bassiana* on leaves of alfalfa and wheat. *Biocontrol Science and Technology.* 5:365-369.
- Isman, M.B. (2006) Botanical insecticides, deterrent and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomic.* 51:45-66.
- Iwanicki, N.S., Ferreira, B.O., Mascarin, G.M., Júnior, I.D. (2018) Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. *Fungal Biology.* 122:883-890.
- Jackson, M.A., Jaronski, S.T. (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological research.* 113:842–50.
- Jackson, M.A., Cliquet, S., Iten, L.B. (2003) Media and Fermentation Processes for the Rapid Production of High Concentrations of Stable Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology.* 13(1):23-33.

- Jackson, M.A., McGuire, M.R., Lacey, L.A., Wraight, S.P. (1997). Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 101:35-41.
- Kamal, M. Kenawy, M.A., Rady, M.H., Khaled, A.S., Samy, A. M. (2018) Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. *PLoS ONE*. 13(12):1-21.
- Kannathasan, K., Senthilkumar, A., Venkatesalu, V. (2011) Mosquito larvicidal activity of methyl-p-hydroxybenzoate isolated from the leaves of *Vitex trifolia* Linn. *Acta Tropica* 120:115-118.
- Kanungo, S., Shukla, D., Kim, R. (2008) Branch retinal artery occlusion secondary to dengue fever. *Indian J. Ophthalmol.* 56:73-4.
- Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Knols, B.D., Knols, B.G.J., Koekemoer, L.L., Farenhorst, M., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Coetzee, M. (2010) The infectivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to insecticide-resistant and susceptible *Anopheles arabiensis* mosquitoes at two different temperatures. *Malaria Journal*. 9(71):1-9.
- Kim, J.S., Je, Y.H., Skinner, M., Parker, B.L. (2013) An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) *Pest Manage. Sci.* 69:576-581.
- Kirkland, B.H., Cho, E.M., Keyhani, N.O. (2004) Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*. 31:414-421.

- Kraemer, M.U.G., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A., Shearer, F.M., Barker, C. M., Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I.R.F., Teng, H.J., Brady, O.J., Messina, J.P., Pigott, D.M., Scott, T.W., Smith, D.L., Wint, G.R.W., Golding, N., Hay, S.I. (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLIFE*. 4:1-18.
- Kweka, E.J., Nyindo, M., Mosha, F., Silva, A.G. (2011) Insecticidal activity of the essential oil from fruits and seeds of *Schinus terebinthifolia* Raddi against African malaria vectors. *Parasites & Vectors*. 4(129):1-10.
- Lacey, L. A., Undeen, A. H. (1986). Microbial control of black flies and mosquitos. *Ann. Rev. Entamol.* 31:265-96.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. (2001) Insect Pathogens as biological control agents: do they have a future. *Biol. Contr.* 21(3):230-248.
- Leite, L.G., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Alves, S.B. (2003) Produção de fungos entomopatogênicos. 1° ed. Ribeirão Preto: *Sene Pinto*. 92p.
- Lindsay, S. W., Wilson, A., Golding, N., Scott, T. W., Takken, W. (2017) Improving the built environment in urban areas to control *Aedes aegypti*-borne diseases. *Bull World Health Organ.* 95:607-608.
- Liu, N,L,T., Reid, W.R., Yang, T., Zhang, L. (2011) Multiple Cytochrome P450 Genes: Their Constitutive Overexpression and Permethrin Induction in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLoS ONE*. 6(8):1-8.
- Lu, H.L., St. Leger, R.J. (2016) Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi. *Advances in Genetics*.94:1-35.

- Luna, J.E.D., Martins, M.F., Anjos, A.F., Kuwabara, E.F., Silva, M.A.N. (2004) Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil Comunicação Breve. *Revista Saúde Pública* 38(6):842-843.
- Luz, P.M., Codeço, C.T., Medlock, J., Struchiner, C.J., Valle, D., Galvani, A.P. (2009) Impact of insecticide interventions on the abundance and resistance profile of *Aedes aegypti*. *Epidemiol. Infect.* 137:1203-1215.
- Luz, C., Silva, I.G., Magalhães, B.P., Cordeiro, C.M.T., Tigano, M.S. (1999) Control of *Triatoma infestans* (Reduviidae, Tria-tominae) with *Beauveria bassiana*: preliminary assays on formulation and application in the field. *Sociedade Entomológica Brasileira*. 28:101-110.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Otrera, V.C.G., Carvalho, L.R., Caldas Júnior, A.L., Brogdon, W.G. (2007) Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 102(8):895-900.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2010) *Microbiologia de Brock*. 12° ed. São Paulo, SP: Ed. Artmed. 1091p
- Maheswaran, R., Ignacimuthu, S. (2012) A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Parasitol Res.* 110:1801-1813.
- Maier, S.B., Huang, X., Massad, E., Amaku, M., Burattini, M.N., Greenhalgh, D. (2017) Analysis of the optimal vaccination age for dengue in Brazil with a tetravalent dengue vaccine. *Mathematical Biosciences*. 294:15-32.
- Malarvizhi, P., Usha, G. (2019) A study of clinical manifestations of dengue fever with laboratory investigations and outcome in a tertiary care center in Tamil Nadu. *International Archives of Integrated Medicine*. 6(3):95-98.

- Mardondes, C.B. (2001) *Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo: Atheneu. 59-103.
- Marques, R.P., Monteiro, A.C., Pereira, G.T. (2004) Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*. 34(6):1675-1680.
- Martins, A.J., Ribeiro, C.D.M., Bellinato, D.F., Peixoto, A.A., Valle, D., Lima, J.B.P. (2012) Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. *PLoS ONE*. 7(3):1-9.
- Martinez, S.S. (2003). O Uso do Nim no Café e em outras Culturas. *Revista Agroecologia Hoje*. 4:13-14.
- Mascarin, G.M., Kobori, N.N., Jacksony, M.A., Dunlap, C.A., Delalibera Jr., I. (2018) Nitrogen sources affect productivity, desiccation tolerance and storage stability of *Beauveria bassiana* blastospores. *Journal of Applied Microbiology*. 124(3):810-820.
- Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kobori, N.N., Behle, R. W., Delalibera Júnior, Í. (2015) Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of invertebrate pathology*. 127:11-20.
- Matthews, B.J., Dudchenko, O., Kingan, S.B., Koren, S., Antoshechkin, I., Crawford, J.E., Glassford, W.J., Herre, M., Redmond, S.N., Rose, N.H., Weedall, G.D., Wu. Y., Batra, S.S., Brito-Sierra, C.A. et al., (2018) Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature*. 563(7732):501-507.

- Mehlhorn, H. (2011) *Nature helps. How plants and other organisms contribute to solve health problems*. Parasitology Research Monographs 1. Berlin: Springer, 372p.
- Micha, B. Z. (1958) The Effect of Temperature on the Growth Rate and Survival of the Immature Stages of *Aedes aegypti* (L.). *Bulletin of Entomological Research*. 49(1):157-163.
- Mietkiewski, R., Tkaczuk, C., Zurek, M., Geest, L.P.S. (1994) Temperature requirements of four entomopathogenic fungi. *Acta Mycologica*. 29(1):109-120.
- Miranpuri, G.S., Khachatourians, G. (1990) Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. *Veterinary Parasitology*. 37:155-162.
- Monath, T.P. (2001) Yellow fever: An update. *Lancet Infectious Diseases*. 1(1):11-20.
- Mora, M.A.E., Castilho, A.M.C., Fraga, M.E. (2017) Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arq. Inst. Biol.* 84:1-10.
- Morais, C.O.P. (2015) Combinação de fungos entomopatogênicos com o inseticida diflubenzuron e o encapsulamento de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de larvas de *Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes-RJ -Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 95p.
- Mordue, A.J., Nisbet, A.J. (2000) Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 29(4):615-632.
- Mossini, S.A.G., Kimmelmeier, C. (2005) A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. *Acta Farm. Bonaerense*. 24(1):139-148.

- Musso, D. (2015) Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect. Dis.* 21(10):187.
- Musso, D., Lorneau, V.M., Gubler, D.J. (2015a) Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet.* 386(9990):243-244.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., Lorneau, V.M.C. (2015b) Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg Infect Dis.* 21(2):359-361.
- Napolitano, R., Juárez, M.P. (1997) Entomopathogenous Fungi Degrade Epicuticular Hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 34(1):208-214.
- Neto, O.S., Gomes, S.A., Soares, A. R., Machado, F.L.S., Samuels, R.I., Fonseca, R.N., Menezes, J.S., Moraes, J.L.C., Campos, E., Mury, F.B., Silva, J.R. (2016) Larvicidal Potential of the Halogenated Sesquiterpene (+)-Obtusol, Isolated from the Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodomelaceae), against the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). *Mar. Drugs.* 14(20):1-14.
- Normile, D (2013). Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 342(6157):415.
- Nunes, M.L., Carlini, C. R., Marinowic, D., Neto, F.K., Fiori, H.H., Scotta, M.C., Zanellaa, P.L.A., Soder, R.B., Costa, J. C. (2016) Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. *J Pediatr. (Rio J).* 92(3):230-240.
- Okumu, F.O., Knols, B.G.J., Knols, U. (2007) Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal.* 6(63):1-8.
- Oliveira, M.S.S., Roel, A.R., Arruda, E.J., Marques, A.S. (2007) Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartuch-do-milho *Spodoptera*

- frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciênc. Agrotec., Lavras*. 31(2):326-331.
- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N.O. (2013) Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4:357–374.
- Pai, H.H., Hsu, E.L. (2013) Effectiveness and Acceptance of Total Release Insecticidal Aerosol Cans as a Control Measure in Reducing Dengue Vectors. National Environmental Health Association. 76(6):68-74.
- Parra, J.R.P.; Botelho, P.S.M.; Ferreira, B.S.C.; Bento, J.M.S. (2002) Controle Biológico no Brasil- Parasitóides e Predadores. São Paulo: Monole, 635p.
- Paula, A.R., Ribeiro, A., Lemos, F.J.A., Silva, C.P., Richard I. Samuels, R.I. (2019) Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasites & Vectors*. 12(163):1-9.
- 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):1-8.
- Paula, A.R., Brito, E., Pereira, C.R., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Suscetibilidade do adulto de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) à infecção por *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*: perspectivas para o controle de vetores da dengue. *Biocontrol Science and Technology*. 18(10): 1017-1025.
- Parida, M.M., Upadhyay, C., Pandya, G., Jana, A.M. (2002) Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.* 79:273-278.
- Paris, M., Melodelima, C., Coissac, E., Tetreau, G., Reynaud, S., David, J.P., Despres, L. (2012) Transcription profiling of resistance to Bti toxins in the

- mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109:201-208.
- Paris, M., David, J. P., Despres, L. (2011) Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology*. 20:1184-1194.
- Pedrini, N., Crespo, N.R., Juárez, P (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146:124-137.
- Pelizza, S.A., Lastra, C.C.L., Becnel, J.J., Bisaro, V., García, J.J. (2007) Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96(2):133-137.
- Penteado, S.R. (1999) Defensivos alternativos e naturais para uma agricultura saudável. 3° ed.Campinas: CATI. 79p.
- Pereira, C.R., Paula, A.R., Gomes, S.A., Oliveira, P.C., Samuels, R.I. (2009) The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*. 1-6.
- Pimenta, A.T.A., Santiago, G.M.P., Arriaga, A.M.C., Menezes, G.H.A., Bezerra, S.B. (2006) Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(4):501-505.
- Pinto Junior, V.L. (2014) Dengue e Chikungunya: coexistência possível no Brasil. *Rev Med Saude*. 3(1):2-3.
- Polanczyk, R.A., Garcia, M.O., Alves, S.B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelenses* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*. 37(6):813-816.

- Powers, A.M. (2010) Chikungunya. *Clin Lab Med.* 30(1):209–219.
- Qu, S., Wang, S. (2018) Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental and Comparative Immunology.* 83:96-103
- Quesada-Moraga, E., Carrasco-Díaz, J.A., Santiago-Alvare, Z.C. (2006) Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J Appl Entomol.* 130:442-452.
- Rajadhyaksha, A., Mehra, S. (2012) Dengue fever evolving into systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a case report. *Lupus.* 21:999-1002.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Flint, S.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W. (2004) Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology.* 81(2/3):77-83.
- Rather, I.A., Parray, H.A., Lone, J.B., Paek, W.K., Lim, J., Bajpai, V.K., Park, Y.H. (2017) Prevention and Control Strategies to Counter Dengue Virus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 7(336):1-8.
- Reddy. N.P., Khan, P.A.A., Devi, K.U., Victor, J.S., Sharma, H.C. (2008). Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Pest Manag Sci.* 64:909–915
- Reyes-Villanueva, F., Garza-Hernandez, J.A., Garcia-Munguia, A.M., Tamez-Guerra, P., Howard, A.F.V., Rodriguez-Perez, M.A. (2011) Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors.* 4(171):1-7.
- Rodrigues, M. M., Marques, G. R. A. M., Serpa, L. L. N., Arduino, M. B., Voltolini, J. C., Barbosa, G. L., Andrade, V. R., Lima, V. L. C. (2015) Density of *Aedes*

aegypti and *Aedes albopictus* and its association with number of residents and meteorological variables in the home environment of dengue endemic area, São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*. 8(115):1-9.

Rodriguez-Morales, A.J. (2015) Dengue and chikungunya were not enough: now also Zika arrived. *Arch Med*. 11(2:3):1-4.

Rose, R.I. (2001) Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*. 7(1):17-23.

Roberts, D.W., St Leger, R.J. (2004) *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect pathogenic fungi: mycological aspects. In: Laskin, A.I., Bennett, J.W., Gadd, G. (Eds.), *Adv Appl Microbiol*. 54:1-70. Doi:10.1016/S0065-2164(04)54001-7

Roberts, D.R. & His, B.P. (1977) Method of evaluating *Aedes* ovipositional attractants. *Journal of Medical Entomology*. 14:129-131.

Robinson, M.C. (1955) An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*. 49 (1):28-32.

Rodriguez, H.C., Vendramim, J.D. (1997) Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) *Revista da Agricultura*. 72:305-318.

Samuels, R.I., Paterson, I.C. (1995) Mini Review: Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol*. 110(4):661-669.

Samuels, R.I., Paula, A.R., Carolino, A.T., Gomes, S.A., Morais, C.O.P., Cypriano, M.B.C., Silva, L.E.I., Ribeiro, A., Santos, J.W.A.B., Silva, C.P. (2016) Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world

- applications for mosquito biological control. *Open Access Insect Physiology*. 6:25-31.
- Sandhu, S. S., Sharma, A. K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., Jaglan, S., A. K. Sharma, A. K., Malhotra, S. (2012) Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation. *Journal of Pathogens*. 2012(126819):1-10.
- Santos, A.B.S., Silva, T.F.B., Santos, A.C., Paiva, L. M., Lima, E. A.L.A. (2009) Efeito fungitóxico do óleo de Nim sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Caatinga*. 22(2):17-22.
- Scheepmaker, J.W.A., Butt, T.M. (2010) Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with regulations. *Biocontrol Science and Technology*. 20(5):503-552.
- 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., Knols, B.G.J., Samson, R.A., Takken, W. (2004) Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of insect science*. 4:1-19.
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E.M., Feitosa, I.M.L, Horovitz, D.D.G., Cavalcanti, D.P., Pessoa, A., Doriqui, M.J.R, Neri, J.I., Neto, J.M.P., Wanderley, H.Y.C., Cernach, M., El-Husny, A.S., Pone, M.V.S, Cassio, L.C. Serao, C.L.C., Sanseverino, M.T.V. (2016) Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly-Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly*. 65(3):59-62.
- Seye, F., Ndiaye, M., Faye, O., Afoutou, J.M. (2012) Evaluation of Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem

- (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults. *Malaria Chemotherapy, Control & Elimination*. 1:1-6.
- Shah, P. A., Pel, J.K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological agents. *Plant and Invertebrate Ecology Division*. 413-423.
- Shahid, A.A., Rao, A.Q., Bakhsh, A., Husnain, T. (2012) Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.* 64 (1):21-42.
- Silva, M.V., Santi, L., Staats, C.C., Costa, A.M., Colodel, E.M., Driemeier, D., Vainstein, M.H. Schrank, A. (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology*. 156:382–392.
- Silveira-Neto, S., Nakano, O., Barbin, D., Villa Nova, N. (1976) Manual de ecologia dos insetos. São Paulo, Agronômica Ceres, 419p. *Apud* Beserra, E.B., Castro Jr., F.P., Santos, J.W., Santos, T. S., Fernandes, C. R. M. (2006) Biologia e Exigências Térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*. 35(6):853-860.
- Simas, N.K., Lima, E.C., Conceição, S.R., Kuster, R.M., Filho, A.M.O. (2004) Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova*. 27(1):46-49.
- Soares Jr.G.G., Pinnock., D.E. (1984) Effect of temperature on germination, growth, and infectivity of the mosquito pathogen *Tolypocladium cylindrosporum* (deuteromycotina; hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*. 43(2):242-247.
- St. leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D. W., Staples, R. C. (1992) Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural

gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry*. 204(3):991-1001.

Staples, J. E., Fischer, M. (2014) Chikungunya Virus in the Americas - What a Vectorborne Pathogen Can Do. *Journal of Medicine, Mass Medical Soc.* 371:887-889.

Steinwascher, K. (2018) Competition among *Aedes aegypti* larvae. *PLoS ONE*. 13(11):1-41.

Stoddarda, S.T., Forshey, B.M., Morrison, A.C., Paz-Soldan, V.A., Gonzalo Prokopec, M.V., Astete, H., Reiner, Jr., R.C., Vilcarrero, S., John P. Elderh, J.P., Halsey, E.S., Kochel, T.J., Kitron, U., Scott, T. W. (2013) House-to-house human movement drives dengue virus transmission. *PNAS*. 110(3):994-999.

Tanada, Y., Kaya, H.K. (1993) *Insect Pathology*. California, USA: Academix Press, Inc. 667p.

Tauil, P.L., (2014) Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 23(4):773-774.

Thomas, M.B., Read, A.F. (2007) Fungal bioinsecticide with a sting. *Nature biotechnology*. 25(12):1367-1368.

Thomas MB, Wood S.N, Langewald J, Lomer C.J, 1997. Persistence of *Metarhizium flavoviride* and consequences for biological control of grasshoppers and locusts. *Pestic. Sci.* 49:47-55.

Tizzot, M.R.P.A. (2016) Zika Vírus. *Cad. da Esc. de Saúde*. 1(15):1-2.

Valdez, L.D., Sibona, G.J., Condat, C.A. (2018) Impact of rainfall on *Aedes aegypti* populations. *Ecological Modelling*. 385:96-105.

Valle, D., Pimenta, D.N., Cunha, R.V. (2015). Dengue: teorias e práticas (*online*). Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 450p.

- Vasconcelos, P.F.C. (2003) Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(2):275-293.
- Vega, F. E., Jackson, M. A., Mercadier, G., Poprawski, T. J. (2003) The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:363-368.
- Verkerk, R.H.J., Wright, D.J. (1993) Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* *Pest. Sci.* 37:83-91.
- Vinauger, C., Lahonde`re, C., Wolff, G.H., Locke, L.T., Liaw, J.E., Parrish, J.Z., Akbari, O.S., Dickinson, M.H., Jeffrey A. Riffell, J.A. (2018) Modulation of Host Learning in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Current Biology*. 28:333-344.
- Vinson, S.B. (1991) Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. In: Pathak, J.P.N. (Ed.). *Insect Immunity*. Dordrecht, Boston and London: *Kluwer Academic Publishers*. 171-187.
- Wanchoo, A., Lewis, M. W., Keyhani, N. O. (2009) Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*. 155:3121-3133.
- Wang, J.J., Cai, Q., Qiu, L., Ying, S.H., Feng, M.G. (2017) Additive roles of two TPS genes in trehalose synthesis, conidiation, multiple stress responses and host infection of a fungal insect pathogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(9):3637-3651.
- Wang, C., St. Leger, R.J. (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesion enables attachment to plants. *Cell eukaryotic*. 6: 808-816.

- Widiyanti, N.L.P.M., Sanusi Muyadihardja, S. (2004) Uji toksisitas jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. *Media Litbang Kesehatan*. 14(3):25-30.
- World Health Organization (2015) Dengue and severe dengue. Fact sheet n° 117 (Internet), Updated May 2015. Disponível em: <http://www.who.int/Media/centre/factsheets/fs117/en/>. Acessado em fevereiro de 2016.
- World Health Organization (2012) Global strategy for dengue prevention and control. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75303/9789241504034_eng.pdf. Acessado em março de 2019.
- World Health Organization (1986). Prevention and control of yellow fever in Africa, Geneva, Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39154/9241560916_%28part1%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acessado em março de 2019.
- Wraight, S.P., Butt, T.M., Galaini-Wraight, S., Allee, L.L., Soper, R.S., Roberts, D.W. (1990) Germination and infection processes of the entomophthorean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 56:157-174.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A., Kock, S.D. (2001) Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. Butt, T. M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, CABI Publishing. 253-287.
- Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, X., Wang, G., Luo, Z., Fan, Y., Wu, Z., Pei, Y. (2010) Requirement of a Mitogen-Activated Protein Kinase for Appressorium Formation and Penetration of Insect Cuticle by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(7):2262–2270.

Zelger, T., Schweigkofler, W. (2001) Persistence of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch blastospores and conidia in non-sterile and semi-sterile soils. *Laimburg Journal*. 1 (2):1-10.

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