



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

PRISCILLA RODRIGUES BORGES

**TOXICIDADE DE ADITIVOS E DE FORMULADOS DE
Metarhizium anisopliae s.I. IP46 EM ADULTOS DE *Aedes aegypti*
E CONIDIOGÊNESE QUANTITATIVA NA FASE
SAPROBIÔNTICA.**

Goiânia

2012

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Priscilla Rodrigues Borges

Título do trabalho: TOXICIDADE DE ADITIVOS E DE FORMULADOS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. IP46 EM ADULTOS DE *Aedes aegypti* E CONIDIOGÊNESE QUANTITATIVA NA FASE SAPROBIÔNTICA

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a) Prof. Dr. Wolf-Christian Luz
Universidade Federal de Goiás - UFG,
IPTSP / DMIPP Mat. 241283

Data: 22 / 03 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

PRISCILLA RODRIGUES BORGES

**TOXICIDADE DE ADITIVOS E DE FORMULADOS DE
Metarhizium anisopliae s.I. IP46 EM ADULTOS DE *Aedes aegypti*
E CONIDIOGÊNESE QUANTITATIVA NA FASE
SAPROBIÔNTICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Wolf Christian Luz

Co-orientador: Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes

Goiânia

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rodrigues Borges, Priscilla
TOXICIDADE DE ADITIVOS E DE FORMULADOS DE
Metarhizium anisopliae s.l. IP46 EM ADULTOS DE Aedes aegypti E
CONIDIOGÊNESE QUANTITATIVA NA FASE SAPROBIÓTICA
[manuscrito] / Priscilla Rodrigues Borges. - 2012.
xix, 51 f.

Orientador: Prof. Dr. Christian Luz; co-orientador Dr. Éverton Kort
Kamp Fernandes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2012.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Controle integrado de
mosquitos. 3. Toxicidade de aditivos. I. Luz, Christian, orient. II. Título.

CDU 576.8



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE PRISCILLA RODRIGUES BORGES - Aos quinze dias do mês de fevereiro do ano de 2012 (15/02/2012), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. WOLF CHRISTIAN LUZ, SOLANGE XAVIER DOS SANTOS e LUIZ FERNANDO NUNES ROCHA, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“TOXICIDADE DE ADITIVOS E DE FORMULADOS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. IP 46 EM ADULTOS DE *Aedes aegypti* E CONIDIOGÊNESE QUANTITATIVA NA FASE SAPROBIÓNTICA”**, em nível de MESTRADO, área de concentração em PARASITOLOGIA, de autoria de PRISCILLA RODRIGUES BORGES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. WOLF CHRISTIAN LUZ, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1037/2011 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wolf Christian Luz
Profa. Dra. Solange Xavier dos Santos
Prof. Dr. Luiz Fernando Nunes Rocha

Aprovado (a) / Reprovado (a)

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 02 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

Prof. Dr. Wolf Christian Luz (IPTSP/UEG)
Profa. Dra. Solange Xavier dos Santos (UEG/GO)
Prof. Dr. Luiz Fernando Nunes Rocha (CEPU/SE/GO)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Wol
Solange Xavier dos Santos
Luiz Fernando Nunes Rocha
José Clementino de Oliveira Neto

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Sem alteração

“Quem observa o vento, nunca semeará, e o que olha para as nuvens nunca segará.”

Eclesiastes 11: 4

Dedico este trabalho Àquele que sempre está comigo e é a razão de toda sabedoria, o meu Deus!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Christian Luz pela sua extraordinária orientação e principalmente por me receber, de forma tão especial e acolhedora, em seu laboratório. Christian, obrigada pela paciência e confiança depositada em mim, e também pelas ótimas tardes com café, ou seria “chafé”?

Ao Prof. Dr. Éverton K. K. Fernandes pela co-orientação, incentivos e bons momentos de descontração, muito obrigada!

A toda equipe do Laboratório de Biologia, Fisiologia de Insetos e Xenodiagóstico, em especial a Prof^a. Dr^a. Heloisa Helena Garcia da Silva e Carmeci Natalina Elias (Carmeci, é muito bom trabalhar com você), pela disponibilização de pupas.

Aos colegas do Laboratório de Patologia de Invertebrados em especial ao Juscelino Rodrigues (pelos ensinamentos ao fazer as análises de dados, mas principalmente pelo carinho e amizade), a Luciana Lobo (minha companheira de viagens), as queridas Raissa Hubner-Campos e Nathália Almeida (por todo carinho empregado a mim), ao Renan Leles (pelos conselhos e caronas) e ao Walmirton (pela ajuda nas faxinas matinais). Acreditem, vocês tornaram a realização deste trabalho mais agradável, obrigada!

A Prof^a. Dr^a Adelair Helena dos Santos pela ajuda no estágio docência, poucas pessoas são tão atenciosas como você!

A Ana Paula, colega de disciplinas que em pouco tempo se tornou muito especial!

Ao Programa de Pós- Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP – UFG, pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, Guilherme e Janete Borges pelo apoio que sempre dedicaram a mim e pelo exemplo de vida, mas principalmente, por me ensinarem a mais preciosa vereda da vida, o amor incondicional. Essa conquista também é de vocês, amo vocês!

Ao meu amado esposo, Eden Rodrigues, pelo amor, carinho, compreensão, mas acima de tudo pelo companheirismo. Sem dúvidas, depois do nosso amor, essa é a essência do nosso relacionamento. Amo você!

Aos meus lindos irmãos, Philippe e Neemias Borges, a amizade e o amor de vocês são imprescindíveis para mim. Amo muito vocês!

As minhas primas-irmãs Raquel e Kamila Rabelo pelo amor e carinho em toda minha vida, principalmente a Kamila por me incentivar antes e durante o curso de mestrado e pela companhia nas viagens de Anápolis à Goiânia.

As minhas queridas avós Alice Rodrigues e Maria Borges, pelo grande amor!

Aos meus familiares, em especial a minha sogra Elizabete Rodrigues, pelo apoio e orações.

A Deus, por me capacitar e ensinar a aproveitar as oportunidades da vida, guiando-me por um caminho reto e principalmente por fazer parte da minha existência!

Obrigada!

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas.....	xi
Lista de siglas e abreviaturas.....	xii
Resumo	xiii
Abstract.....	xv
1 Introdução	1
1.1 <i>Aedes aegypti</i>	1
1.1.1 Aspectos biológicos e morfológicos	1
1.1.2 Importância como vetor	5
1.2 Controle de <i>A. aegypti</i>	6
1.2.1 Controle químico	7
1.2.2 Resistência a inseticida	7
1.2.3 Controle integrado	8
1.3 Controle biológico	8
1.4 Fungos entomopatogênicos	9
1.4.1 Segurança de fungos	12
1.4.2 Formulação de fungos	12
1.4.3 Aplicação de formulados fúngicos.....	15
2 Justificativa	16
3 Objetivos	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 Materiais e métodos.....	18
4.1 Origem e criação de <i>A. aegypti</i>	18
4.2 Preparo de adultos para testes	18
4.3 Origem e cultivo de <i>M. anisopliae</i>	19
4.4 Preparo de recipiente para exposição de mosquitos a aditivos ou formulados	20

4.5	Aditivos.....	21
4.6	Preparo de formulados	21
4.7	Bioensaios	22
4.7.1	Avaliação da toxicidade de aditivos para <i>A. aegypti</i>	22
4.7.2	Avaliação de diferentes concentrações de conídios em <i>A. aegypti</i>	23
4.7.3	Avaliação de formulados em <i>A. aegypti</i>	23
4.7.4	Avaliação de diferentes tempos de exposição de <i>A. aegypti</i> a conídios formulados em terra diatomácea e óleo mineral.....	24
4.7.5	Avaliação da conidiogênese quantitativa sobre adultos mortos	24
4.8	Análise de dados.....	25
5	Resultados	26
5.1	Efeito de aditivos sobre a mortalidade acumulada.....	26
5.2	Efeito da concentração de conídios sobre a mortalidade acumulada.....	27
5.3	Efeito de formulados sobre a mortalidade acumulada	27
5.4	Efeito do tempo de exposição sobre a mortalidade acumulada	28
5.5	Efeito de formulados sobre a conidiogênese quantitativa.....	29
6	Discussão	37
6.1	Toxicidade de aditivos.....	37
6.2	Susceptibilidade de <i>A. aegypti</i> a <i>M. anisopliae</i> formulado ou não	38
6.3	Tempo de exposição	39
6.4	Conidiogênese quantitativa	40
7	Conclusão e considerações finais.....	41
8	Referências bibliográficas.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases evolutivas de <i>Aedes aegypti</i>	2
Figura 2 - Cabeça de culicídeo em vista superior – (A) Culicinae fêmea, com destaque às antenas pilosas e os palpos menores que a probóscida; (B) Culicinae macho, destacando as antenas plumosas e os palpos maiores que o aparelho bucal. a: antena; pa: palpo maxilar; pr: probóscida.....	4
Figura 3 - Incidência de dengue nos municípios brasileiros de janeiro a março, 2010 e 2011.....	6
Figura 4 - Ciclo da fase anamorfa de um <i>Metarhizium</i> sp. no inseto hospedeiro.....	11
Figura 5 - Preparo de adultos de <i>Aedes aegypti</i> para testes. A, pupas em 100 ml de água. B, adultos recém emergidos.....	19
Figura 6 - Preparo do copo plástico para exposição de adultos a aditivos ou formulados. A, copo sendo lixado. B, perfuração na lateral. C, copo contendo frasco de vidro com solução açucarada.....	20
Figura 7 - Preparo de formulados. A, conídios sendo raspados sobre o meio. B, conídios em placa de Petri sobre sílica gel. C, pesagem de conídios. D, conídios misturados a KeepDry®	22
Figura 8 - Aplicação de aditivos em copo plástico. A, aplicação de óleo com a ponta do dedo. B, aplicação de KeepDry® com pincel.....	23

Figura 9 - Transferência de mosquitos mortos após período de incubação para vidro com Tween 80® (0,1%).....	25
Figura 10 - Copo com mosquitos mortos após 15 dias de exposição à KeepDry®.....	26
Figura 11 - Conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> em mosquito de <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 12 - Mortalidade acumulada de <i>Aedes aegypti</i> após exposição, em diferentes tempos, à combinação de terra diatomácea e óleo mineral (KD + N).....	34
Figura 13 - Mortalidade acumulada de <i>Aedes aegypti</i> após exposição, em diferentes tempos, a conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> IP 46 a $3,3 \times 10^6$ conídios/cm ²	35
Figura 14 – Mortalidade acumulada de <i>Aedes aegypti</i> após exposição, em diferentes tempos, a conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> IP 46 a $3,3 \times 10^6$ conídios/cm ² formulados em terra diatomácea e óleo mineral (IP 46 + KD + N).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mortalidade acumulada (%; \pm erro padrão, EP) 5 e 15 dias após exposição e tempo letal (dias) para matar 50 ou 90% (TL₅₀ e TL₉₀ com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, I.C., slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a aditivos isolados ou combinados30

Tabela 2 - Mortalidade acumulada (%; \pm erro padrão, EP) 5 e 15 dias após exposição e tempo letal (dias) para matar 50 ou 90% (TL₅₀ e TL₉₀ com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, I.C., slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a *Metarhizium anisopliae* s. l. IP 46.....31

Tabela 3 - Concentração Letal (conídios/cm² dias) para 50 ou 90% (CL₅₀ e CL₉₀ com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, I.C., slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a *Metarhizium anisopliae* s. l. IP 46.....31

Tabela 4 - Mortalidade acumulada (%; \pm erro padrão, EP) 5 e 15 dias após exposição e tempo letal (dias) para matar 50 ou 90% (TL₅₀ e TL₉₀ com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, I.C., slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a aditivos isolados ou combinados a diferentes formulados de *Metarhizium anisopliae* s. l. IP 46.....32

Tabela 5 - Mortalidade acumulada (%; \pm erro padrão, EP) do 5º e 15º dia de avaliação de grupos de adultos de *Aedes aegypti* expostos a conídios de *Metarhizium anisopliae* IP 46 formulados em terra diatomácea e óleo mineral em tempos diferentes e tempos letais (dias) para matar 50 e 90% (TL₅₀ e TL₉₀ com respectivos intervalos de confiança de 95%, slope e EP).....33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA - Análise de Variância

BDA - Batata Dextrose Agar

Bs - *Bacillus sphaericus*

Bti - *Bacillus thuringiensis israelensis*

CL₅₀ - Concentração Letal para 50% dos indivíduos

CL₉₀ - Concentração Letal para 90% dos indivíduos

C - Celsius

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

Den - Dengue

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

Fig. - Figura

G - Graxol[®]

IP - Isolado fúngico armazenado no IPTSP

IPTSP/UFG - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás

KD - KeepDry[®]

L - Larvas

N - Naturol[®]

o.b. - Absorvente feminino

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

SDAY - Sabouraud Dextrose Agar Yeast

SNK - Teste de comparação múltipla de Student - Newman- Keuls

Tab. - Tabela

TL - Tempo Letal

TL₅₀ - Tempo Letal para 50% dos indivíduos

TL₉₀ - Tempo Letal para 90% dos indivíduos

UR - Umidade Relativa

RESUMO

Aedes aegypti é o vetor da dengue e da febre amarela urbana no Brasil. A eliminação deste mosquito é uma estratégia para o controle da dengue, e medidas como o controle integrado, tem sido adotadas. Fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* possuem atividade ovicida, larvicida e adulticida em *A. aegypti*, por isso, são de grande interesse para um controle deste mosquito. Formulações fúngicas à base de água, óleo, água-óleo e pó, podem auxiliar o fungo na superação de efeitos adversos no ambiente e potencializar sua ação entomopatogênica. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito de aditivos nas formulações em adultos de *A. aegypti*. O presente estudo relata o efeito de terra diatomácea e óleos (vegetal e mineral), formulados ou não com conídios de *M. anisopliae* IP 46 em adultos de *A. aegypti*, o efeito de diferentes tempos de exposição sobre a mortalidade acumulada destes mosquitos e o efeito de formulados sobre conidiogênese quantitativa em adultos mortos por infecção. Foram testados óleo vegetal Graxol[®] em duas concentrações (0,25 e 0,05 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), óleo mineral Naturoil[®] a 0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ e terra diatomácea KeepDry[®] a 0,6 mg/cm^2 . Primeiramente os aditivos foram avaliados separadamente e também em combinações (KeepDry[®] + Graxol[®]; KeepDry[®] + Naturoil[®]). Posteriormente formulações oleosas ou combinações de IP 46 a $3,3 \times 10^6$ conídios/ cm^2 + KeepDry[®] + óleos (Graxol[®] ou Naturoil[®]) foram testadas. Aditivos e formulações foram aplicados na área interna de copos plásticos. Dez adultos de *A. aegypti* foram colocados no copo e mantidos a 25°C, 75% de umidade relativa e fotofase de 12 h com acesso permanente a solução açucarada a 10%. Para avaliar o efeito do tempo de exposição, mosquitos foram expostos a conídios de IP 46 ($3,3 \times 10^6$ conídios/ cm^2) formulados em terra diatomácea e óleo mineral durante 0,016 h (60s), 12 h, 48 h, 72 h e 120 h. Um grupo controle sem tratamento foi mantido nas mesmas condições. A mortalidade foi avaliada, diariamente, por 15 dias. Mosquitos mortos por infecção fúngica foram incubados por 10 dias em câmara úmida com umidades relativas perto de saturação ($\geq 98\%$) e em seguida suspensos em Tween 80[®] (0,1%) para quantificação de conídios em câmara de Neubauer. Os resultados mostraram que os aditivos possuem toxicidade para adultos de *A. aegypti* e efeito sobre a mortalidade acumulada ($F_{6,35} = 31,9$, $P = 0,0001$). Conídios de IP 46 combinados com KeepDry[®] puro ou em associações com óleos apresentaram menor tempo para matar 50% (TL₅₀)

dos mosquitos e o formulado IP 46 + KD + N, levou menos tempo para matar 90% (TL₉₀) que foi 7,5 dias. Não houve diferença significativa do tempo de exposição sobre a mortalidade acumulada de adultos expostos a conídios de IP 46 formulados ou não. O crescimento de micélio sobre adultos mortos teve início com 2 dias de incubação em câmara úmida. Novos conídios de IP 46 foram visualizados a partir do 3º dia independentemente da concentração de conídios e do tipo de formulado em que os mosquitos tinham sido expostos anteriormente. O efeito do formulado sobre a conidiogênese quantitativa em mosquitos mortos foi significativamente diferente ($F_{5,18} = 3,8$; $P = 0,02$), sendo encontrado maior número de conídios em mosquitos que foram expostos ao formulado IP 46 + KeepDry®. A combinação de conídios de IP 46 com KeepDry® e Naturol®, mostrou-se a mais indicada para um controle de adultos *A. aegypti* com um micoinseticida.

Palavras – chaves: Fungos entomopatogênicos, toxicidade de aditivos, diferentes tempos de formulação

ABSTRACT

Aedes aegypti is both the dengue and urban yellow fever vector in Brazil. Elimination of this mosquito is a strategy taken for the control of dengue. Entomopathogenic fungi such as *Metarhizium anisopliae* exhibit ovicidal, larvicidal and adulticidal activity on *A. aegypti*, being therefore of great interest for the integrated control of such mosquito. Water based, oil based, water/oil/powder based fungal formulations may help such fungi overtake environmental adverse effects as well as magnify their entomopathogenic action. Nevertheless, little is known about the effect of additives on *A. aegypti* adults. This study reports the effect of additives such as diatomaceous earth and oils (both vegetal and mineral), with or without the presence of *M. anisopliae* conidia IP 46 on *A. aegypti* adult mosquitoes, the effect of exposure time on accumulated mortality of such mosquitoes as well as the effects of formulations on conidiogenesis on dead adult mosquitoes killed by infection. Graxol[®] vegetable oil was tested in two concentrations (0.25 and 0.05 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), as well as Naturol[®] mineral oil (0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) and KeepDry[®] diatomaceous earth (0,6 mg/cm^2). Such additives were analyzed both separately and in combination (KeepDry[®] + Graxol[®]; KeepDry[®] + Naturol[®]). Subsequently, oily formulations or combinations of IP 46 at 3.3×10^6 conidia/ cm^2 + KeepDry[®] + oils (Graxol[®] or Naturol[®]) were tested. Additives and formulations were applied inside plastic cups. Ten *A. aegypti* adults were placed in the cup and kept at 25°C, relative humidity of 75% and 12 hours of photophaxis with permanent access to a 10% sugar solution. In order to assess the effect of the time of exposure, mosquitoes were exposed to IP 46 conidia (3.3×10^6 conidia/ cm^2) formulations on diatomaceous earth and mineral oil for 0.016 hours (60s), 12 hours, 48 hours, 72 hours and 120 hours. A non-treated control group was kept at the same conditions. Mortality was daily verified for 15 days. Mosquitoes killed by fungal infection were incubated for 10 days in a humid chamber with relative humidity close to saturation ($\geq 98\%$) and then suspended in Tween 80[®] (0,1%) for conidia quantification in Neubauer chamber. Results showed that the additives exert toxicity on *A. aegypti* adults as well as effect on mortality ($F_{6,35} = 31,9$, $P = 0,0001$). IP 46 conidia combined to pure KeepDry[®] or on oil associations took shorter to kill 50% (TL_{50}) of mosquitoes and the IP 46 + KD + N combination took less time to kill 90% (TL_{90}), namely 7.5 days. There was no relevant difference between time of exposure on accumulated mortality of

adults exposed to combined and non-combined IP 46 conidia. The growth of mycelia on dead adults started within 2 days of humid chamber incubation. New IP 46 conidia were observed from the 3rd day on, regardless conidia concentration and combination type to which mosquitoes had previously been exposed to. The effect of the combination on quantitative conidiogenesis on dead mosquitoes was significantly different ($F_{5,18} = 3.8$; $P = 0.02$), a greater number of conidia on dead mosquitoes being found on mosquitoes who were exposed to the IP 46 + KeepDry[®] combination. The IP 46 with KeepDry[®] and Naturol[®] combination proved to be the most recommended one for the control of *A. aegypti* adults using a mycoinsecticide.

Keywords: Entomopathogenic fungi, additive toxicity, different formulation times

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é um artrópode pertencente à ordem Diptera, família Culicidae e subfamília Culicinae. Evidências faunísticas de *A. aegypti* na África indicam que a espécie surgiu nesse continente, na região da Etiópia, tendo sido introduzido nas Américas pelas expedições colonizadoras dos europeus (SILVA; SILVA 1999). Com distribuição mundial, geralmente pode ser encontrado em áreas compreendidas principalmente entre os paralelos (latitudes) 45° N e 35° S ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermais de 20° C (BISSET 2002).

1.1.1 Aspectos biológicos e morfológicos

A. aegypti possui desenvolvimento holometabólico, com fases de ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 1). Com exceção da fase adulta, que é terrestre, as outras fases são aquáticas. Machos e fêmeas possuem hábitos diurnos, acasalando e alimentando-se durante o dia. Ambos alimentam-se de seiva de plantas, mas as fêmeas necessitam de sangue como fonte de proteína para maturar seus ovos, por isso, são responsáveis pela transmissão de patógenos (FORATTINI, 2002). Uma mesma fêmea pode alimentar-se de sangue diversas vezes no mesmo hospedeiro ou em hospedeiros diferentes (SCOTT et al., 1993) que são na maior parte vertebrados, inclusive o homem. Regiões mais baixas do corpo humano são preferencialmente as mais picadas, como por exemplo, as partes inferiores das pernas e os pés (EIRAS, 2005).

As fêmeas possuem um complexo sistema sensorial, formado por vários tipos de receptores, como os de temperatura e umidade. Estímulos visuais, táteis e olfatórios no ambiente, que podem atrair ou repelir a fêmea, como por exemplo cor, densidade óptica, textura, refringência do substrato, umidade e temperatura são utilizados na seleção dos sítios de oviposição (BADANO; REGIDOR, 2002). A presença de bactérias e fungos saprobióticos e seus metabólitos voláteis, em águas poluídas ou em infusões à base de

gramíneas, também são estímulos atraentes para fêmeas de *A. aegypti* e outros mosquitos, no momento da oviposição (NAVARRO et al., 2003). Por serem bem adaptadas ao ambiente urbano, as fêmeas utilizam recipientes em lugares sombreados, próximos à superfície da água ou sobre substratos adjacentes, no domicílio ou peridomicílio, para realizar ovipostura (MADEIRA et al., 2002). Uma fêmea põe, durante dois meses, cerca de oitenta ovos (MICIELLI; CAMPOS, 2003). Em um mesmo ciclo gonotrófico a fêmea pode colocar ovos em vários criadouros, garantindo assim sobrevivência e dispersão melhor de sua prole. Esse comportamento tem sido chamado de saltos de oviposição (REITER, 1991). Tanques de armazenamento de água e vasilhames temporários, dentro e fora das casas, como potes, barris, pneumáticos usados, latas, garrafas e vasos de plantas, frequentemente são selecionados como sítios de oviposição e para o desenvolvimento de sua fase larvária. Ovos e larvas também podem ser encontrados em calhas de telhado, bambus cortados e axilas de folhas (MANGUDO et al., 2010).

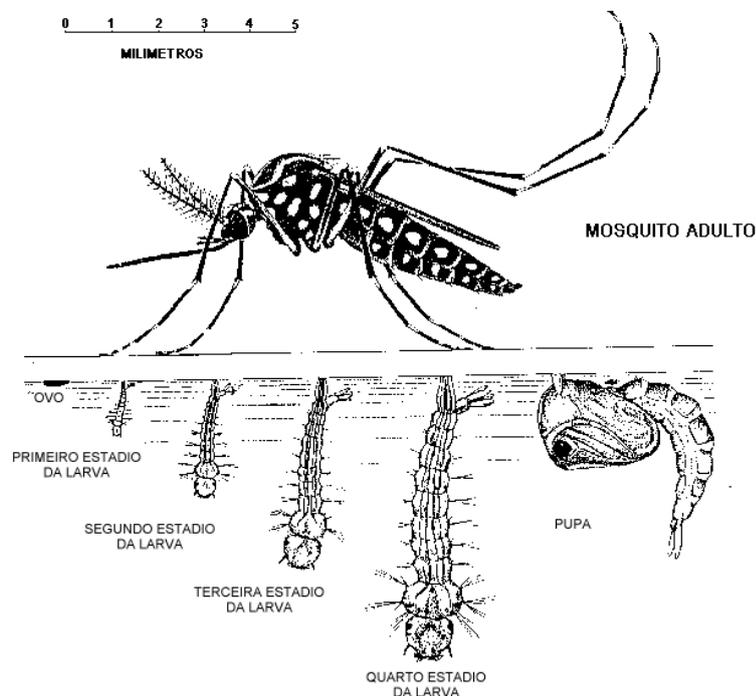


Figura 1 - Fases evolutivas de *Aedes aegypti* (Fonte: www.prdu.unicamp.br/dengue/mosquito.html; Acesso em 15 de Julho de 2011).

Os ovos são elípticos, alongados, fusiformes e medem cerca de 1 mm de comprimento. No momento da postura são brancos, no entanto, após algumas horas adquirem coloração enegrecida e tonalidade brilhante (FORATTINI, 2002). Com temperatura em torno de 27° C e umidade relativa de 80%, o desenvolvimento embrionário se completa em 48 horas. Estando completamente amadurecido, o ovo resiste às situações adversas como dessecação, baixa de temperatura e insolação, estabelecendo a diapausa dentro do ovo. A presença de uma cutícula serosa constituída por quitina e a existência de expressão gênica relacionada tanto com a produção de quitina quanto de lipídeos importantes para o processo de impermeabilização (REZENDE et al., 2008), a temperatura (FARNESI et al., 2009) e a rigidez do córion (PEREIRA et al., 2006), são fatores que favorecem esse mecanismo de resistência. Assim, os ovos resistem meses ou anos no ambiente, só eclodindo quando em contato com a água (SILVA; SILVA, 1999; JULIANO et al., 2002; LUZ et al., 2008). Durante esse período de resistência, os ovos podem ser transportados a grandes distâncias, tornando-se o principal meio de dispersão do inseto. Essa resistência é um sério obstáculo para a erradicação do mosquito. A diapausa é interrompida não só após submersão dos ovos na água, como também por agitação, variações de temperatura e devido a estímulos por metabólitos de microrganismos (LIVDHAL et al., 1984; EDGERLY; MARVIER, 1992).

As larvas são vermiformes, alongadas e esbranquiçadas. Possuem cabeça e o corpo é formado por tórax e abdome. A cabeça possui um par de antenas, olhos compostos e aparelho bucal mastigador-raspador. O tórax é globoso, mais largo que a cabeça, com segmentos fundidos e revestidos por cerdas. No oitavo e último segmento localiza-se o sifão respiratório que é curto, grosso e escuro (FORATTINI, 2002). Encontradas principalmente em recipientes de pequeno porte (STEIN et al., 2011), são exclusivamente aquáticas, possuem vida livre e representam os períodos de alimentação e crescimento do mosquito. Alimentam-se de partículas orgânicas presentes na água, como alguns tipos de algas (AHMAD et al., 2001) e a filtração é a forma mais comum de alimentação (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). Seu ciclo de vida compreende quatro estádios (L1- L4) e o completo desenvolvimento da fase larval ocorre em cerca de 8 a 10 dias e é influenciado pela temperatura, luminosidade, salinidade e poluentes

orgânicos e inorgânicos (FORATTINI, 2002), e também pela disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro (BESERRA et al., 2006).

A pupa, por possuir a cabeça unida ao tórax, formando o cefalotórax, tem aspecto de vírgula (Fig. 1). É móvel, mas geralmente fica parada na superfície da água, não se alimenta e desenvolve-se em dois dias. Este é o estágio de vida que representa a transição do indivíduo do meio aquático para o terrestre (FORATTINI, 2002).

O adulto de *A. aegypti* mede cerca de 3-6 mm de comprimento, possui o corpo delgado, pernas longas com manchas prateadas e apresenta um par de asas funcionais e outro par de asas transformado em balancins. A cabeça tem um par de antenas com 15 a 16 artículos cada, sendo plumosas nos machos e pilosas nas fêmeas. Possui também probóscida e um par de palpos maxilares, que são mais curtos que a probóscida nas fêmeas e mais longos que a probóscida nos machos (Fig. 2). As fêmeas possuem aparelho bucal do tipo picador (sugador-pungitivo) e os machos do tipo sinfonador-sugador. Os olhos compostos ocupam grande parte da porção ântero-lateral da cabeça e são constituídos de pequenos omatídeos, que são responsáveis por captar a luz. O tórax é dividido em protórax, mesotórax, onde estão inseridas as asas, metatórax, onde estão os balancins. O escudo característico de *A. aegypti* apresenta um conjunto de escamas prateadas em forma semelhante a uma lira que, juntamente com o escutelo forma o mesonoto. O abdome é composto por oito segmentos evidentes e dois segmentos reduzidos modificados em ânus e genitália externa. O tórax, as pernas, as asas e o abdome são revestidos por escamas e, em geral, apresentam a cor marrom médio (FORATTINI, 2002).

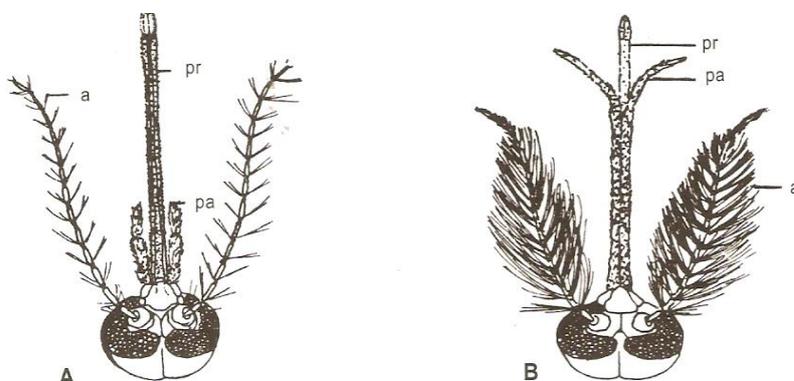


Figura 2. Cabeça de culicíneo em vista superior – A, Culicinae fêmea; B, Culicinae macho. a: Antena; pa: Palpo maxilar; pr: Probóscida (Fonte: Eiras 2005).

1.1.2 Importância como vetor

A fêmea de *A. aegypti* previamente infectada, transmite aos humanos os vírus da febre amarela urbana e da dengue (FOLEY et al., 2007). Ela adquire a infecção por respasto sanguíneo em um indivíduo infectado, ou pela via transovariana (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). A febre amarela urbana foi erradicada no Brasil em 1942, em consequência da utilização de vacina, mas há um risco de reurbanização da febre amarela silvestre. Isso porque indivíduos infectados no ambiente silvestre através de outros vetores poderão entrar em contato com *A. aegypti* no ambiente urbano, ainda no período de incubação ou fase virêmica da doença. Assim, após a infecção, o *A. aegypti* poderá transmitir a febre amarela urbana para pessoas não imunizadas (BARRET; HIGGS, 2007).

A dengue, uma das arboviroses humanas mais importantes atualmente, é uma doença infecciosa febril causada por vírus da família Flaviviridae, do qual existem quatro sorotipos. A dengue e suas formas graves (dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue) estão hoje presentes em quase todos os estados do Brasil. A ocorrência dos quatro sorotipos (Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4) no país, potencializa o risco de surgimento de epidemias de febre hemorrágica por dengue, sobre tudo nas grandes metrópoles que tiverem epidemias por dois sorotipos.

Os dados divulgados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde da Semana epidemiológica 1 a 39 de 2011 registraram um total de 721.546 casos notificados de dengue no país. Esses dados mostram uma redução de 24% no número de casos notificados de dengue em comparação ao ano de 2010 (944.662 casos notificados) (Fig. 3). A região Centro-Oeste teve uma redução de 78% de casos, mas o estado de Goiás é o que detém a maior incidência de casos notificados da região (Ministério da Saúde 2011).

A persistência e a progressão desta virose estão condicionadas à sobrevivência e reprodução do seu vetor no ambiente. Como não existe ainda uma vacina para a dengue, a eliminação do vetor é ainda a melhor estratégia para o controle da doença.

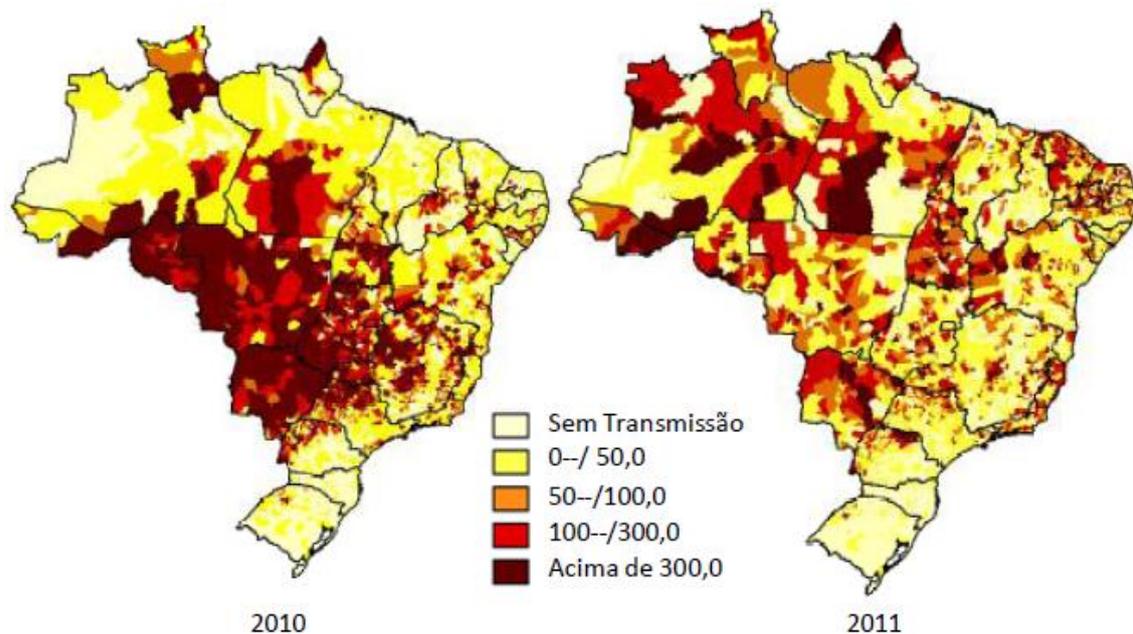


Figura 3. Incidência de dengue nos municípios brasileiros de janeiro a março, 2010 e 2011. (Fonte: Ministério da Saúde 2011).

1.2 Controle de *A. aegypti*

O controle de *A. aegypti* tem sido alvo de campanhas políticas sanitárias desde 1900, idealizadas por Oswaldo Cruz, para a erradicação da febre amarela urbana no Rio de Janeiro. Através de ataques aos focos do vetor e participação voluntária da população, o mosquito foi erradicado do país entre as décadas de 1950 e 1960. Porém, com o aumento da complexidade urbana, essas políticas tornaram-se ineficazes e houve em 1976 a reintrodução do mosquito no país (TAUIL, 2002). Com isso, o Ministério da Saúde, através da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), implantou diversos programas visando controlar a transmissão da doença. Essas ações são dirigidas à população e aos órgãos setoriais de saúde e saneamento, buscando a eliminação dos focos de criação no domicílio e peridomicílio (OPAS, 1995). Em todos os programas houve uma associação entre campanhas para a eliminação de criadouros por meio de políticas de conscientização populacional associadas à vigilância entomológica e combate ao vetor, e o emprego de inseticidas químicos, como por exemplo, o uso de

temefós como larvicida e nebulização térmica e atérmica para o controle de adultos (BRAGA; VALLE, 2007).

1.2.1 Controle químico

O controle químico iniciou-se com um organoclorado sintético, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), inseticida de efeito prolongado ou residual que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanece ativo contra os insetos por vários meses (ROZENDAAL, 1997). Organofosforados, carbamatos e piretróides são outros inseticidas comumente utilizados, de modo geral eles atuam sobre o sistema nervoso central de insetos. Os organofosforados em especial são amplamente utilizados no controle de vetores, pois são biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos. Porém, tem como principal desvantagem, a instabilidade química, o que torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação. Além disso, são mais tóxicos para organismos não-alvos mesmo em doses relativamente baixas (LUNA et al., 2004). Um exemplo é a intoxicação aguda em vertebrados devido à inibição irreversível da acetilcolinesterase, o que gera acúmulo de acetilcolina nos receptores trazendo riscos à saúde humana e animal. Apesar desses indícios, o derivado da uréia, diflubenzuron, é o larvicida sintético recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tratamento focal em depósitos domiciliares de água potável, e o malathion e piretróides como adulticidas (BRAGA; VALLE, 2007).

1.2.2 Resistência á inseticida

A. aegypti tem se adaptado a diferentes situações, tornando-se resistente aos químicos comumente utilizados. Casos de resistência de larvas ao temefós já foram notificados em diversas regiões do Brasil como nos estados de São Paulo (MACORIS et al., 2003), Rio de Janeiro, Espírito Santo, Sergipe, Alagoas (BRAGA et al., 2004), Ceará (LIMA et al., 2006) e Paraíba (BESERRA et al., 2007). Resistência de adultos à cipermetrina também foi relatada no Paraná (LUNA et al., 2004), Rio de Janeiro e Alagoas (CUNHA et al., 2005).

A resistência de *A. aegypti* a esses produtos químicos pode ocorrer como resultado de fatores genéticos e operacionais. A resistência é uma característica genética que se insere numa população em função do uso de inseticidas. Ou seja, quanto mais o inseticida é utilizado, maior é a seleção de insetos resistentes na população e maior o nível de resistência atingido (BARRETO 2005). Sendo assim, em muitas regiões, esse desenvolvimento de resistência exige aplicação de doses crescentes de inseticidas, o que pode aumentar o risco à saúde humana (HEMINGWAY & RANSON 2000) e causar grandes desequilíbrios ambientais que atingem tanto os insetos quanto o restante da fauna e da flora da área afetada (D'AMATO et al. 2002). Por esses motivos, nos últimos anos, pesquisas são realizadas para o desenvolvimento de medidas integradas de controle de dengue.

1.2.3 Controle integrado

Os reguladores de crescimento são substâncias químicas que atuam como inibidores da síntese da quitina ou análogos do hormônio juvenil, impedindo assim a ecdise e conseqüentemente matam as larvas (BORGES et al., 2004), têm sido empregados como uma medida alternativa para o controle de mosquitos. Reguladores de crescimento possuem ação específica e apresentam riscos reduzidos de toxicidade para vertebrados (BRAGA et al., 2005). O uso de inseticidas botânicos e bioinseticidas também se apresentam como uma opção econômica e ecologicamente viável (SILVA et al. 2004).

O desenvolvimento de inseticidas botânicos a partir da pesquisa de princípios ativos em plantas é outra importante linha de estudo para controle de mosquitos (SILVA et al., 2004, 2007, 2008 a). Substâncias de baixo peso molecular, como os fenilpropanóides e os terpenóides são os principais constituintes que estão envolvidos nas interações planta-inseto (ALVES, 2001). Substância extraída da casca do caule, das folhas e dos frutos de diversas plantas tem demonstrado propriedades larvicidas no controle de *A. aegypti* (SILVA et al., 2004). Apesar do potencial de inseticidas botânicos para o controle de *A. aegypti*, nenhum produto ainda foi comercializado.

1.3 Controle biológico

O controle biológico é também outra alternativa efetiva e segura para o homem e animais no controle de *A. aegypti* (BECKER; ASCHER, 1998), e pode ser realizado através de predadores como por exemplo *Betta splendens*, um peixe larvófago que apresentou grande potencial para o controle de larvas de *A. aegypti* em criadouros permanentes (CAVALCANTI et al., 2007), ou por meio de manipulação de microrganismos. Produtos biológicos mostram-se eficazes, pois são mais específicos quanto ao alvo, não apresentam risco a outros organismos, tem menor risco de danos ao meio ambiente, uma vez que não agredem a flora e outros indivíduos da fauna e não são tóxicos a humanos. Bactérias entomopatogênicas por terem ação rápida e seletiva foram os primeiros agentes de controle biológico efetivos contra larvas de mosquitos (BECKER et al., 1998). Biolarvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) são utilizados no controle de *A. aegypti* desde o ano de 2001 nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte (BRAGA; VALLE, 2007). Produtos comerciais à base de *Bacillus sphaericus* (*Bs*) também são usados em larga escala com sucesso em programas de controle de mosquitos (IBARRA et al., 2003). Essas bactérias produzem endotoxinas protéicas que, ao serem ingeridas pela larva de *A. aegypti*, causam danos no trato gastrointestinal, provocando sua morte. Casos de resistência de larvas às toxinas bacterianas já foram registrados (TABASHNIK, 1994), e isso aumenta o interesse da comunidade científica para a busca de outros agentes de controle biológico de mosquitos, principalmente por fungos.

1.4 Fungos entomopatogênicos

A maior parte das doenças naturais dos insetos e de outros artrópodes (cerca de oitenta por cento), são causadas por fungos (ALVES, 1998). Estima-se que exista mais de setecentas espécies de fungos entomopatogênicos agrupadas em noventa gêneros (DESTÉFANO et al., 2004). A grande biodiversidade de espécies e linhagens, como seus metabólitos secundários tóxicos, apresentam um enorme potencial para controle de vetores e outras pragas (INGLIS et al., 2001; ZIMMERMANN, 2007), por isso nos últimos anos o conhecimento sobre a atividade de fungos entomopatogênicos como

agentes de controle biológico de mosquitos vem aumentando (ALBERNAZ et al., 2009). Fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos utilizados no controle biológico de pragas e são importantes agentes para o controle de insetos de importância em saúde pública (LUZ et al., 2003; Luz et al., 2004). O uso destes agentes apresenta vantagens por serem mais específicos, por terem capacidade de dispersão e multiplicação, por serem patógenos de largo espectro e estarem dispersos em diferentes ambientes, como solos, vegetais, água e ar (INGLIS et al., 2001) e apresentarem grande variabilidade genética e número elevado de linhagens virulentas que são úteis para o controle de mosquitos. Além disso, não são agressivos à saúde humana e ao meio ambiente, mas podem induzir respostas características de alergias (WARD et al., 1998).

O ciclo biológico de fungos entomopatogênicos, em insetos terrestres, se inicia com a adesão de formas infectantes, geralmente conídios, à cutícula do inseto (Fig. 4). Em seguida inicia-se a germinação do conídio que se completa entre doze e vinte horas, com formação de um tubo germinativo e hifas. Em alguns fungos há formação de apressório e grampo de penetração. A penetração é favorecida pela pressão exercida pelas hifas em áreas membranosas ou esclerosadas associadas a enzimas como proteases, quitinases e lipases, produzidas durante a penetração (KHACHATOURIANS, 1998). Proteases e metabólitos secundários tóxicos são considerados fatores chave para a eficiência do processo de invasão (Moraes et al., 2003). Após a penetração das hifas, que dura entre seis e doze horas, atingem a hemocele e colonizam com corpos hifais o inseto. Mecanismos de defesa interna do inseto como fagocitose, destruição de plasmócitos infectados, encapsulação do propágulo e formação de nódulos, são ativados para inibir o crescimento fúngico. Um fungo patogênico escapa do sistema imune através da excreção de toxinas que suprimem a resposta imune do artrópode infectado (PAL et al., 2007). Essas toxinas, associadas a alterações patológicas na hemocele, devido ao crescimento de propágulos fúngicos causam a morte do inseto. No cadáver, o fungo coloniza o corpo gorduroso, sistema digestivo, tubos de Malpighi, sistema nervoso, músculos e traquéias. Em seguida, hifas emergem através de espiráculos e da cutícula na superfície e inicia a produção de novos conídios os quais serão disseminados no ambiente através da água, vento e animais, contaminando e infectando novos insetos. Gêneros de fungos entomopatogênicos como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, são os mais

estudados (KACHATOURIANS, 1998; FARIA; WRAIGHT, 2007). Dentre eles as espécies mais pesquisadas são *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Recentes trabalhos tem confirmado a alta suscetibilidade de mosquitos como *Anopheles gambiae* e *A. aegypti* a esses fungos (MNYONE et al., 2010; FAHRENHORST et al., 2010; LELES et al., 2010).

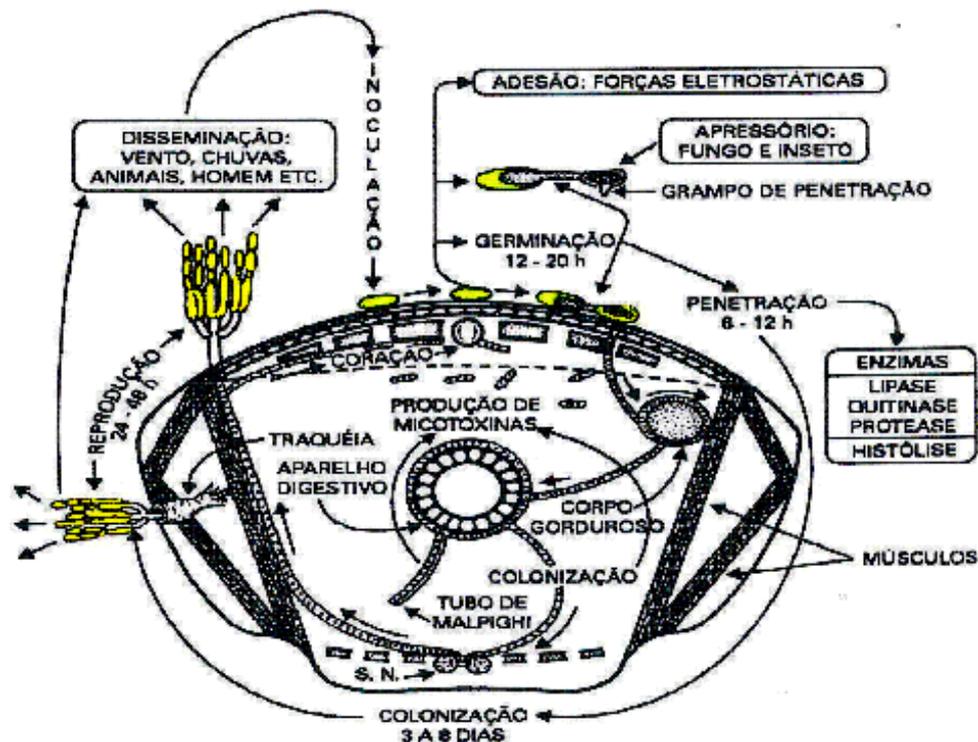


Figura 4- Ciclo da fase anamorfa de um *Metarhizium* sp. no inseto hospedeiro (Alves 1998 adaptado).

M. anisopliae foi descrito por Metschnikoff e Sorokin no final do século XIX. Sua atividade entomopatogênica foi demonstrada pelos mesmos pesquisadores, que utilizaram esse fungo no controle de praga do trigo *Anisopliae austriaca*, e de praga da beterraba *Cleonus punctiventris*. É um fungo filamentoso, ascomicético, pertencente à família Clavicipitaceae (ZIMMERMAN, 1993; ALMEIDA; BATISTA-FILHO, 2001). Possui distribuição cosmopolita, é encontrado comumente em solos, em clima temperado e tropical, podendo ser cultivado em meios artificiais simples (SHAH et al., 2005). Seus conídios podem ser estocados com facilidade e utilizados para formulações aquosas ou oleosas (BATTA, 2003) atuando no controle de grande número de pragas. *M. anisopliae*, em condições de laboratório, possui atividade em vetores de importância

médica, como *Triatoma infestans* (LUZ et al., 1998; LUZ; BATAGIN, 2005), *Amblyomma cajennense* (LOPES et al., 2007), *A. aegypti* e *A. albopictus* (SCHOLTE et al., 2007), *An. gambiae* (SCHOLTE et al., 2005) e *Culex quinquefasciatus* (SCHOLTE et al., 2003). Vários estudos mostraram que esse fungo é patogênico para *A. aegypti* no estágio de ovo (LUZ et al., 2007, 2008; ALBERNAZ et al., 2009; SANTOS et al., 2009), larva (SCHOLTE et al., 2004 a) e adulto (SCHOLTE et al., 2007; PAULA et al., 2008; LELES et al., 2010). Não se conhecem danos ocasionados por *M. anisopliae* em organismos não alvo (ALVES, 1998; BUTT et al., 1998), como organismos do solo (BROZA et al., 2001), peixes (MILNER et al., 2002), anfíbios (GENTHENER et al., 1998), répteis (AUSTWICK, 1980), aves (WASTI et al., 1980) e o homem (ZIMMERMANN, 1993, 2007).

1.4.1 Segurança no emprego de fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos, são considerados seguros tanto para o homem como para o ambiente. Não existem relatos de doenças, morte de pessoas ou de desequilíbrios ambientais provocados por fungos entomopatogênicos, apesar do contato constante de pessoas com propágulos desses microrganismos que ocorrem naturalmente ou que foram aplicados em plantações (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007). A segurança no uso de fungos entomopatogênicos se deve principalmente à grande diferença existente entre a fisiologia de insetos e vertebrados. Assim, organismos adaptados para desenvolvimento e reprodução em insetos em geral não possuem capacidade de desenvolvimento em vertebrados. A temperatura representa uma das principais barreiras que impede o crescimento de fungos entomopatogênicos sobre mamíferos, inclusive o ser humano. Como insetos são animais sem controle interno de temperatura, a temperatura do seu corpo normalmente fica abaixo da temperatura normal do corpo humano (36 - 37°C) e de outros mamíferos. Assim, os microrganismos adaptados ao crescimento em insetos têm em geral crescimento ótimo abaixo de 30°C e o desenvolvimento é muito limitado, ou nulo, em temperatura acima de 35°C. Outra barreira importante nos vertebrados é o sistema imunológico. Embora os insetos

também possuem mecanismos complexos de imunidade, o sistema de vertebrados, em geral, é mais eficiente (ALVES, 1998).

1.4.2 Formulação de fungos

Fatores ambientais influenciam na germinação, conidiogênese e virulência de fungos entomopatogênicos em campo (ALVES, 1998). Dos muitos fatores que podem afetar a sobrevivência e a capacidade infectiva desses fungos no meio ambiente, a radiação solar, a umidade relativa e a temperatura são considerados os mais importantes (BUGEME et al., 2009). Vários estudos foram feitos para avaliar os efeitos de fatores abióticos em parâmetros biológicos de fungos, como *M. anisopliae* (BRAGA et al., 2001; FERNANDES et al., 2008; LAZZARINI et al., 2006; BUGEME et al., 2009).

Uma forma de melhorar o desempenho de fungos e aumentar a resistência às condições abióticas é a formulação de produtos. Para isso, propágulos fúngicos são misturados a veículos líquidos como água, óleo puro e emulsões água-óleo, ou sólidos como pós e granulados de diferentes tamanhos. Por isso, maneiras específicas de formulação de fungos entomopatogênicos como formulações oleosas e secas visam aumentar a infectividade e persistência de propágulos fúngicos no meio ambiente (ALVES, 1998), além disso, esses ingredientes usados nas formulações podem melhorar o espalhamento na aplicação e adesão de conídios sobre a cutícula do inseto aumentando então a toxicidade sobre a praga alvo (BATISTA-FILHO et al., 1998).

Formulados fúngicos preparados com óleo são utilizados no controle de pragas agrícolas como *Diatraea saccharalis* e *Tetranychus urticae*, e também no controle de gafanhotos mantendo a atividade do fungo alta mesmo em baixas condições de umidade (ALVES et al., 2002 a ; LOMER et. al., 2001). Isso provavelmente porque o óleo promove a resistência dos conídios a condições abióticas desfavoráveis, aumentando assim, o tempo de vida útil dos conídios (ALVES et al., 2002 a). Testes em condições de laboratório com formulados oleosos causaram maior mortalidade de *T. infestans* tratados com fungos quando comparados com formulações aquosas, demonstrando que o óleo melhora o contato da superfície lipofílica dos conídios com a cutícula do inseto e promove o aumento da contaminação quantitativa (LUZ; BATAGIN, 2005).

Formulações de *M. anisopliae* á base de óleo vegetal tem demonstrado grande atividade em adultos de *A. aegypti*, *A. albopictus* (SCHOLTE et al., 2007), *An. gambiae* e *Culex quinquefasciatus* (SCHOLTE et al., 2003).

Formulações de propágulos fúngicos com óleo mineral também tem apresentado efetividade contra adultos de *An. gambiae* (MNYONE et al., 2009, 2010; FARENHORST et al., 2008, 2010) e *An. funestus* (FARENHORST et al., 2008). Óleos, tanto de origem vegetal como mineral, podem ter efeitos sobre microrganismos. No caso de fungos entomopatogênicos, o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação podem ser modificados alterando a sua virulência (ALVES, 1998). Assim, a viabilidade de fungos entomopatogênicos em conjunto com óleos tem sido avaliada em alguns trabalhos (LUZ et al., 2004; SILVA et al., 2008 b) bem como o sinergismo destes no controle integrado de pragas (HAZZARD et al., 2003).

As informações sobre o efeito de óleos vegetais em vetores de importância em saúde pública ainda são poucas. Um óleo de soja não apresentou, em baixas concentrações, toxicidade e repelência para triatomíneos e adultos de *A. aegypti*. Porém, ficou claro, que microrganismos saprobióticos, como fungos e bactérias, presentes no local da aplicação, metabolizam óleos vegetais e, proliferando, interferem no desenvolvimento de fungos entomopatogênicos no inseto e na persistência do propágulo formulado no meio ambiente (LUZ; BATAGIN, 2005; LOBO; LUZ, dados não publicados).

Óleos minerais, utilizados em formulações, não têm efeito tóxico para microrganismos, incluindo fungos entomopatogênicos, pois são dificilmente metabolizados por microrganismos e têm efeito protetor mais estável para os conídios, aumentando assim, a persistência do conídio, como foi mostrado por Daoust et al. (1983) para conídios de *M. anisopliae*, porém ainda não se conhece os efeitos destes óleos em mosquitos adultos.

Formulados secos de conídios preparados com pós que possuem propriedades absorventes e abrasivas têm sido utilizados como inseticidas para o controle de pragas de grãos armazenados (PINTO JÚNIOR et al., 2008) e do cascudinho-dos-aviários, *Alphitobius diaperinus* (ALVES et al., 2006). Um pó muito utilizado para estes fins é a terra diatomácea, produto originado de algas microscópicas aquáticas constituídas predominantemente (86%) por dióxido de silício (ANDRADE et al., 2001). É atóxico a

peças e outros animais e não promove resistência em insetos (LORINI et al., 2001). A morte dos insetos ocorre por estresse e desidratação, uma vez que moléculas de cera da camada superficial da epicutícula são adsorvidas pelas partículas de sílica, formando então pequenos canais que permitem a evaporação de água (PINTO JÚNIOR et al., 2008). A terra diatomácea e o fungo atuam por meio do contato com a cutícula do inseto, o que pode resultar em uma interação positiva para o controle de pragas. Estudos demonstraram que a germinação dos fungos *B. bassiana* e *M. Anisopliae* não é afetada pela terra diatomácea e os danos que esta provoca aos insetos podem auxiliar na penetração do entomopatógeno (LORD, 2005; LUZ, et al., 2012 no prelo). Embora estudos comprovem a toxicidade de terra diatomácea em insetos pragas de grãos armazenados e aviários (PINTO JÚNIOR et al., 2008; OLIVEIRA ; ALVES, 2007), o seu efeito em mosquitos adultos de *A. aegypti* precisa ser esclarecido.

1.4.3 Aplicação de formulados fúngicos

O desempenho de um formulado fúngico depende muito do tipo de aplicação, que está ligado a aspectos biológicos da praga-alvo. Sendo assim, métodos adequados de aplicação de propágulos fúngicos são essenciais para o sucesso de um controle de pragas com micoinseticidas.

A aplicação direta de conídios sobre o inseto leva a uma maior contaminação quantitativa quando comparada à aplicação indireta, ou seja, sobre uma área na qual o inseto entra em contato posteriormente (SCHOLTE et al., 2003; LUZ; BATAGIN, 2005). Estudos com *A. aegypti* e *M. anisopliae* comprovaram que a aplicação direta de conídios sobre ovos e a exposição à alta umidade proporcionaram um elevado crescimento fúngico sobre os ovos e uma reduzida taxa de eclosão (ALBERNAZ et al., 2009). Entretanto, métodos de aplicação indireta de conídios são mais importantes e realísticos para infectar adultos no campo, onde a pulverização direta de um micoinseticida parece inviável. Estudos recentes comprovam que fêmeas de *A. aegypti* fizeram oviposição sem considerar a presença de conídios no local da oviposição (LOBO; LUZ dados não publicados). Assim, ao colocar ovos em locais tratados com *M. anisopliae*, fêmeas e ovos provavelmente foram contaminados de forma indireta. Além disso, fêmeas contaminadas podem disseminar, no momento do acasalamento, o

patógeno para o macho, o que já foi comprovado em *An. gambiae* (SCHOLTE et al., 2004 b) e recentemente também em *A. aegypti* (GARCÍA-MUNGUÍA et al., 2011).

A aplicação de formulados de fungos, com alta atividade e resistência em locais de presença concentrada de adultos e ovos de mosquitos, como criadouros, sem exposição direta ao homem, parece ser uma estratégia promissora e segura para contaminar e infectar adultos e ovos e assim reduzir a população do vetor e o risco de transmissão da dengue.

2 JUSTIFICATIVA

Os altos gastos com inseticidas sintéticos, o aumento da resistência de *A. aegypti* aos mesmos, associados ao risco de produtos químicos para o meio ambiente e à saúde humana, incentivam a busca por medidas alternativas de controle deste mosquito. Medidas estas que sejam eficientes, economicamente viável e que causem menores danos ao meio ambiente. Formulações com fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae*, possuem especificidade elevada para artrópodes, não provocam danos à saúde humana e ao meio ambiente e atuam em ovos, larvas e adultos de mosquitos. Por estes motivos, os micoinseticidas são promissores para o controle integrado e sustentável de *A. aegypti*. Sendo assim, conhecimentos sobre a toxicidade de óleos vegetais e minerais e terra diatomácea para adultos de *A. aegypti*, contribuem para a escolha de um aditivo que potencialize a ação entomopatogênica do fungo em micoinseticidas sustentáveis e biorracionais para o controle biológico desse inseto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para o controle integrado de *A. aegypti* com fungos entomopatogênicos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a toxicidade de óleos e terra diatomácea em adultos de *A. aegypti*.

Avaliar a ação combinada de *M. anisopliae* com óleos e terra diatomácea na mortalidade de adultos de *A. aegypti*.

Avaliar o efeito de diferentes tempos de exposição de adultos de *A. aegypti* a conídios de *M. anisopliae* formulados em terra diatomácea e óleo mineral.

Avaliar o efeito de formulados sobre a conidiogênese quantitativa em mosquitos mortos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem e criação de *A. aegypti*

Larvas de *A. aegypti* não infectadas pelo vírus da dengue foram coletadas em Goiânia, Brasil, no ano de 1991, e originaram uma população de *A. aegypti* que foi criada em condições adequadas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. A população de mosquitos foi mantida em gaiolas acondicionadas em uma sala climatizada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 h. Machos e fêmeas foram alimentados em algodão de absorvente feminino (do tipo ob.) embebido em água açucarada. Para repasto sanguíneo as fêmeas se alimentaram em camundongos imobilizados em uma tela de náilon. No interior das gaiolas de criação, foi colocado um recipiente de vidro âmbar contendo água e um papel filtro, do tipo coador de café, para oviposição. Diariamente o papel filtro com ovos era coletado e colocado para secar em temperatura ambiente, e, em seguida, acondicionado em saco plástico constituindo uma “ovoteca”. Para obtenção de larvas, ovos aderidos ao papel filtro eram incubados em bacias brancas (30 cm de diâmetro x 7 cm de altura) contendo 2 L de água de torneira. Após eclosão as larvas eram transferidas para bacias novas e alimentadas com ração triturada para gato (Black Jack[®] Alisul Alimentos S.A.) até empuparem. Após a emergência, os adultos eram transferidos para as gaiolas de criação (SILVA et al., 1998).

4.2 Preparo de adultos para testes

Pupas foram transferidas para um recipiente plástico, com 100 ml de água de torneira, autoclavada, vedado com uma malha de filó e liga. Após a emergência, os mosquitos adultos foram transferidos, com auxílio de um “capturador de Castro”, para outro recipiente plástico, estes foram alimentados com solução açucarada a 10% embebida em algodão hidrófilo (Fig. 5). Os testes foram realizados com mosquitos adultos, emergidos entre 24 e 72 h.

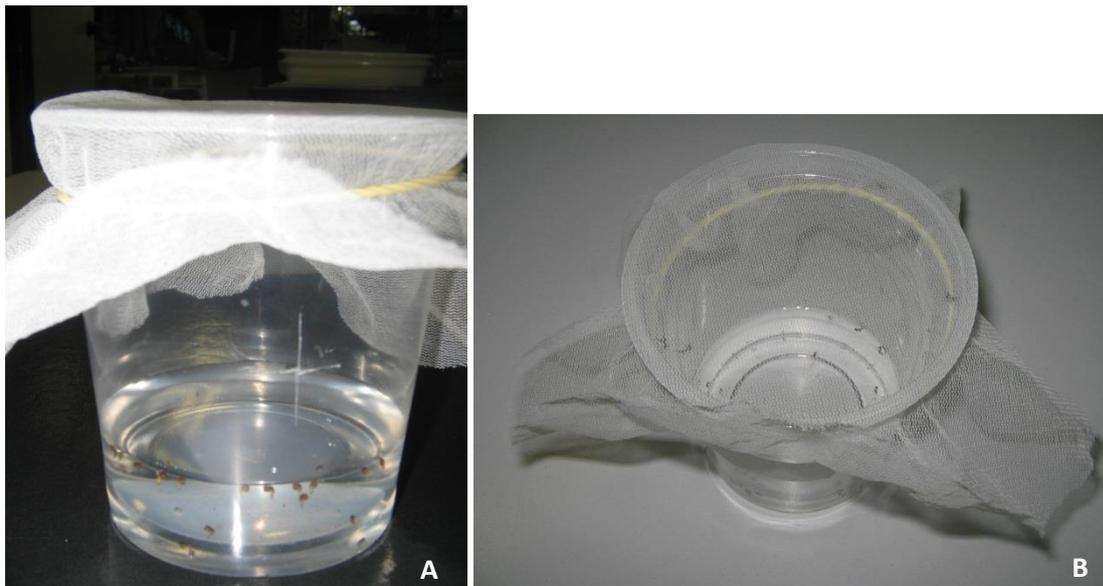


Figura 5- Preparo de adultos de *A. aegypti* para testes. A, pupas em 100 ml de água. B, adultos recém emergidos.

4.3 Origem e cultivo de *M. anisopliae*

M. anisopliae s. l. IP 46 foi coletado em solo de Cerrado do Centro-Oeste brasileiro em 2001 e está armazenado na Coleção de Fungos Entomopatogênicos do IPTSP/UFG. Para assegurar que a virulência do isolado não fora reduzida em função do armazenamento ou do cultivo *in vitro*, o isolado foi previamente passado em adultos de *A. aegypti* a cada três meses (LUZ et al., 2007), reisolado e então cultivado em meio BDA (batata, dextrose e ágar). O meio BDA foi preparado com 170 g de batatas descascadas e autoclavadas em 1.000 ml de água destilada. Após o cozimento, a mistura foi peneirada, acrescida de 20 g de dextrose, 18 g de ágar e água destilada até completar 1.000 ml e o pH ajustado em 7. Novamente, o meio foi autoclavado durante 20 minutos à 120°C e distribuído em placas de Petri (100 x 20 mm) esterilizadas, as quais, posteriormente, foram armazenadas a 4°C até a utilização. O isolado IP 46 foi cultivado em meio BDA, em placas de Petri a 25°C, 75 ± 10% de umidade relativa e fotofase de 12 h, durante 10 dias.

4.4 Preparo de recipiente para exposição de mosquitos a aditivos ou formulados

Para expor adultos a uma área tratada, foram usados copos plásticos transparentes e descartáveis de 500 ml (Copobras SBEDE Ltda, São Ludgero, SC) com área interna total de 336 cm². Para melhor aderência do óleo, da terra diatomácea e dos conídios à superfície, lixas (Norton® - Massa advance A257, n° 12E) foram usadas para lixar as laterais, o fundo do copo e a face interna da tampa. Para manter a umidade constante no interior do copo, após receber algum aditivo ou formulado, este foi perfurado nas laterais numa altura média. No total foram quarenta e cinco perfurações com 1 mm de diâmetro divididas em três grupos. No interior de cada copo foi fixado um frasco de vidro (2 cm de diâmetro x 4,5 cm de altura), contendo solução açucarada (sacarose) a 10% previamente autoclavada. Um papel filtro (5,5 cm de diâmetro) foi colocado em contato com a solução açucarada para que os adultos pudessem se alimentar (Fig. 6).



Figura 6- Preparo do copo plástico para exposição de adultos a aditivos ou formulados. A, copo sendo lixado. B, perfuração na lateral. C, copo contendo frasco de vidro com solução açucarada.

4.5 Aditivos

Os aditivos utilizados nos experimentos foram: óleo vegetal emulsionável Graxol[®] (G; Agrária Indústria e Comércio Ltda, Jardinópolis, SP), óleo mineral Naturol[®] (N; Farmax – Amaral Ltda, Divinópolis, MG) e terra diatomácea KeepDry[®] (KD; Irrigação Dias Cruz Ltda, São Paulo, Brasil). O óleo vegetal foi testado em duas concentrações (0,25 e 0,05µl/cm²), o óleo mineral a uma concentração de 0,25 µl/cm² e a terra diatomácea a 0,;6 mg/cm².

4.6 Preparo de formulados

Conídios foram raspados da superfície do meio com auxílio de espátula e colocados para secar em placas de Petri, sobre sílica gel, durante 5 dias a 4°C. Para a avaliação da quantidade de conídios, uma pequena alíquota com cerca de 2 mg de conídios secos foi pesada em balança analítica, e posteriormente, suspensa em 1 ml de água destilada estéril com Tween 80[®] a 0,1%. A suspensão foi agitada em vórtex e, após diluição, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Para a avaliação do efeito de diferentes concentrações de conídios em *A. aegypti*, conídios de IP 46 não formulados, foram padronizados em cinco concentrações 10⁵, 10⁶, 3,3 x 10⁶, 10⁷ e 3,3 x 10⁷ conídios/cm². Para avaliar o efeito do formulado em adultos de *A. aegypti*, conídios de IP 46 foram ajustados a uma concentração de 3,3 x 10⁶ conídios/cm². Nas combinações de IP 46 e óleo, Graxol[®] (0,05µl/cm²) ou Naturol[®] (0,25 µl/cm²) foi uniformemente espalhado em toda superfície interna do copo e em seguida os conídios foram aplicados sobre o mesmo. Já nos formulados com combinações de terra diatomácea, óleo e IP 46, conídios foram misturados com KeepDry[®] em um tubo de vidro e agitado em vórtex (Fig. 7). Após agitação, a mistura foi aplicada sobre o óleo que previamente foi espalhado na superfície do copo. No início de cada experimento, a viabilidade dos conídios (> 90 %) foi confirmada pela inoculação de 100 µl da suspensão de conídios, em placa de Petri contendo meio SDAY (Sabouraud, dextrose, ágar, extrato de levedura), preparado em laboratório, incubadas a 25 ± 1°C por até 24 h. A contagem de conídios germinados foi realizada com o uso de microscópio óptico.



Figura 7- Preparo de formulados. A, conídios sendo raspados da superf. meio. B, conídios em placa de Petri sobre sílica gel. C, pesagem de conídios. D, conídios misturados a KeepDry[®].

4.7 Bioensaios

4.7.1 Avaliação da toxicidade de aditivos para *A. aegypti*

Os aditivos foram avaliados separadamente, Graxol[®] (0,05 e 0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), Naturol[®] (0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) e KeepDry[®] (0,6 mg/cm^2) ou em combinações de KeepDry[®] e Graxol[®] (KD + G) e KeepDry[®] e Naturol[®] (KD + N). Óleos e terra diatomácea foram previamente autoclavados. Os óleos foram aplicados em toda superfície interna do copo com a ponta do dedo usando luvas enquanto KeepDry[®] foi aplicado com auxílio de pincel (Fig. 8). Dez mosquitos adultos foram colocados em cada copo imediatamente após aplicação dos aditivos, um copo sem tratamento também recebeu dez mosquitos

(grupo controle). Os copos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $75 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 h e a mortalidade foi avaliada diariamente durante 15 dias. Foram realizadas seis repetições em dias diferentes.

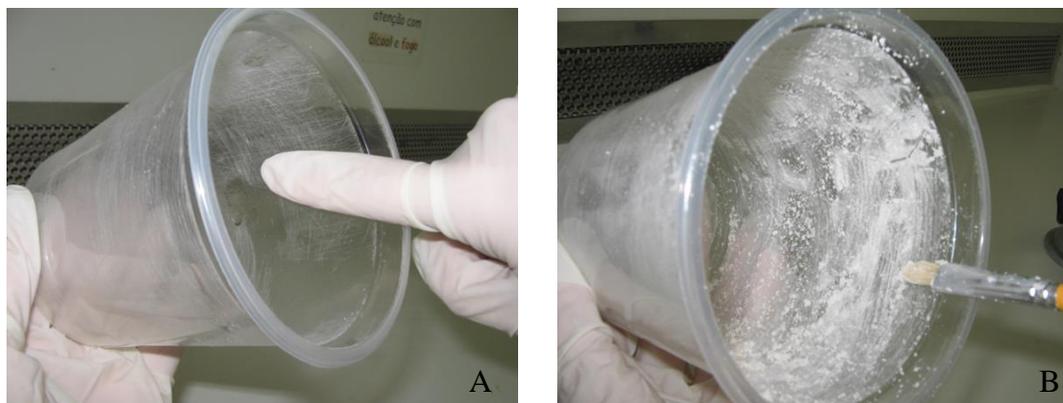


Figura 8- Aplicação de aditivos em copo plástico. A, Aplicação de óleo com a ponta do dedo. B, aplicação de KeepDry® com pincel.

4.7.2 Avaliação de diferentes concentrações de conídios em *A. aegypti*

Foram avaliadas cinco concentrações de conídios, 10^5 , 10^6 , $3,3 \times 10^6$, 10^7 e $3,3 \times 10^7$ conídios/cm². Conídios, em diferentes concentrações, foram aplicados com pincel no interior de copos plásticos. Após aplicação, cada copo recebeu dez mosquitos. Os copos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $75 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 h durante 15 dias e a mortalidade foi avaliada diariamente. Nas mesmas condições foi mantido um grupo de mosquitos em copo sem conídios (grupo controle). Foram realizadas quatro repetições independentes.

4.7.3 Avaliação de formulados em *A. aegypti*

Os formulados testados foram: KeepDry® e IP 46 (KD + IP 46); KeepDry® e Naturoi® e IP 46 (KD + N + IP 46); KeepDry® e Graxol® e IP 46 (KD + G + IP 46); Naturoi® e IP 46 (N + IP 46) e Graxol® e IP 46 (G + IP 46). Todos os formulados foram preparados e aplicados em copos como descrito no item 4.6. Após aplicação, cada copo recebeu dez mosquitos. Estes copos foram acondicionados a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $75 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 h durante 15 dias e a mortalidade foi avaliada diariamente. Dois

grupos controle foram mantidos nas mesmas condições: um grupo sem nenhum tratamento e outro com apenas conídios de IP 46 a $3,3 \times 10^6$ conídios/cm². Para a avaliação do efeito de aditivos em formulados de conídios de IP 46 em adultos de *A. aegypti*, os óleos (G a 0,05µl/cm² e N a 0,25 µl/cm²) e terra diatomácea (KD a 0,6 mg/cm²) em combinações ou separadamente, foram testados novamente ao mesmo tempo em que os formulados. Quatro repetições independentes foram realizadas.

4.7.4 Avaliação de diferentes tempos de exposição de *A. aegypti* a conídios de IP 46 formulados em terra diatomácea e óleo mineral

Grupos com dez mosquitos cada, foram utilizados para a exposição ao formulado IP 46 + KD +N e a três controles (copo contendo apenas IP 46 na concentração de $3,3 \times 10^6$ conídios/cm²; copo tratado com KD + N e copo sem tratamento). A exposição ocorreu em cinco tempos diferentes: 60 s (0,016 h), 12 h, 48 h, 72 h e 120 h. Copos plásticos contendo o formulado e os controles foram preparados do mesmo modo e mantidos nas mesmas condições como mencionadas anteriormente. Após cada período de exposição, os mosquitos foram acondicionados por 30 s em baixa temperatura (- 4°C) para imobilização temporária. Com o auxílio de um capturador, os mosquitos foram transferidos para novos copos contendo apenas frasco de vidro com solução açucarada a 10%. Quatro repetições independentes foram realizadas.

4.7.5 Avaliação da conidiogênese quantitativa sobre adultos mortos

Mosquitos mortos foram transferidos para placas de Petri com papel filtro esterilizados e incubados a umidades relativas perto de saturação ($\geq 98\%$) a 25° C e fotofase de 12 h. A formação de conídios sobre os cadáveres (conidiogênese) foi avaliada qualitativamente em dias alternados, durante 10 dias com auxílio de uma lupa estereoscópica. Passado o período de incubação, cada cadáver foi cuidadosamente colocado em tubo de vidro com 5 ml de solução aquosa de Tween 80[®] (0,1%) e pérolas de vidro e agitado em vórtex por 3 minutos (Fig. 9). A concentração de conídios foi estimada em câmara de Neubauer e ajustado o número de conídios/ml em 5 ml. Foram realizadas quatro repetições independentes, tanto para mosquitos mortos que tinham

sido expostos a diferentes concentrações de conídios, quanto para mosquitos mortos que foram expostos a diferentes formulados.



Figura 9 - Transferência de mosquitos mortos após período de incubação para tubos de ensaio de vidro com Tween 80[®] (0,1%).

4.8 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados foram examinados com análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. Médias foram consideradas significativamente diferentes com $p < 0,05$. Para cálculo do tempo letal (TL) e concentração letal (CL) de 50 e 90% dos indivíduos foi realizada análise de probit.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito de aditivos sobre a mortalidade acumulada

Mosquitos adultos expostos à terra diatomácea (KD), apresentaram uma leve alteração no comportamento. Estes mosquitos, em comparação aos mosquitos expostos a óleos (vegetal ou mineral) e aos mosquitos do grupo controle, tiveram uma maior frequência da fricção das patas entre si e das patas contra a cabeça, principalmente nas antenas e probóscida.

Os primeiros adultos morreram entre 24 e 72 h de exposição a Graxol[®] a 0,25 e 0,05 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Nos grupos de mosquitos expostos a KD, ao óleo mineral (N) ou às combinações de KD e óleos (N ou G), a mortalidade iniciou a partir do 4º dia de exposição. Neste período, todos os adultos do grupo controle tinham sobrevivido. A mortalidade acumulada até o 5º dia de exposição variou entre 5% (KD combinado com G a 0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) e 31,7% (G a 0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), não havendo efeito do aditivo sobre a mortalidade ($F_{6,35} = 2,3$; $P = 0,06$; Tab 1). Com 15 dias de exposição, o efeito dos aditivos sobre a mortalidade acumulada foi significativamente diferente ($F_{6,35} = 31,9$; $P < 0,001$; Tab. 1) de KD com óleos e para KD e G nas duas concentrações (Fig. 10). Os tempos letais para matar 50% (TL_{50}) dos adultos foram de 5,3 dias para G a 0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ e 10,8 dias para N, e o TL_{90} variou entre 10,1 dias (G a 0,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) e 18,4 dias (N) (Tab. 1).

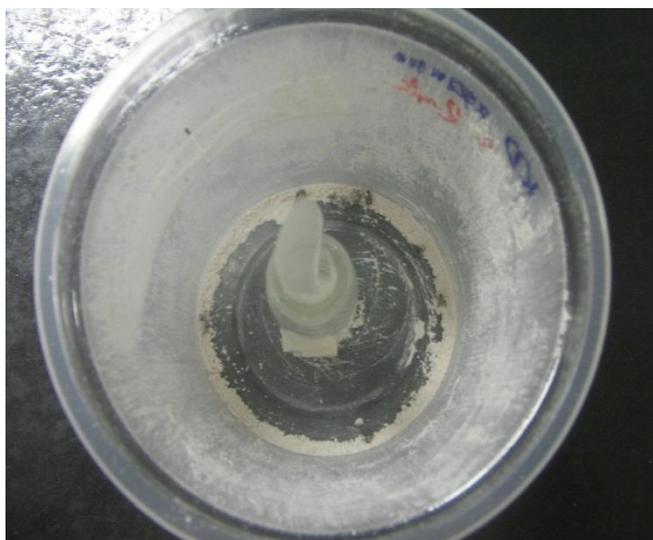


Figura 10- Copo com mosquitos mortos após 15 dias de exposição à KeepDry[®].

5.2 Efeito da concentração de conídios sobre a mortalidade acumulada

Os adultos sobreviveram nos dois primeiros dias de exposição ao *M. anisopliae* IP 46 independentemente das concentrações de conídios testadas (10^5 a $3,3 \times 10^7$ conídios/cm²). Os primeiros mosquitos mortos foram encontrados após 3 dias de exposição, nas concentrações 10^7 e $3,3 \times 10^7$ conídios/cm² e a partir do 4º dia nas demais concentrações. Houve um efeito altamente significativo da concentração na mortalidade acumulada em até 5 dias ($F_{5,18} = 47,4$; $P < 0,001$) e 15 dias ($F_{5,18} = 32$; $P < 0,001$; Tab. 2). As concentrações letais para matar 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) dos adultos foram de $5,8 \times 10^6$ e $1,7 \times 10^7$ conídios/cm² com 5 dias de exposição, e $2,7 \times 10^5$ e $2,4 \times 10^6$ conídios/cm² com 10 dias de exposição respectivamente (Tab. 3). Na maior concentração de conídios ($3,3 \times 10^7$ conídios/cm²) foram encontrados os menores valores de TL₅₀ e TL₉₀ com 3,8 e 4,6 dias, respectivamente. Na menor concentração de conídios testada (10^5 conídios/cm²), os mosquitos adultos sobreviveram por mais tempo com TL₅₀ de 11,7 dias e TL₉₀ de 19,3 dias (Tab. 2). Não houve mortalidade no grupo controle em nenhuma repetição. Com base no valor de CL₅₀ ($5,8 \times 10^6$) e seu respectivo intervalo de confiança ($2 \times 10^6 - 1,3 \times 10^7$) para 5 dias de exposição, a concentração de $3,3 \times 10^6$ conídios/cm² foi selecionada para avaliar o efeito de aditivos em formulações com conídios de IP 46 em *A. aegypti*.

5.3 Efeito de formulados sobre a mortalidade acumulada

A mortalidade iniciou ao 3º dia de exposição ao formulado IP 46 + KD e ao formulado IP 46 + KD + N. Em grupos de mosquitos expostos somente a conídios de IP 46 e ao formulado IP 46 + KD + G, a mortalidade teve início a partir do 4º de exposição, enquanto que, para os demais formulados (IP 46 + N e IP46 + G) foi a partir do 5º dia (Tab. 4). O efeito dos formulados sobre a mortalidade acumulada foi significativamente diferente tanto em até 5 dias de exposição ($F_{11,36} = 2,2$; $P = 0,03$) quanto em 15 dias ($F_{11,36} = 16,3$; $P < 0,001$; Tab. 4). Em 5 dias de exposição não houve mortos em grupos de mosquitos expostos apenas a Graxol® a $0,05 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ e no grupo controle, já nos demais formulados e aditivos a mortalidade acumulada variou entre 7,5% (KD; KD + N; KD + G; IP 46 + N; IP 46 + G) e 30% (N; IP 46 + KD + G). Com

15 dias de exposição não houve mortalidade no grupo controle e os valores da mortalidade acumulada foram de 17,5% (G) e acima de 75% nos demais formulados e aditivos (Tab. 4). O tempo letal para matar 50% (TL₅₀) dos adultos foi de 5,8 dias para o formulado IP 46 + KD e IP 46 + KD + N e 17,6 dias para o aditivo G. Para matar 90% (TL₉₀), os valores variaram entre 7,5 dias para o formulado IP 46 + KD + N e 21,9 dias para o aditivo G. A adição da combinação de terra diatomácea com óleo (G ou N) aos conídios de IP 46, diminuíram o tempo necessário para matar 90% dos mosquitos (TL₉₀) comparado ao TL₉₀ apresentado por apenas conídios de IP 46 (Tab. 4). Isso demonstra um leve efeito dos aditivos nos formulados de IP 46.

5.4 Efeito do tempo de exposição sobre a mortalidade acumulada

Mosquitos mortos foram encontrados a partir do 3º dia de avaliação independentemente do tempo que estiveram expostos ao formulado (IP 46 + KD + N), ao fungo (IP 46) ou à combinação da terra diatomácea com o óleo mineral (KD + N). Não houve efeito do tempo de exposição na mortalidade acumulada em até 5 dias de avaliação ($F_{14,45} = 1,3$; $P = 0,25$). Os valores da mortalidade acumulada para esse período variaram entre 10% para grupos de mosquitos expostos ao KD + N por 0,016 h e 38% para mosquitos expostos ao formulado (IP 46 + KD + N) durante 120 h (Tab. 5). Com 15 dias de avaliação houve efeito do tempo de exposição na mortalidade acumulada ($F_{14,45} = 2,7$; $P = 0,006$), com valores de 42,5% para mosquitos expostos a KD + N por 0,016 h e acima de 67,5% para os demais grupos de mosquitos (Tab. 5). Grupos de mosquitos expostos ao formulado (IP 46 + KD + N) durante 120 h apresentaram menor tempo para matar 50 e 90% dos indivíduos com valores de 5,2 e 7,8 dias, respectivamente. Enquanto que grupos expostos ao KD + N por 0,016 h, apresentaram os maiores valores tanto para TL₅₀ (11,4 dias) quanto TL₉₀ (25 dias). Uma análise de variância foi realizada separadamente para cada tratamento: formulado com 5 dias de avaliação ($F_{4,15} = 0,7$; $P = 0,6$), com 15 dias de avaliação ($F_{4,15} = 0,90$; $P = 0,5$); terra diatomácea e óleo mineral ($F_{4,15} = 1,7$; $P = 0,2$; $F_{4,15} = 1,3$; $P = 0,3$) para o 5º e 15º dia de avaliação respectivamente e para conídios de IP 46 com $F_{4,15} = 0,3$; $P = 0,9$ no 5º dia de avaliação e $F_{4,15} = 0,9$; $P = 0,5$ no 15º dia de avaliação. Estes resultados mostraram que não houve efeito do tempo de exposição na mortalidade acumulada (Fig.

11, 12 e 13). A mortalidade no grupo controle (copo sem tratamento) durante todo período de avaliação foi menor que 5% (Tab. 5).

5.5 Efeito de formulados sobre a conidiogênese quantitativa

O crescimento de micélio sobre adultos mortos iniciou com 2 dias de incubação em câmara úmida, independentemente da concentração de conídios, do tipo de formulado a que os mosquitos foram expostos anteriormente e do tempo de exposição aos mesmos. Novos conídios de IP 46 sobre cadáveres foram visualmente detectados a partir do 3º dia de incubação nas formulações de KD em combinação com óleos (IP 46 + KD + N e IP 46 + KD + G), e a partir do 4º dia nas demais formulações e em todas as concentrações de conídios testadas (Fig. 14). Em mosquitos expostos somente a conídios em concentrações diferentes, o número de conídios encontrados nos cadáveres, após uma incubação de 10 dias, variou entre $4,9 \times 10^6$ (a 10^5 conídios/cm²) e $13,4 \times 10^6$ conídios (a $3,3 \times 10^7$ conídios/cm²), e não houve efeito significativo da concentração inicial de conídios testada sobre a conidiogênese quantitativa em mosquitos mortos ($F_{4,10} = 1,3$; $P = 0,36$; Tab. 2). Já em mosquitos expostos a diferentes formulados, a conidiogênese quantitativa sobre os cadáveres foi significativamente diferente ($F_{5,139} = 12$; $P < 0,01$; Tab. 4). Os valores de conídios encontrados em cada mosquito morto variaram entre $3,8 \times 10^6$ conídios (IP 46 + G) e $5,7 \times 10^6$ conídios (IP 46 + KD + G). Também foi encontrada diferença significativa ($F_{9,158} = 3,67$; $P = 0,003$; Tab. 5) no número de conídios sobre os cadáveres de mosquitos que foram expostos em tempos diferentes ao fungo e ao formulado IP 46 + KD + N.



Figura 11- Novos conídios de *Metarhizium anisopliae* em *Aedes aegypti*, após 10 dias de incubação.

Tabela 1. Mortalidade acumulada (%; \pm erro padrão, EP) com 5 e 15 dias de exposição e tempo letal (dias) para matar 50 ou 90% (TL50 e TL90 com respectivos intervalos de confiança de 95%, slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a aditivos separadamente ou em combinações.

Aditivos	Concentração /cm ²	Mortalidade acumulada		Tempo letal		
		5 dias	15 dias	TL ₅₀	TL ₉₀	Slope \pm EP
Sem aditivos		0	8,3 \pm 2,6 a	*	*	-
kD	0,6 mg	11,7 \pm 5A	96,7 \pm 2,6 c	8,9 (6,8 - 10,9) b	13,3 (11,3 - 17,3) b	0,3 \pm 0,03
N	0,25 μ L	10 \pm 4,3	76,6 \pm 7,5 b	10,8 (8,5 - 13,3) b	18,4 (15,5 - 23,6) c	0,2 \pm 0,02
G	0,25 μ L	31,7 \pm 10,3	100 c	5,3 (3 - 7,5) a	10,1 (7,8 - 14,7) a	0,3 \pm 0,03
	0,05 μ L	25 \pm 9	95 \pm 4,5 c	8,1 (4,3 - 11,7) b	15 (11,4 - 23,7) bc	0,2 \pm 0,02
kD + N	0,6 mg e 0,25 μ L	10 \pm 5,5	93,3 \pm 4,5 c	8,5 (6,7 - 10,2) b	11,8 (10,1 - 15,2) b	0,4 \pm 0,03
kD + G	0,6 mg e 0,25 μ L	5 \pm 1,8	100 c	9 (8,3 - 9,8) b	12,8 (11,9 - 14,1) b	0,3 \pm 0,03
	F _{6,25}	2,3	31,9	-	-	
	P	0,06	< 0,001	-	-	

Dez adultos foram expostos a copo plástico com 336 cm² de área total da superfície interna, previamente tratada ou não (controle) com KeepDry® (KD), óleo mineral Naturool® (N), óleo vegetal Graxol® (G), combinados KD e N ou KD e G, incubados a 75 \pm 5% UR e 25 \pm 1°C até 15 dias. Os valores (calculados para seis repetições independentes) na mesma coluna (mortalidades com base em análise de variância e teste SNK, $P < 0,05$; TL₅₀ e TL₉₀ IC 95%), seguidos por letra diferentes (a – c), foram significativamente diferentes entre si. *Mortalidade insuficiente para calcular TL₅₀ e TL₉₀.

Tabela 2. Mortalidade acumulada (%; \pm erro padrão, EP) com 5 e 15 dias de exposição e tempo letal (dias) para matar 50 ou 90% (TL50 e TL90 com respectivos intervalos de confiança de 95%, slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a *Metarhizium anisopliae* IP 46; conidiogênese quantitativa na fase saprobiótica.

Conídio/cm ²	Mortalidade acumulada			Tempo letal		Conídios por adulto ** (\pm SE)
	5 dias	15 dias	TL ₅₀	TL ₉₀	Slope \pm SE	
0	0 a	0 a	*	*	-	-
10 ⁵	7,5 \pm 3 a	75 \pm 3,2 b	11,7 (9,8 - 14) c	19,3 (16,6 - 23,6) b	0,2 \pm 0,02	4,9 (\pm 1,4) a
10 ⁶	45 \pm 4,4 b	100 c	7,5 (5,3 - 9,5) b	12,4 (10,3 - 16,5) b	0,3 \pm 0,03	8,7 (\pm 3,7) a
3,3 x 10 ⁶	20 \pm 4,6 a	100 c	7,2 (4,2 - 9,9) bc	11,9 (9,4 - 18,7) b	0,3 \pm 0,04	7,6 (\pm 1,6) a
10 ⁷	77 \pm 6 c	100 c	4,2 (0,5 - 6,9) ab	7,2 (5,2 - 17,5) b	1,7 \pm 0,25	8,7 (\pm 1) a
3,3 x 10 ⁷	97 \pm 1,7 d	100 c	3,8 (3,6 - 4) a	4,6 (4,3 - 4,9) a	0,3 \pm 0,07	13,4 (\pm 2,3) a
F _{5,18}	47,4	32	-	-		F _{4,10} 1,4
P	< 0,001	< 0,001	-	-		P 0,4

Dez adultos foram expostos a copo plástico com 336 cm² de área total da superfície interna, previamente tratada ou não (controle) com diferentes concentrações de conídios e incubados a 75 \pm 5% UR e 25 \pm 1°C até 15 dias. Os valores (calculados para quatro repetições independentes) na mesma coluna (mortalidades com base em análise de variância e teste SNK, $P < 0,05$; TL₅₀ e TL₉₀ com seu IC 95%), seguidas por letras diferentes (a – d), foram significativamente diferentes entre si. *Mortalidade insuficiente para calcular TL₅₀ e TL₉₀. **Valores multiplicados por 10⁶.

Tabela 3. Concentração letal (conídios/ cm² dias) para matar 50 ou 90% (CL₅₀ e CL₉₀ com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a *Metarhizium anisopliae* IP 46.

Dias	CL ₅₀	CL ₉₀	Slope ± EP
5	5,8 x 10 ⁶ (2 x 10 ⁶ - 1,3 x 10 ⁷) a	1,7 x 10 ⁷ (9,2 x 10 ⁶ - 7,1 x 10 ⁷) a	2,7 ± 0,11
10	2,7 x 10 ⁵ (1,3 x 10 ⁵ - 4 x 10 ⁵) b	2,4 x 10 ⁵ (1,5 x 10 ⁵ - 4 x 10 ⁵) b	1,1 ± 0,13

Dez adultos foram expostos a copo plástico com 336 cm² de área total da superfície interna, previamente tratada com diferentes concentrações de conídios (10⁵ – 3,3 x 10⁷ conídios/ cm²) e incubados a 75 ± 5% UR e 25 ± 1°C até 15 dias. Os valores (calculados para quatro repetições independentes) na mesma coluna seguidos por letras diferentes (a – b) foram significativamente diferentes entre si.

Tabela 4. Mortalidade acumulada (%; ± erro padrão, EP) com 5 e 15 dias de exposição e tempo letal (dias) para matar 50 ou 90% (TL₅₀ e TL₉₀ com respectivos intervalos de confiança de 95%, slopes e EP) de adultos de *Aedes aegypti*, expostos a aditivos separadamente ou a combinações de diferentes formulados de *Metarhizium anisopliae* IP 46; conidiogênese quantitativa na fase saprobiótica.

Aditivos ou formulados	Mortalidade acumulada			Tempo letal		Conídios por adulto** (± EP)
	5 dias	15 dias	TL ₅₀ (IC)	TL ₉₀ (IC)	Slope ± EP	
Controle	0 a	0a	*	*	-	-
KD	7,5 ± 4 ab	87,5 ± 8,2 c	10,4 (8,6 - 12,2) b	17,2 (14,9 - 20,6) c	0,2 ± 0,02	-
N	30 ± 15 b	77,5 ± 14 c	9,7 (0 - 30,7) ab	19,8 (12,4 - 179,8) c	0,1 ± 0,02	-
G	0 a	17,5 ± 6 b	17,6 (15,9 - 30,8) b	21,9 (18,1 - 49,7) c	0,3 ± 0,1	-
KD + N	7,5 ± 4 ab	92,5 ± 4 c	8,9 (7,7 - 10,2) ab	13,9 (12,5 - 18,9) c	0,3 ± 0,03	-
KD + G	7,5 ± 2 ab	97,5 ± 2 c	9,8 (7,9 - 11,9) ab	15,1 (12,9 - 18,9) c	0,2 ± 0,03	-
IP 46	22,5 ± 6 b	100 c	6,4 (5,7 - 7) a	9 (8,2 - 10,1) b	0,5 ± 0,06	5 (± 0,3) b
IP 46 + KD	17,5 ± 9 b	100 c	5,8 (4 - 8) a	7,9 (6,4 - 14,6) ab	0,6 ± 0,08	6,3 (± 0,06) c
IP 46 + N	7,5 ± 4 ab	85 ± 6 c	10,2 (1,8 - 19) ab	17,9 (12,6 - 54,6) c	0,2 ± 0,02	2,8 (± 0,1) a
IP 46 + G	7,5 ± 6 ab	75 ± 13 c	10,2 (0,3 - 23,4) ab	18,5 (12,6 - 87,5) c	0,2 ± 0,02	3 (± 0,1) ab
IP 46 + KD + N	25 ± 2b	100 c	5,8 (5,4 - 6,3) a	7,5 (6,9 - 8,3) a	0,8 ± 0,1	4 (± 0,9) b
IP 46 + KD + G	30 ± 9b	100 c	5,9 (5,4 - 6,3) a	7,6 (7 - 8,5) a	0,7 ± 0,1	6 (± 0,2) c
F _{11,36}	2,3	16,3	-	-		F _{5,135} 12
P	0,03	< 0,001	-	-		P < 0,01

Dez adultos foram expostos a conídios de IP 46 (3,3 x 10⁶ conídios/ cm²) ou com KeepDry® (KD) a 0,6 mg/cm², óleo mineral Naturol® (N) a 0,25 µL/ cm², óleo vegetal Graxol® (G) a 0,05 µL/ cm², combinados KD + N ou KD + G ou combinados com conídios de IP 46 (IP 46 + KD; IP 46 + N; IP 46 + G; IP 46 + KD + N; IP 46 + KD + G), incubados a 75 ± 5% UR e 25 ± 1°C até 15 dias. Os valores (calculados para quatro repetições independentes) na mesma coluna (mortalidades com base em análise de variância e teste SNK, P < 0,05; TL₅₀ e TL₉₀ IC 95%), seguidos por letra diferentes (a – c), foram significativamente diferentes entre si. * Mortalidade insuficiente para calcular TL₅₀ e TL₉₀. ** Valores multiplicados por 10⁶

Tabela 5. Mortalidade acumulada (%; \pm erro padrão, EP) do 5º e 15º dia de avaliação de grupos de adultos de *Aedes aegypti* expostos a conídios de *Metarhizium anisopliae* IP 46 formulados em terra diatomácea e óleo mineral em tempos diferentes e tempos letais (dias) para matar 50 e 90% (TL₅₀ e TL₉₀ com respectivos intervalos de confiança de 95%, slope e EP) e conidiogênese quantitativas na fase saprobiótica.

Conídios IP 46	Aditivos KD + N	Tempo de exposição (h)	Mortalidade acumulada		Tempo letal			Conídios por adulto **	
			5 Dias	15 Dias	TL ₅₀ (IC)	TL ₉₀ (IC)	Slope (\pm EP)	(\pm EP)	
-	+	0,016	10 \pm 7,5	42,5 \pm 22,5 a	*	*	-	-	
-	+	12	30 \pm 15,4	67,5 \pm 12 ab	11,4 (3-26,7) bc	25 (16,1-82) b	0,1 \pm 0,02	-	
-	+	48	17,5 \pm 5,4	82,5 \pm 7,4 ab	10,5 (6,1-16) abc	18,7 (14-33) b	0,1 \pm 0,03	-	
-	+	72	17,5 \pm 6,5	77,5 \pm 7,4 ab	11,3 (4,1-21,4) c	21 (14,6-57,4) b	0,1 \pm 0,02	-	
-	+	120	0	75 \pm 9 ab	10,8 (5,5-17,8) ab	19,8 (14,4-41,9) b	0,1 \pm 0,03	-	
+	-	0,016	22,5 \pm 11,4	77,5 \pm 11,4 ab	9,6 (7,4-12) ab	18 (15,2-23,2) b	0,1 \pm 0,03	4,3 \pm 6 abc	
+	-	12	27,5 \pm 12	90 \pm 8,6 b	8,1 (2,1-13,3) bc	16,8 (12-33,7) a	0,1 \pm 0,03	4,4 \pm 7,3 bc	
+	-	48	20 \pm 14,58	90 \pm 8,6 b	8,1 (7-9,3) ab	12,7 (11,2-15) a	0,3 \pm 0,04	8,4 \pm 9,6 c	
+	-	72	32,5 \pm 4,1	97,5 \pm 2,2 b	8,3 (6,5-10) ab	15 (13-18,2) a	0,2 \pm 0,03	6,3 \pm 7,2 abc	
+	-	120	32,5 \pm 7,4	100 b	5,9 (5-6,7) a	9 (8-10,4) ab	0,4 \pm 0,06	4,2 \pm 7,9 a	
+	+	0,016	27,5 \pm 8,2	90 \pm 8,6 b	7 (5,3-8,4) ab	13 (11-15,7) ab	0,2 \pm 0,03	5,5 \pm 5,8 bc	
+	+	12	17,5 \pm 7,4	85 \pm 10,3 ab	8,7 (7-10) ab	15,4 (13,2-18,9) ab	0,2 \pm 0,03	5,8 \pm 9,3 abc	
+	+	48	35 \pm 10,3	95 \pm 4,3 b	6,4 (1,8-10,2) b	12,1 (8,7-22,1) ab	0,2 \pm 0,03	5,5 \pm 4,8 bc	
+	+	72	37,5 \pm 9	100 b	5,8 (5,1-6,4) a	8,2 (7,5-9,3) a	0,5 \pm 0,06	7,7 \pm 8,4 ab	
+	+	120	38 \pm 14	100 b	5,2 (4,5-5,8) a	7,8 (7-8,9) a	0,5 \pm 0,06	4,3 \pm 6,3 a	
			$F_{14,45}$	1,3	2,7	-	-	$F_{9,158}$ 3,7	
			P	0,25	0,006	-	-	P 0,003	

Dez adultos foram expostos em tempos diferentes: 0,016 h (60 s), 12 h, 48 h, 72 h e 120 h, a conídios de IP46 ($3,3 \times 10^6$ conídios/cm²) formulados em KeepDry® (KD) a 0,6 mg/cm² e óleo mineral Naturol® (N) a 0,25 μ l/cm² (IP 46 + KD + N) incubados a 75 \pm 5% UR e 25 \pm 1° C até 15 dias. Os valores (calculados para quatro repetições independentes) na mesma coluna (mortalidades com base em análise de variância e teste SNK, $P < 0,05$; TL₅₀ e TL₉₀ com seu IC 95%), seguidos por letra diferentes (a – c), foram significativamente diferentes entre si. * Mortalidade insuficiente para calcular TL₅₀ e TL₉₀. ** Valores multiplicados por 10⁶.

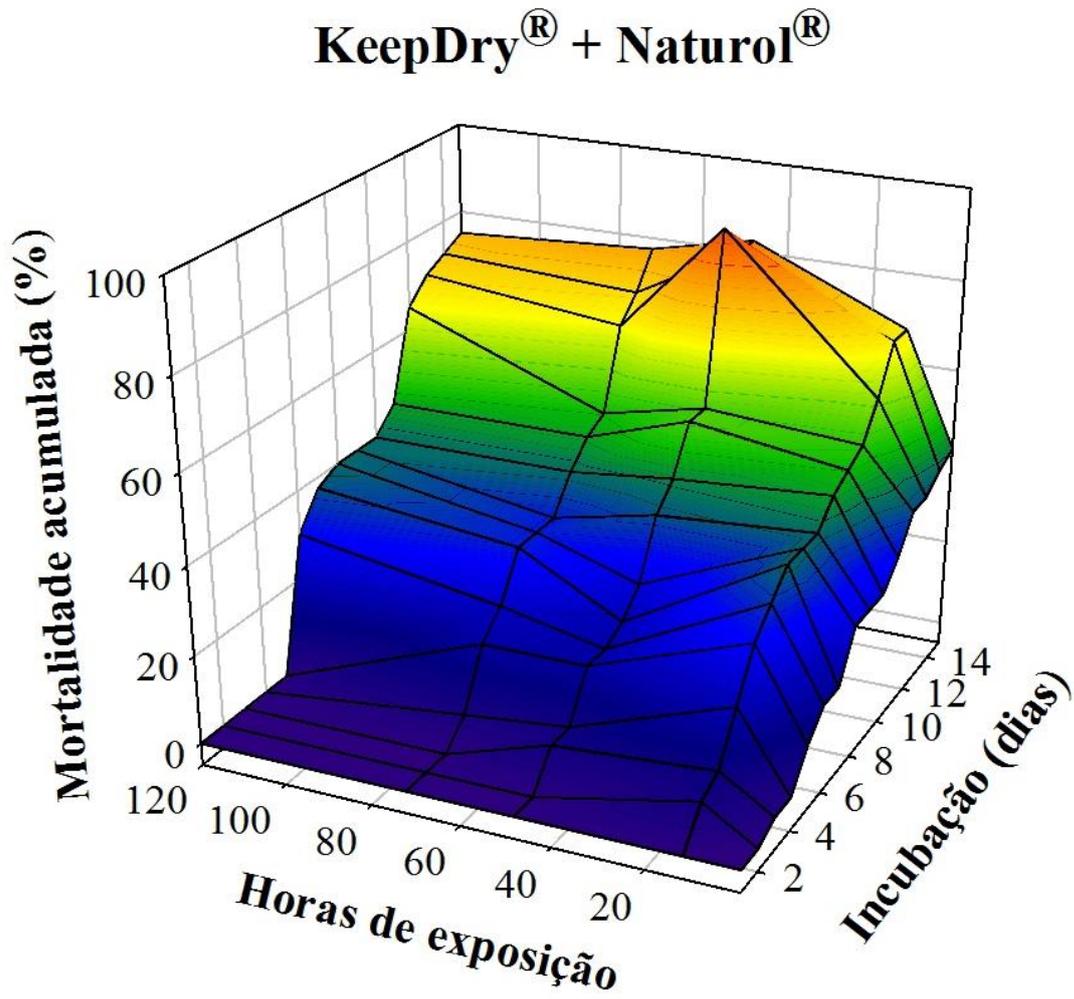


Figura 12. Mortalidade acumulada de *Aedes aegypti* após exposição, em diferentes tempos, à combinação de terra diatomácea e óleo mineral (KD + N).

Metarhizium anisopliae IP 46

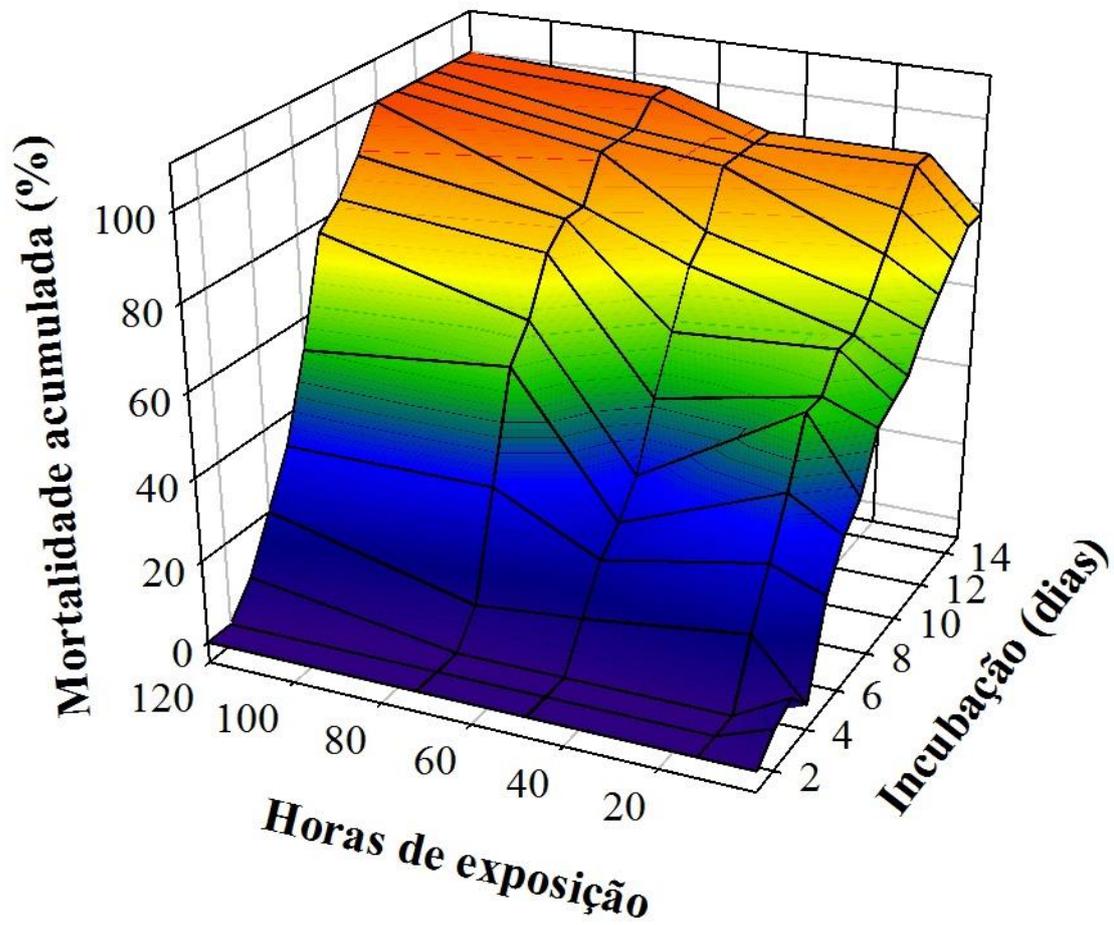


Figura 13. Mortalidade acumulada de *Aedes aegypti* após exposição, em diferentes tempos, a conídios de *Metarhizium anisopliae* IP 46 a $3,3 \times 10^6$ conídios/cm².

Formulado

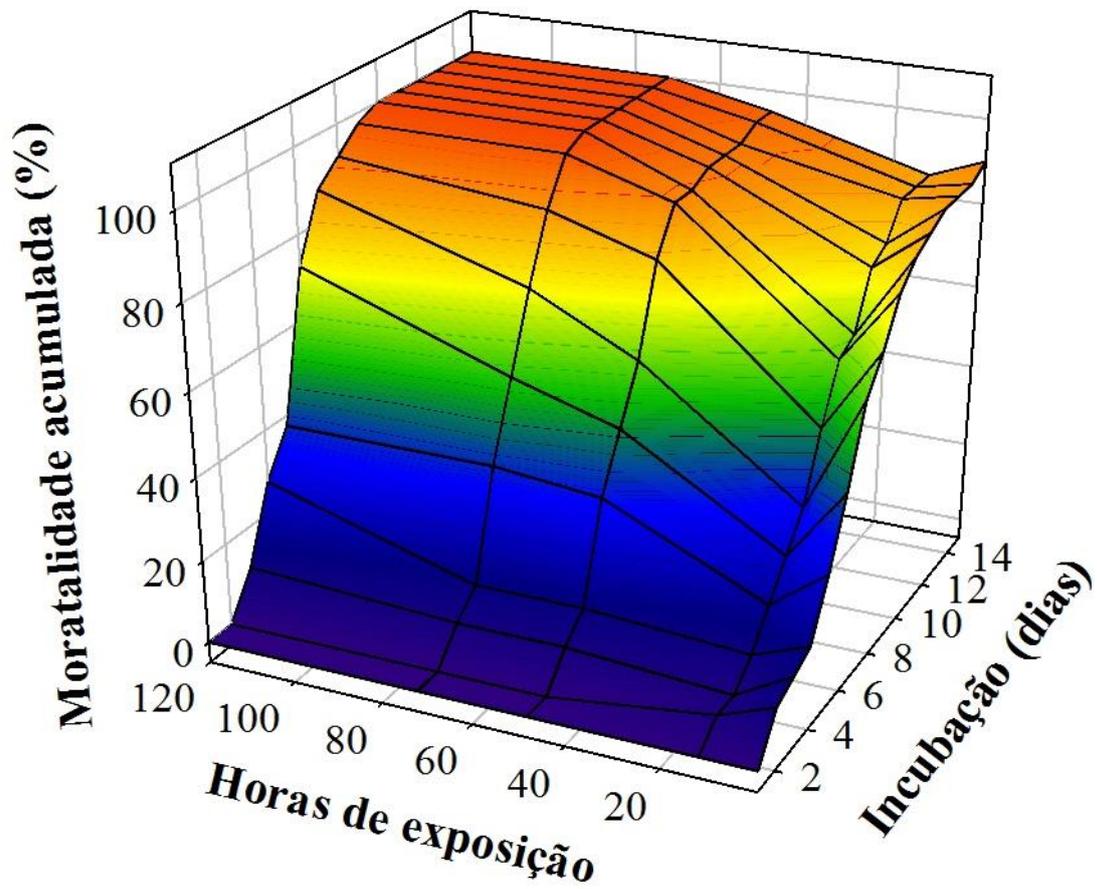


Figura 14. Mortalidade acumulada de *Aedes aegypti* após exposição, em diferentes tempos, a conídios de *Metarhizium anisopliae* IP 46 a $3,3 \times 10^6$ conídios/cm² formulados em terra diatomácea e óleo mineral (IP 46 + KD + N).

6 DISCUSSÃO

6.1 Toxicidade de aditivos

A toxicidade é a medida do potencial tóxico de uma substância. Alguns fatores como: frequência da exposição, duração da exposição e via de administração influenciam na toxicidade. Além disso, existe uma relação direta ente a frequência e a duração da exposição no efeito tóxico de uma substância (VERNALHA et al., 1977). Neste estudo, a toxicidade dos aditivos foi comprovada mediante a mortalidade acumulada de adultos de *A. aegypti*. Sendo assim, os resultados mostraram que a terra diatomácea (KD) e ambos os óleos, mineral (N) e vegetal (G), separadamente ou em combinações nas concentrações testadas, apresentam toxicidade para os mosquitos adultos de *A. aegypti*. Pois em uma exposição prolongada, houve efeito altamente significativo dos aditivos na mortalidade acumulada dos mesmos.

O efeito tóxico da terra diatomácea está bem esclarecido para pragas de grãos armazenados e insetos urbanos, e este produto é comercializado como inseticida para o controle destes insetos (ALVES et al., 2006, FAULDE et al., 2006; ATHANASSIOU et al., 2007). Porém, em mosquitos adultos, os efeitos da terra diatomácea ainda não estão bem estabelecidos. Em um experimento com escolha multiopcional para sítios de oviposição, Lobo e Luz, (dados não publicados), mostraram que tanto fêmeas quanto machos de *A. aegypti*, pousaram sobre papel filtro tratado com terra diatomácea independentemente da concentração testada. Indicando então, que possivelmente, não há um efeito repelente deste produto para adultos de *A. aegypti*. Em outro estudo, Luz et al. 2012 no prelo, mostraram que terra diatomácea não possui ação repelente nem efeito tóxico para ninfas de *Triatoma. infestans*.

A ação abrasiva e absorvente da terra diatomácea, provavelmente, provocou um estresse nos mosquitos adultos, tornando-os assim mais susceptíveis à atividade tóxica da mesma. Isso pode ser explicado pelo aumento do mecanismo de limpeza da superfície do próprio corpo apresentado pelos adultos expostos à terra diatomácea quando comparados aos demais tratamentos.

No presente estudo, os resultados comprovaram o efeito tóxico do óleo vegetal Graxol[®] mesmo em baixa concentração do óleo (0,05 µl/cm²). A vulnerabilidade destes

adultos ao óleo vegetal pode ter aumentada devido ao estresse provocado pela incubação ou por substâncias tóxicas eventualmente geradas pela degradação química do óleo pela microbiota presente na cutícula (LUZ et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo onde o mesmo óleo vegetal foi testado em três concentrações (0,1, 1 e 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) e as concentrações crescentes do óleo não só aumentaram a mortalidade dos mosquitos como também repeliram fêmeas grávidas (Lobo e Luz dados não publicados). Fica claro então que, óleo vegetal Graxol[®], além de apresentar atividade tóxica para adultos de *A. aegypti* possui ação repelente aos mesmos.

A toxicidade de óleo mineral para adultos de *A. aegypti* não está esclarecida, uma vez que, até esse momento, nenhum estudo foi encontrado referente ao efeito tóxico ou repelente de óleos minerais para mosquitos de *A. aegypti*. Sendo assim, os resultados deste estudo relatam pela primeira vez a toxicidade de um óleo mineral (Naturol[®]) para mosquitos adultos, por meio de uma exposição prolongada.

A combinação de terra diatomácea e óleos (vegetal ou mineral) não reforçou o efeito tóxico destes aditivos em adultos. Talvez isso tenha ocorrido porque a terra diatomácea absorveu o óleo retardando assim a eficácia de ambos. Resultados diferentes foram mostrados por LUZ et al., (2012 no prelo), onde a combinação de terra diatomácea e óleo vegetal apresentou um efeito altamente significativo sobre a mortalidade acumulada de ninfas de *T. infestans*.

6.2 Susceptibilidade de *A. aegypti* a *M. anisopliae* formulado ou não

Adultos de *A. aegypti* são altamente susceptíveis à infecção fúngica (LELES et al., 2010, GARCÍA-MUNGUÍA, 2011). Os resultados mostraram que independentemente da concentração de conídios, *M. anisopliae* IP 46 apresenta toxicidade contra os adultos de *A. aegypti* mesmo em condições subotimais para o desenvolvimento do fungo (75% UR). Porém, maiores concentrações do fungo (10^7 e $3,3 \times 10^7$ conídios/ cm^2), precisaram de menos tempo para matar os adultos. Dados semelhantes a estes foram relatados por SCHOLTE et al., 2003, mostrando que maiores concentrações de *M. anisopliae* também levam menor tempo para matar adultos de *An. gambiae*.

A combinação de IP 46 com terra diatomácea e óleos mostrou um leve efeito sinérgico porque matou mais mosquitos em menor tempo quando comparado a somente conídios de IP 46. Isso provavelmente ocorreu porque o óleo não só aumentou a adesão de conídios na cutícula do adulto (LUZ & BATAGIN, 2005) como também de partículas de sílica. Sendo a abrasão e o dissecamento da cutícula, uma das propriedades da terra diatomácea (PINTO JÚNIOR et al., 2008), hipoteticamente, um estresse foi gerado e levou o mosquito adulto a se friccionar com maior frequência removendo então mais escamas da cutícula (o que promove o contato de mais conídios com a mesma), havendo então aumento na evaporação de água, o que facilitou uma invasão por maior número de conídios e também proporcionou um microclima favorável ao desenvolvimento do entomopatógeno. Além do mais, a combinação de entomopatógenos com terra diatomácea já foi apresentada como controle de insetos, principalmente contra pragas de grãos armazenados, PINTO JÚNIOR et al., (2008). Este estudo então, relata pela primeira vez o efeito sinérgico entre fungo, terra diatomácea e óleo em baixa umidade em adultos de *A. aegypti*.

A combinação de entomopatógenos com terra diatomácea já foi apresentada como mecanismo de controle de insetos, principalmente contra pragas de grãos armazenados (PINTO JÚNIOR et al., 2008). Isso porque a abrasão e o dessecamento da cutícula, são uma das propriedades da terra diatomácea (PINTO JÚNIOR et al., 2008). Luz; Batagin, (2005), mostraram que em barbeiros, a presença de óleo em formulados fúngicos, aumentou a adesão de conídios e também de sílica na cutícula do adulto. Neste estudo, a combinação de IP 46 com terra diatomácea e óleos mostrou um aumento no número de mosquitos mortos, em menor tempo de exposição, quando comparados a tratamento contendo somente conídios de IP 46. Isso hipoteticamente ocorreu, porque um estresse foi gerado e levou o mosquito adulto a se friccionar com maior frequência removendo então mais escamas da cutícula (o que promove o contato de mais conídios com a mesma), aumentando assim a evaporação de água, o que facilitou uma invasão por maior número de conídios e também proporcionou um microclima favorável ao desenvolvimento do entomopatógeno. Sendo assim, este estudo, relatou pela primeira vez o efeito sinérgico entre fungo, terra diatomácea e óleo em baixa umidade para adultos de *A. aegypti*.

6.3 Tempo de exposição

Mosquitos adultos são frágeis e isso inviabiliza a aplicação direta de formulados sobre os mesmos. Por este motivo, nos bioensaios deste trabalho, os formulados foram aplicados indiretamente por meio de exposição permanente dos adultos por até quinze dias a um substrato tratado, o que não corresponde à realidade, onde adultos têm múltiplas escolhas de abrigo. Por isso, estudos sobre o tempo mínimo necessário para conídios infectarem e matarem mosquitos adultos, são de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle integrado em campo. A escolha dos tempos de exposição deste trabalho foi selecionada a fim de representar períodos realistas de exposição. O menor tempo (0,016 h) foi baseado na hipótese de um pouso rápido de adultos para um descanso, considerando que o mesmo seja “perturbado” (pela presença humana, ou predador, ou até mesmo por alguma substância repelente) fazendo-o voar novamente. O tempo de 12 h foi selecionado com base no período, após o crepúsculo, em que o mosquito adulto repousa para dormir (FORATTINI, 2002). Já os tempos de 48 e 72 h foram baseados no período em que fêmeas alimentadas de sangue, permanecem em repouso nos lugares chamados de abrigo pós-prandial até que ocorra a digestão do sangue ingerido (FORATTINI, 2002). O tempo de 120 h foi selecionado com base nos bioensaios anteriores onde o formulado IP 46 + KD + N e apenas conídios de IP 46 levaram cerca de 120 h para matarem 50% dos adultos. Os resultados deste estudo mostraram que tanto em um contato curto (0,016 h) quanto em um longo contato (120 h) de adulto de *A. aegypti* com conídios de IP 46 formulados ou não, é suficiente para causar infecção e levá-lo a morte. Os resultados mostraram também que o efeito de doses baixas de conídios ($3,3 \times 10^6$ conídios/cm²) em curto período de exposição e em baixa umidade, não é necessariamente anulado pela resposta imunológica do mosquito. Dados semelhantes a estes já foram apresentados para *An. gambiae* com *B. bassiana* e *M. anisopliae* (MNYONE et al., 2009).

6.4 Conidiogênese quantitativa

Maiores números de novos conídios sobre mosquitos mortos por infecção foram encontrados nos grupos de adultos expostos a conídios de IP 46 formulados em terra

diatomácea (KD). Provavelmente a desidratação da cutícula causada pela terra diatomácea aumentou a umidade proporcionando um microclima favorável ao desenvolvimento do fungo.

A presença de novos conídios de *M. anisopliae* IP 46 sobre mosquitos mortos em locais de concentração de adultos, como abrigos e criadouros, aumenta a dispersão deste entomopatógeno. Pois estes locais são frequentados por mosquitos sadios que podem se infectar. Por isso, a intervenção com micoinseticidas em criadouros naturais ou simulados, onde o fungo é protegido contra radiação ultravioleta e temperaturas extremas, onde os adultos de *A. aegypti* podem permanecer por um período prolongado, parece ser uma estratégia promissora para o controle integrado deste mosquito.

7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo comprovaram que:

- Adultos de *A. aegypti* são susceptíveis a conídios de IP 46 mesmo em baixas concentrações e com umidades relativas subotimais para o desenvolvimento do fungo.
- Terra diatomácea e óleos vegetal e mineral, nas concentrações testadas, possuem toxicidade para adultos de *A. aegypti* em condições de laboratório.
- Formulados de conídios em terra diatomácea apresentaram maior número de novos conídios sobre os mosquitos mortos por infecção.
- Embora não haja efeito sinérgico destes aditivos em formulações com propágulos fúngicos, IP 46 formulados com KeepDry[®] e Naturol[®] (KD + N) são promissores para o controle de adultos de *A. aegypti*.
- Um curto período de exposição (0.016 h) a conídios de IP 46, formulado ou não, é suficiente para infectar e matar mosquitos adultos.

Sendo assim, novos estudos que avaliem a repelência de Naturol[®] em diferentes concentrações para *A. aegypti* irão contribuir com o desenvolvimento de micoinseticidas para o controle deste mosquito.

REFERÊNCIAS

AHMAD, R.; CHU, W.; LEE, H.; PHANG, S. Effect of four chlorophytes on larval survival, development and adult body size of the mosquito *Aedes aegypti*. **J Appl Phycol** v. 13, p. 369-374, 2001.

ALBERNAZ, D.; TAI, M.; LUZ, C. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. **Med Vet Entomol.** v. 23, p. 141-147, 2009

ALMEIDA, J.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Rev Biotec Cienc Desenvol.** v. 20, p.30-33, 2001.

ALVES, H. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Quim Nova.** v.3, p. 10-15, 2001.

ALVES, L.; BUZARELLO, G.; OLIVEIRA, D.; ALVES, S. Ação da terra de diatomácea contra adultos do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Arq Inst Biol.** v. 73, p. 115-118, 2006.

ALVES, S. **Controle Microbiano de Insetos.** 2ª ed., Piracicaba: FEALQ. 1998.

ALVES, R.; BATEMAN, R.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotrop Entomol.** v. 31, p. 91-99, 2002

ANDRADE, M.; GÓES, M.; OLIVEIRA, N.; FRANÇA, S. Especificação de sílica e estudo de metodologias de digestão de diatomito assistida por micro-ondas com radiação focalizada. In: **Anais do Congresso Anual da ABM Internacional**, Belo Horizonte, 2001. p.1019-1028.

ATHANASSIOU, C.; STEENBERG, T. Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Biol Control.** v.40, p. 411-416, 2007

AUSTWICK, P. The pathogenic aspects of the use of fungi: The need for risk analysis and registration of fungi. **Ecol Bull.** v. 31, p. 91-102, 1980.

BADANO, E.; REGIDOR, H. Habitat selection for oviposition in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) through physical stimuli. **Ecol Aust.** v. 12, p. 129–134, 2002.

- BATISTA-FILHO, A.; ALVES, S.; ALVES, L.; PEREIRA, R.; AUGUSTO, N. Formulação de Entomopatógenos. In ALVES, S. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 917-966.
- BATTA, Y. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Crop Prot.** v. 22, p. 215-422, 2003.
- BARRETO, C. *Aedes aegypti* – resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Rev Eletr Faculdade Montes Belos, Goiás.** n. 2, p. 62-73, 2005.
- BARRETT, A.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu Rev Entomol.** n. 52, p.209-229, 2007
- BECKER, N. ASCHER, K. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. **Isr J Entomol.** n. 32, p. 63-69, 1998.
- BESERRA, E.; CASTRO-JÚNIOR, F.; SANTOS, W.; SANTOS, T.; FERNANDES, C. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotrop Entomol** n. 35, p. 825-829, 2006.
- BESERRA, E.; FERNANDES, C.; QUEIROGA, M.; CASTRO, J.; Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotrop Entomol** n. 36, p. 303-307, 2007.
- BISSET, J. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Rev Cubana de Med Trop.** n. 54, p. 202-219, 2002.
- BORGES, R.; CAVASIN, G.; SILVA, I.; ARRUDA, W.; OLIVEIRA, E.; SILVA, H.; MARTINS, F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev Pat Trop.** n. 33, p. 91-104, 2004.
- BRAGA, G.; FLINT, S.; MESSIAS, C.; ANDERSON, A.; ROBERTS, D. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycol research,** n. 105, 874-882, 2001.
- BRAGA, I.; LIMA, J.; SOARES, S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** n. 99, p.199-203, 2004.

BRAGA, I.; MELLO, C.; MONTELLA, I.; LIMA, J.; MARTINS JÚNIOR, A.; MEDEIROS, P.; VALLE, D. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. **J Med Entomol.** n. 42, p. 830-837, 2005.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiol Serv Saude.** n. 16, p. 295-302, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Balanço Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf

BROZA, M.; PEREIRA, R.; STIMAC, J.; The nonsusceptibility of soil Collembola to insect pathogens and their potential as scavengers of microbial pesticides. **Pedobiol.** n. 45, p. 523-534, 2001.

BUGEME, D.; MANIANIA, N.; KNAPP, M.; BOGA, H. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. **Exper Appl Acarol.** n. 46, p. 275-285, 2009.

BUTT, T.; CARRECK, N.; IBRAHIM, L.; WILLIAMS, I. Honey bee mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocont Sci Technol.** n. 8, p. 533-538, 1998.

CAVALCANTI, L.; PONTES, R.; REGAZZI, A.; PAULA JUNIOR, F.; FRUTOSO, R.; SOUSA, E.; FILHO, F.; LIMA, J. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Rev Saúde Pública.** n. 41, p. 638-644, 2007.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** 1ª ed., Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. 228 pp.

CUNHA, M.; LIMA, J.; BRONGDON, W.; MOYA, G.; VALLE, D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** n. 100, p. 441-444, 2005.

D`AMATO, C.; TORRES, J.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Quim Nova.** n. 25, p. 995-1002, 2002.

DAOUST, R.; WARD, M.; ROBERTS, D. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. **J Invert Pathol.** n. 41, p. 151-160, 1983.

DESTÉFANO, R.; DESTÉFANO, S.; MESSIAS, C. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Gen Mol Biol.** n. 27, p. 245-252, 2004.

EDGERLY, J.; MARVIER, M. To hatch or not to hatch? Egg hatch response to larval density and to larval contact in a tree hole mosquito. **Ecol Entomol.** n. 17, p. 28-32, 1992.

EIRAS, A. Culicidae. In: NEVES, D.; MELO, A.; LINARDI, P.; VITOR, R. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Atheneu, 2005. p. 355-367.

FARENHORST, M.; FARINA, D.; SCHOLTE, E.; TAKKEN, W.; HUNT, R.; COETZEE, M.; KNOLS, B. African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. **Am J Trop Med Hyg.** n. 78, p. 910-916, 2008.

FARENHORST, M.; KNOLS, B.; THOMAS, M.; HOWARD, A.; TAKKEN, W.; ROWLAND, M.; N'GUESSAN, R. Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes. **PLoS ONE.** n. 5, p. 12081, 2010.

FARIA, M.; WRAIGHT, S. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biol Control.** n. 43, p. 237–256, 2007.

FARNESI, L.; MARTINS, A.; VALLE, D.; REZENDE, G. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** n. 104, p.124-126, 2009.

FAULDE, M.; TISCH, E.; SCHARNINGHAUSEN, J. Efficacy of modified diatomaceous earth on different cockroach species (Orthoptera, Blattellidae) and silverfish (Thysanura, Lepismatidae). **J Pest Sci.** n. 79, p. 155-161, 2006.

FERNANDES, E.; RANGEL, D.; MORAES, A.; BITTENCOURT, V.; ROBERTS, D. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **J Invertebr Pathol.** n. 98, p. 69-78, 2008.

FOLEY, D.; RUEDA, L.; WILKERSON, R. Insight into global mosquito biogeography from country species records. **J Med Entomol.** n. 44, p. 554-567, 2007.

FORATTINI, O. **Culicidologia Médica.** São Paulo: EDUSP, 2002. 864 pp.

GARCÍA-MUNGUÍA, A.; GARZA-HERNÁNDEZ, J.; REBOLLAR-TELLEZ, E.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.; REYES-VILLANUEVA, F. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasite Vector** v. 4, n. 1, p. 24, 2011.

GENTHENER, F.; CHANCY, C.; COUCH, J.; FOSS, S.; MIDDAUGH, D.; GEOGE, S.; WARREN, M.; BANTLE, J.; Toxicity and pathogenicity testing of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. **Arch Environ Contam Toxicol**. n. 35, p. 317-324, 1998.

Hawksworth, D. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycol Res**. n. 95, p. 641-655, 1991.

HAZZARD, R.; SCHULTZ, B.; GRODEN, E.; NGOLLO, E.; SEIDLECKI, E. Evaluation of oils and microbial pathogens for control of Lepidopteran pests of sweet corn in New England. **Journal of economic entomology**, v. 96, n. 6, p. 1653-1661, 2003.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

IBARRA, J.; RINCON, M.; ORDUZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.; LANZ, H.; RODRIGUES, M.; SANCHEZ, J.; PENA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, 2003.

INGLIS, G.; GOETTEL, M.; BUTT, T.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, CABI, p. 23- 69, 2001.

JULIANO, A.; O'MEARA, G.; MORRILL, J.; CUTWA, M. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. **Oecologia**, v. 130, n. 3, p. 458-469, 2002.

KHACHATOURIANS, G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: HOWARD, D.; MILLER, J. **The Mycota, Human and Animal Relationships**. Berlin: Springer, p. 331-363, 1998.

LAZZARINI, G.; ROCHA, L.; LUZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v. 110, n. 4, p. 485-492, 2006.

LELES, R.; SOUSA, N.; ROCHA, L.; SANTOS, A.; SILVA, H.; LUZ, C. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 107, n. 5, p. 1271-1274, 2010

LIMA, E.; OLIVEIRA-FILHO, A.; LIMA, J.; RAMOS JÚNIOR, A.; CAVALCANTI, L.; PONTES, R. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 259-63, 2006.

LIVDAHL, T.; KOENEKOOP, R.; FUTTERWEIT, S. The complex hatching response of *Aedes* eggs to larval density. **Ecological Entomology**, v. 9, n. 4, p. 437-442, 1984.

OMER, C.; BATEMAN, R.; JOHNSON, D.; LANGENWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual review of entomology**, v. 46, n. 1, p. 667-702, 2001

LOPES, R.; ALVES, S.; PADULLA, L.; PÉREZ, C. Efficiency of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* formulations on *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) nymphae. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007

LORD, Jeffrey C. Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). **Biological Control**, v. 34, n. 2, p. 180-186, 2005.

LORINI, I.; FERREIRA FILHO, A.; BARBIERI, I.; DEMAMAN, N.; MARTINS, R.; DALBELLO, O. Terra de diatomáceas como alternativa no controle de pragas de milho armazenado em propriedade familiar. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 2, p. 32-36, 2001.

LUNA, J.; MARTINS, M.; ANJOS, A.; KUWABARA, E.; NAVARRO-SILVA, M. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 842-843, 2004.

LUZ, C.; BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. **Mycopathologia**, v. 160, n. 1, p. 51-62, 2005.

LUZ, C.; ROCHA, L.; HUMBER, R. Record of *Evlachovaea* sp.(Hyphomycetes) on *Triatoma sordida* in the State of Goiás, Brazil, and its activity against *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae). **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 4, p. 451-454, 2003.

LUZ, C.; ROCHA, L.; NERY, G.; MAGALHÃES, B.; TIGANO, M. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 211-218, 2004

LUZ, Christian; RODRIGUES, Juscelino; ROCHA, Luiz FN. Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. **Acta tropica**, v. 122, n. 1, p. 29-35, 2012.

LUZ, C.; TAI, M.; SANTOS, A.; ROCHA, L.; ALBERNAZ, D.; SILVA, H. Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 799-804, 2007.

LUZ, C.; TAI, M.; SANTOS, A.; SILVA, H. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 214-215, 2008.

LUZ, C.; TIGANO, M.; SILVA, I.; CORDEIRO, C.; ALIANABI, S. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 839-846, 1998.

MACORIS, M.; ANDRIGHETTI, M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.; GARBELATO, V.; BRACCO, J. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.

MADEIRA, N.; MACHARELLI, C.; CARVALHO, L. Variation of the oviposition preferences of *Aedes aegypti* in function of substratum and humidity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 415-420, 2002.

MANGUDO, C.; APARICIO, J.; GLEISER, R. Huecos de árboles como hábitat larval de *Aedes aegypti* en el arbolado público de la localidad de Aguaray, provincia de Salta. **VII Jornadas Regionales sobre mosquitos editors**. Posadas: FCEQYN, Universidad Nacional de Misiones, v. 37, 2010

MICIELI, M.; CAMPOS, R. Oviposition activity and seasonal pattern of a population of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in subtropical Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 659-663, 2003.

MILNER, R.; LIM, R.; HUNTER, D. Risks to the aquatic ecosystem from the application of *Metarhizium anisopliae* for locust control in Australia. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 58, n. 7, p. 718-723, 2002.

MNYONE, L.; KOENRAADT, C.; LYIMO, I.; MPINGWA, M.; TAKKEN, W.; RUSSELL, T. Anopheline and culicine mosquitoes are not repelled by surfaces treated with the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.

MNYONE, L.; RUSSELL, T.; LYIMOIN, I.; LWETOIJERA, D.; KIRBY, M.; LUZ, C. First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* ss and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae). **Parasites & vectors**, v. 2, n. 1, p. 59, 2009.

DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 0205-0210, 2003.

NAVARRO, D.; OLIVEIRA, P.; POTTING, R.; BRITO, A.; FITAL, S.; The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 127, n. 1, p. 46-50, 2003.

DE OLIVEIRA, D.; ALVES, L. Interação do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com terra diatomácea para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae), o cascudinho dos aviários. **BioAssay**, v. 2, 2007.

OPAS – Organização Panamericana de Saúde. **Dengue y dengue hemorrágico em las Américas: Guías para su prevención y control**. Washington DC: OPS. Publicacion Científica, p. 548, 1995.

PAL, S.; LEGER, R.; WU, L. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8969-8977, 2007.

PAULA, A.; BRITO, E.; PEREIRA, C.; CARRERA, M.; SAMUELS, R. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for dengue vector control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 10, p. 1017-1025, 2008

PEREIRA, S.; SECUNDINO, N.; BOTELHO, A.; PINHEIRO, V.; TADEI, W.; PIMENTA, P. Role of egg buster in hatching of *Aedes aegypti*: Scanning electron microscopy study. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2006.

PINTO JUNIOR, A.; LAZZARI, F.; LAZZARI, S.; CERUTI, F. Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2103-2108, 2008.

PIRALI, K.; HADDADZADE, H.; RAZZAGHI-ABYANEH, M.; BOKAIE, S.; ZARE, R.; GHAZAVI, M.; SHAMS, G. Biological control of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. **Parasitology research**, v. 100, n. 6, p. 1297-1302, 2007.

REITER, P. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **J Am Mosq Control Assoc.** n. 7, p. 52-55, 1991.

REZENDE, G.; MARTINS, A.; GENTILE, C.; FARNESI, L.; PELAJO-MACHADO, M.; PEIXOTO, A.; VALLE, D. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC developmental biology**, v. 8, n. 1, p. 82, 2008.

ROZENDAAL, J. **Vector control methods for use by individuals and communities**. World Health Organization, Geneve, 398 pp, 1997.

SANTOS, A.; TAI, M.; ROCHA, L.; SILVA, H.; LUZ, C. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v. 50, n. 1, p. 37-42, 2009.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B.; SAMSON, R.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of Insect Science**, v. 4, n. 1, 2004 (a)

SCHOLTE, E.; KNOLS, B.; SAMSON, R.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* ss. **Malaria Journal**, v. 3, n. 1, p. 45, 2004 (b).

SCHOLTE, E.; NG'HABI, K.; KIHONDA, J.; TAKKEN, W.; PAAIJMANS, K.; ABDULAA, S.; KILLEEN, G.; KNOLS, B. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1641-1642, 2005.

SCHOLTE, E.; NJIRU, B.; SMALLEGANGE, R.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* ss) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria journal**, v. 2, n. 1, p. 29, 2003.

SCHOLTE, E.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta tropica**, v. 102, n. 3, p. 151-158, 2007.

SCOTT, W.; CLARK, G.; LORENZ, L.; AMERASINGHE, P.; REITER, P.; EDMAN, J. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 94-99, 1993

SHAH, F.; WANG, C.; BUTT, T. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 259-266, 2005.

SILVA, W.; DÓRIA, G.; MAIA, R.; NUNES, R.; CARVALHO, G.; BLANK, A.; ALVES, P.; MARÇAL, R.; CAVALCANTI, S. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource technology**, v. 99, n. 8, p. 3251-3255, 2008.

SILVA, H.; GERIS, R.; RODRIGUES, F.; ROCHA, C.; SILVA, I. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Rev Inst Med Trop**. n. 50, p. 25-28, 2008 (a).

SILVA, H.; GERIS, R.; SILVA, I.; RODRIGUES FILHO, E. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata*. **Rev Soc Bras Med Trop**. n. 40, p. 264-267, 2007.

SILVA, H.; SILVA, I. 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**, p. 349-55, 1999.

SILVA, H.; SILVA, I.; LIRA, K. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Rev Patol Trop.** v. 27, n. 1, p. 53-63.

SILVA, H.; SILVA, I.; SANTOS, R.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev Soc Bras Med Trop.** n. 37, p. 396-399, 2004

STEIN, M.; LUDUEÑA-ALMEIDA, F.; WILLENER, J.; ALMIRÓN, W.; Classification of immature mosquito species according to characteristics of the larval habitat in the subtropical province of Chaco, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 400-407, 2011

TABASHNIK, Bruce E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, v. 39, n. 1, p. 47-79, 1994.

TAUIL, Pedro Luiz. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

VERNALHA, M.; DA SILVA, R.; GABARDO, J.; RODRIGUES DA COSTA, F. **Toxicologia dos inseticidas**. Volume 7. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas: Curitiba, 55p., 1977.

WARD, M.; SAILSTAD, D.; SELGRADE, M. Allergic responses to the biopesticide *Metarhizium anisopliae* in Balb/c mice. **Toxicological Sciences**, v. 45, n. 2, p. 195-203, 1998.

WASTI, S.; HARTMANN, G.; ROUSSEAU, A. Gypsy moth (*Lymantria dispar*) mycoses by 2 species of entomopathogenic fungi and an assessment of their avian toxicity. **Parasitol.** n. 80, p. 419-424, 1980.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science**, v. 37, n. 4, p. 375-379, 1993..

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007.