

AUMENTANDO A EFICIÊNCIA DE PANOS PRETOS  
IMPREGNADOS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O  
CONTROLE DE *Aedes aegypti* UTILIZANDO ATRAENTE SINTÉTICO

**LEILA EID IMAD DA SILVA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
ABRIL – 2019

AUMENTANDO A EFICIÊNCIA DE PANOS PRETOS  
IMPREGNADOS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O  
CONTROLE DE *Aedes aegypti* UTILIZANDO ATRAENTE SINTÉTICO

**LEILA EID IMAD DA SILVA**

“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.

S586 Silva, Leila Eid Imad da.

Aumentando a eficiência de panos pretos impregnados com fungos entomopatogênicos para o controle de *Aedes aegypti* utilizando atraente sintético / Leila Eid Imad da Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

103 f. : il.

Bibliografia: 78 - 103.

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

Orientador: Richard Ian Samuels.

1. Isca Sintética. 2. Vetor. 3. Vírus. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

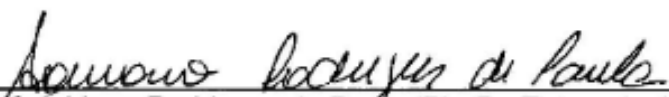
AUMENTANDO A EFICIÊNCIA DE PANOS PRETOS  
IMPREGNADOS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O  
CONTROLE DE *Aedes aegypti* UTILIZANDO ATRAENTE SINTÉTICO

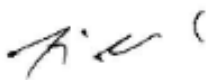
LEILA EID IMAD DA SILVA


"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"

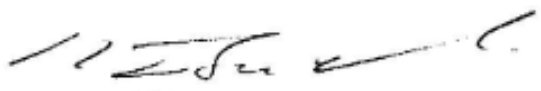
Aprovada em 9 de abril de 2019.

Comissão Examinadora:

  
Prof. Adriano Rodrigues de Paula (Ph. D., Entomologia) – UENF

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

  
Prof. José Roberto da Silva (Ph. D., Biociências Biotecnologia) - UFRJ

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

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

(João Guimarães Rosa).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela alegria desta conquista. Com a Tua soberana presença ao meu lado, eu consigo perceber que não existem impossíveis na minha vida. É um momento de muita emoção e meu coração está carregado de gratidão;

Ao professor Dr. Richard Ian Samuels e ao Dr. Adriano Rodrigues de Paula pelos ensinamentos que me passaram desde o mestrado, os quais foram, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional;

Meus agradecimentos e muita admiração pelos professores da Comissão Examinadora: Dr. Francisco José Alves Lemos, Dr. José Roberto da Silva; também aos Professores Suplentes: Adriano Gerson da Silva; Milton Erthal Junior;

Agradeço a toda equipe do laboratório de Entomologia e Fitopatologia e em especial, a equipe da dengue: Adriano, Anderson, Josiane, Simone, Thaís, Aline, Denise;

Agradeço a UENF pela oportunidade e a FAPERJ pela bolsa concedida para que eu pudesse me dedicar à pesquisa em tempo integral;

Agradeço de maneira grandiosa meus pais, minhas filhas e meu esposo por tudo. Sem palavras...

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Biologia, morfologia e ecologia do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	5
2.2 Distribuição e arboviroses transmitidas pelo mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	9
2.2.1 A febre amarela .....	10
2.2.2 A dengue.....	11
2.2.3 A chikungunya .....	13
2.2.4 A Zika.....	15
2.3 Armadilhas utilizadas na vigilância entomológica do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	17
2.4 Controle convencional de populações de mosquitos vetores de doenças .....	22
2.5 Controle alternativo .....	25
2.6 Controle biológico de mosquitos .....	26
2.7 Controle microbiano de insetos utilizando fungos entomopatogênicos .....	28
2.8 Pesquisas de semicampo e campo utilizando fungos entomopatogênicos contra mosquitos.....	32
2.9 Atraentes utilizados em armadilhas para mosquitos .....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
3.1 Criação e manipulação dos mosquitos .....	38
3.2 Cultivo dos fungos entomopatogênicos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> .....	41
3.3 Preparo da armadilha PET com pano preto impregnado com fungo .....	42
3.4 Preparo da armadilha PET adesiva .....	43

3.5 Preparo da armadilha PET associada ao atraente sintético.....	44
3.6 Experimentos realizados em câmara de observação.....	46
3.7 Testes realizados em salas simulando cômodos residenciais .....	47
3.8 Bioensaio 1 – Avaliação da taxa de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas por diferentes períodos à armadilha PET com pano preto + <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> .....	49
3.9 Bioensaio 2 - Observação da quantidade necessária de armadilha PET com pano preto + <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> para reduzir as taxas de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> por cômodo residencial.....	50
3.10 Bioensaio 3 - Verificação das taxas de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com sangue ou sacarose expostas às armadilhas PET com pano preto + <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> .....	50
3.11 Bioensaio 4 – Avaliação da atratividade de AtrAedes <sup>®</sup> mantido em condições ambientais por diferentes períodos .....	51
3.12 Bioensaio 5 - Comparação das porcentagens de sobrevivência de <i>A. aegypti</i> expostas por 120 horas a diferentes tipos de armadilhas PET com <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> + AtrAedes <sup>®</sup> .....	52
3.13 Bioensaio 6 - Verificação das porcentagens de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas por 24, 48 ou 72 horas à armadilha PET com <i>M. anisopliae</i> + AtrAedes <sup>®</sup> .....	53
3.14 Bioensaio 7 - Investigação da taxa de captura de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas à armadilha PET com pano preto + filme adesivo + AtrAedes <sup>®</sup> colocado na base ou no topo da armadilha.....	53
3.15 Análise estatística .....	54
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
4.1 Bioensaio 1 – Avaliação da taxa de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas por diferentes períodos à armadilha PET com pano preto + <i>B. bassiana</i> ou <i>M. anisopliae</i> .....	55
4.2 Bioensaio 2 - Observação da quantidade necessária de armadilha PET com pano preto + <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> para reduzir significativamente as taxas de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> por cômodo residencial.....	57
4.3 Bioensaio 3 - Verificação das taxas de sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com sangue ou sacarose expostas às armadilhas PET com pano preto + <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> .....	58
4.4 Bioensaio 4 - Avaliação da persistência da atratividade de AtrAedes <sup>®</sup> mantido em condições ambientais por longo prazo.....	60
4.5 Bioensaio 5 - Comparação da sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas por 120 horas a diferentes tipos de armadilhas PET com <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i> + AtrAedes <sup>®</sup> .....	62
4.6 Bioensaio 6 - Verificação da sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas por 24, 48 ou 72 horas à armadilha PET com <i>M. anisopliae</i> + AtrAedes <sup>®</sup> .....	63



4.7 Bioensaio 7 – Investigação da taxa de captura de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas à armadilha PET com pano preto + filme adesivo + AtrAedes <sup>®</sup> colocado na base ou topo da armadilha.....	64
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6. RESUMO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>

## RESUMO

IMAD SILVA, L.E. D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2019. Aumentando a eficiência de panos pretos impregnados com fungos entomopatogênicos para o controle de *Aedes aegypti* utilizando atraente sintético. Orientador: Dr. Richard Ian Samuels. Coorientador: Dr. Adriano Rodrigues de Paula.

Este estudo visou aumentar a eficiência da armadilha PET com fungo associando um atraente sintético *AtrAedes*<sup>®</sup> para o controle do mosquito *Aedes aegypti*. O primeiro teste foi realizado em câmaras de observação, avaliando as taxas de sobrevivência de *A. aegypti* expostos por diferentes períodos a 1 armadilha PET com pano preto impregnado com *Metarhizium anisopliae* ou *Beauveria bassiana*. Os testes seguintes foram realizados em salas simulando cômodos residenciais. Foi observada a quantidade necessária de armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* por sala para a redução das taxas de sobrevivência de *A. aegypti*. As armadilhas PET com fungo também foram testadas contra fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue ou sacarose. Uma “armadilha PET adesiva” foi utilizada para investigar a atratividade do *AtrAedes*<sup>®</sup> deixado em condições ambientais ao longo do tempo. Foram investigadas as taxas de sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* expostos por 24, 48, 72 e 120h à armadilha PET com fungo + *AtrAedes*<sup>®</sup>. Por fim, foi comparada a taxa de captura de *A. aegypti* à “armadilha PET adesiva” com *AtrAedes*<sup>®</sup> na base ou no topo da armadilha. Os resultados dos testes realizados nas câmaras de observação mostraram que as menores taxas de sobrevivência ocorreram quando os mosquitos foram expostos a duas espécies

de fungos por 48h (14% e 13,3% respectivamente), enquanto os controles resultaram em aproximadamente 85% de sobrevivência. As taxas de sobrevivência ((aproximadamente 30%) foram similares quando os mosquitos foram expostos a 5 ou 3 armadilhas PET com fungo, no entanto, estas taxas aumentaram quando os insetos foram expostos a 1 armadilha PET com fungo (45%). Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose expostas por 48h ao *M. anisopliae* ou *B. bassiana* apresentaram taxas de 33,3% e 35,3% de sobrevivência, respectivamente. Fêmeas alimentadas com sangue apresentaram baixa taxa de sobrevivência somente quando foram expostas aos mesmos fungos por 72h (36,6% e 38,6%, respectivamente). Foi observado que a “armadilha PET adesiva” com *AtrAedes*<sup>®</sup> capturou boas porcentagens de mosquitos mesmo quando o *AtrAedes*<sup>®</sup> ficou exposto no ambiente por até 30 dias. As armadilhas com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* + *AtrAedes*<sup>®</sup> causaram menores taxas de sobrevivência dos mosquitos (32,6% e 36,2%, respectivamente) comparado aos controles. As taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos por 24h, 48h ou 72h à armadilha com *M. anisopliae* + *AtrAedes*<sup>®</sup> não diferiram significativamente entre si, variando de 34% a 38%. A “armadilha PET adesiva” com atraente no topo capturou a maior taxa de mosquitos (53%), comparado com o atraente na base da armadilha (28%). O *AtrAedes*<sup>®</sup> foi altamente atrativo para fêmeas de *A. aegypti*. A associação do *AtrAedes*<sup>®</sup> ao pano preto + fungo resultou em menores taxas de sobrevivência de *A. aegypti*. A armadilha PET + fungos e *AtrAedes*<sup>®</sup> é uma ferramenta importante para reduzir a população de *A. aegypti* e a incidência de arboviroses, podendo ser utilizada em residências.

**Palavras-chave:** *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Aedes aegypti*, Isca sintética, Vetor, Vírus.

## ABSTRACT

IMAD SILVA, L.E.. D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2019. Increasing the efficiency of black cloths impregnated with entomopathogenic fungus for the control of *Aedes aegypti* using a synthetic lure. Advisor: Prof. Richard Ian Samuels. Co-advisor: Adriano Rodrigues de Paula.

This study aimed to increase the efficiency of a fungal impregnated PET trap by using a synthetic attractive lure *AtrAedes*<sup>®</sup> with the aim of controlling *Aedes aegypti* mosquitoes. The first test was performed in an observation chamber, evaluating the survival rates of *A. aegypti* exposed to one PET trap with a black cloth impregnated with *Metarhizium anisopliae* or *Beauveria bassiana*, for different periods. The subsequent tests were performed in rooms simulating human residences. The number of *M. anisopliae* or *B. bassiana* impregnated PET traps per room was investigated to evaluate the effects on *A. aegypti* survival rates. PET traps impregnated with fungus were also tested against blood or sucrose fed *A. aegypti* females. An “adhesive PET trap” was used to investigate the attractiveness of *AtrAedes*<sup>®</sup> maintained under normal environmental conditions over time. Survival rates of *A. aegypti* mosquitoes exposed to the PET + *AtrAedes*<sup>®</sup> fungus trap for 24, 48, 72 and 120h were investigated. Finally, we compared the *A. aegypti* capture rates in “adhesive PET trap” with *AtrAedes*<sup>®</sup> at the base or top of the trap. Observation chamber test results showed that the lowest survival rates occurred when mosquitoes were exposed to the two fungal species for 48h (14% and 13.3% respectively), while control survival was approximately 85%. Survival rates (approximately 30%) were similar when

mosquitoes were exposed to three or five PET traps, however, survival increased when insects were exposed to one fungus impregnated PET trap (45%). Sucrose-fed *A. aegypti* exposed for 48h to *M. anisopliae* or *B. bassiana* had survival rates of 33.3% and 35.3%, respectively. Blood-fed females had significantly reduced survival rates only when exposed to fungi for 72h (36.6% and 38.6%, respectively). It was observed that the “adhesive PET trap” with AtrAedes<sup>®</sup> captured high percentages of mosquitoes even when AtrAedes<sup>®</sup> was maintained under environmental conditions for up to 30 days. *M. anisopliae* or *B. bassiana* + AtrAedes<sup>®</sup> traps lowered mosquito survival rates (32.6% and 36.2%, respectively), compared to controls. Survival rates of mosquitoes exposed for 24h, 48h or 72h to the *M. anisopliae* + AtrAedes<sup>®</sup> trap did not differ significantly, ranging from 34% to 38%. The “sticky PET trap” with AtrAedes<sup>®</sup> in the top captured the highest percentage of mosquitoes (53%), compared to capture rates with AtrAedes<sup>®</sup> at the bottom of the trap (28%). AtrAedes<sup>®</sup> was highly attractive to female *A. aegypti*. The association of AtrAedes<sup>®</sup> with black clothes + fungus resulted in significant reductions in *A. aegypti* survival rates. The PET trap + fungus + AtrAedes<sup>®</sup> could be an important tool for the reduction of *A. aegypti* populations and the lowering of arbovirus transmission, which can be easily deployed in homes.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Aedes aegypti*, Synthetic bait, Vector, Virus.

## 1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus da febre amarela urbana, dengue, chikungunya e Zika (Tolle, 2009; Johansen, 2014; Vasconcelos, 2015; Terra et al., 2017). O mosquito *Aedes albopictus* é vetor secundário dessas doenças (Guia de Vigilância em Saúde, 2017). Entretanto, este vetor foi apontado como principal transmissor de chikungunya na Europa (Gould et al., 2010).

As alterações antrópicas como a forma desordenada do crescimento das cidades (Tauil, 2002), o aumento da produção de resíduos não orgânicos, as alterações climáticas e o crescente número de voos internacionais favoráveis à movimentação de pessoas infectadas têm proporcionado a dispersão rápida de vetores intensificando a dimensão das epidemias (Chan et al., 2013).

O controle das populações do mosquito *A. aegypti* permanece como medida mais eficaz para reduzir a transmissão de arboviroses, uma vez que só existe vacina eficiente contra febre amarela. A vacina contra o vírus da dengue está em fase de desenvolvimento (Ferguson et al., 2016), não existe vacina para chikungunya (Mdeffo Mbah et al., 2016) e Zika e nem fármacos específicos para o tratamento destas enfermidades (Câmara et al., 2009; Ministério da Saúde, 2017).

Muitos inseticidas sintéticos foram retirados do mercado por serem nocivos ao homem e provocarem danos ambientais (D' Amato et al., 2002; Luna et al., 2004; Lima et al. 2011). Já foi constatado que o uso frequente de inseticidas sintéticos gera resistência às populações de insetos como *Anopheles gambiae*

(Koekemoer et al., 2011), *Culex pipiens* (Liu et al., 2011), *Culex quinquefasciatus* (Wondji et al., 2008) e *A. aegypti* (Ranson et al., 2010; Lima et al., 2011).

O controle biológico de vetores utilizando bactérias e fungos entomopatogênicos é uma das alternativas aos inseticidas sintéticos.

Vários estudos demonstraram que as bactérias *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* (*Bs*) apresentam toxicidade elevada contra larvas de mosquitos (Monnerat e Bravo, 2000; Polanczyk et al., 2003; Lacey, 2007; Melo et al., 2009). Mosquitos adultos de *A. aegypti* infectados com a bactéria *Wolbachia pipientis* são capazes de produzir incompatibilidade reprodutiva, resultando em uma progênie estéril ou aumento da transmissão da *Wolbachia* nas próximas gerações, permitindo a substituição de mosquitos selvagens por mosquitos infectados com *Wolbachia*, refratários à dengue (Walker et al., 2011; McLean et al., 2018).

Os fungos entomopatogênicos são virulentos contra ovos (Luz et al., 2007), larvas (Pereira et al., 2009; Seye et al., 2013; Paula et al., 2019) e mosquitos adultos (Scholte et al., 2005; Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Santos et al., 2009; Darbro et al., 2011; Paula et al., 2013a; Paula et al., 2013b; Samuels et al., 2016), se mostrando vantajosos em relação às bactérias, já que podem infectar todos os estágios do ciclo de vida dos insetos e apenas o contato com a cutícula já é capaz de provocar infecção (Alves, 1998).

O fungo *Metarhizium anisopliae* foi eficiente para infectar e reduzir significativamente a sobrevivência do mosquito *A. gambiae*, vetor do protozoário do gênero *Plasmodium* (causador da doença malária) e o *C. quinquefasciatus*, vetor do nematoide do gênero *Wulchereria* (causador da doença filariose) (Scholte et al., 2003).

Várias estratégias foram desenvolvidas para infectar mosquitos adultos em condições de campo. Sabe-se que panos pretos impregnados com *M. anisopliae* atraíram *A. aegypti* independente do estado nutricional do mosquito (Paula et al., 2013b). Fêmeas de *Anopheles stephensi* foram atraídas por panos pretos impregnados com *B. bassiana* (George et al., 2013). Paula et al. (2008) mostraram em gaiolas grandes que isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram altamente virulentos resultando em baixas taxas de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*.

Os fungos *M. anisopliae* ou *B. bassiana* impregnados em painéis de madeira revestidos com barro, semelhantes às paredes de habitações humanas, ou em panos pretos de algodão causaram significativa redução da sobrevivência do mosquito *A. gambiae* na Tanzânia (Mnyone et al., 2010). Farenhorst et al. (2008) desenvolveram uma técnica utilizando formulações de conídios de *M. anisopliae* aplicados dentro de vasos de barro contra machos e fêmeas de *A. gambiae* e *Anopheles funestus*.

Em uma simulação de um cômodo residencial foram observadas baixas taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas a panos pretos impregnados com *M. anisopliae* fixados com fita adesiva embaixo de mesas e cadeiras simulando móveis residenciais. Entretanto, este método não foi viável, porque a fixação de panos pretos com fita adesiva danificou os móveis ou o pano descolou rapidamente, inviabilizando os experimentos (Paula et al., 2013b).

Para contornar esse problema Imad Silva (2015) desenvolveu um suporte para colocação do pano preto para ser testado em salas simulando cômodos residenciais. Esse suporte foi denominado de “armadilha PET”, confeccionado de garrafa PET transparente de 2L com um corte lateral. Um pano preto impregnado com fungo foi suspenso com auxílio de um arame no interior da armadilha PET. Esta armadilha foi altamente eficiente para reduzir as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* em condição de semicampo.

Substâncias que atraem insetos adultos simulando odor humano podem ser usadas para aumentar a atratividade das armadilhas utilizadas para o monitoramento e controle de mosquitos (Eiras, 2002; Eiras e Resende, 2009; Ball e Ritchie, 2010). Lwetoijera et al., (2010) testaram armadilhas com atraente sintético constituído de CO<sub>2</sub> orgânico (a base de levedura e açúcar) e panos pretos impregnados com *M. anisopliae* para o controle de *Anopheles arabiensis*. Estes autores observaram mortalidade de 100% dos mosquitos que visitaram as armadilhas.

No Brasil, o atraente sintético *AtrAedes*<sup>®</sup> foi desenvolvido para ser utilizado em armadilhas denominadas MosquiTRAP<sup>™</sup> para monitorar a população de fêmeas grávidas de *A. aegypti* (Eiras e Resende, 2009).

Com o objetivo de aumentar a eficiência da armadilha PET com pano preto impregnado com fungo *M. anisopliae* ou *B. bassiana*, e ainda reduzir a necessidade de implantar um grande número de armadilhas PET nas salas



experimentais, o presente estudo associou um atraente sintético (AtrAedes®) à armadilha PET, visando atrair maior quantidade de mosquitos *A. aegypti* à armadilha, aumentando a taxa de infecção e morte dos insetos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os mosquitos são insetos de pequeno porte, conhecidos popularmente como pernilongos e carapanãs. Estudos registraram aproximadamente 3.500 espécies, classificadas em 95 gêneros distribuídos em todo o globo terrestre (Cantuária, 2012). Os mosquitos vetores de doenças apresentam um perigo eminente para bilhões de pessoas que vivem nos trópicos (Benserradj e Mihoubi, 2014), sendo que o *A. aegypti* é uma das espécies de grande importância científica por ser vetor de vários patógenos como a dengue, chikungunya, Zika e febre amarela.

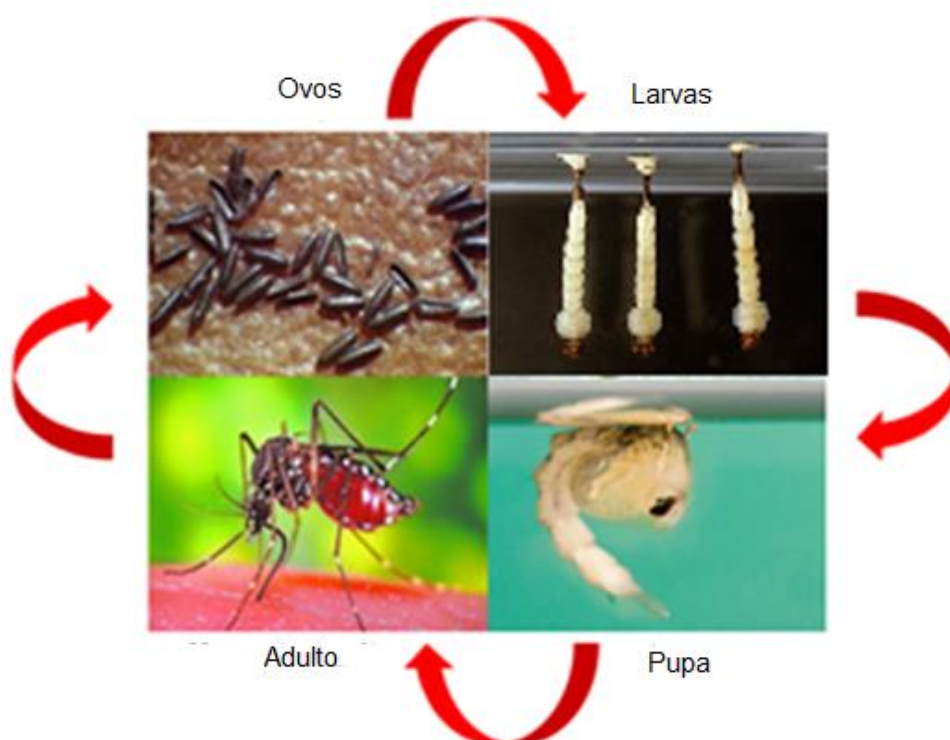
### 2.1 Biologia, morfologia e ecologia do mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* foi primeiramente descrito no Egito por Linnaeus em 1762. Pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Díptera, família Culicidae e gênero *Aedes*. É um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna (Ponlanwat e Harrington, 2005). São insetos holometábolos, que se desenvolvem através de quatro estágios: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1).

Os ovos de *A. aegypti* medem aproximadamente um milímetro de comprimento e apresentam-se lisos, de forma ovoide, contorno alongado e fusiforme (Christophers, 1960; Forattini, 1962). São depositados pelas fêmeas

individualmente, nas paredes internas dos recipientes que servem como criadouros, próximos à superfície da água, onde o embrião se desenvolve entre 2 a 3 dias. No momento da postura os ovos são brancos translúcidos, mas rapidamente tornam-se pretos lustrosos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1998; Grácio, 2008).

Em condições ambientais adversas, os ovos podem interromper seu processo de maturação embrionária e entrar em fase de quiescência (interrupção no desenvolvimento induzido pela baixa umidade), resistindo a longos períodos de dessecação, podendo permanecer viáveis por mais de um ano (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1998; Ministério da Saúde, 2013). Silva e Silva (1999) estudaram a influência do período de quiescência (3 a 720 dias de armazenamento) dos ovos de *A. aegypti* em condições de laboratório. Estes autores observaram a viabilidade dos ovos em até 492 dias durante períodos de seca e logo após o contato com a água as larvas eclodiram. O desenvolvimento pós-embrionário (larval e pupal) do mosquito *A. aegypti* variou de 7 a 10 dias independente dos períodos de quiescência.



**Figura 1:** Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Center for Disease Control and Prevention.

A resistência a condições adversas dos ovos se apresenta como uma das limitações para o controle deste vetor (Farnesi et al., 2015), já que possibilita a dispersão passiva do mosquito (Neves, 2005).

A produção de ovos é um processo cíclico nas fêmeas dos mosquitos. O processo se inicia com a resposta ao odor do hospedeiro, seguido pelo repasto sanguíneo, amadurecimento dos ovos e oviposição denominado de ciclo gonotrófico (Klowden e Briegel, 1994).

No momento da oviposição, as fêmeas de *A. aegypti* são influenciadas por fatores físicos (Forattini, 1962; Chua et al., 2004), químicos (Navarro Silva et al., 2009), fisiológicos (Clements, 1996), ambientais (Costa et al., 2008; Kearney et al., 2009) e comportamentais (Gomes et al., 2006). Esses fatores atuam de maneira complexa e sinalizam à fêmea um local adequado para deposição de seus ovos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Tais sinalizações incluem cor da água, densidade óptica, textura e umidade, temperatura e refletância do substrato de oviposição (Davis e Bowen, 1994; McCall e Cameron, 1995; Badano e Regidor, 2002). As fêmeas de *A. aegypti* podem distribuir os ovos de uma mesma postura em vários sítios de oviposição (Chua et al., 2004).

As larvas do mosquito *A. aegypti* são aquáticas e respiram na superfície da água através do sifão respiratório presente no último segmento das formas imaturas do inseto. O sifão é quitinizado, curto, grosso e mais escuro que o corpo onde a larva fica em posição quase vertical durante a respiração (Nelson, 1986). São fotofóbicas e reagem imediatamente à presença de luz (Strieder, 2005). A eclosão das larvas pode depender de fatores como a presença de água (Forattini, 1962; Roberts, 2001) e densidade larval (Agnew et al., 2002). Desenvolvem-se bem em recipientes com grande volume de água (Honório e Oliveira, 2001), baixa concentração de indivíduos e abundância de alimentos (Beserra et al., 2009).

Na fase larval, os indivíduos são providos de grande mobilidade e durante os quatro estádios de desenvolvimento (L1, L2, L3, L4) alimentam-se de detritos orgânicos e microrganismos presentes na água (Forattini, 1962; Murrell e Juliano, 2008).

O processo de muda ou ecdise ocorre durante os estádios de desenvolvimento das larvas, ou seja, momento em que elas trocam o exoesqueleto quitinoso (estrutura resistente que reveste o corpo da larva) promovendo o crescimento larval antes deste esclerotizar. O exoesqueleto

antigo é eliminado por intermédio da ação de enzimas e um novo exoesqueleto é sintetizado (Chapman, 1982; Merzendorfer e Zimoch, 2003).

O corpo da larva é dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça tem um par de antenas e olhos compostos. O aparelho bucal é do tipo mastigador. Dependendo das condições de temperatura, luz e umidade, de 4 a 7 dias as larvas do quarto estágio transformam-se em pupas (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

As pupas recém-emergidas têm a mesma cor das larvas e escurecem na medida em que se aproxima o momento da emergência do adulto. Seu corpo tem o formato de uma vírgula. Também são aquáticas e bastante móveis quando perturbadas, porém se mantêm quase sempre na superfície da água, o que facilita a emergência do inseto adulto. Não se alimentam e levam cerca de 48 horas até a eclosão do vetor (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

A pupa é dividida em cefalotórax e abdômen (dividido em oito segmentos). A cabeça e o tórax são unidos, constituindo a porção chamada cefalotórax, contendo duas estruturas tubulares chamadas trombetas ou trompas respiratórias e um par de olhos compostos. No final do abdômen existe um par de paletas que auxiliam a pupa na locomoção. De modo geral, entre o estágio de ovo até a emergência do mosquito adulto leva cerca de 7 a 12 dias, embora possa sofrer influência da temperatura, umidade, competição larval (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Beserra et al., 2006; Reiskind e Lounibos, 2009).

Os mosquitos adultos são alados e colonizam o ambiente terrestre (Clements, 2000). Este inseto apresenta o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, de coloração escura com escamas branco-prateadas distribuídas pelo corpo. No mesonoto (tórax), as escamas formam um desenho em forma de lira. As pernas (três pares) são escuras com manchas claras nas articulações.

O macho possui antenas plumosas e palpos mais longos, enquanto as fêmeas apresentam antenas pilosas e palpos mais curtos. Ambos apresentam um par de asas anterior funcional e um par posterior reduzido denominado halteres, utilizado para manter o equilíbrio durante o voo. Possuem em média, 0,5 cm de comprimento (Forattini, 1962; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Consoli et al., 1998; Becker et al., 2010).

Os adultos machos e fêmeas necessitam de carboidratos como fonte de energia que é obtida de néctares florais e é essencial para seu desenvolvimento (Harrington, 2001; Harrington, 2008). Somente as fêmeas são hematófagas, apresentando aparelho bucal picador/sugador apropriado para a hematofagia. O repasto sanguíneo ocorre durante o dia, nas primeiras horas do período matutino (7:00 às 10:00h) e vespertino (16:00 às 19:00h) (Ministério da Saúde, 2010). A aquisição de alimentação sanguínea é necessária para o desenvolvimento dos ovócitos durante o período reprodutivo (Scott e Takken, 2012). Pelo menos dez aminoácidos encontrados no sangue de diversos hospedeiros têm sido descritos como essenciais à produção de ovos (Barata et al., 2001; Briegel et al., 2003).

O mosquito *A. aegypti* está associado a ambientes urbanos e ao visitar o domicílio e o peridomicílio, estes insetos acabam vivendo no mesmo habitat dos seus hospedeiros, o que fornece condições para realização do repasto sanguíneo e diminuição de ameaças à sua sobrevivência. Nestes locais, os recipientes e sítios de oviposição são abundantes e, na sua maioria, produzidos pelo próprio homem. Todas estas características contribuem para a preferência destes insetos em se alimentar nos seres humanos (Scott et al., 1993; Harrington et al., 2001; Reiter, 2007). A longevidade dos mosquitos adultos depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. Geralmente o tempo de vida é maior em fêmeas, podendo variar entre 23 a 72 dias, dependendo da qualidade da água em que se desenvolveram, da temperatura e teor nutricional (Beserra et al., 2009).

## **2.2 Distribuição e arboviroses transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti***

O mosquito *A. aegypti* está presente em quase todos os países tropicais e subtropicais (Halstead, 2008), geralmente entre as latitudes 45° Norte e 40° Sul (Forattini, 2002). Embora a presença deste vetor tenha sido detectada na Índia e na Colômbia (acima de 2.000 metros), sua distribuição em relação à altitude é mais frequente abaixo de 1.000 metros (Gadelha e Toda, 1985; El Badry e Al Ali, 2010; Walker et al., 2011).

De origem africana, o mosquito *A. aegypti* foi introduzido no continente americano no período colonial, e no Brasil, sua presença foi registrada

primeiramente no século XVII. É considerado o vetor primário de maior importância na Saúde Pública, já que transmite várias doenças, como a febre amarela, dengue (Ministério da Saúde, 2010), chikungunya (Thiboutot et. al., 2010) e Zika (WHO, 2015).

### 2.2.1 A febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda de curta duração com gravidade variável, causada pelo arbovírus *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, podendo se manifestar como febre amarela silvestre e febre amarela urbana. A forma silvestre é transmitida na floresta por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, que picam animais silvestres suscetíveis, especialmente macacos, sendo o homem um hospedeiro acidental (Pedroso e Rocha, 2009). A forma urbana é transmitida nas cidades, de homem para homem pelo *A. aegypti* (Brasil, 1986; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Brasil, 2008).

A cada ano, esta doença atinge cerca de 6000 pessoas com 5% dos casos ocorrendo na América do Sul (Tauil, 2010). No Brasil, a febre amarela apareceu pela primeira vez em Pernambuco, no ano de 1685, onde permaneceu durante 10 anos. A cidade de Salvador também foi atingida causando cerca de 900 mortes durante seis anos. Em 1849 a doença foi reintroduzida no Brasil, ocorrendo a primeira grande epidemia no Rio de Janeiro. Em 1940 foi criado o serviço Nacional contra a febre amarela. Desde 1942, não há registro de febre amarela transmitida pelo mosquito *A. aegypti* (ciclo urbano) no Brasil. Os casos confirmados após 1942 são resultados de transmissão silvestre (Guia de Vigilância em Saúde, 2017).

A partir de 2014 a reemergência do vírus voltou a causar preocupação. A possibilidade de reintrodução do vírus causador da febre amarela urbana, pela ampla dispersão do *A. aegypti*, tem motivado uma intensa atividade de vacinação.

Entre 2014 e 2015, a transmissão da febre amarela silvestre se deu na região Norte, com posterior expansão no sentido leste e sul do país, onde afetou prioritariamente a região Centro-oeste entre 2015 e 2016. Mais recentemente, entre 2017 e 2018, foi registrado o surto mais expressivo no Brasil, que afetou

principalmente os estados da região Sudeste, quando foram registrados 1.376 casos humanos e 483 óbitos, além de 864 epizootias por febre amarela no Brasil (Ministério da Saúde, 2018a). Em 2019 até o momento, 116 casos humanos permanecem em investigação, sendo 12 confirmados. Entre os casos confirmados, 5 evoluíram para o óbito. A maior parte dos casos eram trabalhadores com idades entre 24 e 60 anos (Ministério da Saúde, 2019a).

Embora haja vacina como medida profilática, a cobertura vacinal da população em áreas infestadas ainda é muito baixa, o que pode tornar um fator a reurbanização da doença no Brasil (Pedroso e Rocha, 2009).

### **2.2.2 A dengue**

O vírus da dengue é um arbovírus, palavra derivada da expressão inglesa “Arthropod Borne Viruses” (CDC, 2005). Considerada uma doença febril aguda de notificação compulsória, a dengue é causada pelo arbovírus do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, com cinco sorotipos virais identificados no mundo (DEN-1 a 5) (Figueiredo et al., 1996; Pinheiro et al., 1996). A infecção por um deles confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros tipos (Ministério da Saúde, 2010).

Esta doença é capaz de causar infecções assintomáticas, sintomáticas e óbitos (Siqueira et al., 2011), podendo se manifestar de várias formas: dengue clássica, dengue hemorrágica, dengue com complicações e síndrome do choque da dengue. Esta última pode levar até 50% dos pacientes não tratados à óbito (WHO, 2001; CDC, 2005; Linha-Guia de Atenção à Saúde, 2009).

De acordo com Gubler (1997), a dengue é uma doença muito antiga. Os primeiros registros datam do século XII, e no continente americano, a primeira epidemia ocorreu no Peru no século XIX e tem se expandido desde a segunda metade do século XX, com ciclo de caráter urbano devido à relação entre o ser humano e o vetor (Forattini, 2002). No ano de 1846 ocorreram as primeiras epidemias de dengue no Brasil (Taveira et al., 2001).

Após um longo período de silêncio epidemiológico, na década de 80, esta arbovirose voltou a ganhar importância no cenário brasileiro (Cordeiro, 2008).



Desde então, a distribuição, incidência e severidade da doença tem aumentado (Gibbons e Vaughn, 2002). Sendo assim, a primeira epidemia no Brasil, após erradicação do mosquito, ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista, no estado de Roraima pelo DENV-1 e DENV-4 (Tauil, 2001; Osanai et. al., 1983) e em seguida, em 1986 e 1987 no Rio de Janeiro entre outros estados (Pontes e Ruffino, 1994).

Em 2002 uma série de epidemias ocorreu com 794.219 casos de dengue, algumas no estado do Rio de Janeiro. No período de janeiro a abril de 2008 o governo federal registrou 230.829 casos de dengue com 77 mortes. As hospitalizações pela doença chegaram a cerca de 50 mil nos anos de 2002 e 2008 (Barreto et al., 2008).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (2013), foram notificados 204.650 casos com 33 óbitos até 16 de fevereiro de 2013, contabilizando um aumento de 190% de casos em relação ao ano anterior (2012).

No ano de 2016, foram registrados 1.487.924 casos prováveis de dengue no Brasil, sendo que a região sudeste registrou o maior número de casos (855.425), equivalendo a 57,5% dos casos da doença em relação ao total do país (Ministério da Saúde, 2016a).

Em 2018 foram registrados 265.934 casos prováveis de dengue no país, apresentando 75.421 casos na região sudeste. Neste mesmo período foram confirmados 155 óbitos, 321 casos de dengue grave e 3.616 casos de dengue com sinais de alarme (Ministério da Saúde, 2019b).

Para dengue, a dificuldade em elaborar uma vacina deve-se à existência de sorotipos distintos capazes de induzir reação cruzada, mas não anticorpos de proteção cruzada e da instabilidade inerente ao genoma do vírus, que é constituído de RNA (Araújo e Carels, 2007; Qi et al., 2008; Swaminathan e Khanna, 2009). Sendo assim, o fato de ainda não existir uma vacina preventiva eficaz disponível (Ferguson et al., 2016), o controle do vetor é a principal estratégia para diminuição de casos de dengue tanto no Brasil, quanto nos demais países onde a doença está presente.

### 2.2.3 A chikungunya

A doença chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus da chikungunya, da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*. Esse vírus, no continente africano, é originalmente circulante entre primatas das savanas onde mantém o ciclo silvestre da doença. A transmissão também ocorre em áreas urbanas entre humanos (Chhabra et al. 2008), através da picada de fêmeas do mosquito *A. aegypti* e *A. albopictus* infectadas pelo vírus (Donalisio et al., 2015).

O nome chikungunya deriva de uma palavra “Makonde”, a língua falada por um grupo que vive no sudeste da Tanzânia e norte de Moçambique. Significa “aqueles que se dobram”, descrevendo a aparência encurvada de pessoas que sofrem com a artralgia característica (Kucharz e Cebula Byrska, 2012).

De acordo com o Guia de Vigilância em Saúde (2017), devem ser consideradas como casos suspeitos todas as pessoas que apresentarem febre de início súbito maior de 38,5°C e artralgia (dor articular) ou artrite intensa com início agudo e que tenham histórico recente de viagem às áreas nas quais o vírus circula de forma contínua. A principal manifestação clínica que difere da dengue são as fortes dores nas articulações (poliartralgia persistente), especialmente em cotovelos, punhos e tornozelos, que pode levar a incapacidade das pessoas durante anos (fase crônica), apresentando elevada taxa de morbidade, consequente redução da produtividade e qualidade de vida dos seres humanos (Campbell et al., 2015; Guia de Vigilância em Saúde, 2017).

Embora quadros severos não sejam comuns, manifestações neurológicas (encefalite, meningoencefalite, mielite, síndrome de Guillain Barré), manifestações cutâneas bolhosas e miocardite podem trazer gravidade aos casos (Powers e Logue, 2007). As formas graves da doença são raras, mas quando ocorrem podem evoluir para óbito (Ministério da Saúde, 2017).

A chikungunya se apresenta em mais de 60 países na Ásia, África, Europa e nas Américas (WHO, 2014). As epidemias de maior magnitude datam de 2005 a 2006 nas ilhas francesas da Reunião, no Oceano Índico, com 266.000 pessoas infectadas e mais de 200 óbitos. Em 2006, a epidemia propagou-se do Oceano Índico, em direção à Índia infectando 1,39 milhão de pessoas. Em 2007 ocorreu transmissão autóctone no norte da Itália, após o vírus ser introduzido no

país por um viajante oriundo da Índia. Ainda na Itália e no sudeste da França em 2017, ocorreu outro grande surto de infecções por chikungunya adquiridas localmente, destacando a vulnerabilidade da Europa à transmissão de arboviroses (Venturi et al., 2017; Fortuna et al., 2018).

Nas Américas e nas ilhas do Caribe foram notificados os primeiros casos no final de 2013. No ano seguinte, vários países da América do Sul inclusive o Brasil já haviam registrado a circulação deste vírus (CDC, 2015), na qual foram notificados 828 casos, sendo somente 39 vindos do exterior (Donalisio, 2015). Em 2015, foram notificados 20.662 casos autóctones suspeitos da doença chikungunya em 12 Unidades da Federação, ocorrendo 3 óbitos no Brasil, sendo 2 na Bahia e 1 em Sergipe (Ministério da Saúde, 2016b).

Em 2016 foram registrados 263.598 casos de chikungunya distribuídos em 2.752 municípios, sendo confirmados 159 óbitos (Ministério da Saúde, 2016a). Durante o ano de 2017 foram registrados 185.593 casos resultando em 192 óbitos. Em 2018, 87.687 casos de chikungunya com 39 óbitos no país. Neste período (2018), a região Sudeste apresentou o maior número de casos de febre de chikungunya (52.966 / 60,4%), sendo que o município de Campos dos Goytacazes/ RJ fez parte de um dos municípios com as maiores incidências registradas desta doença (1.487 casos/100 mil habitantes) (Ministério da Saúde, 2019b).

O vírus de chikungunya apresenta três genótipos diferentes: Asiático, África Ocidental e Leste/Central/Sul-africana (Nasci, 2014). Parece ter havido duas introduções virais diferentes nas Américas, pois o genótipo viral que foi isolado no Oiapoque e no Caribe não é o mesmo que foi estudado na Bahia (Feira de Santana) (Donalisio et al., 2015). Sendo assim, Nunes et al. (2015) afirmaram que o vírus de chikungunya, tanto da linhagem Asiática (encontrados em Oiapoque) como a Leste / Central / Sul-africana (encontrados em Feira de Santana) circulam no Brasil.

Ainda não existe tratamento antiviral específico para combater o vírus da chikungunya (Thiboutot et al., 2010). Logo, o controle do vetor se faz necessário para a prevenção da doença.

## 2.2.4 A Zika

O vírus da Zika (*Flavivírus*) é transmitido principalmente pela picada dos mosquitos da espécie *A. aegypti* e *A. albopictus* infectados em áreas urbanas. Também existe a possibilidade de transmissão pela via sexual, por transfusão sanguínea e vertical (Luz et al., 2015; Guia de Vigilância em Saúde, 2017). O vírus foi isolado pela primeira vez de macaco *Rhesus* em 1947 nas florestas da Zika (Uganda), durante um estudo sobre a transmissão da febre amarela silvestre (Faye et al., 2008). Dados epidemiológicos mostram que a associação do vírus Zika ao vírus da dengue em um mesmo indivíduo pode levar a complicações neurológicas e autoimunes (Vasconcelos, 2015).

Em 2007, houve o primeiro grande surto de infecção por vírus da Zika na ilha de Yap (Micronésia). Posteriormente, um surto na Polinésia Francesa, iniciado no final de outubro de 2013, registrou cerca de 10.000 casos, dos quais 70 graves, com complicações neurológicas ou autoimunes. Também ocorreram surtos de Zika na África, no Sudeste da Ásia e nas Ilhas do Pacífico. Em 2014 foram notificados casos na Nova Caledônia, Ilhas Cook e foi detectada a circulação do vírus nas Américas. Até dezembro de 2015, países das Américas confirmaram a circulação do vírus da Zika no Brasil, Chile, Colômbia, El Salvador, Guatemala, México, Paraguai, Suriname, Venezuela e Panamá (WHO, 2015).

Em 2017 foram registrados 17.593 casos da doença Zika no Brasil e em 2018, 8.680 casos, sendo que a região sudeste apresentou o maior número de casos (3.149 / 36,3 %) em relação ao total do país. Também foram confirmados 449 casos da doença Zika em gestantes, no mesmo período de 2018 (Ministério da Saúde, 2019b).

A infecção pelo vírus da Zika pode se apresentar desde manifestações brandas até complicações neurológicas e malformações congênitas. Na maioria das vezes, o quadro clínico clássico se manifesta por febre baixa, exantema, artralgia, conjuntivite não purulenta, cefaleia, mialgia e prurido. Porém, foram descritos também casos de Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas (Guia de Vigilância em Saúde, 2017).

A primeira associação entre a infecção pelo vírus da Zika e distúrbios neurológicos ocorreu durante o surto de 2013 e 2014 na Polinésia Francesa (Cao-

Lormeau et al. 2014 ), que foi associado com um aumento de 20 vezes em casos de Síndrome de Guillain-Barré (Oehler et al. 2014; Cao-Lormeau et al. 2016) e no Brasil, em 2014, durante a epidemia do vírus da Zika (loos, 2014). Esta síndrome é uma neuropatia periférica autoimune pós-infecção que pode produzir dor, fraqueza e paralisia. Embora a doença normalmente seja temporária, a paralisia respiratória pode ser fatal (Willison et al., 2016).

Relatórios do Ministério da Saúde do Brasil relataram que os casos de microcefalia aumentaram entre os recém-nascidos na região nordeste, indicando associação entre a infecção Zika na gravidez e má-formação fetal (loos, 2014). Vários casos de infecção intrauterina pelo vírus da Zika resultaram em calcificações cerebrais em diferentes regiões do cérebro de recém - nascidos ou fetos no útero (Oliveira Melo et al., 2016).

Exame de ultrassonografia foi realizado em uma gestante com 29 semanas de gestação, revelando microcefalia com calcificações no cérebro fetal e placenta. Foi realizada a interrupção da gravidez, e em seguida, uma autópsia microcefálica do feto, verificando a presença de hidrocefalia e calcificações no córtex. O vírus da Zika foi encontrado no tecido cerebral fetal com resultados consistentes em microscopia eletrônica (Mlakar et al., 2016). As evidências apoiam a conclusão de que o vírus da Zika pode atravessar a placenta e danificar o feto em desenvolvimento (Martines et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016 ).

Estudos realizados na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (Idor) e Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) mostraram que o vírus da Zika ataca as células do cérebro humano em desenvolvimento, causando morte celular, malformações e reduzindo o crescimento do cérebro em 40% (Garcez et al., 2016).

O Ministério da Saúde (2018b) registrou casos de alterações no crescimento e desenvolvimento de recém-nascidos e crianças possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, entre 2015 e 2018. Foram confirmados 3.279 casos (19,4%), sendo 615 casos (3,6%) classificados como prováveis para relação com infecção congênita durante a gestação.

Vacinas contra o vírus da Zika ainda estão sendo desenvolvidas. Pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e da Fundação

Oswaldo Cruz (Fiocruz) conseguiram proteger camundongos da infecção pelo vírus Zika vacinando-os contra a febre amarela. A vacinação reduziu a carga do vírus no cérebro e preveniu deficiências neurológicas causadas pela infecção, como a microcefalia (Vicente et al., 2019). No entanto, muitos estudos ainda estão sendo desenvolvidos, mostrando que o controle do mosquito vetor *Aedes* é de vital importância.

### **2.3 Armadilhas utilizadas na vigilância entomológica do mosquito *Aedes aegypti***

O monitoramento de vetores de doenças tem como finalidade mapear determinadas áreas de risco e para isso, se utiliza da vigilância entomológica a fim de detectar a presença de vetores (FUNASA, 2002).

Vários estudos têm mostrado a eficiência de armadilhas para o monitoramento do mosquito *A. aegypti*, podendo ser usadas para as fases de ovos, larvas e adultos (Gomes et al., 2008).

As armadilhas para ovos denominadas ovitrampas foram primeiramente proposta por Fay e Perry (1965) e constituem uma ferramenta importante para verificar a dispersão geográfica, densidade, frequência e sazonalidade do vetor (Chadee, 1990; Passos et al., 2003). Esta armadilha é constituída de um recipiente de cor preta. Em seu interior é fixado verticalmente um substrato de oviposição (palheta de eucatex), com superfície rugosa exposta para facilitar a postura dos ovos. Água ou infusão de gramíneas pode ser adicionada no interior da armadilha.

Ovitrampas contendo água de torneira foram eficientes para o monitoramento e coleta de ovos dos mosquitos *A. aegypti* no município de São João da Barra RJ, indicando locais com maior infestação dos insetos (Paula et al., 2017).

Nunes et al. (2011) compararam dois substratos diferentes colocados dentro das ovitrampas: infusão de gramínea (*Panicum maximum*) e água natural como atrativos às fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Estes autores constataram que

não houve diferença significativa em relação à quantidade de ovos encontrados nas palhetas das diferentes ovitrampas (Gomes, 1998; Gomes, 2002).

A utilização de ovitrampas demonstra ser um método sensível e econômico para fornecer informações sobre a presença do vetor (Rawlins et al., 1998). Foi constatado que o uso de armadilhas para ovos foi mais eficiente e econômico para verificação da presença do vetor em relação às armadilhas para larvas (larvitrapas) (Marques et al., 1993; Rawlins et al., 1998; Braga et al., 2000).

Areia et al. (2012) demonstraram que experimentos realizados com ovitrampas feitas com vasos plásticos pretos com quatro palhetas de eucatex foram mais eficientes em relação a outro modelo de ovitrampa testado por Lenhart et al. (2005), feito de um copo azul com um pano de algodão branco. Foi verificada a presença de ovos somente nas armadilhas de vaso preto.

As larvitrapas são armadilhas utilizadas em áreas sob vigilância do mosquito *Aedes*, servindo para verificar a presença de larvas deste vetor. São depósitos feitos de pneus usados contendo água e são colocados em locais considerados focos do mosquito adulto. A finalidade básica das larvitrapas é a detecção precoce de infestações (FUNASA, 2001).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue recomenda que as larvitrapas sejam usadas em áreas onde o fluxo de pessoas é intenso como aeroportos, terminais rodoviários, portos fluviais e marítimos para verificação da entrada do mosquito. Entretanto, esses dois tipos de armadilhas são ineficazes para quantificar o número de fêmeas no local e também para capturar os mosquitos adultos (Lima et al., 1989). Além disso, sobressalta-se a importância da verificação diária das armadilhas ovitrampas e larvitrapas para que não se tornem criadouros.

Vários autores constataram a utilização de armadilhas para monitorar a densidade populacional do mosquito *A. aegypti* na fase adulta (Ritchie et al., 2004; Favaro et al., 2006; Sant'ana et al., 2006; Gama et al., 2007).

Donatti e Gomes (2007) apresentaram a eficiência da Adultrap (Figura 2A), uma armadilha de forma cilíndrica e cor escura composta por um balde telado contendo uma estrutura formada por três compartimentos: um para a entrada do mosquito (extremidade superior), o outro para colocação da isca atrativa (extremidade inferior) e o compartimento do meio com cones

transparentes. Uma vez atraído pela água, os insetos têm acesso aos cones, ultrapassam o orifício contido nestes cones e alcançam o balde revestido por tela fina onde ficam retidos neste espaço.

Outra armadilha eficiente para capturar o vetor da dengue é a Bio Gent (BG) Sentinel<sup>™</sup> (Figura 2B) desenvolvida por pesquisadores alemães da Universidade de Regensburg em parceria com o Laboratório de Culicídeos da Universidade Federal de Minas Gerais (Eiras e Geier, 2002). Um atraente sintético BG-Lure<sup>™</sup> é colocado no interior da armadilha. Além do estímulo químico (BG-Lure<sup>™</sup>), a armadilha possui outros elementos que atraem as fêmeas, como o estímulo visual (contraste entre as cores preto e branco) e correntes de ar que mimetizam correntes de convecção que simulam odor humano que atrai o mosquito para um saco coletor onde ficam presos sem chances de retornar ao ambiente (Eiras, 2002).

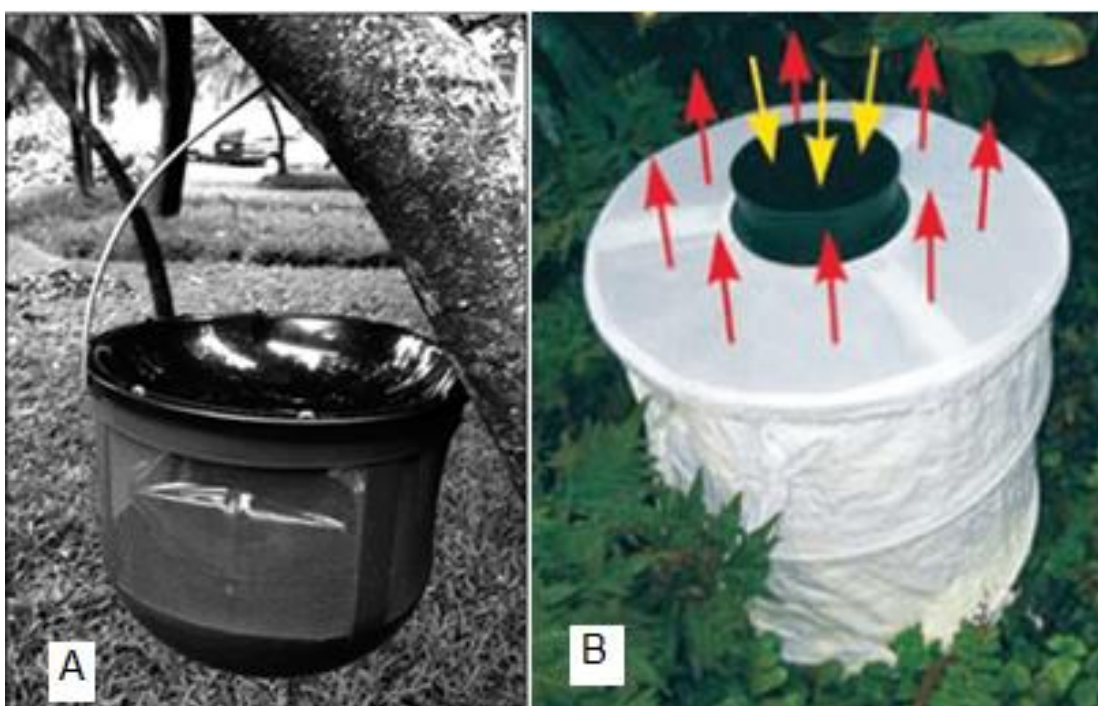


Figura 2 (A): Armadilha Adultrap (Donatti e Gomes, 2007). (B): Armadilha Bio Gent (BG) Sentinel<sup>™</sup> com atraente BG-Lure<sup>™</sup>. Setas vermelhas indicam direção de correntes de convecção formadas pelo miniventilador no interior da armadilha. Setas amarelas indicam o tubo preto de entrada dos mosquitos ao saco coletor da armadilha (Biogents 2006).



Ball e Ritchie (2010) investigaram a eficácia da armadilha BG Sentinel™ em capturar *A. aegypti* em um ambiente visivelmente competitivo, ou seja, lugares escuros de refúgio para os insetos, fornecendo importantes considerações e interpretações de amostras do mosquito *A. aegypti*, sendo considerada uma ferramenta promissora contra vetores.

A armadilha CDC (Centers of Disease Control) Gravid Trap consiste em um balde de água com material orgânico e um pequeno tubo de sucção movido à bateria (Figura 3). Esta armadilha foi projetada para coletar mosquitos adultos, sendo eficiente na coleta de grandes quantidades do mosquito *C. quinquefasciatus* (Reiter et al., 1986).



Figura 3: Armadilha CDC - Gravid Trap - Modelo 1712. Fonte: Ford County Public Health Department.

Thornton et al. (2016) constataram que a armadilha CDC Gravid Trap é apropriada para capturar *Culex* e também *A. aegypti* na Tanzânia.

Armadilhas adesivas são utilizadas para coletar mosquitos adultos (Kay et al., 2000; Ritchie et al., 2003; Ritchie et al., 2004; Santos et al., 2012). Santos et al. (2012) desenvolveram uma armadilha adesiva denominada *AedesTraP*,

confeccionada de garrafa de plástico descartável de 2L e pintada de preto no exterior. Um material de borracha foi revestido em um lado com resina de colofônia (resina de origem vegetal) e em seguida foi colocado dentro da garrafa servindo como substrato adesivo. Esta armadilha foi capaz de capturar *A. aegypti* e outros culicídeos (*C. quinquefasciatus* e *A. albopictus*), fornecendo informações sobre a população do mosquito adulto e permitindo a identificação de áreas criticamente infestadas por mosquitos.

O sistema de Monitoramento Inteligente da Dengue (MI-Dengue) é uma ferramenta informatizada criada com base em pesquisas realizadas pelo Laboratório de Culicídeos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Eiras, 2002; Fávares et al., 2006). A MosquiTRAP<sup>®</sup> é um modelo de armadilha que permite capturar mosquitos adultos de *A. aegypti* ou *A. albopictus* (Figura 4AB), principalmente fêmeas grávidas devido à presença de um atraente de oviposição (AtrAedes<sup>®</sup>) preso a um cartão adesivo de polietileno de cor preta no interior da armadilha. Ao pousarem ou tocarem na parte interna da MosquiTRAP<sup>®</sup> as fêmeas ficam presas no cartão adesivo. A identificação do inseto capturado ocorre no momento da inspeção da armadilha no campo, permitindo agilizar a obtenção de dados (Eiras, 2002). As informações coletadas, como, por exemplo, a presença e a quantidade de insetos são enviadas em tempo real via celular, para um site onde são feitas atualizações e análises gerando planilhas e mapas, para estimar a população de adultos georreferenciados. Os insetos capturados podem ser encaminhados para testes para verificação da presença do vírus (Eiras e Resende, 2009).



Figura 4 (A): Armadilha MosquiTRAP<sup>®</sup>. (B): (a) parte inferior, (b) tampa, (c) tela de proteção, (d) (AtrAedes<sup>®</sup>) e (e) cartão adesivo (Eiras., 2002).

Cinco cidades representando quatro regiões endêmicas da dengue, climaticamente distintas no Brasil, foram monitoradas pelas armadilhas Adultrap, BG- Sentinel<sup>™</sup>, MosquiTRAP<sup>®</sup> e ovitrampas. Os autores observaram que todas as armadilhas detectaram aumento da infestação de mosquitos durante as estações de transmissão da dengue, indicando sua capacidade de detectar a variação da densidade do mosquito (Codeço et al., 2015).

Ovitrampas adesivas também foram eficientes em estudos entomológicos realizados por Felix et al. (2018), confirmando a presença do vírus de chikungunya e Zika nos mosquitos *A. aegypti* capturados pela armadilha.

#### 2.4 Controle convencional de populações de mosquitos vetores de doenças

Controlar uma espécie vetorial seria manter sua população natural a uma densidade baixa para evitar a transmissão e a ocorrência de surtos epidêmicos da doença, sendo ainda, a única ferramenta disponível para diminuir a infestação de insetos (Zara et al., 2016; Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2018).

O Brasil, assim como muitos países do continente americano, apresenta diversos fatores que são determinantes para a proliferação do mosquito *Aedes*, como o surgimento de aglomerados urbanos, inadequadas condições de habitações humanas, irregularidade no abastecimento de água, grande concentração do lixo produzido no país, destinação imprópria do lixo (lixões), o crescente trânsito de pessoas entre países e as mudanças climáticas provocadas pelo aquecimento global (Coelho, 2008). Esses macrofatores comprometem a efetividade dos métodos tradicionais de controle do mosquito *A. aegypti*.

O controle mecânico do vetor está associado às ações centradas em detectar e destruir reservatórios naturais ou artificiais de água que possam servir de criadouros para o *Aedes*, através de visitas domiciliares e mutirões de limpezas (Forattine, 1962; Taulil, 2006; Secretaria de Vigilância Sanitária, 2011). Na maioria das vezes, esse processo vem acompanhado pelo controle químico relacionado ao uso de inseticidas sintéticos, sobretudo em casos de epidemias (Marcondes, 2001).

Os inseticidas sintéticos são classificados em quatro principais grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides, (Bisset, 2002).

Os Inseticidas organoclorados são altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos. Dentre os compostos mais conhecidos estão o diclorodifeniltricloroetano (DDT). Em 1939, Muller descobriu as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT), se tornando um fator primordial para a Saúde Pública no controle de vetores. Porém, em 1946 surgiram os primeiros problemas relacionados à resistência aos inseticidas clorados, reduzindo a eficiência do produto. Este grupo de inseticida foi proibido devido à sua persistência no ambiente por longos períodos e pela bioacumulação em tecidos de animais e de seres humanos. (Becker et al., 2010).

O grupo dos organofosforados, malathion e temephos, constitui uma das alternativas ao uso do DDT por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos dos animais, apresentando baixa toxicidade (Braga e Valle, 2007a). O malathion é usado principalmente para o controle de mosquitos adultos na forma de aerossol para pragas urbanas e na agricultura (Becker et al., 2010). O temephos é eficaz para todos os estágios larvais de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* com grande potencialidade para reduzir populações de *A. aegypti* (Becker et al., 2010). Porém, foi constatada por Campos e Andrade

(2001), a resistência de larvas de *A. aegypti* coletadas em Campinas SP ao organofosforado temephos.

Os carbamatos têm sido usados em controle de insetos vetores que apresentam resistência aos organoclorados. O propoxur é um dos inseticidas desse grupo de compostos mais comumente usado (Hemingway e Ranson, 2005; Becker et al., 2010).

Os inseticidas piretroides, apesar de apresentarem baixa toxicidade para mamíferos, são altamente tóxicos para espécies aquáticas, já que são solúveis em água. Foram muito usados no controle de mosquitos adultos da malária ou como larvicidas (Hemingway e Ranson, 2005; Braga e Valle, 2007b; Becker et al., 2010). Além do impacto ambiental causado pelos piretroides, outra desvantagem está no alto custo deste grupo de inseticida (Braga e Valle, 2007b; Guzman et al., 2010).

Outros inseticidas de nova geração são os reguladores do crescimento de insetos (IGR). Braga et al., (2005) investigaram em condições de laboratório, a eficácia do methoprene. Nesta perspectiva, pode-se citar também o pyriproxifen (Slama et al., 1974). Ambos são recomendados pela Organização Mundial de Saúde para o controle de *Aedes* em água potável (Estrada e Mulla, 1986; Chavasse e Yap, 1997). Existem outros compostos como o diflubenzuron e triflumuron que agem pela inibição da síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto, reduzindo significativamente as taxas de sobrevivência das larvas tratadas (Mulla, 1995; Martins et al., 2004; Borges et al., 2004).

Apesar das dificuldades enfrentadas no uso de inseticidas sintéticos, principalmente quanto à resistência dos insetos aos produtos, em vários países ainda é a medida de controle mais eficiente para redução do vetor da malária (Mabaso et al., 2004).

O problema da resistência dos insetos também foi observado nos produtos utilizados no controle de *A. aegypti* no Brasil (Lima et al., 2011). A ineficiência dos programas tradicionais de controle de mosquitos destaca a necessidade de buscar estratégias alternativas que podem fornecer contribuições importantes para o controle de mosquitos vetores.

## 2.5 Controle alternativo

Diversas tecnologias estão sendo utilizadas no Brasil com diferentes mecanismos de ação, tais como o uso de mosquitos transgênicos.

A liberação de mosquitos geneticamente modificados foi testada no Brasil a partir de 2010. Esta estratégia tem o objetivo de reduzir ou mesmo eliminar espécies de mosquitos por meio do desenvolvimento de genes letais ou capazes de tornar os insetos estéreis (Carvalho et al., 2014; Araújo et al., 2015). Para a criação em massa dos mosquitos e posterior liberação em campo, é necessário o uso de tecnologias de sexagem, já que somente os machos são liberados por não se alimentarem de sangue (Harris, et al. 2012). A empresa britânica Oxitec é responsável pela liberação comercial de mosquitos transgênicos *A. aegypti* no Brasil, visando eliminação desta espécie.

De acordo com Zara et al. (2016), a estratégia genética apresenta algumas dificuldades e limitações, como a necessidade do uso de tecnologias de sexagem, de protocolo de soltura dos mosquitos transgênicos, além da produção e liberação constante de mosquitos no campo.

Uma bactéria chamada *Wolbachia* está sendo investigada com o objetivo de reduzir a transmissão de arboviroses pelo vetor de *A. aegypti*, de forma natural e autossustentável. Esta bactéria está presente em mais de 60% dos insetos no ambiente e, entretanto, não é encontrada naturalmente em *A. aegypti* (Walker et al., 2011; Dutra et al., 2015).

Turley et al. (2009) mostraram que os mosquitos infectados com *Wolbachia pipientis* são menos capazes de obter refeições de sangue, devido aos danos provocados nos tecidos dos insetos, diminuindo também o tempo de vida do *A. aegypti*. Neste estudo foi observado que a probóscida dos mosquitos infectados se curvava repetidamente enquanto o mosquito empurrava a cabeça em direção à pele do hospedeiro durante a sondagem, reduzindo o sucesso de se alimentar com sangue. Em estudos recentes, foi verificado que a *Wolbachia* restringe a replicação do vírus da dengue e da Zika (Flaviviridae) em *A. aegypti* (McLean et al., 2018).

Após anos de pesquisas em laboratório e campo, o “Programa Mundial contra Mosquitos”, (<http://www.eliminatedengue.com/program>), visa reduzir as

arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti* sem diminuir a população destes mosquitos. Neste programa, a *Wolbachia* é introduzida nos mosquitos *A. aegypti* (machos e fêmeas) e em seguida liberadas no campo para avaliar a capacidade de se reproduzir com os mosquitos já existentes no ambiente (Dutra et al., 2015). Com o tempo, espera-se que as gerações descendentes do *A. aegypti* estejam infectadas com a *Wolbachia*, reduzindo a transmissão da dengue (Walker et al., 2011) e outras arboviroses (Van et al., 2012).

Apesar das vantagens, esta estratégia depende das infecções com *Wolbachia* serem mantidas em níveis elevados dentro das populações naturais, bem como continuar a exibir interferência do vírus sem produzir alterações na virulência. Porém, testes comparativos sugerem que é improvável que a virulência aumente, podendo não persistir de forma estável nas populações infectadas com a *Wolbachia*. Sendo assim, o sucesso em longo prazo e em grandes áreas é um desafio (Bull et al., 2013).

## 2.6 Controle biológico de mosquitos

O controle biológico envolve o controle de pragas agrícolas e insetos vetores de doenças a partir do uso de inimigos naturais, que podem ser os predadores como peixes, outros insetos e crustáceos e os três principais grupos de microrganismos entomopatogênicos como os vírus, bactérias e fungos (Rozendal, 1997; Alves, 1998; Hogsette, 1999; Lenteren e Godfray, 2004).

Os agentes biológicos têm demonstrado alta potencialidade como alternativas na luta contra vetores de doenças (Becnel, et al. 2001; Debach e Rosen, 1991; Polanczyk, et al. 2003; Scholte, et al. 2004; Paula, et al. 2011a).

Os diferentes patógenos como vírus, bactérias e fungos são eficientes para o controle de vetores de doenças. Becnel et al. (2001) avaliaram a patogenicidade dos baculovirus (CuniNPV) apresentando alta infectividade para todos os estádios das larvas de *Culex nigripalpus* e *Culex quinquefasciatus*. Os resultados demonstraram que a infecção das larvas através de baculovirus culminou na morte do inseto entre 72 e 96 horas.

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* (*Bs*) são bactérias gram-positivas, entomopatogênicas e muito importantes do ponto de vista científico e industrial, por apresentarem efeito inseticida. Estas duas espécies produzem proteínas tóxicas (Cry), denominadas cristais que são altamente específicas para os insetos da ordem Diptera (De Souza et al., 1999). Os cristais se solubilizam, ativando as toxinas, que se ligam aos receptores específicos na membrana do epitélio intestinal da larva, ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que se intumescce e rompe. Este processo resulta no extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele da larva levando-as a morte (Neto et al., 1985; Monnerat e Bravo, 2000; Polanczyk et al., 2003; Fiuza, 2004; Costa et al., 2010).

A bactéria entomopatogênica *Bacillus sphaericus* mostra boa persistência nos habitats aquáticos poluídos típicos da espécie *Culex* e boa eficácia contra algumas espécies de *Anopheles*, enquanto *Bacillus thuringiensis* é usado para controlar *Simulium* e *Aedes* (Vilarinhos et al., 1998; Regis et al., 2001; Espindola et al., 2008; Ritchie et al., 2010).

Entre algumas vantagens, estas bactérias têm se destacado por não serem tóxicas aos humanos, uma característica muito importante, já que são geralmente aplicadas em áreas urbanas (Becker, 2000). Outro fator importante é a possibilidade de serem usadas juntamente com produtos químicos para aumentar a eficiência do controle (Chui et al., 1995), como, por exemplo, a combinação com organofosforados (Polanczyk et al., 2003).

*Bacillus thuringiensis* foi usada em campanhas intensivas realizadas nos Estados Unidos e Alemanha para o controle de pernilongos e na África para o controle de simúlideos vetores da Oncocercose (Glare e O'Callaghan, 2000). Os tabletes desta bactéria são preparados especificamente para uso em programas de controle e são facilmente distribuídos (Vilarinhos et al., 1998).

Esta estratégia também é limitada para o controle eficiente de vetores, pois as bactérias (*Bti*) e (*Bs*) proporcionam apenas atividade larvicida, não apresentando efeitos sobre as fases de pupa e insetos adultos (Monnerat e Bravo, 2000; Espindola et al., 2008).

Os fungos entomopatogênicos apresentam vantagens em relação a outros microrganismos, já que podem infectar todos os estágios de desenvolvimento dos insetos, como ovos, larvas, pupas e adultos através da



penetração via tegumento do inseto, quando comparados a outros grupos de patógenos que infectam exclusivamente via oral (Alves, 1998; Leathers et al., 1993).

## **2.7 Controle microbiano de insetos utilizando fungos entomopatogênicos**

O controle microbiano utilizando fungos entomopatogênicos é um ramo do controle biológico que vem ganhando destaque em relação aos outros agentes patogênicos.

O ciclo do processo de infecção do fungo no inseto passa pelas fases de adesão, germinação, formação de apressório, formação de grampo de penetração, penetração, colonização, reprodução e disseminação do patógeno (Alves, 1998). Durante este processo, os fungos produzem uma variedade de enzimas degradantes de cutículas (proteases, lipases e quitinases), penetrando o tegumento e atingindo a hemocele, onde produz hifas colonizando todo o corpo do hospedeiro (Figura 5).

Após o contato do fungo com o inseto, o processo de penetração fúngica até a infecção generalizada e morte do inseto ocorre na maioria das vezes entre 4 a 16 dias dependendo da espécie hospedeira (Ferron, 1981; Roy, et al. 2006). Entretanto, todo este processo depende dos componentes nutricionais da cutícula, reações químicas e ação de toxinas (Chandler et al., 2000).

Após a morte do inseto, as hifas emergem do cadáver produzindo conídios no exterior do hospedeiro, que em seguida, são dispersos pelo vento, pela chuva ou contato com outros insetos (Goettel e Inglis, 1997; Alves, 1998).

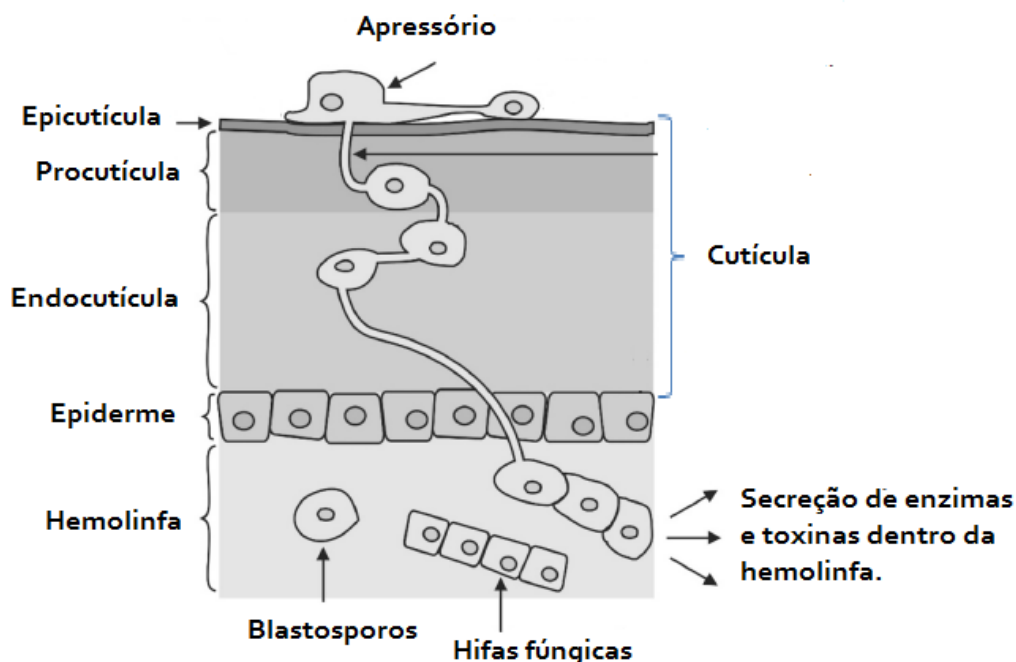


Figura 5: Ciclo da relação fungo-hospedeiro. Fonte: Samuels et al., 2016.

Scholte, et al. (2004a) discutiram a importância de uma variedade de gêneros fúngicos como *Lagenidium*, *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Culicinomyces*, *Beauveria* e *Metarhizium* a serem usados como agentes de controle biológico de mosquitos, sendo que *M. anisopliae* e *B. bassiana* têm maior potencial para ser utilizado no controle de vetores de doenças.

As espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* pertencem atualmente à classe dos Sordariomycetes (Ascomycota) e são encontrados naturalmente nos solos de todo o mundo onde sobrevivem por longos períodos (Driver et al., 2000; Franceschini et al., 2001). Ambos os fungos causam doenças fatais em insetos chamados muscardine branca (*B. bassiana*) e muscardine verde (*M. anisopliae*), devido à grande quantidade de micélios brancos e verdes, respectivamente esporulando (conidiogênese) no corpo dos insetos após a morte (Alves, 1998).

O potencial dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi demonstrado no controle de vários insetos como cupins (Fernandes e Alves, 1991), pulgas (de Melo et al., 2006), moscas (Wright et al., 2004, Angel et al., 2005; Moraes et al., 2010), triatomíneos (Romaña e Fargues, 1992; Fargues e Luz, 1998; Fargues e

Luz 2000; Lazzarini et al., 2006) e mosquitos (Silva et al., 2005, Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b; Valero Jiménez et al., 2014).

Luz et al. (2007) mostraram a atividade ovicida de várias espécies fúngicas incluindo *M. anisopliae* e *B. bassiana* em ovos de *A. aegypti*, incubados em umidade relativa alta (UR >98%). Estudos sugerem que a umidade relativa do ambiente é fundamental na atividade dos fungos em ovos de *A. aegypti* (Russel et al., 2001). De acordo com Luz et al. (2008), os ovos de *A. aegypti* tratados com *M. anisopliae* em ambiente com umidade em 100% não apresentaram eclosão das larvas.

A atividade larvicida de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em mosquitos foi relatada por vários autores (Lacey et al., 1987; Alves et al., 2002; Seye et al., 2013; Gomes et al., 2015). Isolados de *M. anisopliae* causaram até 100% de mortalidade de larvas de segundo estágio de *A. aegypti* (Silva et al., 2004). Daoust (1982) descreveu a atividade patogênica deste mesmo isolado contra larvas de *C. pipiens*, *A. stephensi* e também de *A. aegypti*. O fungo *B. bassiana* avaliado por Clark et al. (1968) foi virulento em larvas de *C. pipiens*, *Anopheles albimanus* e *A. aegypti*.

Bioensaios foram realizados utilizando oito isolados do fungo *M. anisopliae* e dois de *B. bassiana* no controle de formas imaturas de *A. aegypti*. Entre os fungos avaliados, *M. anisopliae* (CG 144 e ESALQ 818) e *B. bassiana* (CG 24) foram os mais virulentos apresentando altas taxas de mortalidade. Das larvas expostas à infecção fúngica, 20% originaram pupas que não completaram seu ciclo de desenvolvimento (Pereira, et al. 2009). Bukhari et al. (2010) investigaram diferentes espécies e concentrações de fungos utilizados para infecção de larvas. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* causaram altas taxas de mortalidade em larvas de *A. gambiae* e *A. stephensi*.

Paula et al. (2013c) descreveram um novo método de aplicação de *M. anisopliae* aderido em grãos de arroz colocado na água contra larvas de *A. aegypti*. A aplicação de 20 grãos de arroz com o fungo na água reduziu significativamente a taxa de sobrevivência das larvas em 5% comparada com a aplicação de 10 grãos de arroz com o fungo resultando em 52% de sobrevivência. Os tratamentos controle apresentaram aproximadamente 100% de larvas vivas.

Vieira et al. (2013) registraram imagens do processo de infecção do fungo *M. anisopliae* em larvas e também adultos do mosquito *A. aegypti*, enfatizando o tempo de adesão e germinação dos conídios. O desenvolvimento fúngico foi observado no tegumento das larvas 36 horas após a exposição ao fungo. Para infecção dos adultos, a adesão e germinação dos conídios foram observadas apenas no tórax do inseto.

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* mostraram atividade aduictida contra mosquitos *C. quinquefasciatus*, *A. albopictus*, *A. aegypti*, e *Anopheles* (Scholte et al., 2004b; Blanford et al., 2005; Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008; Paula et al., 2011a; Paula et al., 2011b; Paula et al., 2013a; Paula et al., 2013b).

Scholte et al. (2004b), em condições de laboratório, documentaram o processo de autodisseminação do fungo *M. anisopliae* durante a cópula dos mosquitos *A. gambiae*, observando que fêmeas infectadas com o fungo transmitem para o macho e possivelmente, o macho infectado dissemina o fungo para fêmeas. García Munguía et al. (2011) também demonstraram que o macho *A. aegypti* infectado com *B. bassiana* transmite o fungo para as fêmeas durante o comportamento de acasalamento, causando 90% de mortalidade dos mosquitos em 15 dias.

Fêmeas de *A. stephensi* previamente inoculadas com o protozoário *Plasmodium chaboudi* foram infectadas com o fungo *B. bassiana* reduzindo o repasto sanguíneo e a transmissão do *Plasmodium* (Blanford et al., 2005).

Foi realizado um estudo para comparar a sobrevivência de *A. aegypti*: infectado com *M. anisopliae* e com sangue infectado com o vírus DEN-2 e infectado somente com o fungo *M. anisopliae*, para testar se o fungo impede a disseminação do vírus. Os resultados mostraram que o fungo *M. anisopliae* reduziu a sobrevivência dos mosquitos coinfectados (fungo + sangue com o vírus DEN-2) e também reduziu a sobrevivência dos mosquitos infectados somente com fungo. Independente do vírus, o fungo matou 85% dos mosquitos nos dois tratamentos (Hernández et al., 2013).

Uma das maiores preocupações na utilização destes entomopatógenos é a capacidade do fungo em manter a persistência e virulência em ambientes estressantes como a radiação ultravioleta e temperaturas muito altas (Howard et al., 2010; Tseng et al., 2011).

A persistência e a viabilidade após armazenamento em longo prazo do fungo *B. bassiana* foram testadas contra fêmeas *A. stephensi* e *A. gambiae*. Os conídios foram secos e armazenados sob refrigeração a 7°C. Os resultados mostraram que os conídios armazenados permaneceram viáveis após refrigeração em mais de dois anos. A persistência dos esporos em substrato argiloso alcançou 80% de redução da população de *A. stephensi* por quatro meses e *A. gambiae* por cinco meses (Blanford et al., 2012).

Carolino et al., (2014) testaram a persistência de conídios de *M. anisopliae* impregnados em panos pretos contra fêmeas de *A. aegypti*. Os conídios extraídos de pano preto mantido em uma varanda de 2 a 18 dias permaneceram virulentos apresentando de 28 a 60% de sobrevivência de *A. aegypti*. Nesta perspectiva, os fungos entomopatogênicos se mostram promissores, no entanto, é necessário o desenvolvimento de ferramentas viáveis para sua utilização no campo contra mosquitos vetores.

## **2.8 Pesquisas de semicampo e campo utilizando fungos entomopatogênicos contra mosquitos**

O potencial dos fungos para causar infecção e morte de mosquitos vetores resultou em um crescente interesse em desenvolver métodos práticos e sustentáveis de controle de mosquitos (Knols e Thomas, 2006).

O primeiro teste de campo utilizando fungo para o controle da população de *A. gambiae* foi realizado na África, após fixar panos pretos impregnados com *M. anisopliae* no teto de habitações humanas. O resultado deste teste foi promissor com 23% de infecção no mosquito, que conectado a um modelo de transmissão da malária previu uma redução de 75% na intensidade da transmissão da doença (Scholte et al., 2005).

Farenhorst et al. (2008) mostraram que vasos de barro utilizados para armazenamento de água foram adequados para aplicação de *M. anisopliae* contra machos e fêmeas de *A. gambiae* e *A. funestus*. Os vasos foram pulverizados com diferentes concentrações do fungo e expostos aos mosquitos por 17 horas. Para *A. gambiae* expostos à concentração de  $4 \times 10^{10}$  conídios/mL, a mortalidade foi de

95%. No entanto, a dose mais baixa de conídios, de  $1 \times 10^{10}$  conídios/mL, foi suficiente para causar a mortalidade em 91% tanto para *A. gambiae* quanto para *A. funestus*.

Paula et al. (2008) avaliaram a suscetibilidade do mosquito *A. aegypti* adulto à infecção por *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Os autores mostraram a eficiência de um pano preto impregnado com fungos pendurados em gaiolas grandes para investigar a infecção de fêmeas de *A. aegypti*. Foi obtida alta infectividade dos mosquitos, com 70% na redução da sobrevivência.

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* aplicados em painéis de barro (simulando paredes de casas tradicionais da Tanzânia) ou em panos pretos de algodão ou telas de poliéster foram virulentos contra o vetor da malária *A. gambiae* (Mnyone et al., 2010).

Outra estratégia interessante testada no campo foi o uso de uma caixa confeccionada de madeira, revestida externamente de tela e internamente com panos pretos impregnados com *M. anisopliae* contra *A. arabiensis* (Lwetoijera, et al. 2010). Foram testados na Tanzânia vários métodos intradomiciliares utilizando fungo entomopatogênico: em telhas revestindo o beiral de residências, pano preto de algodão no beiral, pano preto inclinado no beiral, painel de pano de algodão e tiras de pano preto ao redor da cama do hospedeiro. Estes métodos resultaram em uma redução de 39-57% na sobrevivência dos mosquitos *Anopheles* (Mnyone, et al. 2012).

Mmbando et al. (2015) pulverizaram *M. anisopliae* (IP46) na superfície de uma armadilha de cor preta chamada “caixa de aterrizagem de mosquitos”. Fêmeas do mosquito *A. arabiensis* foram liberadas em um galpão com duas armadilhas, e outro galpão sem armadilhas (controle). Este experimento resultou em 69% dos mosquitos contaminados com fungo, sendo 43% capturados dentro da armadilha com auxílio de um aspirador e 26% nas paredes da câmara. Já na câmara controle não foram encontrados mosquitos contaminados por *M. anisopliae*. A visualização do crescimento de hifas nos cadáveres dos mosquitos foi utilizada para avaliar a taxa de mosquitos contaminados pelo fungo, sendo monitorados individualmente até a morte.

Os fungos entomopatogênicos podem ser associados a outras estratégias de controle dos mosquitos vetores. Mnyone et al. (2009) constataram que os mosquitos *A. gambiae* foram infectados quando expostos à formulação de *M.*

*anisopliae* associada ao óleo mineral, resultando em 100% de mortalidade em dez dias de infecção. Paula et al. (2011a) observaram alta virulência do fungo *M. anisopliae* contra fêmeas de *A. aegypti*, verificando o sinergismo entre *M. anisopliae* e inseticida sintético Imidacloprid. Carolino et al. (2014) registraram a eficiência da combinação do fungo *M. anisopliae* com óleo vegetal ou com óleo sintético isoparafina verificando a redução da taxa de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*.

Como já foram observados, panos pretos impregnados com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* são eficientes para serem utilizados em armadilhas para controle de mosquitos (Paula et al., 2013a; Paula et al., 2013b; George et al., 2013). Atraves sintéticos simulando odor humano poderiam ser utilizados juntamente com panos pretos impregnados com fungo para aumentar a atratividade das armadilhas.

## **2.9 Atraves utilizados em armadilhas para mosquitos**

Várias classes de estímulos emitidos por hospedeiros produzidos principalmente na pele são usadas pelos insetos para localização da fonte sanguínea. Aqueles que possuem propriedades voláteis são carregados pelo ar e são detectados a certas distâncias pelos mosquitos. Um exemplo é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que combinado com corrente de ar quente e úmida age como atraves exercendo grande influência no inseto, pois é produzido em grande quantidade comparado com outros estímulos e é interpretado como a presença de hospedeiro (Cooper et al., 2004).

Outros compostos como o ácido láctico e amônia presentes no suor humano têm sido confirmados como fatores atraves para fêmeas de mosquitos (Braks et al., 2001). Esses atrativos formam plumas de odores que se dispersam no ambiente direcionando o inseto até a fonte de alimento (Qiu et al., 2004). A interrupção das plumas de odores, como, por exemplo, o vento, pode modificar as respostas do inseto ao sinal olfativo (Roque e Eiras, 2008).

O primeiro estudo de campo para avaliar o controle de mosquitos baseado na combinação de armadilhas com atrativos foi realizado entre 1993 e

1995, em uma ilha isolada na Flórida (EUA), onde o *Aedes taeniorhynchus* foi a espécie predominante (Kline e Lemire, 1998).

Sant'ana et al. (2006) observaram que ovitrampas com infusão de gramíneas servem como atraente para oviposição de mosquitos *A. aegypti*. Esta armadilha, desenvolvida através de estudos comportamentais de oviposição, foi usada para observar maior quantidade de ovos do mosquito *A. aegypti* em áreas urbanas.

Andrade et al. (2008) avaliaram o efeito de cairomônios (odores sintéticos de hospedeiros) na atratividade de flebotomíneos em armadilha luminosa no campo visando aumentar o potencial das armadilhas luminosas. O cairomônio BG Mesh Lure<sup>®</sup> sozinho e associado ao octenol foi avaliado e se mostrou eficiente na captura de várias espécies de flebotomíneos, quando comparado às armadilhas controle (somente com luz).

A armadilha chamada MosquiTRAP<sup>®</sup> é composta de um atraente de oviposição sintético (AtrAedes<sup>®</sup>), que libera um odor que atrai fêmeas de *A. aegypti*, deixando-as presas em um cartão adesivo colocado nas paredes internas da armadilha (Eiras, 2002; Gama et al., 2007; Fávaro et al., 2008).

A armadilha BG-Sentinel<sup>™</sup> atrai mosquitos adultos utilizando atraente sintético denominado BG-Lure<sup>™</sup> (Krockel et al., 2006; Williams et al., 2006; Meeraus et al., 2008; Schmaedick et al., 2008; Degener et al., 2014). O atraente BG-Lure<sup>™</sup> simula odor humano, já que é constituído de amônia, ácido láctico e ácido caproico, compostos encontrados na pele (Geier et al., 1999; Bosch et al., 2000). Já as armadilhas Mosquito Magnet Liberty e a Fay-Prince Trap, utilizam o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como atraentes, para mosquitos adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Kröckel et al. 2006).

Okumu et al. (2010a) avaliaram no campo uma mistura de odores sintéticos como amônia aquosa, ácido láctico e vários outros ácidos carboxílicos contra *A. gambiae*. Os testes foram conduzidos em cabanas experimentais, utilizando tiras de nylon embebidas na mistura sintética suspensas no tubo da armadilha Mosquito Magnet-X (MM-X<sup>®</sup>) para dispensar o odor sintético por evaporação em plumas contínuas de dióxido de carbono. Os odores da isca atrativa foram comparados com odores humanos naturais (10 voluntários adultos masculinos). Para capturar os mosquitos que entravam em todas as cabanas, foi utilizada armadilha CDC-LT luminosa. Os resultados mostraram que a mistura



sintética atraiu de 3 a 5 vezes mais mosquitos selvagens do que o odor dos voluntários humanos quando as duas iscas (sintética e humana) estavam em diferentes cabanas experimentais, mas foram igualmente atraentes quando as duas iscas foram comparadas lado a lado dentro da mesma cabana.

Outro modelo de armadilha, denominada “armadilha Ifakara, feita de uma caixa de madeira em forma de cabana também utilizou atrativos sintéticos feitos de tiras de nylon embebidas em mistura sintética com a mesma metodologia citada no trabalho de Okumu et al. (2010a). A armadilha Ifakara foi usada como “estação de contaminação”, sendo equipada com panos de algodão preto imersos em solução aquosa a 1% de pirimifos-metil, (organofosfato) e suspensos dentro da armadilha. Os resultados mostraram que 73% dos mosquitos *A. arabiensis*, 78.% de *Culex* e 60% dos mosquitos *Mansonia* foram atraídos, intoxicados e morreram em 24 horas após exposição à armadilha (Okumu et al., 2010b).

A “caixa aterrissagem de mosquitos” desenvolvida por Mmbando et al. (2015) contém painel solar no topo que alimenta uma ventoinha distribuindo odores de atraentes naturais e sintéticos para mosquitos. Nos diferentes experimentos foram utilizados dois tipos de atraentes. As armadilhas foram iscadas com odor de pé humano retido e preservado em meias de nylon usadas por 12 horas antes do início dos testes, ou uma mistura de odor humano sintético desenvolvido previamente por Okumo, et al. (2010a) como citado nos experimentos acima.

Em ambos os casos, tanto as meias de nylon quanto o atrativo sintético foi complementado com gás carbônico produzido pela fermentação de levedura, açúcar e água de acordo com Mweresa et al. (2014). Os atraentes foram colocados no interior da caixa para atrair e matar a maior quantidade de mosquitos *A. arabiensis*. Estes autores concluíram que as armadilhas iscadas com ambos os atraentes de mosquitos associados ao *M. anisopliae* atraíram, infectaram e mataram os mosquitos à procura de sangue humano.

Para melhorar a eficiência da “caixa de aterrissagem de mosquitos” de Mmbando et al. (2015), que contém uma grade de eletrocussão, este estudo combina odor humano sintético com duas ou três grades de eletrocussão de baixo custo para matar os mosquitos atraídos pela isca sintética. Esta armadilha foi testada na Tanzânia, onde os vetores haviam perdido a susceptibilidade aos piretroides.

O atraente sintético testado nas armadilhas de Mmbando et al. (2015) também foi melhorado neste estudo, sendo embalado em pastilhas simples de longa duração que podem ser amplamente utilizadas para reduzir o custo e o tempo de duração. Foram capturados pelas armadilhas com atraentes de odor sintético, um total de 9.685 mosquitos: 36% *A. gambiae*, 1% *A. funestus*, 9% outras espécies de *Anopheles*, 13% de *Culex* e 41% mosquitos *Mansonia*. As armadilhas compostas com atraentes em pastilhas e três grades de eletrocussão foram as mais eficientes para atrair e matar os insetos (Matowo et al., 2016).

Atraentes de mosquitos poderiam ser associados aos panos pretos impregnados com fungos para aumentar a eficiência das armadilhas PET e conseqüentemente, reduzir a sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*. Nesse sentido, foram testadas armadilhas PET em conjunto com o atraente sintético *AtrAedes*<sup>®</sup>, com a finalidade de controlar a população de mosquitos vetores de arboviroses.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Criação e manipulação dos mosquitos

Os ensaios foram realizados no insetário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ (LEF/CCTA/UENF).

As coletas de ovos dos mosquitos *Aedes* foram realizadas usando armadilhas de oviposição denominadas ovitrampas distribuídas no campus da UENF. As ovitrampas foram feitas de vaso plástico preto de 700 ml com quatro palhetas de madeira Eucatex Duratree (3 x 12 cm) presas com elásticos nas bordas dos vasos. Foram adicionados 250 ml de água de torneira dentro da armadilha (Figura 6A). Semanalmente trinta ovitrampas foram distribuídas no campus da UENF em locais sombreados embaixo de árvores com 2 metros de distância entre as ovitrampas. Após sete dias, as ovitrampas foram retiradas do campo e as palhetas colocadas em bandejas para secarem por 48h em temperatura ambiente. Os ovos foram observados nas palhetas utilizando uma lupa (marca Coleman).

A eclosão das larvas foi estimulada por imersão total das palhetas com ovos em bandejas de 5000 ml com 2000 ml de água (Figura 6B).



Figura 6 (A): Ovitrapa para coleta de ovos dos mosquitos. (B): Palhetas com ovos de *Aedes aegypti* imersas em água dentro de bandejas.

Foram adicionados em cada bandeja 10 grãos de ração de pássaro da marca Alcon Club (a composição da ração vide: <http://alconpet.com.br/produto/alcon-club-coleiro>) para alimentação das larvas até atingir o estágio de pupa.

Com auxílio de uma pipeta de plástico, as pupas foram transferidas para potes de 300 ml com 150 ml de água e colocadas dentro de gaiolas (28 x 17 cm) para emersão dos mosquitos adultos. A tampa da gaiola foi cortada para circulação de ar e para fechar o orifício da tampa foi utilizada organza branca.

Os insetos foram alimentados com sacarose ou sangue para em seguida serem utilizados nos testes. Para alimentação com sacarose foi utilizado um vidro transparente de 30 ml contendo um pavio amarelo e sacarose (10%). Para alimentação com sangue, um camundongo da espécie Balb/c foi imobilizado em bolsa de nylon e exposto aos mosquitos dentro das gaiolas com aprovação do comitê de Ética da UENF (Protocolo CEUA 248). Somente fêmeas de 2 a 3 dias de idade foram usadas em todos os ensaios.

Para a manipulação dos mosquitos foi utilizada uma corrente de dióxido de carbono durante 30 segundos para adormecê-los. Os insetos foram adormecidos dentro de um gerbox (11 x11 x 3.5 cm) colocado em cima de uma

placa fria de dimensão de (53 x 33, 5 x 6 cm), com área de resfriamento de (49 x 29,2 cm) (Figura 7).

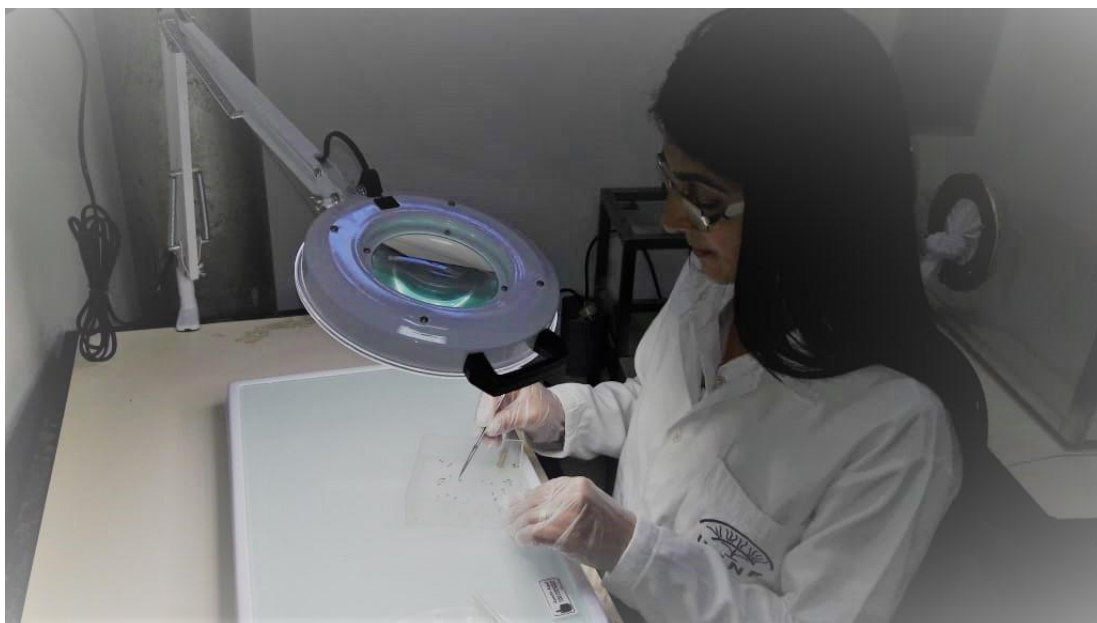


Figura 7: Manipulação de fêmeas de *Aedes aegypti* adormecidas com CO<sub>2</sub>.

Com auxílio de uma lupa (Estec®) e uma pinça fina, cinquenta fêmeas de *A. aegypti* foram selecionadas e colocadas em placas de Petri para serem liberadas em cada câmara de observação e nas salas de simulação de cômodos residenciais.

Um aquecedor (Britânia AB 1500) foi usado para manter uma temperatura ideal na sala de criação dos mosquitos. Através do aparelho Termohigrômetro foi registrado a temperatura máxima (31 °C, mínima: 22.5 °C e umidade relativa máx.: 90.2% min.: 30.8%).

### 3.2 Cultivo dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*

O isolado de *M. anisopliae* (ESALQ 818) utilizado nos experimentos foi obtido da coleção na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba (São Paulo) e o isolado de *B. bassiana* (CG24) foi obtido da EMBRAPA CENARGEN em Brasília.

Os conídios dos fungos *M. anisopliae* (ESALQ 818) e *B. bassiana* (CG 24) foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido SDA (Dextrose 10g; Peptona 2,5g; Extrato de levedura 2,5g; Ágar 20g e água destilada) mantido por duas semanas a 27 °C em câmara climatizada (marca: FANEM) e depois armazenado a 4 °C. Foram adicionados 25g de arroz parboilizado e 10 ml de água destilada em Erlenmeyers de 250 ml. Os frascos foram tampados com algodão e papel alumínio e em seguida autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121°C). Com o auxílio de uma colher estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri, misturados ao arroz e mantidos por 15 dias em câmara climatizada (27 °C) para germinação do fungo. . A Figura 8 AB mostra os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* cultivados em arroz.

Após o período de incubação, o arroz com os conídios de cada fungo foi transferido para sacos de papel a fim de reduzir a umidade usando uma incubadora com ar forçado a 35 °C por 24 horas antes de separar os conídios dos grãos de arroz usando uma máquina separadora de esporos: MR-5 Mycoharvester<sup>®</sup> (ACIS, Reino Unido) (Figura 8C). A concentração fúngica foi avaliada utilizando uma câmara de Neubauer. Os conídios foram formulados com 0,05% de Tween 80 (TW). Para todos os testes, a concentração do fungo no pano preto foi de  $1 \times 10^8$  conídios/ml.

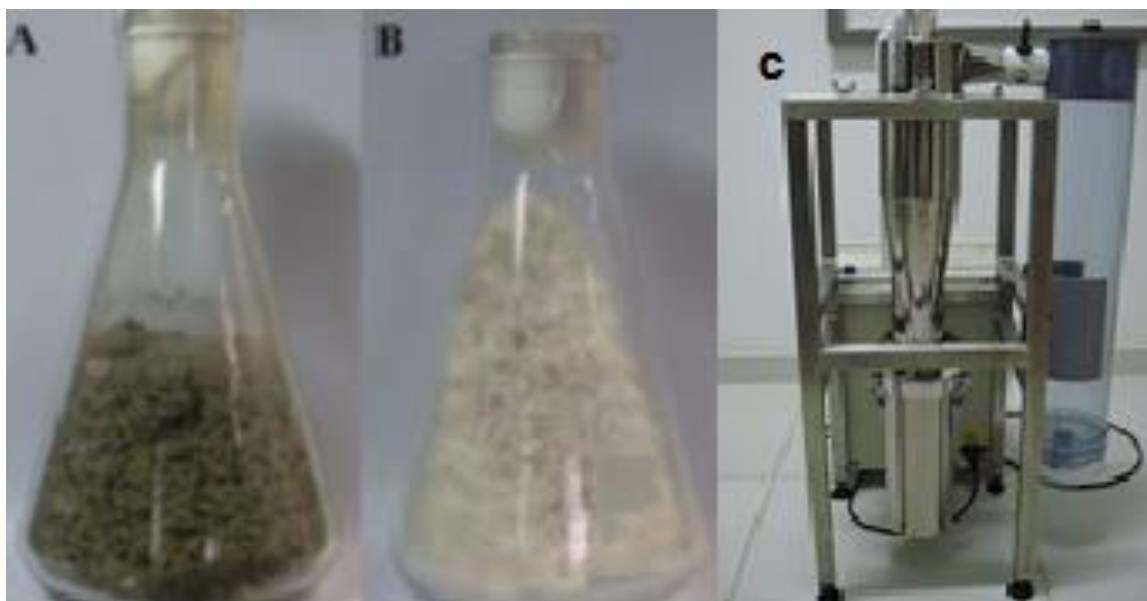


Figura 8 (A): *Metarhizium anisopliae* e (B): *Beauveria bassiana* cultivados em arroz. (C): Máquina separadora de esporos (Mycoharvester).

### 3.3 Preparo da armadilha PET com pano preto impregnado com fungo

A armadilha PET com pano preto impregnado com fungo entomopatogênico foi confeccionada utilizando uma garrafa PET transparente de 2L com um corte frontal (17 x 8 cm) para permitir o acesso dos mosquitos ao interior da armadilha. No fundo da garrafa PET foi adicionado gesso (marca Paris) para maior estabilidade (Figura 9). Um pano preto, 100% algodão no tamanho de (16 x 7 cm), foi impregnado com fungo e suspenso no topo da armadilha com auxílio de um fio de aço. O pano preto foi autoclavado durante 20 minutos a 1 atm (12 °C) e imerso em 200 mL de suspensões de conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* formulado em TW. Para os controles foi utilizado apenas TW.

O pano preto impregnado com o fungo ou TW foi pendurado em um varal de roupa para secar por 16 horas dentro de uma sala com uma temperatura de aproximadamente 25 °C e 70% de UR e em seguida foi suspenso na armadilha PET. Esta armadilha foi utilizada nos experimentos de patogenicidade e virulência do fungo contra mosquitos em câmara de observação e salas simulando cômodos residenciais.

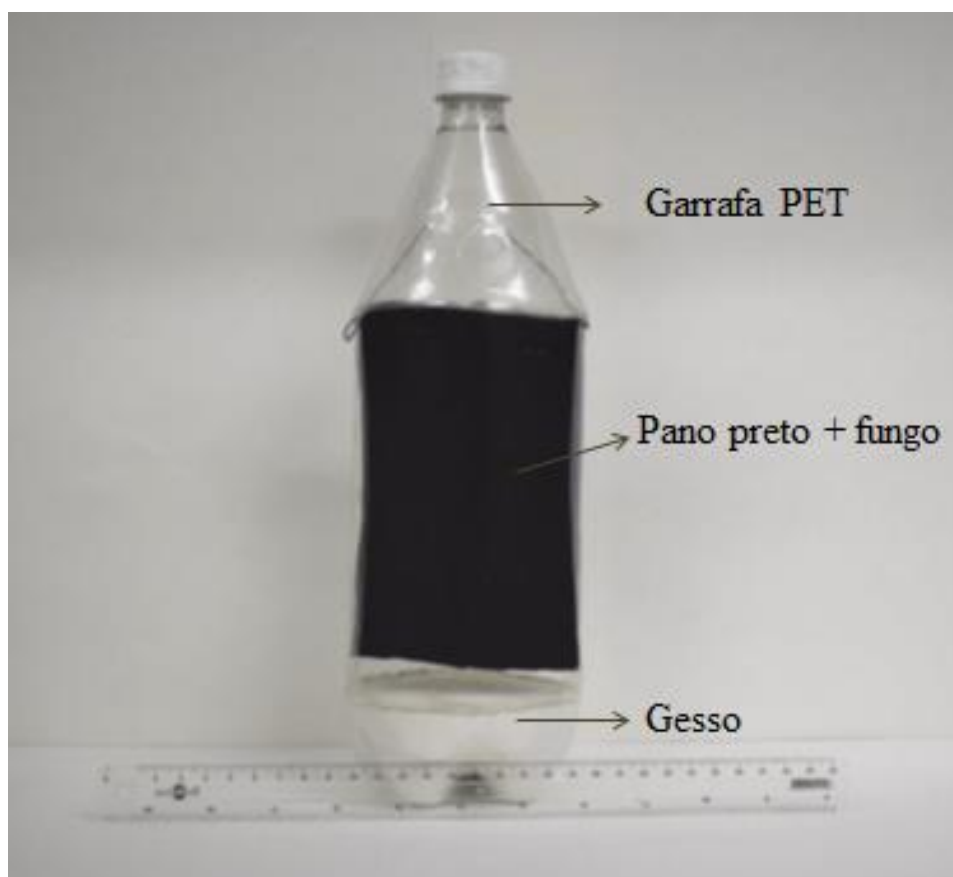


Figura 9: Armadilha PET com pano preto impregnado com fungo entomopatogênico.

### 3.4 Preparo da armadilha PET adesiva

A armadilha PET com filme adesivo foi confeccionada da mesma maneira descrita no protocolo 5.3. Entretanto, o pano preto foi envolvido com um filme adesivo transparente (Agrisense Ltd, Reino Unido). Para tratamento controle o pano preto foi retirado e somente o adesivo transparente foi suspenso na armadilha PET. Os dois lados do filme são adesivos.



### 3.5 Preparo da armadilha PET associada ao atraente sintético

A armadilha PET com pano preto + fungo ou pano preto envolvido no filme adesivo foi associada a um atraente sintético denominado *AtrAedes*<sup>®</sup> (Agrisense Ltd, Cardiff, UK). O *AtrAedes*<sup>®</sup> no tamanho (1,5 x 1,5 x 0,5 cm) foi colocado na parte inferior do pano preto, dobrado e preso com grampo, simulando uma bolsa para colocação do atraente (Figura 10).



Figura 10: Armadilha PET com pano preto impregnado com fungo associado ao atraente sintético *AtrAedes*<sup>®</sup>.

Nas armadilhas com filme adesivo, o *AtrAedes*<sup>®</sup> foi associado de duas maneiras: fixado na base inferior do pano preto revestido com filme adesivo (Figura 11) ou no topo da armadilha (Figura 12).

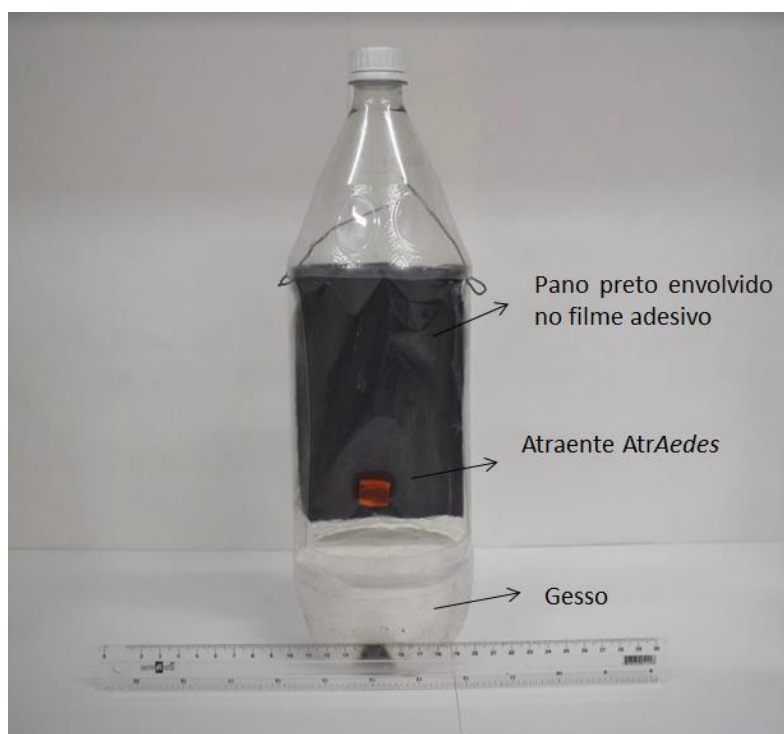


Figura 11: Armadilha PET com pano preto, filme adesivo e *AtrAedes*<sup>®</sup> fixado na base do pano.



Figura 12: Armadilha PET com pano preto, filme adesivo e *AtrAedes*<sup>®</sup> colocado no topo da armadilha.

### 3.6 Experimentos realizados em câmara de observação

Duas câmaras de observação (100 x 51 x 61 cm) foram utilizadas nos experimentos. A parte frontal e superior da câmara foi feita de acrílico transparente e a inferior e as laterais de madeira branca (MDF - Medium Density Fiberboard). A caixa tem uma tela lateral (25 x 20 cm) para a circulação do ar e uma porta (25 x 20 cm) para manipulação dos experimentos (Figura 13).

Antes dos experimentos, as caixas foram limpas e desinfetadas com álcool (70%) e a porta de cada caixa foi deixada aberta por 24h para ventilação e secagem. As caixas foram colocadas dentro de uma sala de 6m<sup>2</sup> do insetário com paredes e porta de cor branca e uma janela (70 x 30 cm) de alumínio. Os experimentos foram realizados em temperatura e luminosidade ambiente. Uma caixa foi utilizada para realização dos testes com fungo *M. anisopliae* ou *B. bassiana* e a outra para tratamento controle feito com TW.

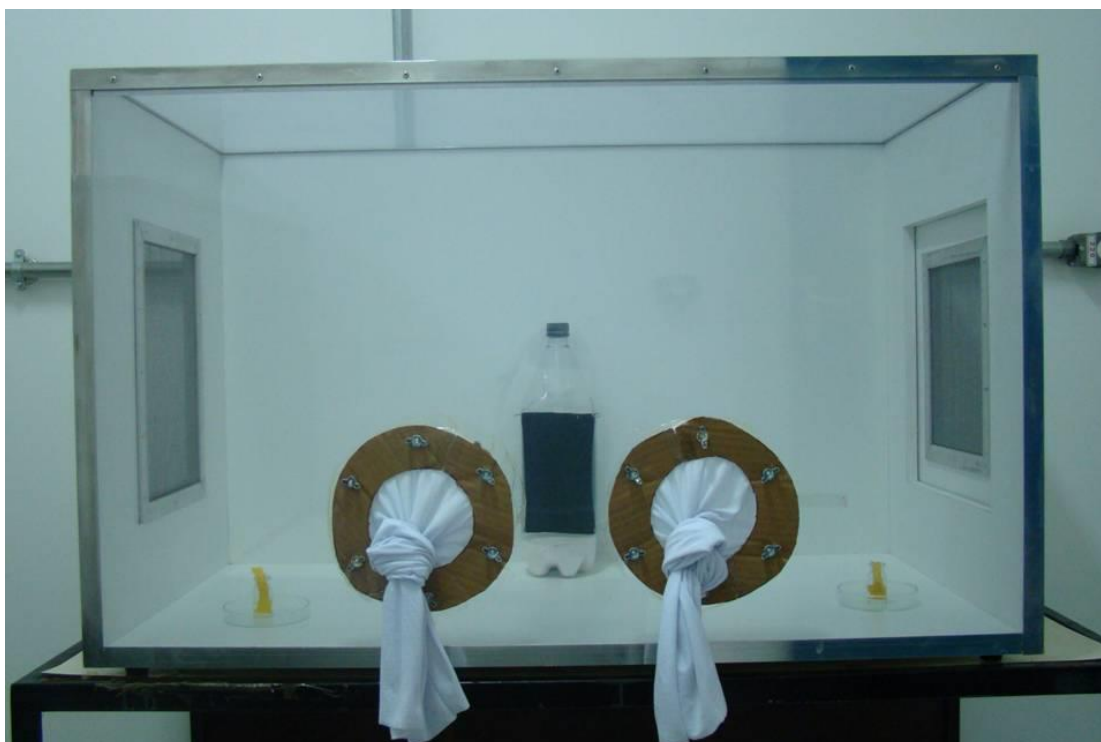


Figura 13: Câmara de observação utilizada nos experimentos com armadilha PET e alimentadores para mosquitos.

### 3.7 Testes realizados em salas simulando cômodos residenciais

Quatro salas simulando cômodos residenciais de 6m<sup>2</sup>/cada localizadas na parte externa do insetário (LEF) foram utilizadas nos testes (Figura 14A). As salas foram construídas com paredes de alvenaria, pisos de cerâmicas brancas e telhado de Eternit com forro de PVC branco. Cada sala possui uma porta de madeira branca (200 x 80 cm) com tela fina embutida (150 x 40 cm) e um exaustor em seu interior para circulação do ar. Organza branca presa com fita adesiva foi utilizada para cobrir o exaustor impedindo a fuga dos mosquitos.

Foi instalado na parte externa das salas um toldo de policarbonato e tela galvanizada para proteção das portas. No interior de cada sala foram colocadas uma mesa e duas cadeiras simulando móveis residenciais (Figura 14B). As salas foram lavadas com detergente neutro, água sanitária (10%), enxaguadas, esterilizadas com álcool (70%) e as portas mantidas abertas para secagem por 24h. A temperatura e umidade foram monitoradas continuamente por um aparelho denominado Datalogger (ESCORT RH iLog) com temperatura variando entre 25,1°C a 28,2°C e umidade relativa em média de 62,8%.



Figura 14 (A): Salas experimentais simulando cômodos residenciais; (B): Armadilha PET embaixo da mesa simulando móveis das residências. Foto: Imad Silva, 2019.

As portas das salas foram fechadas e vedadas com espuma logo após a liberação das fêmeas de *A. aegypti* em cada sala. Vidros transparentes de 30 ml contendo sacarose (10%) foram colocados dentro de uma placa de Petri aberta contendo talco em pó (Vetec, São Paulo, Brasil) para evitar a atração de formigas. Três destes alimentadores foram distribuídos em cada sala para alimentação das fêmeas de *A. aegypti* durante os experimentos.

As salas experimentais foram utilizadas em todos os ensaios e foram sorteadas ao acaso para realização dos experimentos. A avaliação da sobrevivência dos mosquitos após a exposição aos tratamentos com fungo ou controle foi realizada utilizando uma armadilha BG-Sentinel™ com atraente BG-Lure (Biogents Ltd., Alemanha) por 24 horas, a fim de capturar e contabilizar os mosquitos que não foram mortos pelo fungo.

### **3.8 Bioensaio 1 – Avaliação da taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas por diferentes períodos à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana***

Este teste foi realizado para avaliar a taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas ao fungo *M. anisopliae* ou *B. bassiana* em diferentes períodos. Os testes foram realizados utilizando duas câmaras de observação idênticas como citado no item 5.6. Uma caixa foi utilizada para testes contendo tratamento com fungo (*M. anisopliae* ou *B. bassiana*) e a outra para tratamento controle (0,05% Tween 80).

Os tratamentos com fungos foram feitos com uma armadilha PET com pano preto + fungo preparada de acordo com o item 5.3. O tratamento controle foi feito com uma armadilha PET com pano preto + TW. Cinquenta fêmeas de *A. aegypti* foram selecionadas, liberadas em cada câmara de observações e expostas por 3, 12, 24 ou 48 horas a uma armadilha PET com fungo ou controle. No final de cada período a armadilha PET foi retirada de cada câmara. O número de insetos vivos foi avaliado diariamente durante sete dias. Os mosquitos foram alimentados com sacarose (10%) dispostos em vidro de 30 ml com um pavio de feltro amarelo para facilitar a alimentação. Foram realizadas três repetições deste experimento.

### **3.9 Bioensaio 2 - Observação da quantidade necessária de armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana* para reduzir as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* por cômodo residencial**

Neste experimento os mosquitos foram expostos a diferentes números de armadilhas PET (1, 3 ou 5) com pano preto impregnado com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*. Os testes foram realizados em salas simulando cômodos residenciais. O preparo das salas foi realizado conforme o item 5.7. As salas foram sorteadas ao acaso para a montagem dos experimentos.

Primeiramente os testes foram realizados em uma sala contendo cinco armadilhas PET com pano preto + fungo. Ao mesmo tempo, o tratamento controle foi realizado com cinco armadilhas PET com pano preto + TW. Da mesma maneira foram realizados os testes com três ou uma armadilha PET com fungo ou controle por sala.

As armadilhas PET foram colocadas no chão embaixo das mesas e cadeiras e logo após foi realizada a liberação de cinquenta fêmeas/sala. Os mosquitos ficaram expostos às armadilhas PET com fungo ou controle por cinco dias. No quinto dia após o início dos testes, foi colocada a armadilha para a captura de mosquitos vivos (BG-Sentinel™) por 24 horas em cada sala. Em seguida, uma inspeção minuciosa foi feita nas salas experimentais a procura de mosquitos vivos.

### **3.10 Bioensaio 3 - Verificação das taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue ou sacarose expostas às armadilhas PET com pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana***

Este experimento comparou a suscetibilidade de insetos alimentados com sacarose ou sangue expostos a três armadilhas PET impregnadas com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*. A alimentação dos mosquitos com sacarose ou sangue foi realizada conforme o protocolo 5.1. Fêmeas alimentadas com sacarose ficaram expostas às armadilhas PET com fungo ou sem fungo (controle) por 24,

48 e 120 horas e as alimentadas com sangue ficaram expostas às armadilhas PET com fungo ou controle por 48, 72 e 120 horas. Os testes foram preparados separadamente para cada estado nutricional. Primeiramente foram realizados os testes com fêmeas alimentadas com sacarose e depois com sangue. Para cada período de tempo os testes foram montados utilizando três salas: uma para o tratamento com *M. anisopliae*, outra para *B. bassiana* e outra para o tratamento controle.

As armadilhas PET foram colocadas embaixo de mesas e cadeiras. A manipulação e liberação das fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sangue ocorreram de acordo com o protocolo 5.1.

No final de cada período de exposição, as três armadilhas PET com fungo ou controle foram removidas das salas e estas foram fechadas novamente. As avaliações destes bioensaios foram realizadas no quinto dia pós-montagem dos experimentos, utilizando a mesma metodologia em relação às armadilhas BG-Sentinel citadas no protocolo 4.7 para captura das fêmeas de *A. aegypti*.

### **3.11 Bioensaio 4 – Avaliação da atratividade de AtrAedes® mantido em condições ambientais por diferentes períodos**

Esse experimento foi realizado para verificar a atratividade de AtrAedes® mantido por diferentes períodos dentro de uma sala do laboratório em condições ambientais normais antes de ser colocado na armadilha PET.

O AtrAedes® ficou armazenado em geladeira a 4°C antes de ser utilizado nos testes. No tempo zero, o AtrAedes® foi retirado da geladeira e imediatamente fixado na base do filme adesivo dentro da armadilha PET para ser testado. Nos demais períodos de tempo o AtrAedes® foi deixado em placas de Petri abertas em condições ambientais (25°C e 70% de UR) por até trinta dias antes de ser exposto aos mosquitos. Os ensaios foram realizados nos períodos de 0 (zero), 5, 10, 15 e 30 dias. Após cada período de tempo o AtrAedes® foi fixado na base inferior do filme adesivo da armadilha PET que foi colocada em cada sala de teste. As armadilhas PET adesivas foram confeccionadas conforme protocolo para preparo da armadilha PET com pano preto e filme adesivo (item 5.4).



Quatro tratamentos foram realizados simultaneamente. As armadilhas PET foram preparadas com: pano preto + filme adesivo + *AtrAedes*<sup>®</sup>; pano preto + filme adesivo; filme adesivo + *AtrAedes*<sup>®</sup> e somente filme adesivo.

Os experimentos foram realizados em quatro salas idênticas. Os mosquitos foram manipulados para montagem do experimento de acordo com o item 5.1. Cinquenta fêmeas foram liberadas em cada sala com um tipo de armadilha PET. O número de mosquitos capturados no filme adesivo foi quantificado 24h e 48h após o início dos testes.

Após cada período, foi realizada a contagem dos mosquitos nas armadilhas, entrando nas salas rapidamente e observando o número de mosquitos presos nas películas adesivas. No final do experimento todos os mosquitos que não foram presos pelas películas adesivas foram mortos usando um pulverizador manual com 70% de álcool e o número de mosquitos presos foi contabilizado. Os tratamentos foram repetidos três vezes.

### **3.12 Bioensaio 5 - Comparação das porcentagens de sobrevivência de *A. aegypti* expostas por 120 horas a diferentes tipos de armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* + *AtrAedes*<sup>®</sup>**

Esse teste teve o objetivo de avaliar se os mosquitos expostos à armadilha PET com pano preto + fungo + *AtrAedes*<sup>®</sup> teriam menores taxas de sobrevivência comparado com testes realizados sem *AtrAedes*<sup>®</sup>. A armadilha PET utilizada neste experimento foi a mesma do protocolo 5.3. Os panos pretos impregnados com fungo *M. anisopliae* ou *B. bassiana* (tratamentos) ou TW (controle) foram suspensos na armadilha PET seguindo o item 5.3 mencionado acima. O *AtrAedes*<sup>®</sup> foi colocado na base inferior do pano preto.

Quatro tratamentos foram realizados simultaneamente em cada sala: armadilha PET com pano preto + fungo + *AtrAedes*<sup>®</sup>; armadilha PET com pano preto + fungo; armadilha PET com pano preto + TW + *AtrAedes*<sup>®</sup>, armadilha PET com pano preto + TW. Em seguida, cinquenta fêmeas de *A. aegypti* foram liberadas em cada sala. Cinco dias depois (120h), a armadilha BG-Sentinel<sup>™</sup> foi colocada em cada sala por 24 horas. Após esse período, o número de mosquitos

capturados foi contabilizado. As salas foram inspecionadas a procura de mosquitos que não foram capturados. O experimento foi realizado três vezes.

### **3.13 Bioensaio 6 - Verificação das porcentagens de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas por 24, 48 ou 72 horas à armadilha PET com *M. anisopliae* + AtrAedes®**

Esse bioensaio foi realizado conforme metodologia do item anterior, entretanto foi utilizado somente o fungo *M. anisopliae*. A armadilha PET com pano preto + fungo + AtrAedes® foi exposta aos mosquitos por 24, 48 ou 72 horas.

No final de cada período, as armadilhas PET foram retiradas das salas e estas foram fechadas novamente. No quinto dia após o início dos tratamentos (120 horas), os mosquitos vivos foram capturados no saco coletor da armadilha BG-Sentinel™ e quantificados para posterior avaliação.

### **3.14 Bioensaio 7 - Investigação da taxa de captura de fêmeas de *A. aegypti* expostas à armadilha PET com pano preto + filme adesivo + AtrAedes® colocado na base ou no topo da armadilha**

Este teste foi preparado nas mesmas salas dos experimentos antecedentes com a mesma metodologia de manutenção das salas. A armadilha PET utilizada foi semelhante às usadas no bioensaio 4, feita com filme adesivo e AtrAedes® para capturar fêmeas de *A. aegypti*, diferenciando somente no posicionamento do AtrAedes® dentro da armadilha. Neste experimento, a tampa da armadilha PET foi aberta e um tecido filó de poliéster cortado em círculo (10 cm de diâmetro) inserido juntamente com o AtrAedes® no topo da armadilha e em seguida a tampa foi fechada.

Uma armadilha PET foi deixada em cada sala por 24 horas. Na sala 1 foi inserida uma armadilha PET + pano preto envolvido em filme adesivo e um AtrAedes® fixado na base da armadilha. Na sala 2, o AtrAedes® foi colocado no topo da armadilha PET + pano preto + filme adesivo. Na sala 3, armadilha PET + filme

adesivo + AtrAedes<sup>®</sup> na base. Finalmente, na sala 4, o AtrAedes<sup>®</sup> foi colocado no topo da armadilha PET + filme adesivo. No final do tempo de exposição das fêmeas às armadilhas PET, foi feita a avaliação da quantidade de mosquitos capturados nas armadilhas. Três repetições deste ensaio foram realizadas.

### **3.15 Análise estatística**

Os experimentos foram realizados três vezes com 50 insetos por tratamento ou por grupo controle. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as médias de captura em filmes adesivos ou as médias de sobrevivência de mosquitos aos diferentes tratamentos. As taxas de sobrevivência foram calculadas, como a porcentagem de mosquitos capturados em armadilhas BG-Sentinel<sup>™</sup> no final dos experimentos, quando em comparação com o número inicialmente liberado em cada sala (50 fêmeas). Quando um efeito significativo dos grupos foi observado os dados foram analisados por teste post-hoc Duncan com  $P < 0,05$  como critério para significância.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Bioensaio 1 – Avaliação da taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas por diferentes períodos à armadilha PET com pano preto + *B. bassiana* ou *M. anisopliae*

As menores taxas de sobrevivência foram verificadas quando a armadilha PET foi deixada na câmara de observação por 48 horas, resultando em 14% e 13,3% de sobrevivência, respectivamente, para *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Tabela 1).

Quando os mosquitos foram expostos por 24h à armadilha PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*, o resultado mostrou um significativo aumento da sobrevivência das fêmeas (34% e 32%, respectivamente) em comparação à exposição dos mosquitos em 48 horas. As taxas de sobrevivência das fêmeas expostas às armadilhas PET por 12 h (80,6% e 77,3%) e 3h (83,3% e 83%) não foram significativamente diferentes da porcentagem de sobrevivência dos mosquitos no tratamento controle para ambas as espécies fúngicas. O  $S_{50}$  foi de 2 e 3 dias quando uma armadilha PET foi mantida na câmara de observação por 48h e 24h, respectivamente.

Tabela 1: Taxas de sobrevivência ( $\pm$  Desvio Padrão) dos mosquitos após exposição a uma armadilha PET com pano preto impregnado com fungos durante diferentes períodos na câmara de observação

Períodos de exposição (horas)	<i>Metarhizium anisopliae</i>		<i>Beauveria bassiana</i>	
	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	S <sub>50</sub>	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	S <sub>50</sub>
3	83,3 $\pm$ 2,07 c	ND	83 $\pm$ 2,81 c	ND
12	80,6 $\pm$ 4,14 c	ND	77,3 $\pm$ 5,42 c	ND
24	34 $\pm$ 12,8 b	3	32 $\pm$ 14,1 b	3
48	14 $\pm$ 17,3 a	2	13,3 $\pm$ 18,07 a	2
Controle	85,3 $\pm$ 3,18 c	ND	84,0 $\pm$ 3,10 c	ND

Três repetições deste teste foram realizadas. Estatística feita em coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade)

As figuras 15 e 16 mostram as curvas das taxas de sobrevivência diária das fêmeas de *A. aegypti* expostas a uma armadilha PET com fungo *B. bassiana* ou *M. anisopliae* por diferentes períodos de tempo.

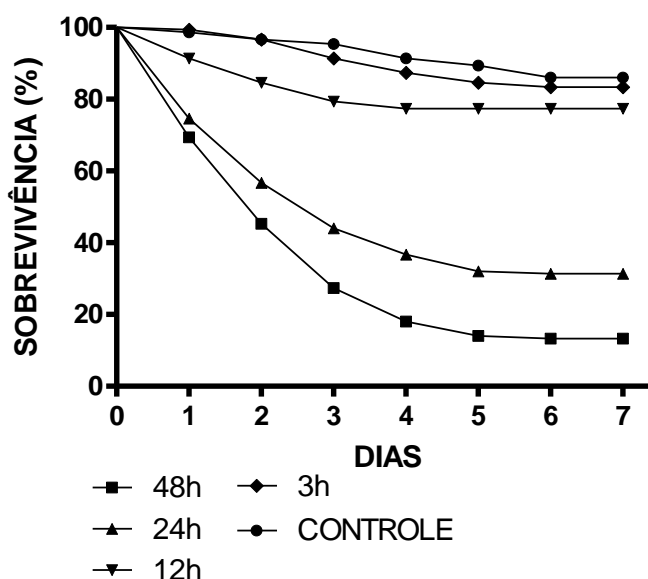


Figura 15: Curvas de sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas por diferentes períodos a uma armadilha PET com pano preto impregnado com *Beauveria bassiana*.

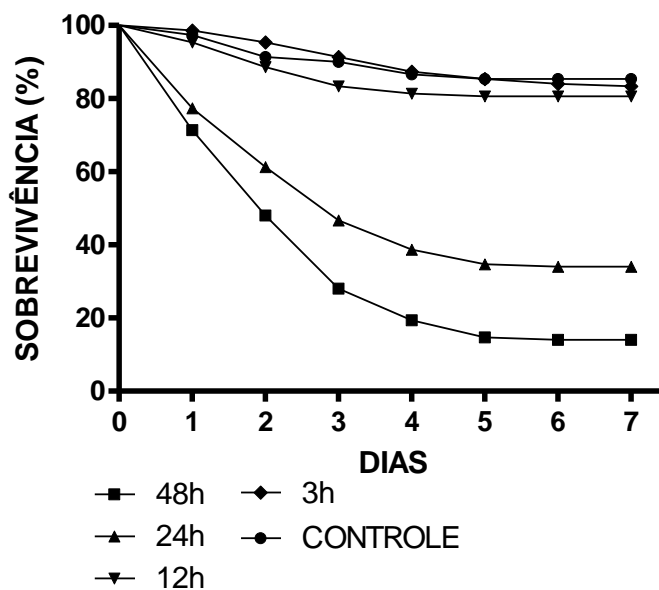


Figura 16: Curvas de sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas por diferentes períodos a uma armadilha PET com pano preto impregnado com *Metarhizium anisopliae*.

#### 4.2 Bioensaio 2 - Observação da quantidade necessária de armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana* para reduzir significativamente as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* por cômodo residencial

A tabela 2 mostra os resultados de mosquitos expostos a cinco armadilhas PET com pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana* com 28,6% e 27,6%, de sobrevivência, respectivamente. Os valores foram significativamente iguais comparados com a porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos a três armadilhas PET com pano preto + *M. anisopliae* (29,3%) ou *B. bassiana* (30%). Não ocorreu diferença significativa quando foram comparadas as taxas de sobrevivência entre mosquitos expostos a *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

A utilização de apenas uma armadilha em cada sala resultou em 46% de sobrevivência dos mosquitos expostos à armadilha com *M. anisopliae* e 44% para *B. bassiana*. Mesmo assim, estas taxas de sobrevivência foram estatisticamente menores comparados ao controle (aproximadamente 80%).

Os tratamentos controle foram estáveis mantendo os mosquitos vivos nas salas experimentais. A taxa de sobrevivência do tratamento controle nos testes realizados com cinco armadilhas por sala foi de 79,3% e três/ sala foi de 80%.

Tabela 2: Taxas de sobrevivência ( $\pm$  Desvio Padrão) de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas a (1, 3 e 5) armadilhas PET com panos pretos impregnados com *Metarhizium anisopliae* ou *Beauveria bassiana*

Tratamento	Sobrevivência (%) $\pm$ Desvio Padrão		
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Controle
1 armadilha PET	46 $\pm$ 1 a \$	44.6 $\pm$ 0.6 a \$	78.6 $\pm$ 5.2 b \$
3 armadilhas PET	29.3 $\pm$ 1.5 a *	30 $\pm$ 1.7 a *	80 $\pm$ 2 b *
5 armadilhas PET	28.6 $\pm$ 1.5 a *	27.3 $\pm$ 1.5 a *	79.3 $\pm$ 3.1 b *

Letras indicam estatística realizada em linha. Símbolos indicam estatística realizada em colunas. Valores seguidos de letras ou símbolos diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade)

#### 4.3 Bioensaio 3 - Verificação das taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue ou sacarose expostas às armadilhas PET com pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana*

A Tabela 3 mostra que as taxas de sobrevivência (51,3%) de fêmeas alimentadas com sacarose e expostas por 24 horas às armadilhas PET com *M. anisopliae* não foram significativamente diferentes ( $P > 0,01$ ), comparado com os tratamentos realizados com *B. bassiana* (55,3%). Entretanto, esses dois tratamentos apresentaram taxa de sobrevivência diferente do controle (82%;  $F_{2,8} = 170,5$ ;  $P < 0,01$ ). O mesmo ocorreu no tratamento em que as fêmeas de *A. aegypti* foram alimentadas com sacarose e expostas às armadilhas PET com fungo ou controle por 48h ( $F_{2,8} = 103,6$ ;  $P < 0,01$ ) ou 120h ( $F_{2,8} = 445,2$ ;  $P < 0,01$ ).

A porcentagem de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sacarose expostas por 24 horas às armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* (51,3% e 55,3%, respectivamente) foi maior e significativamente diferente, comparado com a taxa de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sacarose expostas por 48h ou 120h às armadilhas PET com *M. anisopliae* (33,3% e 28,6%, respectivamente,  $F_{2,8} = 35,8$ ;  $P < 0,01$ ) ou *B. bassiana* (35,3% e 26%, respectivamente,  $F_{2,8} = 47,37$ ;  $P < 0,01$ ).

Expor os mosquitos alimentados com sacarose por 48h às armadilhas PET com *M. anisopliae* (33,3% de sobrevivência) não foi significativamente diferente ( $P > 0,01$ ) de expor mosquitos por 120h ao mesmo tratamento (28,6%).

Expor mosquitos alimentados com sacarose por 48h às armadilhas PET com *B. bassiana* resultou em taxa de sobrevivência significativamente maior (35,3%), comparado com mosquitos expostos por 120h ao mesmo tratamento (26%;  $F_{2,8} = 47,37$ ;  $P < 0,01$ ).

A taxa de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sangue expostas por 48 horas às armadilhas PET com *M. anisopliae* (75,3%) não foi significativamente diferente ( $P > 0,01$ ) da taxa de sobrevivência dos mosquitos expostos ao *B. bassiana* (78,6%). Portanto, foi diferente estatisticamente da porcentagem de sobrevivência das fêmeas expostas ao controle (81,3%).

A taxa de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sangue expostas por 72 horas às armadilhas PET com *M. anisopliae* (36,3%) não foi significativamente diferente ( $P > 0,01$ ) da taxa de sobrevivência dos mosquitos a *B. bassiana* (38,6%). Entretanto, esses dois tratamentos apresentaram taxas de sobrevivência significativamente diferente do controle (80%;  $F_{2,8} = 139,2$ ;  $P < 0,01$ ). O mesmo ocorreu no tratamento em que as fêmeas de *A. aegypti* foram alimentadas com sangue e expostas às armadilhas PET com fungo por 120 horas ( $F_{2,8} = 98,8$ ;  $P < 0,01$ ).

A porcentagem de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sangue expostas, por 48 horas, às armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* (75,3% e 78,6%, respectivamente) foi maior e significativamente diferente da porcentagem de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sangue expostas às armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* por 72 horas (36,6% e 38,6%, respectivamente,  $F_{2,8} = 118,2$ ;  $P < 0,01$ ) ou por 120 horas (34% e 38%, respectivamente,  $F_{2,8} = 159,1$ ;  $P < 0,01$ ).



Tabela 3: Taxas de sobrevivência ( $\pm$  Desvio Padrão) de fêmeas alimentadas com sacarose ou sangue e expostas a 3 armadilhas PET com pano preto + *Metarhizium anisopliae* ou *Beauveria bassiana* por diferentes períodos

Tratamentos	Sobrevivência (%) $\pm$ Desvio Padrão		
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Controle
SAC 24h PET	51.3 $\pm$ 1.5 a*	55.3 $\pm$ 0.6 a*	82 $\pm$ 1 b*
SAC 48h PET	33.3 $\pm$ 2.1 a \$	35.3 $\pm$ 3.1 a #	81.3 $\pm$ 1,52 b*
SAC 120h PET	28.6 $\pm$ 1.5 a \$	26 $\pm$ 1 a \$	78 $\pm$ 1 b*
SANG 48h PET	75.3 $\pm$ 1.5a*	78.6 $\pm$ 1.5a*	81.3 $\pm$ 1.5 a*
SANG 72h PET	36.6 $\pm$ 1.2a\$	38.6 $\pm$ 2.1a\$	80 $\pm$ 2b*
SANG 120h PET	34 $\pm$ 2a\$	38 $\pm$ 1a\$	79.3 $\pm$ 3b*

Os resultados são apresentados como percentagens médias  $\pm$  DP. Letras indicam estatística realizada em linha. Símbolos indicam estatística realizada em colunas. Os valores seguidos de letras ou símbolos diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). SAC = fêmeas alimentadas com sacarose e SANG = fêmeas alimentadas com sangue

#### 4.4 Bioensaio 4 - Avaliação da persistência da atratividade de *AtrAedes*<sup>®</sup> mantido em condições ambientais por longo prazo

Neste bioensaio, as taxas de captura das fêmeas de *A. aegypti* foram avaliadas depois de 24 e 48 horas da colocação das armadilhas nas salas. Na avaliação de 24 horas a armadilha PET com pano preto + filme adesivo + *AtrAedes*<sup>®</sup> capturou as maiores taxas de mosquitos, comparado com as taxas de capturas nos outros modelos das armadilhas PET (Tabela 4).

O *AtrAedes*<sup>®</sup> retirado da geladeira (tempo zero) e imediatamente empregado na armadilha PET + pano preto + filme adesivo capturou as maiores taxas de mosquitos, comparado com taxas de capturas de insetos expostos ao mesmo tipo de armadilha PET com o *AtrAedes*<sup>®</sup> exposto no ambiente por 30 dias.

Foi observada uma redução significativa das taxas de capturas dos insetos à medida que aumentou o tempo de exposição do *AtrAedes*<sup>®</sup> em

temperatura ambiente. Contudo, a atratividade do *AtrAedes*<sup>®</sup> + pano preto mesmo deixado por 30 dias no ambiente ainda continuou atraindo 22% dos insetos.

Em todos os experimentos um efeito aditivo nas taxas de captura dos mosquitos foi observado quando se utilizou a armadilha PET com pano preto + filme adesivo + *AtrAedes*<sup>®</sup> em comparação com as porcentagens de mosquitos capturados nas armadilhas PET com pano preto + filme adesivo ou somente filme adesivo + *AtrAedes*<sup>®</sup>. O tratamento controle com somente filme adesivo capturou baixas taxas e mosquitos.

Tabela 4: Taxas de captura  $\pm$  Desvio Padrão de mosquitos expostos por 24 horas à armadilha PET com diferentes tratamentos

Avaliações realizadas em 24 horas				
Períodos do <i>AtrAedes</i> <sup>®</sup> no ambiente	Pano preto + filme adesivo + <i>AtrAedes</i> <sup>®</sup>	Pano preto + filme adesivo	Filme adesivo + <i>AtrAedes</i> <sup>®</sup>	Filme adesivo
0 dias	38,8 $\pm$ 0,57 A a	18 $\pm$ 1 B a	17,3 $\pm$ 1,52 B a	3,3 $\pm$ 1,15 C a
5 dias	37,3 $\pm$ 0,57 A a	16 $\pm$ 1 B ab	15,3 $\pm$ 0,57 B ab	4,6 $\pm$ 0,57 C a
10 dias	32 $\pm$ 1 A b	14 $\pm$ 1 B c	12,6 $\pm$ 1,52 B bc	0 $\pm$ 0 C b
15 dias	28 $\pm$ 1 A c	14,6 $\pm$ 0,57 B ab	11,3 $\pm$ 0,57 C cd	3,33 $\pm$ 0,57 D a
30 dias	22 $\pm$ 1 A d	16,6 $\pm$ 0,57 B ab	8,66 $\pm$ 0,57 C d	0 $\pm$ 0 D b

Letras maiúsculas indicam estatística na linha. Letras minúsculas, estatística na coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados no teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade)

Os resultados das avaliações dos mosquitos expostos aos diferentes tipos de armadilhas PET por 48 horas foram similares aos de 24 horas (tabela 5). As taxas de captura dobraram à medida que dobrou o tempo de exposição das fêmeas de *A. aegypti*.

Tabela 5: Taxas de captura  $\pm$  Desvio Padrão de mosquitos expostos por 48 horas à armadilha PET com diferentes tratamentos

Avaliações realizadas em 48 horas				
Períodos do <i>AtrAedes</i> <sup>®</sup> no ambiente	Pano preto + filme adesivo + <i>AtrAedes</i> <sup>®</sup>	Pano preto + filme adesivo	Filme adesivo + <i>AtrAedes</i> <sup>®</sup>	Filme adesivo
0 dias	71,3 $\pm$ 0,57 A a	36 $\pm$ 3,60 B a	34 $\pm$ 1 B a	6 $\pm$ 1 C a
5 dias	66 $\pm$ 1 A a	34,6 $\pm$ 1,52 B a	31,3 $\pm$ 0,57 B a	3,3 $\pm$ 1,15 C a
10 dias	64 $\pm$ 1 A a	33,3 $\pm$ 0,57 B a	30 $\pm$ 1 B a	4 $\pm$ 1 C a
15 dias	56 $\pm$ 1 A b	32,6 $\pm$ 0,57 B a	28,6 $\pm$ 0,57 C b	0 $\pm$ 0 D b
30 dias	41,3 $\pm$ 0,57 A c	30 $\pm$ 1 B a	17,5 $\pm$ 0,57 C c	0 $\pm$ 0 D b

Letras maiúsculas estatísticas na linha. Letras minúsculas estatísticas na coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados no teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade)

#### 4.5 Bioensaio 5 - Comparação da sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas por 120 horas a diferentes tipos de armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* + *AtrAedes*<sup>®</sup>

A Tabela 6 mostra que os mosquitos expostos à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana* + *AtrAedes*<sup>®</sup> tiveram significativamente menores taxa de sobrevivência (32,6% e 36%, respectivamente), comparada com as porcentagens de sobrevivência dos mosquitos expostos somente ao pano preto + *M. anisopliae* ou *B. bassiana* (48% e 52%, respectivamente), pano preto + *AtrAedes* (>80%) e pano preto + TW (>82%;  $F_{3,11} = 64,87$ ;  $P < 0,01$ ).

Tabela 6: Taxas de sobrevivência ( $\pm$  Desvio Padrão) de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas por 120 horas a uma armadilha PET com diferentes tratamentos

Tratamentos	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
Pano + Fungo + AtrAedes <sup>®</sup>	32,6 $\pm$ 1,15 a	36 $\pm$ 2,08 a
Pano + Fungo	48 $\pm$ 4,04 b	52 $\pm$ 4,04 b
Pano + AtrAedes <sup>®</sup>	80 $\pm$ 2,08 c	83 $\pm$ 1,52 c
Pano + TW	82 $\pm$ 2,08 c	78 $\pm$ 2,30 c

Estatística feita em colunas. Os valores com letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade)

#### 4.6 Bioensaio 6 - Verificação da sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas por 24, 48 ou 72 horas à armadilha PET com *M. anisopliae* + AtrAedes<sup>®</sup>

Observou-se que os mosquitos expostos por 72h a uma armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* + AtrAedes<sup>®</sup> apresentaram a menor taxa de sobrevivência (34%), comparado com resultados dos mosquitos expostos à armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* (56%), pano + AtrAedes<sup>®</sup> (81,3%) ou pano preto + TW (78,6%) ( $F_{3,11} = 414,0$ ;  $P < 0,01$ ) (Tabela 7).

As taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos de 72, 48 ou 24 horas ao pano preto + *M. anisopliae* + AtrAedes<sup>®</sup> não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,01$ ).

A porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos por 72 horas a uma armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* foi significativamente diferente, comparado com as taxas de sobrevivência dos insetos expostos ao mesmo tratamento por 48 h e 24 h ( $F_{(3,11)} = 20,0$ ;  $P < 0,01$ ).

Tratamentos controle feitos com armadilha PET com pano preto + AtrAedes<sup>®</sup> e pano preto + TW apresentaram taxas de mosquitos vivos  $> 78\%$ .

Tabela 7: Taxas de sobrevivência ( $\pm$  Desvio Padrão) de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas por 72, 48 e 24 horas a uma armadilha PET com diferentes tratamentos

Períodos de exposição da armadilha PET	Pano preto + Fungo + AtrAedes®	Pano preto + Fungo	Pano preto + AtrAedes®	Pano preto + TW
24 horas	38,6 $\pm$ 0,57 Aa	76,6 $\pm$ 2,88 Ba	78,6 $\pm$ 0,57 Ba	81,3 $\pm$ 1,15 Ba
48 horas	36,6 $\pm$ 152 Aa	65,3 $\pm$ 1,52 Bb	80,6 $\pm$ 1,52 Ca	82 $\pm$ 1 Ca
72 horas	34 $\pm$ 2,64 Aa	56 $\pm$ 3,46 Bc	81,3 $\pm$ 2,08 Ca	78,6 $\pm$ 2,08 Ca

Letras maiúsculas indicam comparação de médias realizadas na linha. Letras minúsculas indicam comparação de médias realizadas na coluna. Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados no teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade)

#### 4.7 Bioensaio 7 – Investigação da taxa de captura de fêmeas de *A. aegypti* expostas à armadilha PET com pano preto + filme adesivo + AtrAedes® colocado na base ou topo da armadilha

A Figura 17 mostra que os mosquitos expostos à armadilha PET com pano preto + filme adesivo + AtrAedes® na base apresentaram significativamente menor taxa de captura (28%  $\pm$  1), comparado com a porcentagem de captura dos mosquitos expostos à mesma armadilha, mas com o AtrAedes® fixado no topo da armadilha PET (53,3%  $\pm$  1,15) ( $F_{3,11} = 286,87$ ;  $P < 0,01$ ).

Os mosquitos expostos à armadilha PET com somente filme adesivo + AtrAedes® na base apresentaram significativamente menor taxa de captura (10%  $\pm$  1), comparado com a taxa de captura dos mosquitos expostos à mesma armadilha com atraente no topo (19%  $\pm$  0,57) ( $F_{3,11} = 286,87$ ;  $P < 0,01$ ).

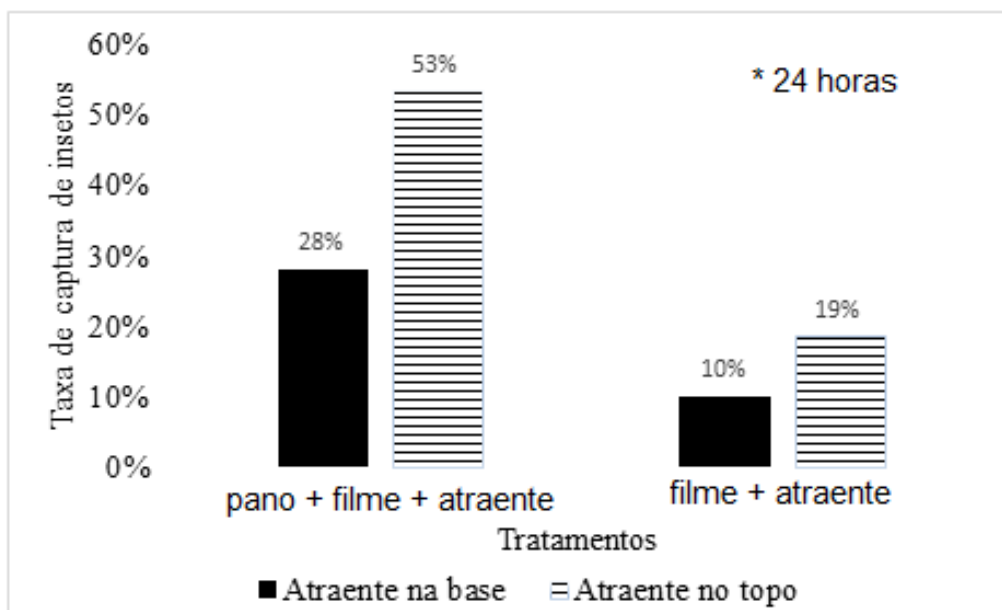


Figura 17: Avaliação das diferentes posições do atraiente *AtrAedes*<sup>®</sup> na armadilha PET com ou sem pano preto + filme adesivo para captura de mosquitos.

## 5. DISCUSSÃO

Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são candidatos para serem usados como biopesticidas no controle de mosquitos vetores de doenças.

No presente estudo foi avaliada a taxa de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti* expostas por diferentes períodos à armadilha PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*. Os resultados mostraram que as menores taxas de sobrevivência foram verificadas quando os mosquitos ficaram expostos por mais tempo à armadilha PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*. O maior período de exposição nesse experimento foi de 48 horas, resultando em aproximadamente 14% de sobrevivência dos insetos para ambos os fungos.

Já foi mostrado anteriormente que um pano preto impregnado com *M. anisopliae* pendurado no topo de uma gaiola grande (115 x 60 x 75 cm) por 48 horas resultou em 30% de sobrevivência de fêmeas *A. aegypti* (Paula et al., 2008). No experimento deste trabalho, em 48 horas de exposição do mosquito ao fungo *M. anisopliae*, as taxas de sobrevivência foram menores em relação aos testes de Paula et al., (2008). Este fato ocorreu talvez devido a alterações na virulência do fungo utilizado nos diferentes tratamentos. Nesse sentido, Carneiro et al. (2008) constataram variação na virulência entre uma mesma espécie de fungo.

As armadilhas PET com panos pretos impregnados com fungo foram eficazes na redução da sobrevivência dos mosquitos, porém, foi necessário deixá-

las na câmara de observação no mínimo 24 horas. Menores tempos de exposição não reduziram significativamente a sobrevivência dos mosquitos (Tabela 1). Ao contrário de George et al., (2013), que demonstraram que em apenas um minuto de exposição dos mosquitos *A. stephensi* aos panos pretos impregnados com *B. bassiana* foi suficiente para causar altos níveis de infecção e morte destes insetos (95%).

Imad Silva et al. (2015) mostraram em uma simulação de um cômodo residencial, que não houve diferença na redução de sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* quando foram expostos a três panos pretos com fungo fixados em móveis residenciais ou três panos pretos pendurados em armadilhas PET. Os mosquitos expostos aos três panos + fungo fixados em móveis residenciais apresentaram taxa de sobrevivência estatisticamente igual (26%) à porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos a três armadilhas PET com pano + fungo (24%). Estes resultados mostram a viabilidade dos panos pretos com fungo em relação a atratividade e redução da sobrevivência dos insetos.

Depois de ter testado a eficiência das armadilhas PET com superfícies de pouso impregnadas com fungos para os mosquitos em um espaço pequeno (câmara de observação), as armadilhas foram então testadas em salas que simularam residências humanas. No presente estudo foi observada a quantidade necessária de armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* para significativamente reduzir a porcentagem de sobrevivência de *A. aegypti*. Os resultados mostraram que uma armadilha com pano preto impregnado com fungo por sala foi suficiente para causar redução significativa na sobrevivência dos mosquitos (46% e 44%, respectivamente). Uma resposta melhorada foi vista quando foram utilizadas três ou cinco armadilhas por sala.

Cinco armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* resultaram em 28,6% e 27,6% de sobrevivência, respectivamente. Esses valores não diferem estatisticamente quando comparados com as taxas de sobrevivência dos mosquitos expostos a três armadilhas PET com pano preto + *M. anisopliae* (29,3%) ou *B. bassiana* (30%). Portanto, o teste posterior foi realizado utilizando três armadilhas PET por sala, já que a taxa de sobrevivência dos mosquitos aumentou quando utilizada apenas uma armadilha por sala (Tabela 2). A eficiência de armadilhas adesivas feitas de garrafas PET na captura de *A. aegypti* também foi proporcional ao número de armadilhas por casa (Santos et al., 2012).



Mmbando, et al., (2015) utilizaram duas armadilhas por câmara para contaminar e matar 69% das fêmeas de *A. arabiensis*. Cinco panos pretos impregnados com *M. anisopliae* foram necessários para reduzir a sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* em 44% de sobrevivência no sétimo dia de observação em semicampo (Paula et al., 2013b).

Este experimento foi realizado para avaliar a eficiência das armadilhas PET contra insetos alimentados com sacarose e sangue, assim como no campo, mosquitos em diferentes estados nutricionais estarão circulando no ambiente. Foram testadas três armadilhas PET com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* para avaliar as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue ou sacarose em uma simulação de um cômodo residencial.

As armadilhas PET foram mantidas nas salas de semicampo por diferentes períodos para os insetos alimentados com sacarose (24, 48 e 120 horas) e para os alimentados com sangue (48, 72 e 120 horas).

À medida que aumentava o tempo de exposição dos mosquitos alimentados com sacarose às armadilhas PET, as taxas de sobrevivência foram reduzindo para ambas as espécies fúngicas testadas. Apenas 24 horas de exposição às armadilhas PET foi suficiente para causar significativas reduções nas taxas de sobrevivência dos mosquitos alimentados com sacarose quando comparados aos controles.

Diferentemente, os mosquitos alimentados com sangue, em 48 horas de exposição às armadilhas PET, as taxas de sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti* foram iguais aos controles. Para reduzir a porcentagem de sobrevivência foram necessárias 72 horas de exposição dos mosquitos alimentados com sangue às armadilhas PET.

Estudos apontam que fêmeas de *A. gambiae* alimentadas com sangue foram menos suscetíveis aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em relação aos mosquitos alimentados com sacarose (Mnyone et al., 2011). Paula et al., (2011b) verificaram que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose foram mais suscetíveis à infecção pelo fungo *M. anisopliae* comparado com fêmeas alimentadas com sangue, sugerindo que o estado nutricional pode estar influenciando a virulência do fungo, apesar da redução na suscetibilidade ser um fenômeno temporário, com duração aproximada de 96 horas. Paula et al. (2013a) sugeriram que este fato pode ter ocorrido devido à redução da atividade

locomotora dos insetos após alimentação sanguínea. Estes autores também confirmaram que as fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue tanto da linhagem Rockefeller quanto selvagem foram menos suscetíveis ao *M. anisopliae*.

Estudos da atividade de voo de uma variedade de espécies de mosquitos sugerem que refeições de sangue impõem um peso adicional ao corpo do inseto devido à grande quantidade de sangue ingerido, comparado com os mosquitos não ingurgitados (Greenberg et al., 2012).

É plausível que a condição fisiológica de *A. aegypti* induzida por alimentação sanguínea, desencadeie mudanças adicionais que afetam o comportamento do inseto.

Taparia et al. (2017) demonstraram que a indução por refeição de sangue é regulada por genes quimiossensoriais nas antenas das fêmeas do mosquito *C. quinquefasciatus*. As fêmeas apresentaram reduzida capacidade de resposta olfativa e atividade de voo quando entraram em estado de repouso durante o processo de digestão sanguínea.

Estudos realizados através de gravações eletrofisiológicas das sensilas das antenas *trichodea* das fêmeas de *A. aegypti*, 24 e 72 horas pós-refeição de sangue, indicaram mudanças significativas nos espectros de respostas e sensibilidade dos neurônios receptores olfatórios contidos na maioria das sensilas comparados com mosquitos não alimentados com sangue. Foi observado um aumento da sensibilidade dos neurônios receptores olfatórios aos compostos indólicos e fenólicos (compostos orgânicos aromáticos) tanto em 24 quanto em 72 horas após repasto sanguíneo. Esses neurônios são envolvidos na condução do comportamento de orientação das fêmeas para locais de oviposição que são conhecidos por liberar compostos indóis e fenóis (Siju et al., 2010).

Pesquisas moleculares mostram que a alimentação sanguínea diminui a expressão de genes do relógio circadiano no flebótomo *Lutzomya longepalpis* (Meireles Filho et al., 2006), no mosquito *A. gambiae* (Das e Dimopoulos, 2008; Rund et al., 2011; Rund et al., 2013) e em *A. aegypti* (Gentile et al., 2013). Estudos realizados através da quantificação da expressão de mRNA dos principais genes do relógio circadiano em duas espécies de mosquitos, utilizando várias combinações de ciclos de luz e temperatura mostraram que o *A. aegypti* é mais sensível à temperatura, enquanto o *C. quinquefasciatus* é mais responsivo à luz. Essas variações na expressão gênica do relógio circadiano e na atividade

locomotora podem afetar o metabolismo e o gasto de energia do inseto (Rivas et al., 2018).

Já foi estudado que panos pretos servem como atraente visual para mosquitos e também foi observado que não houve diferença nas frequências de pouso dos mosquitos em panos pretos impregnados com ou sem fungos, indicando que a presença do fungo não inibe a atividade de pouso do mosquito (Paula et al., 2013b). É importante observar que os panos pretos utilizados neste estudo medem somente 17 x 8 cm, o que seria mais viável para ser utilizado em residências, diferentemente de Scholte et al. (2005), que fixaram panos pretos impregnados com *M. anisopliae* no teto de habitações humanas na África medindo 3m<sup>2</sup>. Provavelmente muitos voluntários rejeitariam essa ideia devido ao tamanho dos panos.

A fim de aumentar a atratividade dos panos pretos e reduzir a quantidade de armadilhas PET por sala e visando diminuir ainda mais a sobrevivência de *A. aegypti*, foi associado um atraente sintético AtrAedes<sup>®</sup> ao pano preto impregnado com fungo e em seguida foi suspenso na armadilha PET.

Superfícies pretas são importantes para atrair *A. aegypti* e outros mosquitos (Hecht et al., 1963). Sabe-se que dentro das residências existem muitos locais de descanso, reduzindo as chances dos mosquitos pousarem no pano preto impregnado com fungo. Desta forma, foi ressaltada a importância da utilização de um atraente de mosquito nas armadilhas com pano preto e fungo.

No atual estudo foi avaliada a atratividade do AtrAedes<sup>®</sup> ao longo do tempo em condições ambientais para captura de *A. aegypti*. Os testes foram realizados utilizando armadilha PET adesiva.

A maior porcentagem de captura foi observada quando foi utilizada a armadilha PET com pano preto + filme adesivo associado ao AtrAedes<sup>®</sup>. Esse modelo de armadilha foi significativamente atrativo para os mosquitos em todos os períodos em que o AtrAedes<sup>®</sup> ficou exposto em condições ambientais (de 0 a 30 dias) (Tabela 4 e 5.)

Nas avaliações de captura realizadas 24 ou 48 horas após o início dos testes, a armadilha PET com pano preto + filme adesivo + AtrAedes<sup>®</sup> recém-tirado da geladeira resultou em maiores taxas de captura de mosquitos (38,8% e 71,3%, respectivamente), comparado com a captura dos mosquitos na armadilha PET com pano preto + filme adesivo sem o AtrAedes<sup>®</sup> (18% e 36,3%,

respectivamente). Quando foi retirado o pano preto e o *AtrAedes*<sup>®</sup> da armadilha e os mosquitos expostos somente ao filme adesivo transparente, a porcentagem de captura foi mínima.

Outros estudos também utilizaram materiais adesivos para capturar *A. aegypti*. Existe uma armadilha denominada MosquiTRAP<sup>®</sup> confeccionada de um material plástico preto com um cartão adesivo preto para prender os mosquitos (Eiras, 2002; Gama et al., 2007). A armadilha AedesTrap, consiste em uma garrafa descartável de refrigerante revestida internamente com resina de colofônia, que serve como um substrato adesivo, capturando mosquitos em ambientes fechados ou ao ar livre (Santos et al., 2012). O uso de filmes adesivos foi importante no atual estudo para mostrar a atração dos mosquitos às armadilhas PET usando a combinação do pano preto + *AtrAedes*<sup>®</sup>.

Já foram desenvolvidos vários tipos de atraentes para mosquitos dos gêneros *Culex* (Mboera et al., 1999; Mboera et al., 2000) e *Aedes* (Chadee, 1993). Sant'ana (2003) identificou sete diferentes compostos voláteis provenientes de infusões de gramíneas (*Panicum maximum*) fermentados por 15 a 20 dias, sendo considerados biologicamente ativos para atrair fêmeas de *A. aegypti*.

O atraente de oviposição sintético *AtrAedes*<sup>®</sup>, foi constituído pelo aldeído nonanal, um dos sete compostos identificados na infusão de *P. maximum* para potencializar a eficiência da armadilha MosquiTRAP<sup>™</sup> na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti* (Eiras, 2002; Fávaro et al., 2006), atraindo os mosquitos por volta de 45 dias (Eiras e Resende, 2009), embora esses resultados não tenham sido publicados.

No atual estudo pode-se observar um declínio lento na atratividade do *AtrAedes*<sup>®</sup> ao longo do tempo, no entanto, estes atrativos foram testados por até 30 dias e mesmo após este tempo eles continuaram viáveis. Este achado sugere que o *AtrAedes*<sup>®</sup> pode ser utilizado nas armadilhas PET em residências por um mês, sem necessidade de realizar troca durante esse período.

Apesar do *AtrAedes*<sup>®</sup> ser mais fácil de usar em relação às infusões de gramíneas, esta substância não atraiu o mosquito *C. quinquefasciatus* quando testado na Tanzânia (Irish, et al., 2015), no entanto, a espécie *Culex* foi encontrada em MosquiTRAP<sup>™</sup> contendo *AtrAedes*<sup>®</sup>, sendo capturados um total de 15.059 mosquitos (Honório et al., 2009).

Como já foi observado neste trabalho, não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência de *A. aegypti* quando os mosquitos foram expostos a três ou cinco armadilhas PET por sala, mas um aumento da taxa de sobrevivência (46%) foi observado ao testar uma armadilha PET por sala sem *AtrAedes*<sup>®</sup>. Sendo assim, neste estudo foi investigada a eficiência de uma armadilha PET com fungo + atraente *AtrAedes*<sup>®</sup> para reduzir a sobrevivência de *A. aegypti* em simulação de um cômodo residencial.

Os resultados mostraram que apenas uma armadilha PET com pano preto + fungo + *AtrAedes*<sup>®</sup> causou significativa redução das taxas de sobrevivência de *A. aegypti* (Tabela 6), comparado com resultados de sobrevivência utilizando uma armadilha PET com fungo, mas sem o atraente.

Snetselaar et al. (2014) mostraram que uma armadilha com atraente + fungo + inseticida sintético reduziu as taxas de sobrevivência de *A. aegypti*. Esta armadilha contém um atraente a base de levedura, uma superfície de pouso impregnada com *B. bassiana* e um larvicida sintético (pyriproxyfen) adicionado na água. As fêmeas são contaminadas pelo fungo e o inseticida no momento da oviposição. As larvas eclodidas morrem pelo inseticida na água (100% de mortalidade) e as fêmeas que saem da armadilha carregam o inseticida para outros criadouros, matando mais de 90% das larvas presentes nesses locais. Além disso, as fêmeas morrem pelo contato com o fungo.

A diminuição do tempo de exposição dos mosquitos à armadilha PET com fungo + *AtrAedes*<sup>®</sup> também foi mostrada no atual estudo. A exposição das fêmeas de *A. aegypti* a uma armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* + *AtrAedes*<sup>®</sup> foi eficiente para causar significativas reduções das taxas de sobrevivência destes insetos (Tabela 7).

Não houve diferença significativa à medida que aumentou os tempos de exposição dos mosquitos (24, 48 e 72 horas) a uma armadilha PET com fungo + *AtrAedes*<sup>®</sup>. Apenas 24 horas de exposição já foi suficiente para causar a redução da sobrevivência em 38 %. Já os mosquitos expostos a uma armadilha PET com fungo, mas sem o *AtrAedes*<sup>®</sup> por 24, 48 ou 72 horas apresentaram altas taxas de sobrevivência variando de 56% a 76,6%.

Pesquisas de campo têm sido desenvolvidas utilizando superfícies impregnadas com fungos associados aos atraentes para infectar e matar mosquitos.

Lwetoijera et al. (2010) mostraram em seus estudos a eficiência de uma armadilha feita com caixa de madeira contendo panos pretos impregnados *M. anisopliae* associados a atraente ( $\text{CO}_2$ ), para atrair, infectar e matar mosquitos *A. arabiensis*.

Em nossos estudos, o *AtrAedes*<sup>®</sup> testado na base da armadilha PET se mostrou eficiente para reduzir a sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti*. Neste bioensaio foi investigado se o *AtrAedes*<sup>®</sup> colocado no topo da armadilha PET com pano preto + filme adesivo iria capturar a maior taxa de mosquitos em relação ao *AtrAedes*<sup>®</sup> fixado na base da armadilha. Fêmeas expostas à armadilha PET com pano preto + filme adesivo + *AtrAedes*<sup>®</sup> na base do pano capturou menores taxas de mosquitos (28%), comparando com a porcentagem de captura dos mosquitos expostos à mesma armadilha, porém com o *AtrAedes*<sup>®</sup> no topo (53,3%). Os resultados foram promissores quando a colocação do *AtrAedes*<sup>®</sup> foi modificada.

A forma como os atraentes se difundem nas armadilhas através da formação de plumas de odores e a sua constituição são fatores responsáveis pela eficiência das armadilhas (Du e Millar, 1999). A dispersão dos odores pode se disseminar em várias direções moduladas pela turbulência do vento (Eiras e Mafra-Neto, 2001). No atual estudo, as salas experimentais possuem portas e exaustores com telas visando à formação de correntes de ar e ventilação natural.

Os insetos utilizam estímulos produzidos pelos hospedeiros, como o dióxido de carbono encontrados na respiração (Cooper et al. 2004) e ácido láctico e amônia encontrados na pele humana (Braks et al., 2001) como atraentes para se direcionar até a fonte de alimentação sanguínea. Estes compostos voláteis produzidos pelo hospedeiro, somados ao calor e à umidade formam plumas de odores que se dispersam no ambiente. Eiras e Jepson (1991) encontraram evidências de que fêmeas de *A. aegypti* foram excitadas a voar quando  $\text{CO}_2$  combinado com ácido láctico foi liberado em um túnel de vento. Esses autores também demonstraram que altas concentrações de  $\text{CO}_2$  associadas a baixas concentrações de ácido láctico levaram a resposta de pouso das fêmeas da mesma espécie sobre a fonte atrativa.

George et al. (2014) testaram em um tubo Y (olfatômetro), a atração de mosquitos para lagartas vivas e mortas, a fim de avaliar a possível contribuição de  $\text{CO}_2$  para atração de *A. stephensi*. Os resultados mostraram que 81% das fêmeas voaram para o braço contendo lagartas vivas. Assim, as emissões de  $\text{CO}_2$

das lagartas vivas contribuíram para os elevados níveis de atração de *A. stephensi* em comparação com lagartas mortas (19%).

A armadilha BG-Sentinel™ é composta de um miniventilador em seu interior que produz correntes de convecção de ar, liberando odor do atraente sintético (BG-Lure™), composto de amônia e ácido láctico, formando plumas de odores para atrair a maior quantidade de mosquitos (Kröckel et al., 2006). Entretanto, o problema no uso desta armadilha é o alto custo (cerca de € 200 a € 300), além da necessidade de uma fonte de energia para o seu funcionamento, podendo inviabilizar a utilização em campo. Degener et al. (2014) realizaram um estudo em Manaus, utilizando a armadilha BG-Sentinel™ capturando mosquitos em massa, no entanto, a incidência de dengue não foi reduzida. A armadilha PET com pano preto impregnado com fungo combinado com AtrAedes® apresenta baixo custo, é de fácil manipulação e não depende de fonte de energia elétrica.

Ensaio de campo utilizando armadilhas PET com pano preto impregnado com fungo entomopatogênico estão sendo desenvolvidos em residências humanas. Esses testes envolvem a distribuição de 15 armadilhas com fungos e 15 armadilhas controle, que são distribuídas em varandas de apartamentos térreos em um condomínio de Campos dos Goytacazes - RJ. Os possíveis efeitos sobre a população de mosquitos estão sendo monitorados usando ovitrampas para estimar o número de ovos depositados por *A. aegypti* semanalmente, na presença ou ausência dos fungos.

Os resultados destes testes são promissores, com uma redução significativa na contagem de ovos em ovitrampas colocadas nas proximidades das armadilhas PET impregnadas com fungos quando comparadas aos controles. Em 2018 foram coletados 64.306 ovos de *Aedes* neste condomínio. Os apartamentos com fungo resultaram em menor quantidade de ovos de *A. aegypti* (16.574 ovos) comparados com os apartamentos sem as armadilhas com fungos (47.732 ovos). Provavelmente os mosquitos foram atraídos para a armadilha PET, se infectaram com o fungo e morreram antes de colocar ovos nas ovitrampas (dados não publicados). Futuros testes de campo poderão avaliar se a armadilha PET com fungo + AtrAedes® resultará em maiores reduções de números de ovos de *Aedes* observados em ovitrampas.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Para testar o aumento da eficiência da armadilha PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*, primeiramente, foi avaliado em câmara de observação, a taxa de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas por diferentes períodos à respectiva armadilha. Os próximos testes foram realizados em salas experimentais. Foi estudada a quantidade necessária de armadilha PET com pano preto + fungos para reduzir as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti*. Foram verificadas as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue ou sacarose expostas às armadilhas PET com pano preto com os mesmos fungos. Em seguida, foi associado o AtrAedes<sup>®</sup> nas armadilhas a fim de aumentar a sua eficiência. Uma “armadilha PET adesiva” foi utilizada para avaliar a atratividade do AtrAedes<sup>®</sup> para captura de *A. aegypti* ao longo do tempo em condições ambientais. Fêmeas de *A. aegypti* foram expostas por 24, 48 72 e 120 horas a diferentes tipos de armadilhas PET com fungos + AtrAedes<sup>®</sup>. E também foi comparado a taxa de captura de fêmeas de *A. aegypti* expostas a “armadilha PET adesiva” com o AtrAedes<sup>®</sup> posicionado na base ou no topo da armadilha.

- Foi confirmada a eficiência da armadilha PET com pano preto impregnado com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* em reduzir a sobrevivência de *A. aegypti*;
- Não houve diferença significativa na taxa de sobrevivência de mosquitos expostos a cinco ou três armadilhas PET com fungo. A porcentagem de sobrevivência dos mosquitos expostos a somente uma armadilha PET com



fungo foi significativamente maior em relação às taxas utilizando 3 ou 5 armadilhas;

- Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose foram mais suscetíveis ao fungo *M. anisopliae* ou *B. bassiana* em relação às fêmeas alimentadas com sangue;
- A atratividade de *AtrAedes*<sup>®</sup> foi apenas ligeiramente reduzida ao longo do tempo em condições ambientais;
- O uso de *AtrAedes*<sup>®</sup> associado ao pano preto impregnado com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* reduziu significativamente a sobrevivência de *A. aegypti* quando comparadas as armadilhas somente com panos pretos impregnados com fungos;
- A utilização do *AtrAedes*<sup>®</sup> no topo da armadilha PET com pano preto foi mais eficiente para capturar fêmeas de *A. aegypti*, comparado com utilização do atraente na base da armadilha PET;
- O uso de panos pretos impregnados com fungos é um método de aplicação promissor para o controle de *A. aegypti* e o uso de atraentes aumenta ainda mais a eficiência desse método, reduzindo significativamente a sobrevivência dos mosquitos e reduzindo o número de armadilhas PET necessárias em cada residência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnew, P., Sidobre, C., Hide, M., Michalakis, W. (2002) A minimalist approach to the effects of density-dependent competition on insect life-history traits. *Ecological Entomology*. V. 27, p. 396-402.
- Alves, S.B., Alves, L.F.A., Lopes, R.B., Pereira, R.M. Vieira, S.A. (2002) Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *Journal Entomology*. V. 126, p. 504-509.
- Alves, S.B. (1998) Controle Microbiano de Insetos. 2 ed. Piracicaba. 1163p.
- Andrade, A.J., Andrade, M.R., Dias, E.S., Pinto, M.C., Eiras, A.E. (2008) Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: *Psychodidae: Phlebotominae*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V.103, p. 337-343.
- Angel Sahagún, C.A., Lezama Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Galindo Velasco, E., López Edwards, M., Rebolledo Domínguez, O., Cruz Vázquez, C., Reyes Velázquez, W.P., Skoda, S.R., Foster, J.E. (2005) Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science*. V.50, p.1-8.
- Araújo, H.R.C., Carvalho, D.O., Ioshino, R.S., Costa da Silva, A.L., Capurro, M.L. (2015) *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects*. V.6, p.576-94.
- Araújo, R.F.S.D., Carels, N. (2007) Investigação de polimorfismos no genoma do vírus da Dengue. *Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde*. V.1, p. 317-321.

- Areia, P.A.V., Paula, A.R., Cypriano, M.B.C., Samuels, R.I. (2012) Comparação de armadilhas ovitrampas e monitoramento do mosquito *Aedes aegypti* em Campos dos Goytacazes – RJ. *Encontro Latino Americano de Iniciação Científica- INIC*.
- Badano, E.I., Regidor, H.A. (2002) Selección de hábitat de oviposición en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mediante estímulos. *Ecologia Austral*. V. 12, p.129-134.
- Ball, T.S., Ritchie, S.R. (2010) Evaluation of BG-sentinel trap trapping efficacy for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in a visually competitive environment. *Journal of Medical Entomology*. V. 47, p. 657-63.
- Barata, E.A.M.F., Costa, A.I.P., Neto, F.C., Glasser, C.M., Barata, J.M.S., Natal, D (2001). População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*. V. 35, p. 237-42.
- Barreto, M.L., Teixeira, M.G. (2008) Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud*. V. 22, p. 53-72.
- Becker, N. (2010) Mosquitoes and their control. 2.ed. New Yourk: Springer-Verlag.
- Becker, N. (2000) Bacterial control of vector mosquitoes and black flies. In: Charles J. F., Delécluse A., Leroux C. N., Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht. V. 45, p. 383-398.
- Becnel, J.J., White, S.E., Moser, B.A., Fukuda, T., Rotstein, M.J., Undeen, A.H., Cockburn, A. (2001) Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* e *Culex quinquefasciatus*. *Journal of General Virology*. V. 82, p. 275-282.
- Benserradj, O., Mihoubi, I. (2014) Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. V. 3, p. 54–62.
- Beserra, E.B., Fernandes, C.R.M., Ribeiro, P.S. (2009) Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L) (Diptera: Culidade) em laboratório. *Neotropical Entomology*. V. 38, p. 847-852.
- 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* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*. V. 35, p.853-860.
- Bisset, J.A. (2002) Correct use of insecticides: management of resistance. *Revista Cubana Medicina Tropical*, Habana. V. 54, p. 202-219.
- Blanford, S., Jenkins, N.E., Christian, R., Chan, B.H.K.; Nardini, L., Osa, M., Koekemoer, L., Coetzee, M., Read, A.F., Thomas, M.B. (2012) Storage and persistence of a candidate fungal biopesticide for use against adult malaria vectors. *Malaria Journal*. V. 11, p. 354.

- 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*. V. 308, p. 1638–1641.
- Borges, R.A., Cavasin, G.M., Silva, I.G., Arruda, W., Oliveira, E.S.; Silva, H.H.G., Martins, F. (2004) Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do Diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti*. *Revista de Patologia Tropical*. V. 33, p. 91-104.
- Bosch, O.J., Geier, M., Boeckh, J. (2000) Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. *Chem Senses*. V. 25, p. 323–330.
- Braga, I.A., Mello, C.B., Peixoto, A.A., Valle, D. (2005) Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, V. 100, p. 435-440.
- Braga, I. A., Gomes, A.C., Nelson, M.M., Mello, R.C.G., Bergamaschi, D.P., Souza, J.M.P. (2000) Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor populations of *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 33, p. 347-353.
- Braga, I. A., Valle, D. (2007a) *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, V. 16, p. 279-293.
- Braga, I.A., Valle, D. (2007b) *Aedes aegypti*: histórico de controle no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Rio de Janeiro. V.16, p.113-118.
- Braks, M. A. H., Meijerink, J., Takken, W. (2001) The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and L-lactic acid, in an olfactometer. *Physiological Entomology*. V. 26, p. 142-148.
- Brasil (2010) Doenças infecciosas e parasitárias. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. *Departamento de Vigilância em Saúde*. 449p.
- Brasil (2008) Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de Bolso. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil (1986) Combate ao *Aedes aegypti* instruções para guardas, guardas chefes e inspetores. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde.
- Briegel, H., Gut, T., Lea, A.O. (2003) Sequential deposition of yolk components during oogenesis in the insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*. V. 49, p. 249-260.
- Bull, J.J, Turelli, M. (2013) *Wolbachia* versus dengue: Previsões evolutivas. *Evolução, Medicina e Saúde Pública*. p. 197-207.
- Bukhari, T., Middelmann, A., Koenraad, C. J. M., Takken, W. Knols, B. G. L. (2010) Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal*. V. 9, p. 2-15.

- Câmara, F.P., Gomes, A.F., Santos, G.T., Câmara, D.C.P. (2009) Clima e Epidemia de Dengue no Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 42, p. 137-140.
- Campbell, L.P., Luther, C., Moo Llanes, D., Ramsey, J.M., Danis Lozano, R., Peterson, A.T. (2015) Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philos Trans R. Soc B*. 370, 20140135.
- Campos, J., Andrade, C.F.S. (2001) Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*. V. 35, p. 232-236.
- Cantuária, M.F. (2012) Ecologia de culicídeos (Diptera: Culicidae) da área de proteção ambiental do rio Curiaú, Macapá, Amapá. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical. Universidade Federal do Amapá.
- Cao-Lormeau, V.M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P. (2016) Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
- Cao-Lormeau, V.M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.L., Mallet, H. P., Sall, A. A., Musso, D. (2014) Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infectar*. V. 20, p. 1085-1086.
- Carneiro, A.A., Gomes, E.A., Guimarães, C.T., Fernandes, F.T., Carneiro, N.P., Cruz, I. (2008) Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V. 43, p. 513-520.
- 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). *Parasitas & Vetores*. V. 7, p. 198.
- Carvalho, D.O., Costa da Silva, A.L., Lees, R.S., Capurro, M.L. (2014) Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases. *Acta Trop*. V. 132, P. 170-7.
- Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2015) Chikungunya nowcast for the Americas. Nowcast: Chikungunya in the Americas. Atlanta. Disponível em: <http://www.cdc.gov/chikungunya/modeling/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention - CDC (2005) <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/arbdet.htm>.
- Chadee, D.D. (1993) Oviposition response of *Aedes aegypti* (L.) to presence of conspecific eggs in the field in Trinidad West Indies. *Journal of the American Mosquito Control Association*. V. 64, p. 63–66.

- Chadee, D.D., Corbet. P., Greenwood, J. (1990) Egg-laying Yellow Fever mosquitoes avoid sites containing eggs laid by themselves or by conspecifics. *Entomol Exp Appl*. V. 57, p. 295-298.
- Chan, J.F., To, K.K., Tse, H., Jin, D.Y., Yuen, K.Y. (2013) Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. *Trends Microbiol*. V. 21, p. 544–555.
- Chandler, D., Davidson, G., Pell, J.K., Ball, B.V., Shaw, K., Sunderland, K.D. (2000) Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Science Technology*. V. 10, p. 357- 384.
- Chapman, R.F. (1982) The insects: structure and function. 3rd ed. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 919p.
- Chavasse, D.C., Yap, H.H. (1997) Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization. WHO/CTD/WHOPES/97.2.
- Chhabra M, Mittal, V., Bhattacharya, D., Rana, U., Lal, S. (2008) Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. *Indian Journal of Medical Microbiology*. V. 26, p. 5-12.
- Christophers, S.R. (1960) *Aedes aegypti* (L.), The yellow fever mosquito - its life history, bionomics and structure. *Cambridge University Press*. London. 739p.
- Chua, K.B., Chua, I.L., Chua, I.E., Chua, K.H. (2004) Differential preferences of oviposition by *Aedes* mosquitos in man- made containers under field conditions. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. V. 35, p. 599-607.
- Chui, V.W.D., Wong, K.W., Tsoi, K.W. (1995) Control of mosquito larvar (Diptera: Culicidae) using Bti and teflubenzuron: laboratory evaluation and semi-field test. *Environ Int*. V. 21, p. 433-440.
- Clark, T.B., Kellen, W.R., Fukuda, T., Lindegren (1968) Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to tree genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 11, p. 1-7.
- Clements, A.N. (2000) The biology of Mosquitoes, Development, Nutrition and Reproduction. London: CABI Publishing.
- Clements, A.N., (1996) The of biology mosquitoes: Development, nutrition and reproduction. London: Chapman e Hall.
- Codeço, C.T., Lima, A.W.S., Araújo, S.C., Lima, J.B.P., Maciel de Freitas, R., Honório, N.A., Galardo, A.K.R., Braga, I.A., Coelho, G.E., Valle, D. (2015) Surveillance of *Aedes aegypti*: Comparison of House Index with Four Alternative Traps. *PLoS Negl Trop Dis*. DOI:10.1371/journal.pntd.0003475.
- Coelho, G.E. (2008) Dengue: desafios atuais. *Epidemiol Serv Saude*. V. 17, p. 231-3.

- Consoli, R.A.G.B., Lourenço de Oliveira, R. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Fiocruz*, Reimpressão. 225p.
- Consoli, R.A.G.B., Lourenço de Oliveira, R. (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro. *Fiocruz*. 228p.
- Cooper, R.D., Frances, S.P., Popat, S., Waterson, D.G.E. (2004) The effectiveness of light, 1-octen-3-ol, and carbon dioxide as attractants for anopheline mosquitoes in Madang Province, Papua New Guinea. *Journal of the American Mosquito Control Association*. V. 20, p. 239- 242.
- Cordeiro, M.T. (2008) Evolução da Dengue no estado de Pernambuco, 1987-2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes. *Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães*. Fundação Oswaldo Cruz. 226p.
- Costa, J.R.V., Rossi, J.R., Marucci, S.C., Alves, E.C., Volpe, H.X.L., Ferraud, A.S., Lemos, M.V.F., Desiderio, J.A. (2010) Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. V. 39, p. 757-766.
- Costa, F.S., Silva, J.J., Souza, C.M., Mendes, J. (2008) Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 41, p.309-312.
- D'amato, C., Torres, J.P.M., Malm, O. (2002) DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental, uma revisão. *Quím. Nova*. São Paulo. V. 25, p. 995-1002.
- Daoust, R.A., Roberts, D.W. (1982) Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larva. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 40, p. 107-117.
- Darbro, J.M., Robert, I.G., Brian, H.K., Peter, A.R., Matthew, B.T. (2011) Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Science and Technology*. V. 21, p.1027-1047.
- Das, S., Dimopoulos, G. (2008). Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMC Physiol*. V. 16, p. 8-23.
- Davis, E.E., Bowen, M.F. (1994) Sensory physiological basis for attraction in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. V.10, p. 316-325.
- Debach, P., Rosen, D. (1991) Biological control by natural enemies. Cambridge University Press. 2 ed. 456p.
- Degener, C.M., Roque, R.A., Eiras, A.E., Àzara, T.M. F., Rösner, S., Codeço, C.T., Nobre, A.A., Rocha, E.S.O., Kroon, E.G., Ohly, J.J., Geier, M. (2014) Evaluation of the effectiveness of mass trapping with BG-Sentinel traps for dengue vector control: a cluster randomized controlled trial in Manaus, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. V. 51, p. 408-420.

- De Melo, D.R, Reis, R.C, Bittencourt, V.R. (2006) In vitro pathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the tick *Boophilus microplus* (Canestrini 1887). *Rev Bras Parasitol Vet.* V. 15, p. 157-162.
- De Souza, M.T., Lima, M.I., Silva Werneck, J.O., Dias, J.C.S.; Ribeiro, B.M. (1999) Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. *Biocell.* V. 23, p. 43-49.
- Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina (2018). Manual Vigilância e Controle do *Aedes aegypti*. Disponível: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/DengueManual-Visualizacao.pdf>
- Driver, F., Milner, R.J., Trueman, W.H.A. (2000) A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. *Mycological Research.* V. 104, p. 135–151.
- Donatti, J.E., Gomes A.C. (2007) Adultrap: Descrição de armadilha para adulto de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia.* V. 51, p. 255-256.
- Donalisio, R.M., Freitas, R.R.A. (2015) Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* V.18, p. 283-285.
- Du, Y., Millar, J.G. (1999) Eletroantennogram and oviposition bioassay responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) to chemicals in odors from bermuda grass infusions. *Journal of Medical Entomology.* V. 36, p. 158-166.
- Dutra, H.L., Santos, L.M., Caragata, E.P., Silva, J.B., Villela, D.A., Maciel de Freitas, R. (2015) From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis.* V. 9 : e0003689.
- Eiras, A.E. (2002) Armadilha para a captura de insetos. Depósito de patente no Brasil: PI0203907-9.
- Eiras, A.E., Geier, M. (2002) Composition for attracting blood sucking arthropods. USA. Patente N.º 60/ 386,582.
- Eiras, A.E., Jepson, P.C. (1991) Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bulletin of Entomological Research,* V.. 81, p. 151-160.
- Eiras, A.E., Mafra-Neto, A. (2001) Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. In: Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C. *Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas.* Ribeirão Preto: Holos. p. 99-112.



- Eiras, A.E., Resende, M.C. (2009) Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro*. V. 1, p. 45-58.
- El-Badry, A.A., Al-Ali, K.H. (2010) Prevalence and seasonal distribution of dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Al-Madinah Al-Munawwarah, Saudi Arabia. *Journal of Entomology*. V. 7, p. 80-88.
- Espindola, C.B., Guedes, R.N., Souza, R.C.P. (2008) Avaliação da eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de formas imaturas do *Aedes (stegomyia) aegypti* (linnaeus, 1762) em ambiente de laboratório. *Entomo Brasilis*. V. 1, p. 10-13.
- Estrada, J.G., Mulla, M.S., (1986) Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc*. V. 2, p. 57-60.
- Fargues, J., Luz, C. (1998) Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Bio Science Tecnol*. V. 8, p. 323-334.
- Fargues, J., Luz, C. (2000) Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol*. V. 75, p. 202-211.
- Farnesi, L.C., Menna Barreto, R.F.S., Martins, A.J., Valle, D., Resende, G.L. (2015) Physical Features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasales* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *Journal of Insect Physiology*. V. 83, p. 43-52.
- Farenhorst, M., Farina, D., Scholte, E.J., Takken, W., Hunt, R.H., Coetzen, M., Knols, B.G.J. (2008) African Water Storage Pots for the Delivery of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* to the Malaria Vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. V. 78, p. 910–916.
- Fávaro, E.A., Mondini, A., Dibo, M.R., Barbosa, A.A.C., Eiras, A.E. (2008) Assessment of entomological indicators of *Aedes aegypti* (L.) from adult and egg collections in São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol*. V. 33, p. 8-16.
- Fávaro, E.A., Dibo, M.R., Mondini, A., Ferreira, A.C., Barbosa, A.A.C., Eiras, A.E., Barata, E.A.M.F., Chiaravalloti Neto, F. (2006) Physiological state of *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs™ in Mirrasol, São Paulo, Brazil. *J. Vector Ecol*. V. 31, p. 285-291.
- Fay, R.W, Perry, A.S. (1965) Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*. V. 25, p. 276-281.
- Faye, O., Dupressoir, A., Weidmann, M., Ndiaye, M., Alpha Sall, A. (2008) One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virology*. V. 43, p. 96-101.

- Felix, G.E., Barrera, R., Vazquez, J., Ryff, K.R., Munoz Jordan, J.L., Matias, K.Y., Hemme, R.R. (2018) Entomological Investigation of *Aedes aegypti* In Neighborhoods With Confirmed Human Arbovirus Infection In Puerto Rico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. V. 34, p. 233-236.
- Ferguson, N.M., Rodriguez Barraquer, I., Dorigatti, I., Mier Y Tteranromero, L., Laydon, D.J., Cummings, D.A.T. (2016) Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science*. V. 353, p. 1033-1036.
- Fernandes, P.M., Alves, S.B (1991) Controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) Isoptera: (Termitidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em condições de campo. *An Soc Entomol Brasil*. V. 20, p. 45-49.
- Ferron, P. (1981) Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burgess HD, editor. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. London. *Academic Press*. V. 24, p. 465-482.
- Figueiredo, L.T.M., Fonseca, B.A.L. (1966) Dengue. In: Veronesi, R., Focacia, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu.
- Fiuzza, L.M. (2004) Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*. V. 32, p. 84-89.
- Forattini, O.P.(2002) Culicidologia médica. São Paulo: *Edusp*. V.2, 864 p.
- Forattini, O.P. (1962) Entomologia médica. São Paulo: *Edusp*, V. 1.
- Fortuna, C., Toma, L., Remoli, M.E., Amendola, A., Severini, F., Boccolini, D., Romi, R., Venturi, G., Rezza, G., Di Luca, M. (2018). Vector competence of *Aedes albopictus* for the Indian Ocean lineage (IOL) chikungunya viruses of the 2007 and 2017 outbreaks in Italy: a comparison between strains with and without the E1:A226V mutation. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles. European communicable disease bulletin*. V. 23, 1800246.
- Franceschini, M., Guimarães, A.P., Camassola, M., Frazzon, A.P., Baratto, C.M., Kogler, V., Silva, M.V., Dutra, V., Nakazato, L., Castro, L., Santi, L., Vainstein, M.H., Schrank, A. (2001) *Biotechnology aplicada ao controle biológico. Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*. V. 23, p. 32-37.
- FUNASA: Fundação Nacional de Saúde (2002). Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília. Ministério da Saúde.
- Gadelha, D.P., Toda, A.T. (1985) Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Malariologia de Doença Tropical*. V. 37, p. 29-36.
- Gama, R.A., Silva, E.M., Silva, I.M., Resende, M.C., Eiras, A.E. (2007) Evaluation of the sticky MosquiTRAP<sup>®</sup> for detecting *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) (Diptera:Culicidae) in the dry season in the district of Itapõa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Neotrop. Entomol*. V. 36, p.294-302.

- Garcez, P.P., Loiola, E.C., Costa, R.M., Higa, L.M., Trindade, P., Delvecchio, R. Nascimento, J.M., Brindeiro, R., Tanuri, A., Rehen, S.K. (2016) Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Revista Science*. Disponível:<http://science.sciencemag.org/content/early/2016/04/08/science.aaf6116.full>
- García Munguía, A.M., Hernández, J.A.G., Tellez, E.A.R., Pérez, M.A.R., Filiberto Reyes-Villanueva, F.R. (2011) Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*. V. 4, P. 24.
- Geier, M., Bosch, O.J., Boeckh, J. (1999) Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chem Senses*. V. 24, p. 647–653.
- Gentile, C., Rivas, G.B.S., Lima, J.B., Bruno, R.V., Peixoto, A.A. (2013) Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. V. 108, p. 80-87.
- George, J., Blanford, S., Thomas, M.D., Baker, T.C. (2014) Malaria mosquitoes host-locate and feed upon caterpillars. *Plos One*. V. 9, 108894.
- George, J., Jenkins, N.E., Blanford, S., Thomas, M.B., Baker, T.C. (2013). Malaria Mosquitoes Attracted by Fatal Fungus. *Plos One*. V. 8, p. 626-32.
- Gibbons, R.V., Vaughn, D.W. (2002) Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal*. V. 324, p.1593-1596.
- Glare, T.R., O'Callaghan, M. (2000) *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester. *John Wiley and Sons*. P. 350.
- Goettel, M.S., Inglis, G.D. (1997) Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA editor. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. V. 5, p. 213–248.
- 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*. V. 8, p.1–8.
- Gomes, A.C., Silva, N.N., Bernal, R.T.I. (2008) Estimacão da infestaco predial por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) por meio da armadilha Adultrap. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. V. 17, p. 293-300.
- Gomes, A.S., Sciavico, C.J., Eiras, A.E. (2006) Periodicidade de oviposico de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Rev. Soc. Bras.Med. Trop*. V. 39, p. 327-332.
- Gomes, A.C. (2002) Vigilância Entomológica. *Informe Epidemiológico do Sistema nico de Saúde*. V. 11, p.79-90.
- Gomes, A.C. (1998) Medidas dos níveis de infestaco urbana para *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* *Aedes* (Stegomyia) albopictus em programas de Vigilância Entomológica. *Informe Epidemiológico do Sistema nico de Saúde*. V. 7, p. 49-57.

- Gould, E.A., Gallian, P., De Lamballerie, X., Charrel, R.N. (2010) First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clinical Microbiology and Infection*. V. 16, p. 1702-1704.
- Grácio, A., (2008) Família Culicidae, subfamílias Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. *Instituto de Higiene e Medicina Tropical*. P. 22.
- Greenberg, J.A, Dimenna, M.A, Hanelt, B., Hofkin B.V.(2012) Analysis of post-blood meal flight distances in mosquitoes utilizing zoo animal blood meals. *Journal Vectors Ecology*. V.37, p.83–89.
- Guia de Vigilância em Saúde (2017). Ministério da Saúde: 2ª edição. V. único. Brasília. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017>
- Gubler, D.J. (1997) Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. CAB International, London, United Kingdom. *In* D. J. Gubler, and G. Kuno, Dengue and dengue hemorrhagic fever. P. 1-22.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy P., Farrar, J., Gubler, D.J. (2010) Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. Suppl 12:S7-16.
- Halstead, S.B. (2008) Dengue Virus–Mosquito Interactions. *Annu. Rev. Entomol*. V. 53, p. 273–291.
- Harrington, L.C., Ponlawat, A., Edman, J.D., Scott, T.W., Vermeylen, F. (2008) Influence of container size, location, and time of day on oviposition patterns of the dengue vector, *Aedes aegypti*, in Thailand. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. V. 8, p. 415–423.
- Harrington, L.C., Edman, J.D., Scott, T.W. (2001) Why do females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J. Med. Entomol*. V. 38, p. 411-422.
- Harris, A.F., McKemey, A.R., Nimmo, D., Curtis Z, Black, I., Morgan, S.A., (2012) Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol*. V. 30, p. 828-30.
- Hecht, O., Hernandez Corzo, J. (1963) On the visual orientation of mosquitoes in their search of resting places. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. V. 6, p. 63–74.
- Hemingway, J., Ranson, H. (2005) Chemical Control of Vectors and Mechanisms of Resistance. In: Marquardt, W. C. (Ed.). *Biology of Disease Vectors*. Fort Collins: Elsevier, cap.41.
- Hernández, J.A.G., Pérez, M.A.R., Salazar, M.I., Russell, T.L., Adeleke, M.A., Santillana, E.J.L., Villanueva, F.R. (2013) Vectorial Capacity of *Aedes aegypti* for Dengue Virus type 2 is Reduced with Co-infection of *Metarhizium anisopliae*. *PLoS Negl Trop Dis*. V. 7. doi:10.1371/journal.pntd.0002013.

- Hogsette, J.A. (1999) Management of ectoparasites with biological control. *International Journal for Parasitology*. V. 29, p. 147-151.
- Honório, N.A.C.T., Codeco, F.C., Alves, M., Magalhães, R., Lourenco-de-Oliveira, (2009) Temporal distribution of *Aedes aegypti* in different districts of Rio de Janeiro, Brazil, measured by two types of traps. *Journal Medicine Entomology*. V. 46, p. 1001-1014.
- Honório, N.A., Lourenço de Oliveira, R. (2001) Frequencia de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. V. 35, p.385-391.
- Howard, A.F.V., N'guessan, R., Koenraadt, C.J.M., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbéto, M., Thomas, M.B., Knols, B.G.J., Takken, W. (2010) The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors*. V. 3, p. 87-98.
- Imad Silva, L.E. (2015) Novo método de controle do mosquito *Aedes aegypti* utilizando uma armadilha com pano preto impregnado com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* associado a um atraente sintético. Dissertação de Mestrado em Entomologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - Campos dos Goytacazes – RJ.
- Ioos, S., Mallet, H.P., Leparç Goffart, I., Gauthier, V., Cardoso, T., Herida, M. (2014) Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*. V. 44, p.302–307.
- Irish, S.R., Batengana, B.M., Eiras, A.E., Cameron, M.M. (2015) Evaluation of the AtrAedes™ Lure for Collection of *Culex quinquefasciatus* in Gravid Traps. *J Am Mosq Cont Assoc*. V. 31, p. 107-9.
- Johansen, I.C. (2014) Urbanização e saúde da população: o caso da dengue em Caraguatatuba (SP). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Demografia. Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, UNICAMP. Campinas-SP.
- Kay, B.H., Sutton, K.A., Russell, B.M. (2000) A sticky entry-exit trap for sampling mosquitoes in subterranean habitats. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* V. 16, p. 262-265.
- Kearney, M., Porter, W.P., Williams, C., Ritchie, S., Hoffmann, A.A. (2009) Integrating biophysical models and evolutionary theory to predict climatic impacts on species ranges: the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Australia. *Functional Ecology*. V. 23, p. 528-538.
- Kline, D.L., Lemire, G.F. (1998) Evaluation of attractant-baited traps/targets for mosquito management on Key Island, Florida, USA. *J Vector Ecol*. V. 23, p. 171–185.
- Klowden, M.J., Briegel, H. (1994) Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Díptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. V. 31, p. 618-22.

- Knols, B.G.J., Thomas, M.B. (2006) Fungal entomopathogens for adult mosquito control - A look at the prospects. *Outlooks on Pest Management*. V. 17, p. 257-259.
- Koekemoer, L.L., Spillings, B.L., Christian, R.N., Lo, T.C., Kaiser, M.L., Norton, R. A., Oliver, S.V., Choi, K.S., Brooke, B.D., Hunt, R.H. (2011) Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from pointe Noire, Republic of the Congo. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. V. 11, p. 1193–1200.
- Kröckel, U., Rose, A., Eiras, A.E., Geier, M. (2006) New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* V. 22, p. 229-238.
- Kucharz, E.J., Cebula Byrska, I. (2012) Chikungunya fever. *Eur J Intern Med*. V. 23, p. 325-9.
- Lacey, L.A. (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* V. 23, p. 133–163.
- Lacey, C.M., Lacey, L.A., Roberts, D.R. (1987) Route of invasion and histopathology of *Metharizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 52, p. 108-118.
- Lazzarini, G.M.J., Rocha, L.F.N., Luz, C. (2006) Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycol Res*. V. 110, p. 485-492.
- Leathers, T.D., Subhash, C.G., Alexander, N.J. (1993) Mycopesticides: status, challengers and potencial. *Journal of Microbiology*. V. 12, p. 69-75.
- Lenhart, A.E., Walle, M., Cedillo, H., Kroeger, A. (2005) Building a better ovitrap for detecting *Aedes aegypti* oviposition. *Acta Tropica*. V. 96, p. 56-59.
- Lenteren, J.C., Godfray, H.C.J. (2004). European science in the Enlightenment and the discovery of the insect parasitoid life cycle in The Netherlands and Great Britain. *Biological Control*. V. 32, p. 12-24.
- Lima, E.P., Paiva, M.H., De Araujo, A.P., Silva, E.V., Silva, U.M., Oliveira, L.N., Santana, A.E., Barbosa, C.N., Paiva, Natto, C.C., Goulart, M.O. (2011) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara Brazil. *Parasites & Vectors*. V. 4, p. 2-12.
- Lima, M.M., Amaral, R.S., Aragão, M.B. (1989) Estudo comparativo da eficácia de armadilhas para *Aedes aegypti*. *Caderno de Saúde Pública*. RJ. V. 5, p. 143 - 150.
- Linha Guia de Atenção à Saúde (2009) Belo Horizonte, 1ª edição.

- Liu, Y., Zhang, H., Qiao, C., Lu, X., Cui, F. (2011) Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipens* complex from China. *Parasites & Vectors*. V. 4, p. 2-7.
- Luna, J.E.D., Martins, M.F., Anjos, A., Kuwabara, E.F., Navarro Silva, M.A. (2004) Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista Saúde Pública*. V. 38, p. 842-843.
- Luz, K.G., Santos, G.I.V., Vieira, R.M. (2015) Febre pelo vírus Zika. *Epidemiol. Serv. Saúde*. Brasília. V. 24, p. 785-788.
- Luz, C., Tai, M.H.H., Santos, A.H., Silva, H.H.G. (2008) Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. V. 103, p. 214-215.
- Luz, C., Tai, M.H.H., Santos, A.H., Rocha, L.F.M., Albernaz, D.A.Z., Silva, H.H.G (2007) Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*. V. 44, p. 799-804.
- Lwetoijera, D.W., Sumaye, R.D., Madumla, E.P., Kavishe, D.R., Mnyone, L.L., Russell, T.L., Okumu, F.O. (2010). An extra-domiciliary method of delivering entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* IP 46 for controlling adult populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*. *Parasites & Vectors*. V. 3, p. 2-6.
- Mabaso, M.L., Sharp, B., Lingeler, C. (2004) *Tropical Medicine Health*. 846p.
- Marcondes, C.B. (2001) *Entomologia médica*. Rio de Janeiro, Atheneu, 432p.
- Marques, C.C.A., Marques, G.R.A.M.M., Brito, M., Neto L.G.S., Ishobashi, V.C., Gomes, F.A. (1993) Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. *Revista de Saúde Pública*. V. 27, p. 237-41.
- Martines, R.B., Bhatnagar, J., Keating, M.K., Silva Flannery, L., Muehlenbachs, A., Gary, J., Goldsmith, C., Hale, G., Ritter, J., Rollin, D., Shieh, W.-J., Luz, K.G., de Oliveira Ramos, A.M., Davi, H.P.F., de Oliveria, W.K., Lanciotti, R., Lambert, A., Zaki, (2016) Evidence of zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses — Brazil, 2015. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. V. 65, p. 159-160.
- Martins, F., Silva, I.G. (2004) Avaliação da atividade inibidora do Diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Rio de Janeiro. V. 37, p. 135-138.
- Matowo, N.S., Koekemoer, L.L., Moore, S.J., Mmbando, A.S., Salum, A., Mapua, S.A., Coetzee, M., Okumu, F.O. (2016) Combining Synthetic Human Odours and Low-Cost Electrocuting Grids to Attract and Kill Outdoor-Biting Mosquitoes: Field and Semi-Field Evaluation of an Improved Mosquito Landing Box. *Plos One*. V. 11, e0145653 pmid:26789733.

- Mboera, L.E.G., Takken, W., Mdira, K.Y., Pickett, J.A. (2000) Sampling gravid *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Tanzania with traps baited with synthetic oviposition pheromone and grass infusions. *Journal of Medical Entomology*. V. 37, p. 172-176.
- Mboera, L.E.G., Mdira, K.Y., Salum, F.M., Takken, W., Pickett, J.A. (1999) Influence of synthetic oviposition pheromone and volatiles from soakage pits and grass infusions upon oviposition site-selection of *Culex* mosquitoes in Tanzania. *Journal of Chemical Ecology*. Muheza. V. 25, p. 1855-1865.
- McCall, P.J., Cameron, M.M. (1995) Oviposition pheromones in insect vectors. *Parasitology Today*. V. 11, p. 352-355.
- McLean, B.J., Dainty, K.R., Flores, H.A., O'Neill, S.L. (2018) Differential suppression of persistent insect specific viruses in trans-infected wMel and wMelPop-CLA *Aedes*-derived mosquito lines. *Journal of Virology*. V. 527, p. 141-145.
- Mdeffo-Mbah, M.L., Durham, D.P., Skrip, L., Nsoesie, E.O., John, S., Brownstein, D.F., Galvani, A.P. (2016) Evaluating the effectiveness of localized control strategies to curtail chikungunya. *Scientific Reports*. V. 6, p. 1-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep23997>.
- Meeraus, W.H., Armistead J.S., Arias, J.R. (2008) Field comparison of novel and gold standard traps for collecting *Aedes albopictus* in Northern Virginia. *J Am Mosq Control Assoc*. V. 24, p. 244-248.
- Meireles Filho, A.C., Rivas, G.B.S., Gesto, J.S., Machado, R.C., Britto C, de Souza, N.A., Peixoto, A.A. (2006) The biological clock of an hematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression. and downregulation after a blood meal. *FEBS Lett*. V. 580, p. 2-8.
- Melo, A.L.A., Soccol, C.R., Thomaz Soccol, V., Nogueira, M.Jr.S. (2009) Evaluation of *Bacillus sphaericus* bioinsecticide produced with white soybean meal as culture medium for the control of *Culex quinquefasciatus*. *Cad. Saúde Pública*. V. 25.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L. (2003) Chitin metabolismo in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*. Cambridge. V. 206, p.4393-4412.
- Ministério da Saúde (2019a) Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2018/2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/informe-FA-n.3-21jan19.pdf>
- Ministério da Saúde (2019b) Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Boletim Epidemiológico 4. V. 50, janeiro de 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>



- Ministério da Saúde (2018a) Ministério da Saúde divulga balanço de um ano da febre amarela. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/44483-ministerio-da-saude-divulga-balanco-de-um-ano-da-febre-amarela>
- Ministério da Saúde (2018b) Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018. Boletim Epidemiológico 54. V. 49, dezembro de 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/14/2018-061.pdf> Acessado em: 05/02/2019.
- Ministério da Saúde (2017) Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Chikungunya: manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/publicacoes/chikungunya\\_manejo\\_clinico\\_1ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico_1ed.pdf)
- Ministério da Saúde (2016a) Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49. Boletim Epidemiológico 38. V. 47. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf> Acessado em: 01/02/2019.
- Ministério da Saúde (2016b) Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 3. Boletim Epidemiológico 06. V. 47. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/04/2016-004---Dengue-SE3.pdf> Acesado em: 29/08/2019.
- Ministério da Saúde (2013) Secretaria de Vigilância em Saúde. Levantamento rápido de índices de *Aedes aegypti*-LIRAA- Para Vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil. Brasília. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/levantamento\\_rapido\\_indices\\_aedes\\_aegypti.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/levantamento_rapido_indices_aedes_aegypti.pdf)
- Ministério da Saúde (2010) Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes\\_epidemias\\_dengue](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_epidemias_dengue)
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Rus, K.R., Vipotnik, T.V., Vodusek, V.F., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., Županc, T.A. (2016) Zika Virus Associated with Microcephaly. *The new england journal of medicine*. V. 374, p. 951-958.
- Mmbando, A.S., Okumu, F.O., Mgando, J.P., Sumaye, R.D., Matowo, N.S., Madumla, E., Kaindoa, E., Samson, S., Kiware, S.S., Lwetoijera, D.W. (2015) Effects of a new outdoor mosquito control device, the mosquito landing box, on densities and survival of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, inside controlled semi-field settings. *Journal Malaria Open Access*. V. 14, p. 494.
- Mnyone, L.L., Lyimo, I.N., Lwetoijera, D.W., Mpingwa, M.W., Nchimbi, N., Hancock, P.A., Russell, T.L., Kirby, M.J., Takken, W., Koenraadt, C.J.M.

(2012) Exploiting the behavior of wild malaria vectors to achieve high infection with fungal biocontrol agents. *Malaria Journal*. V. 11, p. 87.

- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Mpingwa, M.W., Lwetoijera, D.W., Knols, B.G.J., Takken, W., Koenraad, C.J.M., Russell, T.L. (2011) Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Veterinary Parasitology*. V. 108, p. 317-322.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Lwetoijera, D.W., Mpingwa, M.W., Simfukwe, E.T., Knols, B.G.J., Takken, W., Russell, T.L. (2010) Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence. *Malaria Journal*. V. 9, p. 2-46.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Lwetoijera, D.W., Mpingwa, M.W., Knols, B.G., Takken, W., Russell, T.L. (2009) Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*. V. 8, p. 309.
- Monnerat, R.G., Bravo, A. (2000) Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP. *Embrapa Meio Ambiente*. Vol. 3, p.163-200.
- Moraes, A.P.R., Bittencourt, V.R.E.P., Bittencourt, A.J. (2010) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* on immature stages of *Stomoxys calcitrans*. *Ciência Rural*. Santa Maria. V. 40, p. 1802-1807.
- Mulla, M.S. (1995) The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, Fresno. V.11, p. 269-273.
- Murrel, E.G., Juliano, S.A. (2008) Detritus type alters the outcome of interspecific competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. V. 45, p.375-383.
- Mweresa, C.K., Omusula, P., Otieno, B., Van Loon, J.J., Takken, W., Mukabana, W.R. (2014) Molasses as a source of carbon dioxide for the malaria mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Malaria Journal*. V. 13, p.160.
- Nasci, R.S. (2014) Movement of Chikungunya virus into the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis*. V. 20, p.1394-5.
- Navarro Silva, M.A., Marques, F.A., Duque, L., Jonny, E. (2009) Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. *Revista Brasileira de Entomologia*. V. 53, p. 1-6.
- Nelson, J.M., (1986) *Aedes aegypti*: Biologia y Ecologia. *Organizacion Panamericana de la Salud*. Washington, DC.

- Neto, A.L.R., Oliveira, C.M. (1985) Controle biológico de culicídeos e simúlideos inseticidas bacterianos. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. V. 37, p. 67-75.
- Neves, D.P. (2005) *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu. 494p.
- Nunes, M.R.T., Faria, N.R., Vasconcelos, J.M., Golding, N., Kraemer, M.U.G., Oliveira, L.F. (2015) Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*. V. 13, p.102.
- Nunes, L.S., Trindade, R.B.R., Souto, R.N.P. (2011) Avaliação da atratividade de ovitrampas a *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linneus (Diptera: Culicidae) no bairro Hospitalidade, Santana, Amapá. *Biota Amazônia*. V. 1, p. 26-31.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H.P., Musso, D., Ghawche, F. (2014) Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report, French Polynesia. *Euro Surveillance*. V.19, p. 1-3.
- Okumu, F.O., Killeen, G.F., Ogoma, S., Biswaro, L., Smallegange, R.C., Mbeyela, E., Titus, E., Munk, C., Ngonyani, H., Takken, W., Mshinda, H., Mukabana, W.R., Moore, S.J. (2010a) Development and Field Evaluation of a Synthetic Mosquito Lure That Is More Attractive than Humans. *PLoS ONE*. V. 5.
- Okumu, F.O., Madumla, E.P, John, A.N., Lwetoijera, D.W, Sumaye, R.D. (2010b) Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations - The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasites and vectors*. V. 3, p. 12.
- Oliveira Melo, A.S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P.O., Alves Sampaio, S., A.M., Bispo de Filippis, A.M. (2016) Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol*. V. 47, p. 6-7.
- Organização Pan-Americana de Saúde: Dados da dengue no Brasil, (2013). Disponível em:[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3159&Itemid=1](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1)
- Osanaí, C.H., Travassos da Rosa, A.P.A., Amaral, S., Passos, A.C.D., Tauil, P.L. (1983) Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. São Paulo. V. 1, p. 53- 54.
- Passos, R.A., Marques, G.R.A.M., Voltolini, J.C., Condino, M.L.F. (2003) Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral sudeste do Brasil. *Revista Saúde Pública*. V. 37, p. 729-734.
- Paula, A.R., Ribeiro, A., Lemos, F.J.A., Silva, C.P., 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*. V. 12, p. 163.

- Paula, A.R., Ribeiro, A., Imad Silva, L.E., Samuels, R.I. (2017) Monitoramento de *Aedes* e ações educacionais integrando a comunidade de São João da Barra-RJ. *Revista de extensão UENF*. V. 3, p. 17-25.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2013a) Efficiency of fungus-impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Lerrers in Apllied Microbiology*. V. 57, p.1-7.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2013b) Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. *Parasites and vectors*. V. 6, p. 256.
- Paula, A.R., Ribeiro, A., Morais, C.O.P., Dias, R.S.B., Gomes, C.R.P., Samuels, R.I. (2013c) Utilização de grãos de arroz com *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti* em condição de semicampo. *Encontro Latino Americano de Iniciação Científica - INIC*.
- Paula, A.R., Carolino, A.T, Paula, C.O., Samuels, R.I. (2011a) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *A. aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*. V. 4, p. 8.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2011b) Susceptibility of adult females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites & Vectors*. V. 4, p. 2-7.
- Paula, A.R., Brito, E.S., Pereira, C.R., Carrera. M.P., Samuels, R.I (2008) Susceptibility of adult *A. aegypti* (Díptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*. V. 18, p. 1017-1025.
- Pedroso, E.R.P., Rocha, M.O.C. (2009) Infecções emergentes e reemergentes. *Revista de Medicina*. Minas Gerais. V.19, p.140-150.
- Pereira, C.R., Paula, A.R., Gomes, S.A., Pedra Jr, P.C.O, Samuels, R.I. (2009) The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) laval. *Biocontrol Science and Technology*. V. 19, p. 1-6.
- Pinheiro, F.P, Travassos Da Rosa, J.F.S. (1996) Febres hemorrágicas viróticas. Febre hemorrágica da dengue. *Tratado de infectologia*. P. 258-263.
- Polanczyk, R.A., Garcia, M.O., Alvez, S.B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*. V. 6, p. 813-816.
- Ponlanwat, A., Harrington, L.C. (2005) Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of Medical Entomology*. V. 42, p. 844-849.

- Pontes, R.J.S., Ruffino, N.A. (1994) Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Revista Saúde Pública*. V. 28, p. 218-27.
- Powers, A.M, Logue, C.H. (2007) Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*. V. 88, p. 2363-2377.
- Qi, R., Zhang, L., Chi, C. (2008) Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin*. V. 40, p. 91-101.
- Qiu, Y.T., Smallegance, R.C., Hoppe, S., Vanloon, J.J.A., Bakker, E.J., Takken, W. (2004) Behavioural and electrophysiological responses of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* Giles sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human skin emanations. *Med Vet Entomol*. V. 18, p. 429-438.
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., Black, W.C. (2010) Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA. net*. V. 1, p. 1 – 12.
- Rawlins, S.C., Martinez, R., Wiltshire, R., Legall, G. (1998) Comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. *Journal of the American Mosquito Control Association*. V. 14, p. 131-136.
- Regis, L., Silva Filha, M.H., Nielsen LeRoux, C., Charles, J.F. (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol*. V. 17, p. 377-80.
- Reiskind, M.H., Lounibos, L.P. (2009) Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*. V. 23, p. 62–68.
- Reiter, P. (2007) Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of controls strategies. *Vector Borne Zoonotic Dis*. V. 7, p. 261-273.
- Reiter, P., Jakob, W.L., Francy, D.B., Mullenix, J.B. (1986) Evaluation of the CDC-GT for the surveillance of St. Louis encephalitis vectors in Memphis, Tennessee. *Journal of the American Mosquito Control Association*. V. 2, p. 209-211.
- Ritchie, S.A., Ropley, L.P., Benjamin, S. (2010) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) Provides Residual Control of *Aedes aegypti* in Small Containers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. V. 82, p. 1053-1059.
- Ritchie, S.A., Long, S., Smith, G., Pyke, A., Knox, T.B. (2004) Entomological investigations in a focus of dengue transmission in Cairns, Queensland, Australia, by using the sticky ovitraps. *J. Med Entomol*. V. 41, p. 1-4.
- Ritchie, S.A., Long, S., Hart, A., Webb, C.E. , Russell, R.C. (2003) An adulticidal sticky ovitrap for sampling container-breeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc*. V. 19, p. 235-242.

- Rivas, G.B.S., Teles de Freitas, R., Pavan, M.G., Lima, J.B.P., Peixoto, A.A., Bruno, R.V. (2018) Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. *Journal of Biological Rhythms*. V. 33, p. 272-288.
- Roberts, D.M. (2001) Egg hatching of mosquitoes *Aedes caspius* e *Ae.vittatus* stimulated by water vibrations. *Medical and Veterinary Entomology*. V.15, p. 215-8.
- Romaña, C.A., Fargues, J. (1992) Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. V. 87, p. 363-368.
- Roque, R.A., Eiras, A.E. (2008) Calibration and Evaluation of Field Cage for Oviposition Study with *Aedes (Stegomyia) aegypti* Female (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. V. 37, p. 478-485.
- Roy, H.E, Steinkraus, D.C, Eilenberg, J., Hajek, A.E, Pell, J.K. (2006) Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu Rev Entomol*. V. 51, p. 331-357.
- Rozendaal, J.A. (1997) Vector control – methods for use by individual and communities. *World Health Organization*. Geneva. 413p.
- Rund, S.S., Gentile, J.E., Duffield, G.E. (2013) Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*. V. 14, p. 218.
- Rund, S.S., Hou, T.Y., Ward, S.M., Collins, F.H., Duffield, G.E. (2011) Genomewide profiling of diel and circadian gene expression in the malária vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 108, p. 421-430.
- Russel, B.M., Kay, B.H., Shipton, W. (2001) Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs in surface on subterranean breeding sites during the northern Queensland dry season. *J Med Entomol*. V. 38, p. 441-425.
- Samuels, R.I., Paula, A.R., Carolino, A.T., Gomes, S.A., Morais, C.O.P., Cypriano, M.B.C., Imad Silva, L.E., 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*. V. 6, p. 25-31.
- Sant 'Ana, A.L., Roque, R.A., Eiras, A.E. (2006) Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes (Stegomyia)* (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol*. V. 43, p. 214-220.
- Sant'Ana, A.L. (2003) Avaliação, extração, identificação e estudos eletrofisiológicos dos voláteis presentes em infusões de *Panicum maximum* que estimulam e/ou atraem fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) para oviposição. D. Sc. thesis. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 103p.

- Santos, E.M., Melo-Santos, M.A., Oliveira, C.M., Correia, J.C., Albuquerque, C.M. (2012) Evaluation of a sticky trap (*AedesTraP*), made from disposable plastic bottles, as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations. *Parasites & Vectors*. V. 5, p. 195.
- Santos, A.H., Tai, M.H., Rocha, L.F.N., Silva, H.H.G., Luz, C. (2009) Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *A. aegypti*. *Biol Control*. V. 50, p. 37–42.
- Schmaedick, M.A., Ball, T.S., Burkot, T.R., Gurr, N.E. (2008) Evaluation of three traps for sampling *Aedes polynesiensis* and other mosquito species in American Samoa. *J Am Mosq Control Assoc*. V. 24, p. 319-322.
- Scholte, E.J., Takken, W., Knols, B.G.J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Aedes Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. V. 102, p. 151-158.
- Scholte, E., N.G`Habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G.F., Knols, B.G.J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*. V. 308, p. 1641- 642.
- Scholte, E.J., Knols, B.G.J., Samson, R., Takken, W. (2004a) Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*. V. 4, p. 19.
- Scholte, E., Knols, B.G., Takken, W. (2004b) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the Malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*. V. 3, p. 1-6.
- Scholte, E.J., Takken, W., Knols, B.G.J. (2003) Pathogenicity of six east African entomopathogenic fungi to adult *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Proc Exp Appl Entomol NEV*. Amsterdam. V. 14, p. 25-29.
- Scott, T.W., Takken, W. (2012) Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitol*. V. 28, p. 114-121.
- Scott, T.W., Chow, E., Strickman, D., Kittayapong, P., Wirtz, R.A., Lorenz, L.H., Edman, J.D. (1993) Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J. Med. Entomol*. V. 30, p. 922-927.
- Secretaria de Vigilância Sanitária, (2011) Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes\\_dengue\\_controle.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_dengue_controle.pdf)
- Seye, F., Ndione, D., Touré, M., Ndiaye, M., Boukraa, S., Bawin, T. (2013) Laboratory and semi-field environment tests for the control efficacy of *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (suneem) against *Anopheles gambiae* s. l. adult emergence. *Academia Journal of Biotechnology*. V. 1, p. 46-52.
- Siju, K.P., Hill, S.R., Hansson, B.S., Ignell, R. (2010) Influence of blood meal on the responsiveness of olfactory receptor neurons in antennal sensilla trichodea of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. V. 56, p. 659-665.

- Silva, R.O., Silva, H.H.G., Ulhoa, C.J., Luz, C. (2005) Is there a relationship between N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in Central Brazil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae)? *J. Appl. Entomol.* V. 129, p. 158-164.
- Silva, R.O, Silva, H.H.G., Luz, C. (2004) Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil of the central brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Rev. Pat. Trop.* V. 33, p. 207–216.
- Silva, H.H.G., Silva, I.G. (1999) Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop.* V. 32, p. 349-55.
- Siqueira Júnior, J.B., Vinhal, L.C., Carmo Said, R.F., Hoffmann, J.L., Martins, J., Barbiratto, S.B., et al. (2011) Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010 In: Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. Brasília (DF): *Ministério da Saúde*. p. 157-71.
- Slama, K., Romanuk, M., Sorm, F. (1974) *Insect Hormones and Bioanalogues*. Springer Verlag. New York. 259p.
- Snetselaar, J., Andriessen, R., Suer, R.A., Osinga, A.J., Knols, B.G.J., Farenhorst, M. (2014) Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple lifestages of *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors.* V. 7, p. 200.
- Strieder, M.N. (2005) Controle eficiente dos borrachudos. *Ciência Hoje.* V. 36, p. 70-71.
- Swaminathan, S., Khanna, N. (2009) Dengue: recent advances in biology and current status of translational research. *Current Molecular Medicine.* V. 9, p. 152-73.
- Taparia, T., Ignell, R., Hill, S.R. (2017) Blood meal induced regulation of the chemosensory gene repertoire in the southern house mosquito. *BMC Genomics.* V. 18, p. 393.
- Tauil, P.L. (2010) Aspéctos críticos do controle da febre amarela no Brasil. *Revista de Saúde Pública.* V. 44, p. 555-558.
- Tauil, P.L. (2006) Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* V. 39, p. 275-277.
- Tauil, P.L. (2002) Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno de Saúde Pública.* V.18, p. 867-871.
- Tauil, P.L. (2001) Urbanização e ecologia do dengue. *Caderno de Saúde Pública*, (Suplemento). V. 17, p. 99-102.



- Taveira, L.A., Fontes, L.R., Natal, D. (2001) Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto.  
<http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/ssaude/vigilancia/vigep/dengue/vetor-1>
- Terra, M.R., Da Silva, R.S., Pereira, M.G.N., Lima, A.F. (2017) *Aedes aegypti* e as arbovíroses emergentes no Brasil. *Rev. Uningá Review*. V. 30, p. 52-60.
- Thiboutot, M.M., Kannan, S., Kawalekar, O.U., Shedlock, J.V., Khan, A.S., Sarangan, G., Srikanth, P., Weiner, D.B., Muthumani, K. (2010). Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? *PLoS neglected tropical diseases*. V. 4, p. 623.
- Thornton, J.H., Batengana, B.M., Eiras, A.E., Irish, S.R. (2016) Evaluation of collection methods for *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Aedes simpsoni* in northeastern Tanzania. *J Vect Ecol*. V. 41, p. 265-270.
- Tolle, M.A., (2009) Mosquito-borne diseases. Current problems in pediatric and adolescent. *Health care*. V.39, p. 97-140.
- Tseng, M.N., Chung, P.C., Tzean, S.S. (2011) Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 77, p. 4508–4519.
- Turley, A.P., Moreira, L.A., O'Neill, S.L., McGraw, E.A. (2009) *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. Austrália. V. 3, e516.
- Valero Jiménez, C.A., Debets, A.J., Van Kan, J.A., Schoustra, S.E., Takken, W., Zwaan, B.J., Koenraadt, C.J. (2014) Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria Journal*. V.13, p.479.
- Van den Hurk, A.F., Hall Mendelin, S., Pyke, A.T., Frentiu, F.D., McElroy, K. (2012) Impacto da *Wolbachia* na infecção por chikungunya e vírus da febre amarela no mosquito vetor *Aedes aegypti*. *Plos Neglected Tropical Diseases*. V. 6, e1892.
- Vasconcelos, P.F.C. (2015) Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Rev Pan-Amaz Saude*. V.6, p. 9-10. Disponível em: <[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S217662232015000200001&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232015000200001&lng=pt&nrm=iso)>
- Venturi, G., Di Luca, M., Fortuna, C., Remoli, M.E., Riccardo, F., Severini, F., Toma, L., Del Manso, M., Benedetti, E., Caporali, M.G., Amendola, A., Fiorentini, C., Liberato, C., Giammattei, R., Romi, R., Pezzotti, P., Rezza, G., Rizzoet, C. (2017) Detecção de um surto de chikungunya na Itália Central, agosto a setembro de 2017. *Euro Surveill*. V. 22.
- Vicente, A.C., Guedes da Silva, F.H., Dumard, C.H., Ferreira, V.N.S., Costa, I.P.S., Machado, R.A., Barros Aragão, F.G.Q., Neris, R.L.S., Dos Santos, J.S.,

- Assunção Miranda, I., Figueiredo, C.P., Dias, A.A., Gomes, A.M.O., Guedes, H.L.M., Oliveira, A.C., Silva, J.L. (2019) Yellow Fever Vaccine Protects Resistant and Susceptible Mice Against Zika Virus Infection. *BioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/587444>.
- Vieira, L.P., Paula, A.R., Paula, C.O., Da Matta, R.A., Samuels, R.I. (2013) Infection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and Adults by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. *British Microbiology Research Journal*. V. 3, p. 309-317.
- Vilarinhos, P.T.R., Dias, J.M.C.S., Andrade, C.F.S., Araújo Coutinho, C.J.P.C. (1998) Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlideos. In: Alves, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: *Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz*. 447p.
- Walker, K.R., Joy, T.K., Eilers Kirk, C., Ramberg, F.B. (2011) Human and environmental factors affecting *Aedes aegypti* distribution in an arid urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*. V. 27, p. 135-141.
- Williams, C.R., Long, S.A., Russell, R.C., Ritchie, S.A. (2006) Field efficacy of the BG-sentinel compared with CDC backpack aspirators and CO<sup>2</sup>-baited EVS traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* V. 22, p. 296 -300.
- Willison, H. J., Jacobs, B.C., P.A. van Doorn, P.A. (2016) Guillain-Barré syndrome. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1)
- Wondji, C.S., Silva, W.A.P.P., Hemingway, J., Ranson, H., Karunaratne, S.H.P.P. (2008) Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Tropical Medicine and International Health*. V. 13, p. 548–555.
- World Health Organization (2015) Zika disease. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en> Acessado em: 01/07/2018
- World Health Organization (2014) Disponível em: <http://www.paho.org>.
- World Health Organization (WHO) (2001) Dengue prevention and control. Report by the secretariat, nov. Disponível em: [www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB109/eeb10916](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB109/eeb10916)
- Wright, C., Brooks, A., Wall, R. (2004) Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pest Manag Sci*. V. 60, p. 639-644.
- Zara, A.L.D.S.A., Santos, S.M.D., Fernandes Oliveira, E.S., Carvalho, R.G., Coelho, G.E. (2016) Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol Serv Saúde*. V. 25, p. 391-404.