

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Compatibilidade de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. com óleo essencial da espécie vegetal *Schinus molle* L. e eficácia no controle de larvas de *Aedes aegypti*

Fernanda Sousa Faria

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPATIBILIDADE DE *Beauveria* sp. E *Metarhizium* sp. COM O ÓLEO
ESSENCIAL DA ESPÉCIE VEGETAL *Schinus molle* L. E EFICÁCIA NO
CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

FERNANDA SOUSA FARIA

Sob a Orientação da Professora

Isabele da Costa Angelo

E Co-orientação de

Mariana Guedes Camargo

Dissertação submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências
no Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ

Agosto de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F224 c Faria, Fernanda Sousa, 1991-
Compatibilidade de Beauveria sp. e Metarhizium sp.
com óleo essencial da espécie vegetal Schinus molle L.
e eficácia no controle de larvas de Aedes aegypti /
Fernanda Sousa Faria. - Seropédica, 2019.
44 f.: il.

Orientadora: Isabele da Costa Angelo.
Coorientadora: Mariana Guedes Camargo.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2019.

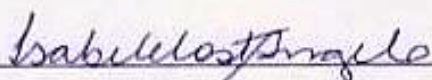
1. Controle de Aedes aegypti. 2. Fungos
entomopatogênicos. 3. Óleo essencial de Schinus molle.
I. Angelo, Isabele da Costa, 1981-, orient. II.
Camargo, Mariana Guedes, 1985-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

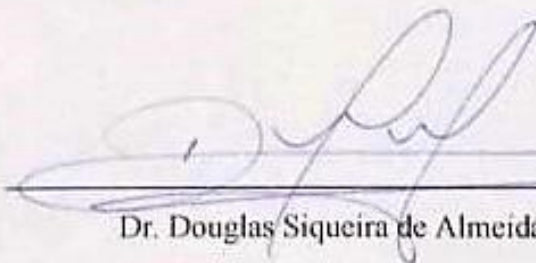
FERNANDA SOUSA FARIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Ciências**.

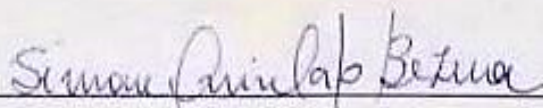
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/08/2019



Dra. Isabele da Costa Angelo (UFRRJ)



Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (UFRRJ)



Dra. Simone Quinelato Bezerra (FIOCRUZ)

Este trabalho é dedicado à Manuela Faria Martins.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ensinar a cada dia a superar os obstáculos vividos;

À minha orientadora Isabele pelos ensinamentos e orientação para realização deste trabalho;

À professora Vânia Bittencourt e a todos os professores da instituição;

Aos meus colegas de laboratório por toda ajuda durante os últimos anos. Em especial, agradeço ao Ricardo Bitencourt por todo apoio na execução desta dissertação, sem você eu não teria conseguido;

À a minha família, por todo apoio para que eu conseguisse seguir em frente e chegar até aqui;

Aos poucos amigos que estiveram presentes em meio às turbulências que vivi no último ano e tornaram meus dias mais leves;

Agradeço a minha Manu, minha Manuzita, que chegou de uma forma especial para mudar e revirar toda minha vida. Tudo isso é por você;

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias e a CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço aos que estiveram presentes direta ou indiretamente na minha vida durante esse período e fizeram parte da minha história.

RESUMO

FARIA, Fernanda Sousa **Compatibilidade de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. com óleo essencial da espécie vegetal *Schinus molle* L. e eficácia no controle de larvas de *Aedes aegypti*.** 2019. Dissertação (Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019. 42p.

O presente estudo avaliou a compatibilidade entre os isolados CG 206 de *Beauveria* sp. e CG 153 de *Metarhizium* sp. associados ao óleo essencial de *Schinus molle* L. (aroeira-salsa) e sua eficácia no controle de larvas de *A. aegypti*. Para compatibilidade entre fungos e óleo, foram avaliadas as unidades formadoras de colônia (UFC) e avaliação de diâmetro de colônia. Cinquenta microlitros de suspensões com e sem óleo (nas concentrações de 75 e 25ppm) a $1,1 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^3$ conídios mL^{-1} respectivamente foram espalhados em cinco placas contendo BDEL+ cloranfenicol (0,5%) e incubado ($25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$). Após sete dias o número de colônias foi quantificado. Para avaliação de diâmetro de colônia, dez microlitros das suspensões sem e com óleo a 25ppm foram inoculados no centro de placas de Petri contendo BDEL+cloranfenicol (0,5%) e incubados ($25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$). Os pontos de inóculo, foram mensurados durante 7 dias. No teste de avaliação de eficácia de *S. molle* as larvas (L_2) foram expostas a 22,5 mL do OE nas concentrações 25, 50, 75 e 100ppm e o grupo controle foi imerso em água desclorada estéril + tween 80, onde observou-se a taxa de sobrevivência durante sete dias. No ensaio biológico com fungo e OE, conídios de *Beauveria* sp. CG 206 ou *Metarhizium* sp. CG 153, cultivados em BDA, foram suspensos em água desclorada estéril + tween 80 (0,01%) na concentração de 1×10^7 conídios mL^{-1} . Para preparação das suspensões fúngicas acrescidas de óleo, cada 10 mL de suspensão fúngica recebeu 0,0025% do OE. Grupos contendo 15 larvas ($N=45$) L_2 foram imersas em 22,5mL das suspensões. O grupo controle foi imerso em água desclorada estéril+tween 80. A taxa de sobrevivência das larvas foi avaliada diariamente por sete dias. Os testes de UFC e diâmetro de colônia foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Os ensaios biológicos foram submetidos análise não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguido do teste SNK (Student-Newman-Keuls). A curva de sobrevivência e o cálculo da média de sobrevivência (S_{50}) foi realizada utilizando Kaplan-Meier. O nível de significância foi de 5% ($P \leq 0,05$). Nos testes da UFC observou-se que o OE a 75 ppm e 25 ppm diminuíram o número de colônias formadas; a queda nos percentuais de UFC foram de 72,33% (CG 153+75ppm), 43,92% (CG 206+75ppm), 67,96% (CG 153+25ppm) e 27,55% (CG 206+25ppm). Na avaliação do crescimento de colônia não houve diferença entre suspensões com e sem óleo de ambos os isolados. No teste de eficácia do OE de *S. molle*, o óleo foi eficaz nas concentrações de 50, 75 e 100 ppm e, a 25ppm foi escolhido para compor as suspensões, pelo alto percentual de sobrevivência das larvas (88,26%). Nos ensaios biológicos, as suspensões apresentaram eficácia, sendo os melhores resultados observados nos tratamentos com o isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. 10^7 conídios mL^{-1} associado ou não ao óleo, onde obteve-se o S_{50} das larvas de 1 dia. Conclui-se que ambos fungos e o óleo essencial são compatíveis e, apesar de não haver ação adjuvante, são boas opções para controle de larvas de *A. aegypti*.

Palavras chave: mosquitos, fungos entomopatogenicos, óleo essencial.

ABSTRACT

FARIA, Fernanda Sousa. **Compatibility of *Beauveria* sp. and *Metarhizium* sp. with essential oil of the plant species *Schinus molle* L. and efficiency in the control of *Aedes aegypti* larvae.** 2019. Dissertação (Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019. 42P.

The present study evaluated the compatibility between the CG 206 of *Beauveria* sp. and CG 153 *Metarhizium* sp. Isolates associated with the essential oil of *Schinus molle* L. (aroeira-salsa) and its effectiveness in controlling *A. aegypti* larvae. For compatibility between fungi and oil, they were evaluated as colony forming units (CFU) and colony diameter evaluation. Fifty microliters of oil and non-oil suspensions (at concentration 75 and 25ppm) at 1.1×10^3 and 1.3×10^3 conidia mL⁻¹, respectively, spread on five identified plates BDEL + chloramphenicol (0.5%) and incubated (25 ± 1 °C and RH \geq 80%). After seven days or number of colonies was quantified. To evaluate the colony diameter, ten microliters of oil-free and 25ppm oil suspension were inoculated into the center of Petri dishes containing BDEL + chloramphenicol (0.5%) and incubated (25 ± 1 °C and RH \geq 80%). Inoculum points were measured for 7 days. In the *S. molle* efficacy evaluation test, larvae (L2) were exposed to 22.5 mL of EO at ratings 25, 50, 75 and 100ppm and the control group was immersed in sterile chlorinated water +tween 80 where the survival rate was observed for seven days. In the biological assay with fungus and OE, *Beauveria* sp. CG 206 or *Metarhizium* sp. CG 153, grown in BDA, was suspended in sterile chlorinated water + tween 80 (0.01%) at a concentration of 1×10^7 conidial mL⁻¹. For preparation of the oil-added fungal suspensions, each 10 ml fungal suspension received 0.0025% of the EO. Groups containing 15 larvae (N = 45) L₂ were immersed in 22.5mL of suspensions. The control group was immersed in sterile chlorinated water + tween 80. A larval survival rate was evaluated daily for seven days. CFU tests and colony diameter were submitted to the Mann-Whitney test. Biological assays were submitted to nonparametric analysis (Kruskal-Wallis), followed by SNK test (Student-Newman-Keuls). Survival curve and survival averaging (S₅₀) was performed using Kaplan-Meier. The significance level was 5% (P \leq 0.05). In CFU tests, 75 ppm and 25 ppm decreases the number of colonies formed; CFU percentages were 72.33% (CG 153 + 75ppm), 43.92% (CG 206 + 75ppm), 67.96% (CG 153 + 25ppm) and 27.55% (CG 206 + 25ppm). In the evaluation of colony growth, there was no difference between oil and non-oil suspensions of both isolates. In no efficacy test of *S. molle* EO, the oil was effective in the 50, 75 and 100 ppm tests and a 25 ppm was chosen to compose it as suspensions, for the largest percentage of larvae duration (88.26%). In biological assays, as described suspensions, the best results were observed in the treatments with CG 153 *Metarhizium* sp. 10^7 conidia mL⁻¹ associated or not with oil, where the larvae S₅₀ was 1 day. It is concluded that both fungi and essential oil are compatible and, although there is no adjuvant action, are good options for controlling *A. aegypti* larvae.

Keywords: mosquitoes, entomopathogenic fungi, essential oil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium</i> sp., hospedeiro do qual foi isolado e local de isolamento.....	10
Tabela 2. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia (UFC) dos isolados CG 153 de <i>Metarhizium</i> sp. e CG 206 de <i>Beauveria</i> sp. associados ou não ao óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 75 ppm.....	16
Tabela 3. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia (UFC) dos isolados CG 153 de <i>Metarhizium</i> sp. e CG 206 de <i>Beauveria</i> sp. associados ou não ao óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 25 ppm.....	17
Tabela 4. Média e desvio padrão da sobrevivência (%) das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm e 25ppm durante sete dias. Tempo médio de sobrevivência (S_{50}). Grupo controle exposto somente a água desclorada estéril (Controle aquoso). ND = Não determinado.	15
Tabela 5. Média e desvio padrão da sobrevivência (%) das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a aos fungos CG 153 de <i>Metarhizium</i> sp. ou CG 206 de <i>Beauveria</i> sp. utilizados isoladamente ou associados ao óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 25ppm. Grupo controle exposto somente a água desclorada estéril + Tween 80 0,01% (Controle aquoso) ou óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 25ppm (Controle oleoso). Tempo médio de sobrevivência (S_{50}). ND= não determinado.	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti* ilustrando suas quatro fases: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulta, composto por fase aquática e fase aérea. Fonte: INEA adaptado. <http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/@inter_dilam/documents/document/zwff/mdi1/~edisp/inea_025933.jpg>..... 2
- Figura 2.** Folhas e frutos da árvore *Schinus molle*, utilizadas para extração de óleo essencial. A espécie vegetal é encontrada em região de mata atlântica e pampa brasileiro. Fonte: Rosângela Rolim - Flora Digital. <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5477> 8
- Figura 3.** Larvas de segundo instar de *Aedes aegypti* expostas durante sete dias às suspensões de óleo essencial de *Schinus molle* nas concentrações de 0,01% (100 ppm), 0,0075% (75 ppm), 0,005% (50 ppm) e 0,00025% (25 ppm). Grupo controle exposto somente à água desclorada estéril. 11
- Figura 4.** Larvas de segundo instar de *Aedes aegypti* expostas durante sete dias a suspensões aquosas dos isolados CG 153 de *Metarhizium* sp. ou CG 206 de *Beauveria* sp. ou suspensões fúngicas associadas ao óleo essencial de *Schinus molle* a 25 ppm (0,0025%)..... 13
- Figura 5.** Germinação de conídios de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. após 24 horas de crescimento em meio BDA. (A) Conídios de *Metarhizium* sp. isolado CG 153 (B) Conídios de *Metarhizium* sp. CG 153 com óleo essencial de *Schinus molle* (C) Conídios de *Beauveria* sp. isolado CG 206 (D) Conídios de *Beauveria* sp. isolado CG 206 com óleo essencial de *Schinus molle*, aumento de 40x, em microscópio óptico. Seta verde indicando conídios germinados e seta vermelha indicando conídios não germinados. 14
- Figura 6.** Avaliação de Unidades formadoras de colônia. Colônias formadas de CG 153 de *Metarhizium* sp. (A e E), associado ao óleo essencial de *Schinus molle* 75 ppm (B) e 25 ppm (F) e de CG 206 de *Beauveria* sp. (C e G), associado ao óleo essencial de *Schinus molle* a 75 ppm (D) e 25 ppm (H). 16
- Figura 7.** Unidades formadoras de colônia dos isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. associados ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* a 75 (A; B). 17
- Figura 8.** Unidades formadoras de colônia dos isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. associados ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* a 25 ppm (C; D). 18
- Figura 9.** Crescimento do diâmetro da colônia avaliado a partir de pontos de inoculo do isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. associado ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* na concentração de 25 ppm durante nove dias. 18

Figura 10. Desenvolvimento médio diário do diâmetro da colônia, aferidos a partir de pontos de inóculo do isolado CG 206 de <i>Beauveria</i> sp. associado ou não ao óleo essencial de <i>Schinus molle</i> na concentração de 25 ppm durante nove dias.	19
Figura 11. Avaliação de crescimento radial das colônias. Colônia de CG 153 de <i>Metarhizium</i> sp. isolado (A) ou associado ao óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 25 ppm (B) e CG 206 de <i>Beauveria</i> sp. isolado (C) ou associado ao óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 25 ppm ((D), sete dias após inoculação em meio de cultura.	19
Figura 12. Sobrevivência (%) das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após sete dias de exposição ao óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm e 25 ppm. Grupo controle exposto somente a água desclorada estéril (Controle aquoso).....	15
Figura 13. Sobrevivência (%) das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após sete dias de exposição as suspensões de isolados CG 153 de <i>Metarhizium</i> sp. ou CG 206 de <i>Beauveria</i> sp. foram preparadas com óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 0,0025% (25ppm). Grupo controle expostos somente a água desclorada estéril + Tween 80 0,01% ou óleo essencial de <i>Schinus molle</i> a 0,0025% (25ppm).	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	2
2.1.1. Biologia	2
2.1.2. História e distribuição	3
2.1.3. Importância em Saúde Pública	3
2.2. Formas de controle	4
2.2.1. Controle mecânico	4
2.2.2. Controle químico	4
2.2.3. Controle biológico.....	5
2.2.4. Dificuldades para o controle.....	5
2.2.5. Técnicas combinadas de controle.....	5
2.3. Fungos entomopatogênicos	6
2.3.1. Uso de fungos entomopatogênicos no controle de <i>Aedes aegypti</i> e seu mecanismo de infecção.....	6
2.4. Óleo essencial de <i>Schinus molle</i>	7
2.4.1. Uso de óleos essenciais no controle de <i>Aedes aegypti</i> e seus mecanismos de ação.....	8
2.5. Compatibilidade e associação de fungos com óleos essenciais	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Local do experimento	10
3.2. Obtenção das larvas.....	10
3.3. Obtenção e Manutenção dos isolados fúngicos	10
3.4. Obtenção do óleo essencial de <i>Schinus molle</i>	10
3.5. Preparo das suspensões	10
3.6. Viabilidade dos conídios	11
3.7. Avaliação de eficácia do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	11
3.8. Compatibilidade do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> com <i>Metarhizium sp.</i> e <i>Beauveria sp.</i>	12
3.9. Ensaio biológico de ação da associação dos isolados de <i>Metarhizium sp.</i> e <i>Beauveria sp.</i> ao óleo de <i>Schinus molle</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	12
3.10. Análise estatística	13
4. RESULTADOS.....	14

4.1. Viabilidade dos conídios	14
4.2. Compatibilidade do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> com <i>Metarhizium</i> sp. e <i>Beauveria</i> sp.	16
4.3. Avaliação de eficácia do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i>.....	14
4.4 Ensaio biológico de ação da associação dos isolados de <i>Metarhizium</i> sp. e <i>Beauveria</i> sp. ao óleo de <i>Schinus molle</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	20
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um importante vetor de agentes patogênicos causadores de diversas doenças transmitidas aos seres humanos em áreas urbanas, como dengue, zika, chikungunya, mayaro e febre amarela urbana, esta que, apesar de não ocorrer no Brasil há mais de 70 anos, comprovou-se recentemente que o mosquito *A. aegypti* ainda possui capacidade de transmiti-la nos dias atuais. Uma única picada do mosquito pode ser capaz de transmitir zika e chikungunya já que ambos vírus conseguem replicar simultaneamente em uma única célula. Essas doenças são responsáveis por diversas epidemias no país, causando prejuízos sociais e econômicos.

Diversas estratégias para o controle do mosquito são utilizadas, entre elas o controle mecânico, químico e, em menor escala, o controle biológico. O uso de agentes biológicos para o controle de mosquitos se mostra uma forma eficiente de controle, já que não confere resistência ao seu uso prolongado, além de apresentar mínimo prejuízo residual ao ambiente, ao contrário dos agentes químicos amplamente utilizados. Esse método de controle também se apresenta eficaz em uso concomitante com outros métodos, aumentando assim sua eficiência.

O controle de *A. aegypti* com a utilização de fungos entomopatogênicos se mostra uma excelente alternativa por seu alto potencial de aplicabilidade, pois o mosquito realiza sua postura em diversos tipos de recipientes e em maioria, com baixo volume de água, nos quais as formulações fúngicas poderiam ser aplicadas.

Os fungos *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. apresentam eficácia e são amplamente utilizados no controle de diversos artrópodes considerados pragas agrícolas e, nos últimos anos, sua aplicação vem sendo estudada para *A. aegypti*.

O controle químico ainda é o mais utilizado no combate ao mosquito *Aedes aegypti*. Possui uma ação muito eficaz, porém gera diversos prejuízos ao ambiente e a biodiversidade local. O desenvolvimento de métodos alternativos utilizando inseticidas biológicos e óleos essenciais vem sendo explorado com o objetivo de minimizar os danos causados a saúde da população e o meio ambiente.

Óleos essenciais podem ser utilizados como um método alternativo de controle químico. Apresentam boa eficácia no controle de mosquitos por possuírem ação inseticida, seja por contato, ingestão ou fumigação dos insetos. Possuem também ação repelente, além de baixa toxicidade ao ambiente, segurança à população e aos aplicadores e serem biodegradáveis.

O óleo essencial extraído da árvore de *Schinus molle*, espécie vegetal popularmente conhecida como aroeira-salsa, apresentou em estudos uma boa ação no controle de artrópodes, sendo uma árvore perene facilmente encontrada na mata atlântica brasileira, seu óleo essencial possui atividade antimicrobiana, antifúngica, inseticida e repelente.

A ação combinada entre diversos métodos de controles químicos e biológicos vem sendo testada e, no presente estudo se objetivou realizar uma associação entre os fungos *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. e o óleo essencial de *S. molle* para avaliação de sua compatibilidade e efeito *in vitro* sobre larvas do mosquito *A. aegypti*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Aedes aegypti*

2.1.1. Biologia

O mosquito *Aedes aegypti* pertencente à ordem Diptera, família Culicidae, tem em seu ciclo de vida quatro fases: ovo, até quatro instares larvais, pupa – fase aquática e adulto – fase aérea (Figura 1). As fêmeas realizam sua postura em depósitos, próximos a superfície da água (FUNASA, 2002).

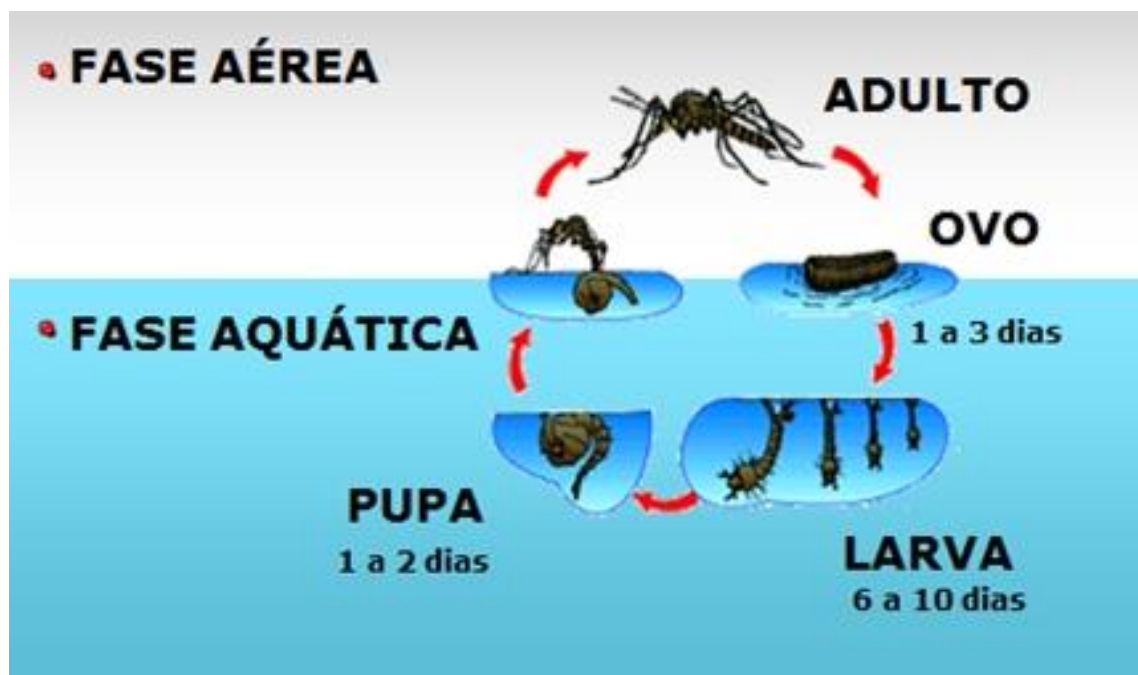


Figura 1. Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti* ilustrando suas quatro fases: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulta, composto por fase aquática e fase aérea. Fonte: INEA adaptado. <http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/@inter_dilam/documents/document/zwff/mdi1/~edis/p/inea_025933.jpg>

Os ovos medem cerca de um milímetro e são fusiformes, possuem inicialmente a cor branca, mas rapidamente adquirem a coloração negra e brilhante. Esse processo de melanização da casca do ovo está relacionado a sua viabilidade e resistência após a formação da cutícula serosa, fora da água. O aumento da pigmentação e a formação da cutícula serosa conferem junto a outros fatores como espessura e textura da casca resistência aos ovos, que aproximadamente 15 horas após a postura podem sobreviver por meses fora do ambiente aquático (FUNASA, 2001; REZENDE, 2008; FARNESI, 2017).

Larvas e pupas, assim como os ovos, fazem parte do ciclo aquático do mosquito. As larvas alimentam-se de matéria orgânica, são sensíveis a movimentos bruscos e possuem fotossensibilidade, buscando refúgio no fundo do reservatório de água. As larvas possuem quatro estádios evolutivos, sendo compostas por cabeça, tórax e abdômen. Respiram o ar do ambiente, porém possuem alta resistência, sendo capazes de sobreviver sem ir a superfície por um período de até 53 dias. As pupas não se alimentam, sendo seu corpo dividido em cefalotórax e abdômen e possuem um par de tubos respiratórios que atravessam a água permitindo assim sua respiração (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FUNASA, 2001).

O adulto possui coloração escura e faixas brancas na base dos segmentos tarsais, além de um desenho com formato de lira no mesonoto. O macho distingue-se da fêmea por suas antenas plumosas, palpos mais alongados e na alimentação, onde a fêmea alimenta-se

frequentemente de sangue de animais vertebrados, apresentando antropofilia. As fêmeas de *A. aegypti* realizam mais de um repasto sanguíneo entre duas oviposições, o que eleva a possibilidade de ingestão e transmissão viral (FUNASA, 2001; BARATA, 2001).

2.1.2. História e distribuição

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae Linnaeus, 1762) pertence ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família Culicidae, Gênero *Aedes* (WALL e SHEARER, 2001). Do grego aêdês “odioso” e do latim *ægypt* “do Egito”, o mosquito é popularmente conhecido no país e, também chamado de mosquito da dengue (FERREIRA, 1986). É um importante disseminador de diversas enfermidades emergentes e reemergentes virais de transmissão vetorial no Brasil, tendo como destaque atualmente a dengue, zika, chikungunya, mayaro e a febre amarela urbana.

Originário da África, foi primariamente descrito no Egito, tem distribuição cosmopolita, sendo identificado em predominância nas regiões tropicais e subtropicais, teve sua introdução no Brasil no período colonial, possivelmente trazido em navios negreiros procedentes da África. No território brasileiro, está distribuído em locais onde há maior concentração populacional e dificilmente é encontrado em regiões semi-silvestres (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

No Brasil, há referências sobre dengue desde 1846. A primeira campanha pública de combate ao vetor ocorreu entre 1902 e 1907. O Brasil erradicou o mosquito em dois distintos momentos, em 1955 sendo confirmado em 1958 sua extinção, e em 1967 sua reintrodução no país. Em 1973 foi erradicado novamente, com retorno em 1976, estando presente no país desde então. Em 1996 o Ministério da Saúde criou o Plano de Erradicação de *A. aegypti* (PEAa), mas não atingiu seu objetivo. Em 2001 a FUNASA eliminou a meta de erradicação do mosquito e passou a objetivar apenas o controle do vetor. Em 2002, portanto, foi implementado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) presente até os dias atuais (BRAGA e VALLE, 2007a), no qual observa-se a implementação de dez componentes: vigilância epidemiológica, combate ao vetor, assistência aos pacientes, integração com a atenção básica, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, capacitação de recursos humanos, legislação, sustentação político-social e acompanhamento e avaliação do Plano (FUNASA, 2002).

2.1.3. Importância em Saúde Pública

A dengue (DENV), a febre de chikungunya (CHIKV) e a febre pelo Zika (ZIKV) e a febre amarela urbana, são arboviroses de notificação compulsória, sendo a febre pelo vírus Zika acrescida à lista através da Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde. Até 13 de abril de 2019 houve um aumento de 339,9% em relação ao ano de 2018 no mesmo período de casos prováveis de dengue no Brasil, com 451.685 casos registrados. Até a mesma data foram registrados 3.085 casos no ano de 2019, sendo em 2018 registrados 3.001 casos prováveis. Já de chikungunya foram registrados 24.120 casos, sendo em igual período de 2018, 37.874 casos registrado, apresentando uma queda de 36,3% (BRASIL, 2019).

De acordo com Bhatt et al. (2013), o controle da dengue há muitos anos é considerado um desafio para autoridades políticas e em saúde pública. Com alta incidência, foi estimado em 2010 que mundialmente os casos sintomáticos e assintomáticos tenham sido por volta de 96 e 294 milhões, respectivamente. É considerada a arbovirose de maior impacto na humanidade, com estimativa de 10 milhões de mortes anuais e com ocorrência em aproximadamente 125 países (STANAWAY et al., 2016).

Em 2014, o primeiro caso autóctone do vírus chikungunya foi identificado no Brasil no município de Oiapoque, no Amapá, onde identificou-se o genótipo asiático do vírus (NUNES, 2016). O indivíduo com a doença desenvolve dor e rigidez articular, com persistência que pode durar de meses a anos, com relatos de dor articular crônica após 40 meses da infecção

(TRITSCH, 2019), podendo evoluir também para complicações neurológicas, responsáveis pelo maior número de óbitos pela doença (CERNY, 2017).

Transmitido principalmente pela picada do mosquito, os primeiros casos autóctones de Zika vírus, também pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, reportados no Brasil, foram identificados em 2015 na cidade de Natal, RN (ZANLUCA et al., 2015), espalhando-se rapidamente o número de casos e, em seguida foi identificada uma associação entre a infecção viral e o aumento de casos de microcefalia em neonatos e síndrome de Guillain-Barré, podendo ser considerado um agente neuropatológico para humanos (SCHULER-FACCINI et al., 2016; WHITE et al., 2007). O mosquito adquire o vírus primariamente picando o indivíduo infectado, porém, apesar de haver indícios de que altera o ciclo biológico do mosquito, diminuindo a eclosão de larvas e tornando sua evolução larval mais lenta, possui capacidade de transmissão vertical pelo fato de *A. aegypti* fêmea transmitir o vírus para sua prole (CHAVES, 2019). Essa forma de transmissão pode ser útil ao vírus para que possa sobreviver sob condições adversas (THANGAMANI et al., 2016).

Previsões mostram que a expansão do mosquito se dará por mudanças climáticas e maior disponibilidade de ambientes urbanos, especialmente entre 2050 e 2080, onde até 2050 49.13% da população mundial estará em risco de se infectar por uma arbovirose caso não haja esforços para limitar a expansão do mosquito (KRAEMER et al., 2019).

2.2. Formas de controle

Existem diversas técnicas desenvolvidas e empregadas para o controle de *A. aegypti*. Entre as principais estão as que utilizam o controle mecânico, que muitas vezes exige a participação direta da população, portanto exige-se maior sensibilização da mesma; composto por ações que visam a eliminação direta de mosquitos adultos e criadouros, o controle químico, principal atividade utilizada, onde visa-se através do emprego de produtos químicos a ação larvicida e inseticida, porém, neste tipo de controle deve-se haver atenção para o manejo ambiental e, o controle biológico, onde se utilizam agentes biológicos e que, quando em ações de uso integrado, minimiza a utilização de inseticidas, dando maior sustentabilidade à eliminação dos focos de mosquito. (BRAGA; VALLE, 2007b).

2.2.1. Controle mecânico

No controle mecânico a participação ativa da população se faz importante. As principais ações envolvem educação ambiental e saneamento básico e estão relacionadas a proteção contra o mosquito, tendo como exemplo o uso de telas de proteção em portas e janelas, manutenção adequada de caixas de água e outros recipientes que possam armazenar água, destruição ou destinação adequada do criadouro com a drenagem dos reservatórios de água, coleta e destinação adequada de lixo (FUNASA, 2001; ZARA et al., 2016).

2.2.2. Controle químico

Amplamente utilizado, consiste em utilizar produtos químicos para matar larvas e mosquitos adultos. Os principais já utilizados para o combate de *A. aegypti* são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. (VALLE E BRAGA, 2007b). Segundo Morrison et al. (2008), um larvicida ideal teria alto poder residual, baixa toxicidade para humanos e outros organismos, além de baixa resistência e, de acordo com Valle e Braga (2007b), um dos avanços no controle de insetos de maior destaque do século passado foi o desenvolvimento dos inseticidas com elevado poder residual, sendo o controle químico, utilizando inseticidas de origem orgânica e/ou inorgânica, um dos principais métodos para o controle de pragas em Saúde Pública.

Exige-se cautela ao utilizar esse método devido à resistência adquirida pelos insetos, pois apesar de muito eficaz, ao longo do tempo se adquire uma população selecionada resistente

aos produtos, além de gerar impactos ambientais pelo seu uso. Em virtude dessa resistência observada ao longo dos anos, inseticidas inicialmente utilizados foram substituídos por novos produtos desenvolvidos. Como exemplo disto, os organoclorados foram substituídos pelos organofosforados e, os piretróides sequencialmente tornaram-se uma alternativa para sua substituição, apesar de ter como desvantagem o elevado custo, além do impacto ambiental gerado (ZARA et al., 2016).

2.2.2.1. Compostos naturais e inseticidas fisiológicos

Uma boa alternativa ao uso de agentes químicos convencionais é o uso de óleos essenciais e inseticidas fisiológicos. Segundo Batista et al. (2016), os óleos essenciais são importantes fontes naturais de pesticidas. Diversos estudos vêm utilizando extratos vegetais com objetivo de encontrar substâncias com ação espécie seletiva para criação de novas formulações comerciais, atuando com atividade larvicida, adulticida, repelente e impedindo ovoposição (FURTADO et al., 2005; MARTIANASARI & HAMID, 2019).

As ações de destaque dos inseticidas fisiológicos são inibição da síntese de quitina, age impedindo a correta formação da cutícula dos insetos, sendo o uso de Novaluron, um larvicida do grupo benzoil-uréia, que atua inibindo a síntese de quitina do mosquito, permitido em água potável (WHO, 2007) e, ações análogas do hormônio juvenil, que atuam principalmente sobre pupas, inibindo a emergência de adultos. Sendo importante ressaltar que não age matando larvas e sim impedindo o desenvolvimento do inseto (BRASIL, 2005).

2.2.3. Controle biológico

O controle biológico pode ocorrer de diversas formas, com o uso de patógenos como vírus, bactérias, fungos entomopatogênicos, parasitos como nematóides entomopatogênicos, e predadores como peixes e invertebrados aquáticos onde são utilizados com a finalidade de reduzir a população do vetor (ALVES, 1998; ZARA et al., 2016).

Entre as alternativas já utilizadas para o controle biológico de *A. aegypti*, destaca-se o uso de *Bacillus thuringiensis israelensis* (POLANCZYK et al., 2003) e de peixes larvófagos, como *Betta splendens* e *Poecilia reticulata* (PAMPLONA et al., 2004; PEREIRA & OLIVEIRA, 2014).

2.2.4. Dificuldades para o controle

O difícil controle desse importante vetor, se dá pela sua fácil propagação, fácil adaptabilidade a ambientes urbano, flexibilidade genética e elevada reprodutibilidade e por seus mecanismos de resistência a diversos inseticidas, que se desenvolveram ao longo do tempo. A resistência pode ocorrer com o uso consecutivo de pesticidas que irão eliminar os indivíduos suscetíveis, permanecendo aqueles que possuem alelos resistentes ao inseticida (BRAGA e VALLE, 2007b; ARAÚJO et al., 2015).

Existem poucos mecanismos identificados que podem conferir resistência a produtos existentes, entre eles, a redução da taxa de penetração do inseticida pela cutícula do inseto, o aumento na capacidade de metabolizar o inseticida, e a alteração no sítio-alvo, dificultando ou impedindo a ligação do mesmo com o inseticida (BRAGA e VALLE, 2007b).

2.2.5. Técnicas combinadas de controle

Definido pela OMS como “O processo de tomada de decisões racional para o uso otimizado dos recursos para o controle de vetores”, o manejo integrado de pragas surge da combinação entre diferentes técnicas de controle de forma integrada e racional, visando redução dos gastos econômicos e a diminuição de danos ao ecossistema (FUNASA, 2001). Ações conjuntas com redução de ambiente propício a proliferação, uso de armadilhas e inseticidas têm

comprovada eficácia na redução da densidade de mosquitos fêmeas de *A. aegypti*, reduzindo assim o número de casos de arboviroses (BARRERA, et al. 2018).

A adoção de estratégias realmente eficazes adaptadas de acordo com cada região, analisando as variáveis regionais que possam ser empecilhos para as ações de combate ao mosquito e adaptando-se as particularidades da população local para que as técnicas empregadas sejam eficazes. (ZARA et al., 2016).

2.3. Fungos entomopatogênicos

Segundo Alves (1998), fungos foram os primeiros agentes utilizados no controle microbiano de insetos, os quais, devido a sua grande variabilidade genética, podem ser amplamente estudados e através de técnicas de ensaios biológicos, selecionados os isolados que possuem características mais adequadas ao controle de insetos. Atualmente, a análise genômica passou a facilitar a identificação de genes codificadores de moléculas presentes nesses fungos que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de produtos fitossanitários e farmacêuticos (WANG et al. 2016).

Apesar de já serem amplamente utilizados na agricultura, entre os fatores que dificultam sua utilização estão as variações de temperatura, a radiação UV e a umidade do ambiente que influenciam diretamente a viabilidade e atividade dos fungos, além da produção artificial dos conídios (ALVES, 1998; MARQUES et al., 2000).

Além disso, os conídios têm características hidrofóbicas, devido a sua constituição lipídica, o que dificulta sua diluição em ambiente aquático bem como a adesão do fungo a cutícula do hospedeiro-alvo (SILVA et al. 2006). Diversas técnicas são desenvolvidas afim de facilitar essa adesão e aumentar a capacidade de diluição, como técnicas de microencapsulamento e utilização de aditivos oleosos como o óleo mineral nas formulações elaboradas com os fungos (LIU et al., 2009; BITENCOURT et al., 2018).

Os fungos *Beauveria* sp. (Bals.) Vuillemin (1912) (Hypocreales: Cordyptitaceae) e *Metarhizium* sp. (Metschn.) Sorokin (1883) (Hypocreales: Clavicipititaceae) (MYCOBANK) são utilizados como inseticidas biológicos principalmente para o controle de pragas agropecuárias por apresentarem em décadas de estudos patogenecidades em diferentes estágios evolutivos para artrópodes como *Sitophilus oryzae* (KAVALLIERATOS et al., 2014), *Lipaphis erysimi* (ARAUJO et al., 2009), *Tetranychus cinnabarinus* (SHI e FENG, 2004), *Psoroptes ovis* (JIANG et al., 2019), *Rhipicephalus microplus* (BITENCOURT et al., 1999) entre outras diversas espécies.

Ainda de acordo com Alves (1998), ambos fungos estão presentes em solos, sendo que como características diferenciais, *Metarhizium*. sp. possui conídios uninucleados, hialino ou com fraca coloração formando-se sobre conidióforos simples e, o inseto colonizado apresenta-se recoberto por micélio em tonalidade verde (variando de claro a escuro), acinzentada ou esbranquiçada com pontos verdes.

A *Beauveria* sp. possui conídios globosos, com forma ovoide, cilíndrica, verrugosos curvado ou não, que ficam sobre as hastes das fíalides, agrupadas nos conidióforos em espirais ou solitárias. Indivíduos infectados ao fim da conidiogênese ficam cobertos por micélio branco. (ALVES, 1998).

2.3.1. Uso de fungos entomopatogênicos no controle de *Aedes aegypti* e seu mecanismo de infecção

O desenvolvimento de estratégias que utilizem formulações fúngicas para controle de larvas e adultos de *A. aegypti* é um importante alvo de pesquisas. Scholte et al. (2017) comprovou através de testes *in vitro* a ação inseticida de *Metazhirium anisopliae*. sobre mosquitos adultos, sendo confirmados a campo em estudo posterior (CAROLINO, et al. 2014). Após a infecção com diferentes cepas de *M. anisopliae*, a cepa de alta virulência apresentou

elevada taxa de mortalidade, reduzindo a fecundidade de fêmeas que estiveram confinadas com machos infectados (REYES-VILLANUEVA et al., 2011). Bitencourt et al. (2018) observaram em seus estudos a virulência de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* sobre larva de *A. aegypti*, sendo todos os isolados eficazes no seu controle.

Armadilhas utilizando garrafas PET envoltas em panos pretos impregnados com fungo *M. anisopliae*. demonstraram redução significativa na população de mosquitos fêmeas, sendo um método promissor para o controle de adultos de *A. aegypti* (PAULA et al., 2016).

A partir da análise do isolado IP 46 de *M. anisopliae*., Falvo et al. (2018) observaram que a virulência de conídios contra L2 do inseto não foi afetada pela profundidade da água ou pelos níveis de radiação UV-B testados, assim como a germinação não caiu significativamente, demonstrando que isolados de *M. anisopliae*. podem possuir significativo potencial de uso contra larvas de *A. aegypti*, mesmo quando expostos a elevados níveis de adversidades.

Os fungos *Metarhizium sp.* e *Beauveria sp.* podem infectar diversos insetos via tegumento ou por ingestão do fungo (ALVES, 1998). A adesão de conídios à cutícula do hospedeiro envolve inicialmente forças hidrofóbicas seguidas da consolidação, facilitada pela ação de enzimas extracelulares e secreção de mucilagem. Embora forças fracas tenham sido registradas em resposta a *A. aegypti*, o fungo não conseguiu se consolidar firmemente na larva do inseto. Análises da composição da cutícula, revelaram uma ausência de hidrocarbonetos de cadeia longa em larvas de *A. aegypti*, que acredita-se serem necessários para o desenvolvimento de fungos na cutícula do hospedeiro. Os estudos indicam, por tanto, que o fungo mata sem aderir à cutícula do hospedeiro e os conídios ingeridos também não germinam e são expelidos no bolo fecal. Os inibidores de protease reduzem a mortalidade larval, o que indica a importância das proteases na interação do hospedeiro. A resposta imune das larvas a *M. Anisopliae* parece limitada, enquanto o gene da resposta ao estresse oxidativo que codifica a peroxidase tiol é regulado positivamente. A mortalidade portanto, parece estar ligada à autólise através da atividade da caspase regulada pela Hsp70 e inibida, nas larvas infectadas, pelos inibidores de protease (GREENFIELD et al., 2014; BUTT et al., 2013).

Segundo Dong et al. (2012) a infecção pelo fungo *B. bassiana* em *A. aegypti* foi capaz de causar uma redução no tempo de vida do mosquito e impediu a replicação do vírus da dengue no intestino do mosquito. Sugeriu-se que a atividade anti-dengue mediada pelo fungo é provavelmente direta ou indiretamente, mediada pela ativação das vias Toll e JAK-STAT do mosquito, via esta que, a partir de análises genéticas, comprovou-se a atuação no mecanismo de defesa do inseto contra o fungo.

2.4. Óleo essencial de *Schinus molle*

A árvore *Schinus molle* (Linnaeus, 1753) da família Anacardiaceae é conhecida popularmente como aroeira-salsa, aroeira-mole, ou pimenteira-bastarda, é uma árvore perene, nativa da América do Sul, podendo ser encontrada em região de mata atlântica e pampa brasileiro (Figura 2). Seu óleo essencial extraído a partir de suas folhas e frutos apresenta atividade antifúngica, antimicrobiana, inseticida e repelente, já sendo estudada para controle de diversos artrópodes considerados pragas agrícolas (SANTOS et al., 2010; SILVA-LUZ &PIRANI, 2015) e ectoparasitas de cães e gatos (BATISTA et al., 2016).



Figura 2 Folhas e frutos da árvore *Schinus molle*, utilizadas para extração de óleo essencial. A espécie vegetal é encontrada em região de mata atlântica e pampa brasileiro. Fonte: Rosângela Rolim - Flora Digital. <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5477>

Martins et al. (2016) observaram em seus estudos que o óleo essencial extraído a partir de folhas e frutos de *Schinus molle* apresentou propriedades antioxidantes e antimicrobianas, já Prado et al. (2019) observou sua atividade antifúngica contra *Paracoccidioides brasiliensis* sugerindo que seu uso pode ser viável na indústria farmacêutica e alimentícia.

Os principais compostos encontrados no óleo essencial de *S. molle* são da classe dos terpenos (DUARTE, 2018), composto encontrado em plantas, sendo alguns utilizados para elaboração de medicamentos, fitoterápicos, precursores de vitaminas e inseticidas (SIMÕES et al., 1999). Batista et al. (2016) sugeriram que os compostos majoritariamente presentes no óleo bem como seu extrato hexânico sejam estudados para desenvolvimento de novos pesticidas.

2.4.1. Uso de óleos essenciais no controle de *Aedes aegypti* e seus mecanismos de ação

Óleos essenciais são importantes alternativas aos inseticidas sintéticos amplamente utilizados há muito tempo, pois são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade para mamíferos e por possuírem uma ampla gama de constituintes bioativos com diferentes mecanismos de ação que podem ser utilizados no combate a diversas populações de insetos alvo (MUTURI, 2017).

Muitos óleos essenciais apresentam alta eficiência em estudos *in vitro* com atividade sobre os estágios larvares de *A. aegypti* (FURTADO et al., 2005), podendo apresentar ação inseticida, repelente ou impedir a oviposição do mosquito com ação efeito dependente do estágio evolutivo do inseto exposto (CASTILLO et al., 2017).

Muitos mecanismos podem estar envolvidos na ação de óleos sobre larvas de *A. aegypti*, podendo se inicializar por ingestão seguida de absorção dos compostos, ou podem ter como porta de entrada o sistema respiratório ou a cutícula, penetrando por ação de fumigamento, por exemplo (COITINHO et al., 2011). Podem ter ação sistêmica, causando a desnaturalização da proteína, inibição enzimática e desintegração da membrana e, por serem lipofílicos podem romper e penetrar pela matriz lipoproteica da membrana celular. Alguns agem impedindo a

alimentação e outros regulando de forma antagônica o crescimento dos insetos. (DIAS e MORAES, 2014). Além disso, algumas evidências mostram que a rápida ação dos óleos ocorre por agirem no sistema nervoso causando toxicidade neuromuscular nos insetos com ação nos canais de cálcio modulados por GABA, ou na octopamina que age como neurohormônio neuromodulador e neurotransmissor, responsável por regular batimentos cardíacos, movimentos, comportamento e metabolismo de insetos (COITINHO et al., 2011).

2.5. Compatibilidade e associação de fungos com óleos essenciais

Diversos autores (MERTZ et al., 2010; TAMAI et al., 2002) afirmam a necessidade de estudos sobre a utilização de produtos de origem natural associados aos fungos entomopatogênicos como estratégia para controle de insetos e redução de impactos, para que, em conjunto a ação dos agentes não seja comprometida, enfatizando a utilização concomitante destas duas alternativas para o manejo integrado de pragas.

Gomes et al. (2015) observaram em estudo *in vitro* que a formulação associando o óleo de Neem ao fungo *M. anisopliae* apresentou eficácia no controle de larvas de *A. aegypti* e Mamprim et al. (2013) após diversos testes avaliando os efeitos de extratos vegetais sobre *M. anisopliae* observaram que os extratos alcoólicos reduziam a viabilidade do fungo, possivelmente pelos compostos de ação tóxica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no laboratório de Controle Microbiano (LCM), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Daniel Neitz (EEPPWON), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária, localizado no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2017 a maio de 2019.

3.2. Obtenção das larvas

Os ovos de *A. aegypti* (linhagem Rockefeller) foram mantidos e cedidos pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos do Departamento de Bioquímica da UFRRJ, projeto CEUA/ICBS número 23083007342/2016-59, sob a coordenação do professor Dr. Emerson Guedes Pontes.

Um papel filtro contendo os ovos de *A. aegypti* foram colocados em uma bandeja plástica contendo 1,5 L de água desclorada estéril com 0,75g de ração de peixe estéril triturada (Tretamin Alevinos®). Após 24 horas de eclosão, as larvas foram mantidas em bandejas plásticas (80 larvas para cada 100 mL de água) e alimentadas a cada 48 horas (0,05g por litro).

3.3. Obtenção e Manutenção dos isolados fúngicos

Os isolados CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. (Tabela 1) foram mantidos no Laboratório de Controle Microbiano, localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz, do Instituto de Veterinária da UFRRJ. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA, KASVI® São José dos Pinhais, PR, Brasil) e mantidos a 25°C e umidade relativa $\geq 80\%$ por 15 dias.

Tabela 1. Isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp., hospedeiro do qual foi isolado e local de isolamento.

Isolado	Hospedeiro do isolamento	Origem geográfica
<i>Beauveria</i> sp. CG 206	Hymenoptera: Vespidae	Costa do Arapapa - AM
<i>Metarhizium</i> sp. CG 153	<i>Deois incompleta</i> (Homoptera:Cercopidae)	Altamira - PA

3.4. Obtenção do óleo essencial de *Schinus molle*

O óleo essencial de *S. molle* foi cedido pelo Laboratório de Química de Bioativos Naturais (LQBioN) sob coordenação do professor Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves, onde foi extraído e caracterizado de acordo com Batista et al. (2016).

O armazenamento do OE foi realizado em frasco de vidro âmbar na ausência de luz e em temperatura média de 4°C.

3.5. Preparo das suspensões

Conídios dos isolados CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. foram raspados da superfície do meio de cultura com o auxílio de uma lâmina estéril de bisturi e suspensos em água desclorada estéril + Tween 80® (Sigma Chem.Co, Saint Louis, MO, USA) (0.01% v/v) tanto para o preparo das suspensões contendo somente os isolados fúngicos quanto para o preparo das suspensões fúngicas acrescidas de óleo essencial (OE) de *S. molle*. Todas as

suspensões foram quantificadas em câmara de Neubauer (ALVES, 1998). Em cada experimento foi determinada uma concentração conidial distinta.

Para cada 10 mL de suspensão fúngica, foram adicionadas 0,25µL (0,0025%) de óleo essencial de *S. molle* para suspensões com OE a 25 ppm, utilizados na execução dos testes de compatibilidade, para viabilidade e ensaios biológicos de ação da associação ou 0,75µL (0,0075%) de OE para suspensões com OE a 75 ppm também para testes de compatibilidade.

3.6. Viabilidade dos conídios

Para cada ensaio biológico foi realizada a viabilidade das suspensões fúngicas afim de garantir que os isolados se encontravam em boas condições de germinação. Alíquotas de 10 µL das suspensões na concentração 1×10^3 conídios mL⁻¹ de cada isolado de *M. sp.* e *B. sp.* com ou sem associação ao óleo foram transferidas para uma placa de Petri com meio BDA e cloranfenicol a 0,5% e em seguida incubadas à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR \geq 80% por 24 horas para observação da viabilidade dos conídios. O cálculo do percentual de germinação dos conídios foi realizado segundo ALVES (1998). Sendo considerado viáveis o percentual de $\geq 90\%$ de conídios germinados.

3.7. Avaliação de eficácia da ação do óleo essencial de *Schinus molle* em larvas de *Aedes aegypti*

Grupos contendo 15 larvas de segundo instar de *A. aegypti* (N=45) foram dispostas em copos descartáveis (50mL, 6cm de largura x 5cm de altura) e expostas a quatro concentrações de óleo essencial de *S. molle*: 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm e 100 ppm. Para 22,5mL de água desclorada estéril foram adicionados proporcionalmente o óleo essencial de *S. molle* nas concentrações de 0,01% (100 ppm), 0,0075% (75 ppm), 0,005% (50 ppm) e 0,0025% (25 ppm) (Figura 3). Após o tratamento, os percentuais de sobrevivência das larvas foram avaliados diariamente durante sete dias. As larvas mortas foram retiradas e os números de larvas vivas foram anotados diariamente. A cada 48 horas as larvas eram alimentadas com ração para peixe, triturada, estéril (Tretamin, Alevinos[®]; 0,05mg/L). O ensaio biológico foi realizado três vezes em tempos distintos usando lotes diferentes de larvas. O grupo controle foi exposto somente à água desclorada estéril.



Figura 3. Larvas de segundo instar de *Aedes aegypti* expostas durante sete dias às suspensões de óleo essencial de *Schinus molle* nas concentrações de 0,01% (100 ppm), 0,0075% (75 ppm), 0,005% (50 ppm) e 0,00025% (25 ppm). Grupo controle exposto somente à água desclorada estéril.

3.8. Compatibilidade do óleo essencial de *Schinus molle* com *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp.

Para a realização do teste de compatibilidade, foram preparados 5 mL de suspensões fúngicas dos isolados CG 153 de *M. sp.* e CG 206 de *B. sp.* associadas ao óleo ou não nas concentrações de $1,1 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^3$ conídios mL⁻¹, respectivamente. As concentrações de óleo essencial para preparação das suspensões fúngicas foram de 75 e 25 ppm. Alíquotas de 50 µL de cada suspensão com e sem OE foram espalhados com auxílio de alça de Drigalski em placa de Petri (60 x 15 mm) contendo BDA suplementado com cloranfenicol (0,5%) e acrescido de 1g/L⁻¹ de extrato de levedura. As placas foram mantidas em câmara climatizada com umidade e temperaturas controladas ($25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$) durante sete dias. Após este período, o percentual relativo de unidades formadoras de colônia (UFC) que foram quantificadas em cada placa (BERNARDO, 2016) foi calculado. Cada grupo foi composto por 5 placas. O experimento foi realizado em três tempos diferentes com três lotes distintos de isolados fúngicos.

$$PR = \frac{\text{número de colônias no grupo tratado} \times 100}{\text{número de colônias no grupo controle}}$$

Para avaliação do crescimento radial de colônia foram utilizadas as suspensões preparadas para o ensaio biológico com larvas. Dez microlitros de cada suspensão foram inoculados no centro de placas de Petri (60 x 15 mm) contendo BDA suplementado com cloranfenicol (0,5%) e acrescido de 1g/L⁻¹ de extrato de levedura. Cada grupo foi composto por 5 placas (MARQUES et al., 2004). Após o primeiro sinal de desenvolvimento das colônias, estas foram mensuradas com auxílio de régua milimétrica (paquímetro digital) (STARFER® 0,1 mm) diariamente durante 9 dias.

Para ambos os testes (isto é, contagem de UFC e avaliação do crescimento radial) os experimentos foram realizados em três tempos diferentes com três lotes distintos de isolados fúngicos.

3.9. Ensaio biológico de ação da associação dos isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. ao óleo de *Schinus molle* contra larvas de *Aedes aegypti*

Grupos contendo 15 larvas de segundo instar de *A. aegypti* (N=45) dispostas em copos descartáveis (50mL; 6cm de largura x 5cm de altura) foram imersas em 22,5mL de suspensões (Figura 4), foram formados então os seguintes grupos: Um grupo tratado com a suspensão CG 153 de *M. sp.* na concentração de $1,3 \times 10^7$, um grupo tratado com a suspensão CG 153 de *M. sp.* na concentração de $1,3 \times 10^7$ com o OE de *S. molle* na concentração de 25 ppm, um grupo tratado com a suspensão CG 206 de *B. sp.* na concentração de $1,2 \times 10^7$, um grupo tratado com a suspensão CG 206 de *B. sp.* na concentração de $1,2 \times 10^7$ com o OE na concentração de 25 ppm. Dois grupos controle, sendo um exposto a água desclorada estéril + Tween 80® a 0,01% e o outro tratado com óleo essencial de *S. molle* a 25 ppm. Para suspensão fúngica adicionadas ao óleo, a concentração de óleo essencial de *S. molle* escolhida foi de 25 ppm (0,0025%), eleita de acordo com os resultados previamente observados nos testes de compatibilidade e ação do óleo sobre as larvas que, por apresentar taxa de sobrevivência maior que as demais concentrações, seu uso em adição à suspensão fúngica poderia ser melhor estudado.

Durante sete dias de imersão, os percentuais de sobrevivência das larvas foram avaliados. As larvas mortas, retiradas e os números de larvas vivas foram anotados diariamente. A cada 48 horas as larvas eram alimentadas com ração para peixe triturada, estéril (Tretamin, Alevinos®; 0,05 mg/L). O ensaio biológico foi realizado três vezes em tempos distintos usando lotes diferentes de larvas e fungos (GOMES, et al. 2015).



Figura 4. Larvas de segundo instar de *Aedes aegypti* expostas durante sete dias a suspensões aquosas dos isolados CG 153 de *Metarhizium* sp. ou CG 206 de *Beauveria* sp. ou suspensões fúngicas associadas ao óleo essencial de *Schinnus molle* a 25 ppm (0,0025%).

3.10. Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de UFC e crescimento de colônia foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, que foi utilizado para avaliação dos dados pareados. Os ensaios biológicos foram submetidos a teste de normalidade, tendo as médias comparadas entre os grupos, através da análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste Student-Newman-Keuls (SNK), para comparação entre as médias e verificar entre quais tratamentos houve diferença significativa, com níveis de significância de 5% ($P < 0,05$) (SAMPALIO, 2010) (Bioestat 5.0). A curva de sobrevivência e o cálculo da média de sobrevivência (S_{50}) foi realizada utilizando Kaplan-Meier (ELANDT-JOHNSON et al, 1980). O nível de significância foi de 5% ($P \leq 0,05$). Todos os resultados foram obtidos através dos programas estatísticos Prism (GraphPad, v.7.00, Inc) e Bioestat 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade dos conídios

O percentual de conídios germinados após 24 horas das suspensões fúngicas dos isolados CG 206 de *Beauveria* sp. e CG 153 de *Metarhizium* sp. com e sem adição de óleo de *S. molle* foram avaliados (Figura 5). O percentual de germinação da suspensão do isolado de *Metarhizium* sp. foi de 99%, sendo 97% para o isolado de *Beauveria* sp. (Figura 5A e 5C, respectivamente). As formulações apresentaram percentual de germinação de 94% para o isolado de *Metarhizium* sp. e de 93% para o isolado *Beauveria* sp. (Figura 5B e 5D, respectivamente).

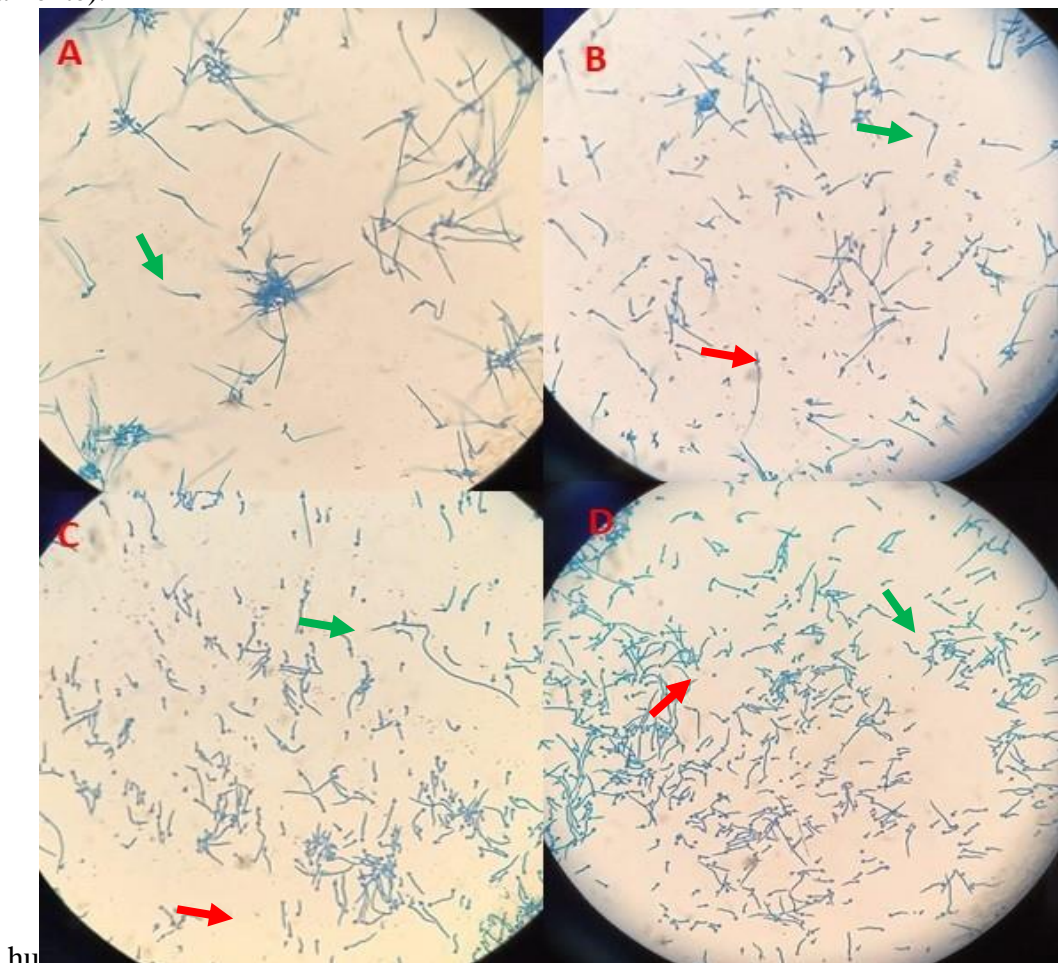


Figura 5. Germinação de conídios de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. após 24 horas de crescimento em meio BDA. (A) Conídios de *Metarhizium* sp. isolado CG 153 (B) Conídios de *Metarhizium* sp. CG 153 com óleo essencial de *Schinus molle* (C) Conídios de *Beauveria* sp. isolado CG 206 (D) Conídios de *Beauveria* sp. isolado CG 206 com óleo essencial de *Schinus molle*, aumento de 40x, em microscópio óptico. Seta verde indicando conídios germinados e seta vermelha indicando conídios não germinados

1.1. Avaliação de eficácia da ação do óleo essencial de *Schinus molle* em larvas de *Aedes aegypti*

Os percentuais de sobrevivência podem ser visualizados na Figura 11. O grupo tratado somente com água desclorada estéril apresentou percentual de sobrevivência de 95,56%, entretanto, ocorreram expressivas reduções nos percentuais de sobrevivência dos grupos tratado

com óleo essencial de *S. molle* a 100 ppm, 75 ppm e 50ppm, sendo de 10,33% ($P<0,0001$), 65,56% ($P=0,0028$) e 57,78% ($P=0,0002$), respectivamente. Em contrapartida, o grupo tratado com óleo essencial de *S. molle* a 25 ppm apresentou percentual de sobrevivência de 88,26% não sendo estatisticamente significativo ($P=0,5739$) em comparação ao controle (Tabela 4).

Quando comparados entre si, a redução do percentual de sobrevivência do grupo tratado com *S. molle* a 100 ppm apresentou resultado estatisticamente significativo em comparação aos grupos tratados nas menores concentrações do óleo ($P<0,0001$) (Tabela 4). O percentual de sobrevivência dos grupos tratados com óleo essencial de *S. molle* a 75 ppm ou 50ppm não foram estatisticamente significativos entre si ($P=0,5739$), porém apresentaram diferença significativa ($P=0,0203$ e $P=0,0024$, respectivamente) em comparação ao grupo tratado a 25 ppm do óleo essencial (Tabela 4).

Aqui, apenas a exposição das larvas a 100 ppm de óleo essencial de *S. molle* foi capaz de reduzir o tempo médio de sobrevivência das larvas para apenas um dia (Tabela 4).

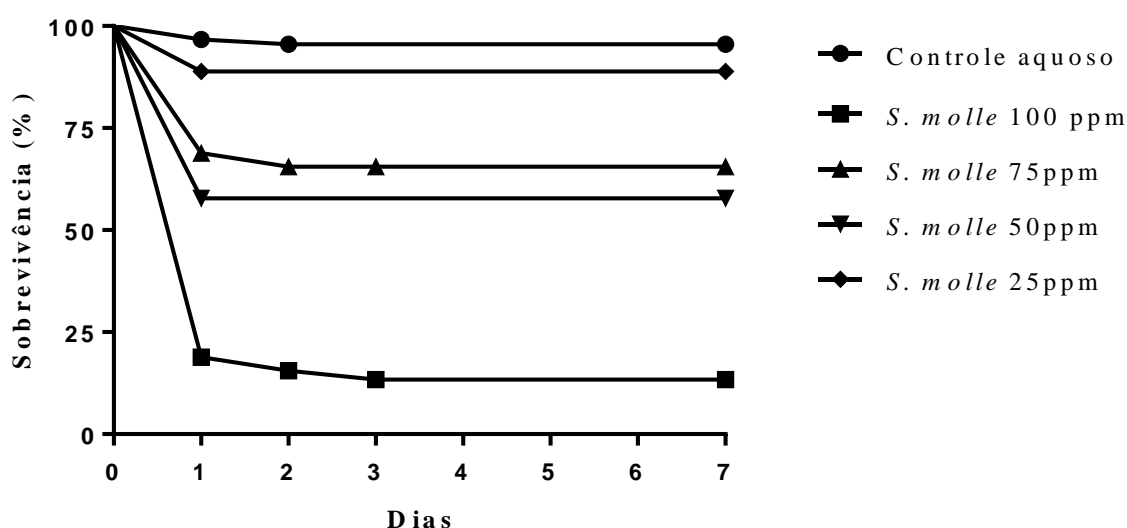


Figura 6. Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de exposição ao óleo essencial de *Schinus molle* a 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm e 25 ppm. Grupo controle exposto somente a água desclorada estéril (Controle aquoso).

Tabela 2. Média e desvio padrão da sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* expostas a óleo essencial de *Schinus molle* a 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm e 25ppm durante sete dias. Tempo médio de sobrevivência (S_{50}). Grupo controle exposto somente a água desclorada estéril (Controle aquoso). ND = Não determinado.

Tratamento	Sobrevivência (%)	S_{50}
Controle aquoso	95,56 a \pm 7,26	ND
<i>S. molle</i> 25 ppm	88,89 a \pm 12,69	ND
<i>S. molle</i> 50 ppm	57,78 b \pm 23,33	ND
<i>S. molle</i> 75 ppm	65,56 b \pm 22,97	ND
<i>S. molle</i> 100 ppm	10,33 c \pm 14,78	1

*Resultados seguidos de mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$).

1.2. Compatibilidade do óleo essencial de *Schinus molle* com *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp.

Após quatro dias, já foi possível observar formação de colônias (Figura 6).

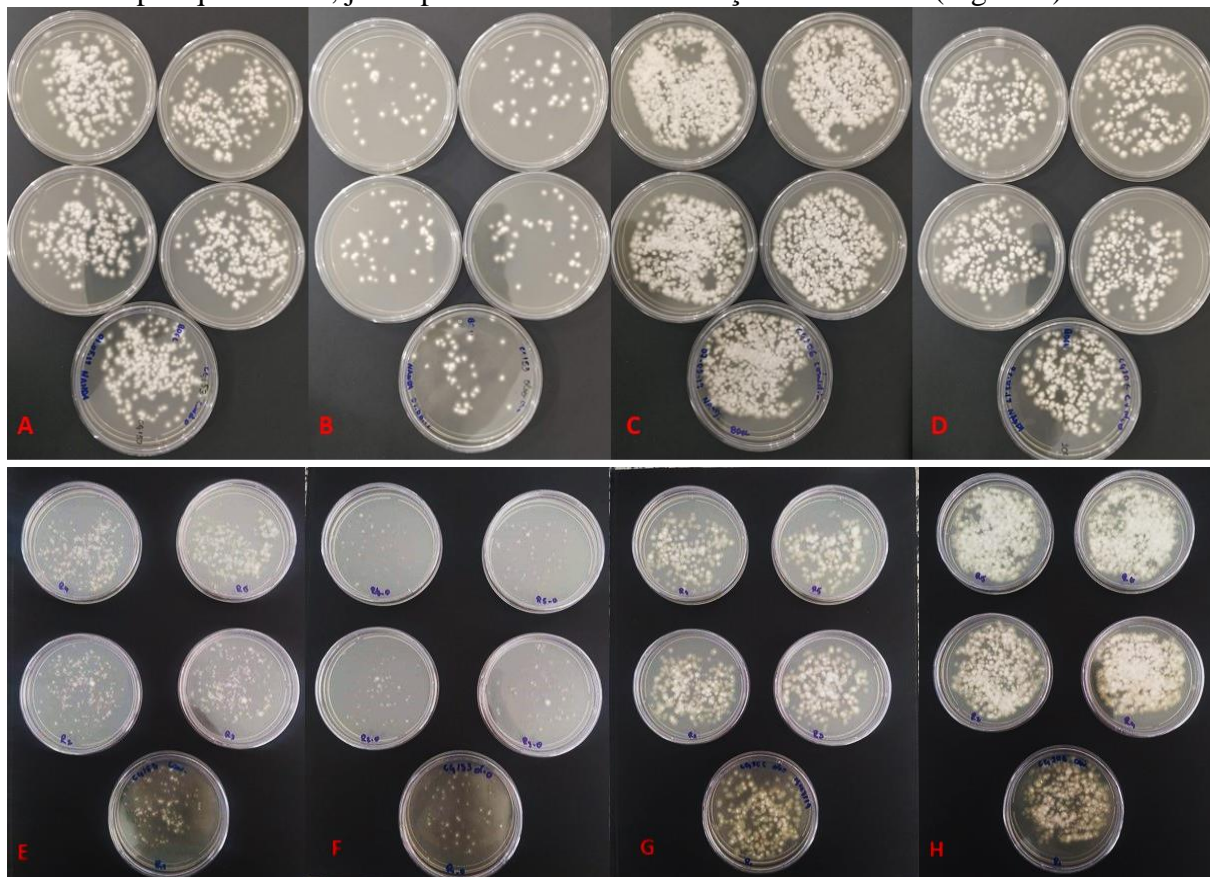


Figura 7. Avaliação de Unidades formadoras de colônia. Colônias formadas de CG 153 de *Metarhizium* sp. (A e E), associado ao óleo essencial de *Schinus molle* 75 ppm (B) e 25 ppm (F) e de CG 206 de *Beauveria* sp. (C e G), associado ao óleo essencial de *Schinus molle* a 75 ppm (D) e 25 ppm (H).

Ambos os isolados fúngicos associados ao óleo essencial de *S. molle* a 75 ppm apresentaram diferença significativa ($P=0,0079$ para ambos) quando comparados às suas respectivas suspensões fúngicas utilizadas isoladamente. O óleo essencial de *S. molle* foi capaz de interferir na formação de colônias fúngicas mesmo na menor concentração (25 ppm). A redução nos percentuais de UFC dos isolados associados ao óleo foram de 72,33% (CG 153+75 ppm), 43,92% (CG 206+75ppm), 67,96% (CG 153+25 ppm) e 27,55% (CG 206+ 25 ppm). As quantificações de UFC podem ser visualizados nas Tabelas 2 e 3 e Figuras 6 e 7.

Tabela 3. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia (UFC) dos isolados CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. associados ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* a 75 ppm.

Tratamento	UFC (+) Desvio Padrão	Tratamento	UFC (+) Desvio Padrão
<i>Metarhizium</i> sp.	120 a ± 16,08	<i>Beauveria</i> sp.	284,3 c ± 20,63
<i>Metarhizium</i> sp.+ OE	33,2 b ± 4,43	<i>Beauveria</i> sp.+ OE	159,6 d ± 25,19

*Resultados seguidos de mesma letra na mesma linha, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$).

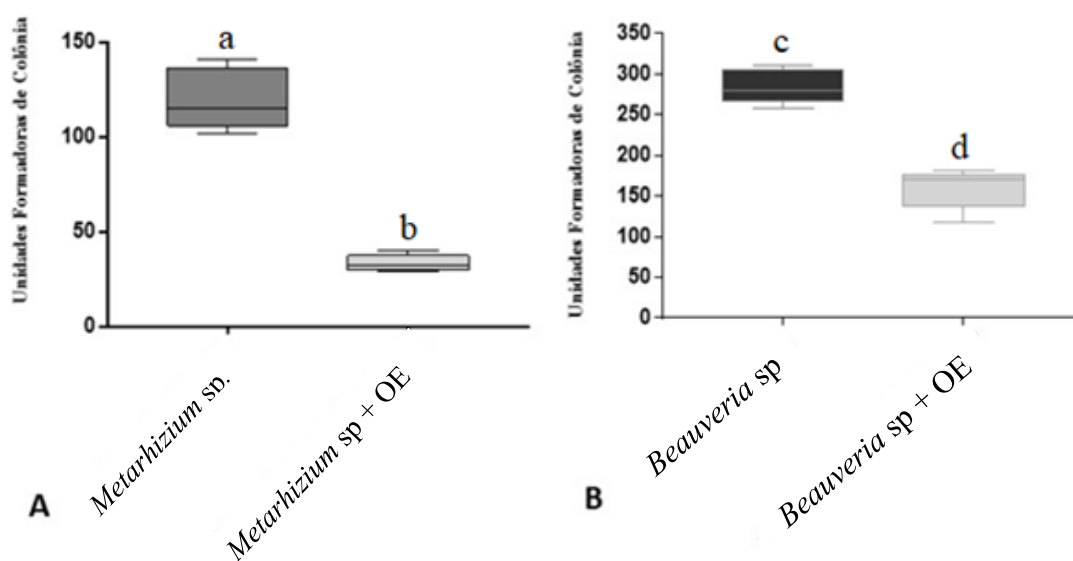


Figura 8. Unidades formadoras de colônia dos isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. associados ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* a 75 (A; B).

Tabela 4. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia (UFC) dos isolados CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. associados ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* a 25 ppm.

Tratamento	UFC (\pm) Desvio Padrão	Tratamento	UFC (\pm) Desvio Padrão
<i>Metarhizium</i> sp.	180,8 a \pm 38,37	<i>Beauveria</i> sp.	184.6 c \pm 17,86
<i>Metarhizium</i> sp.+OE	57,67 b \pm 5,46	<i>Beauveria</i> sp + OE	133,8 d \pm 4,89

*Resultados seguidos de mesma letra na mesma linha, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$).

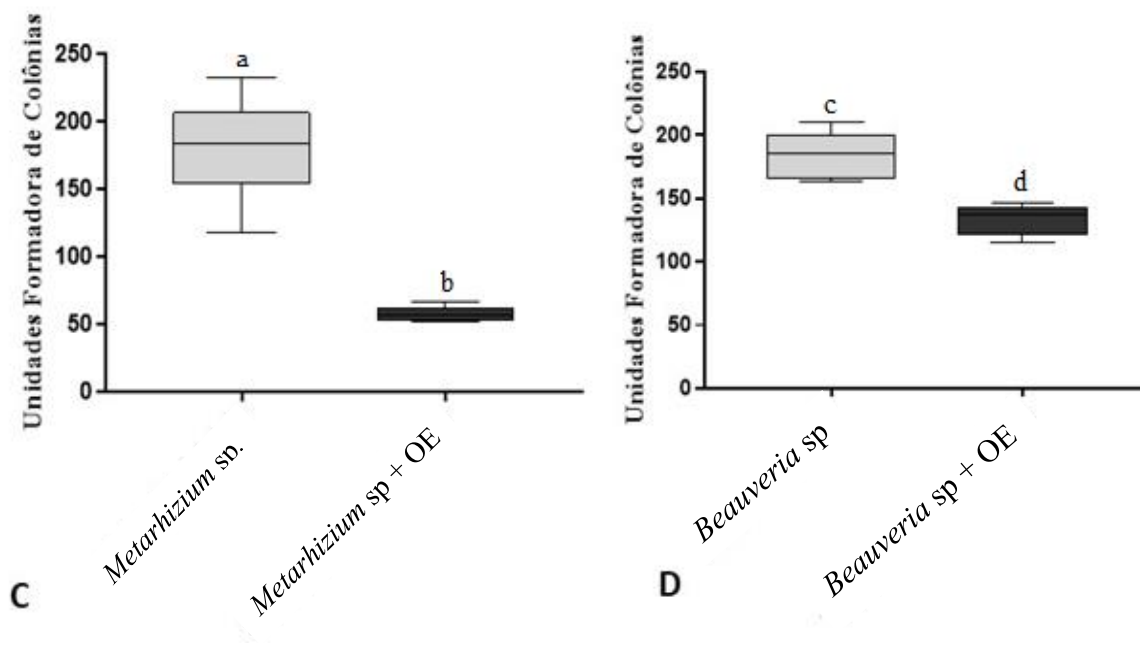


Figura 9. Unidades formadoras de colônia dos isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *Beauveria* sp. associados ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* a 25 ppm (C; D).

Embora o óleo essencial tenha interferido no número de colônias formadas de ambos os isolados fúngicos, na avaliação do crescimento radial da colônia o óleo essencial de *S. molle* a 25 ppm não apresentou diferença significativa ($P=0,7304$) no tamanho das colônias tendo desenvolvimento médio final de 28,81 mm para a colônia do isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. sem associação com óleo e de 30,48 mm para a colônia fúngica associada ao óleo essencial. O mesmo foi observado no isolado CG 206 de *Beauveria* sp., não sendo estatisticamente significativo ($P=0,8633$) os diâmetros das colônias associadas ao óleo essencial (30,70 mm) e sem o óleo essencial (31,22 mm).

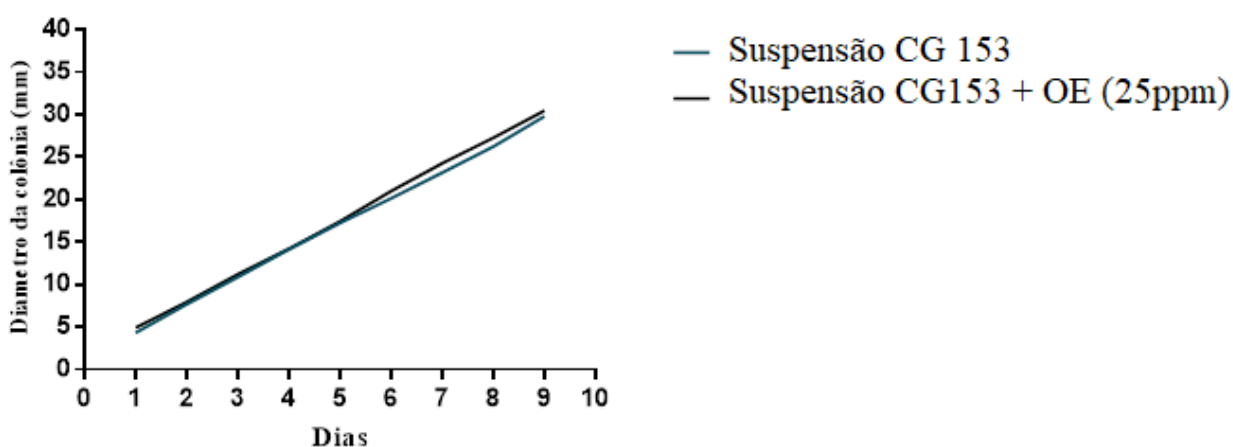


Figura 10. Crescimento do diâmetro da colônia avaliado a partir de pontos de inoculo do isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. associado ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* na concentração de 25 ppm durante nove dias.

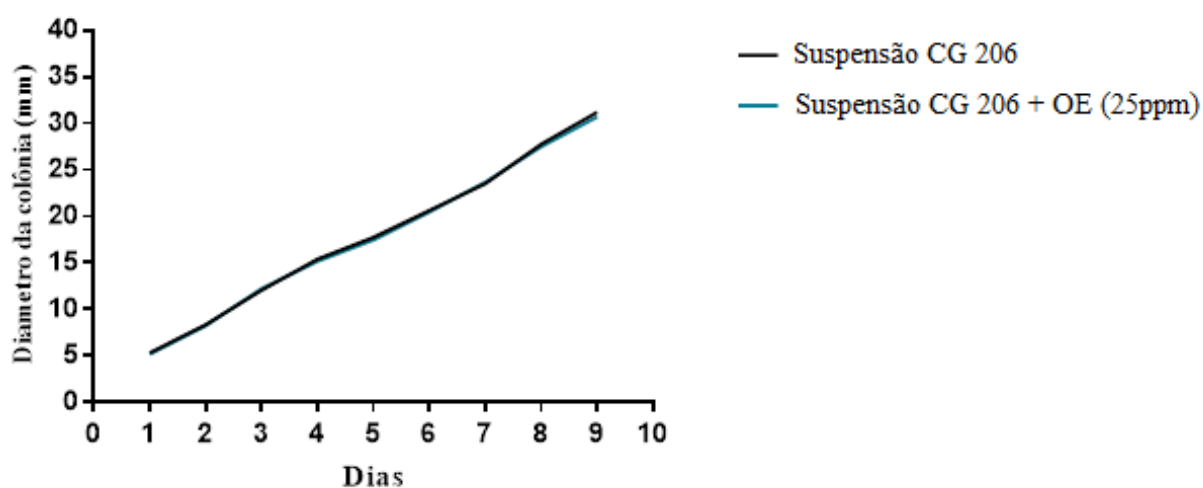


Figura 11. Desenvolvimento médio diário do diâmetro da colônia, aferidos a partir de pontos de inóculo do isolado CG 206 de *Beauveria* sp. associado ou não ao óleo essencial de *Schinus molle* na concentração de 25 ppm durante nove dias.

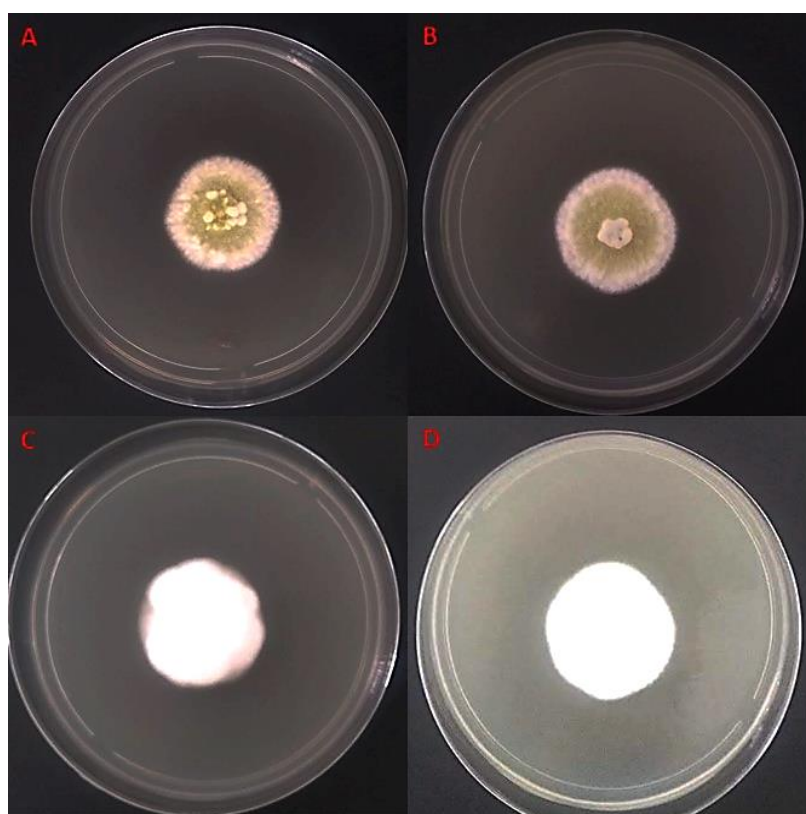


Figura 12. Avaliação de crescimento do diâmetro das colônias. Colônia de CG 153 de *Metarhizium* sp. isolado (A) ou associado ao óleo essencial de *Schinus molle* a 25 ppm (B) e CG 206 de *Beauveria* sp. isolado (C) ou associado ao óleo essencial de *Schinus molle* a 25 ppm (D), sete dias após inoculação em meio de cultura.

4.4 Ensaio biológico de ação da associação dos isolados de *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. ao óleo de *Schinus molle* contra larvas de *Aedes aegypti*

Os percentuais de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* após exposição a suspensões fúngica com e sem o OE podem ser visualizados na Figura 12 e Tabela 5. Não foi observada diferença significativa ($P=0,600$) nos percentuais de sobrevivência entre os grupos controle expostos a água + Tween 80% em comparação ao tratamento com óleo essencial de *S. molle* L. a 25 ppm.

As larvas expostas tanto a suspensão do isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. ou a suspensão do mesmo isolado acrescida de OE apresentaram diferença significativa ($P<0,0001$) quando comparados com ambos os grupos controles. Interessantemente, 24h após exposição, os percentuais de sobrevivência das larvas foram inferiores a 25% para ambos tratamentos com *Metarhizium* sp. a 10^7 conídios mL⁻¹.

Neste ensaio biológico, o óleo essencial na concentração de 25 ppm não apresentou melhora no desempenho do isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. quando comparamos as suspensões acrescidas de OE com suspensões aquosas ($P=1,000$). O mesmo foi observado nos percentuais de sobrevivência das larvas expostas ao isolado CG 206 de *Beauveria* sp., não sendo estatisticamente significativo ($P=0,6531$) a comparação entre o desempenho da suspensão composta por fungo adicionado de óleo com a suspensão aquosa.

Os resultados obtidos das larvas de *A. aegypti* expostas ao isolado CG 153 de *M. sp.* foram melhores quando comparados ao tratamento com o isolado CG 206 de *B. sp.*. Sendo estatisticamente significativos ambos os tratamentos (com e sem óleo) ($P=0,0075$) em comparação a suspensão do isolado CG 206 de *B. sp.* somada ou não ao OE de *S. molle* ($P=0,0261$).

Quando comparados os percentuais de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* expostas ao isolado CG 206 de *Beauveria* sp., somente as larvas tratadas com óleo essencial apresentaram diferença significativa ($P<0,0322$) em comparação ao grupo controle exposto ao óleo essencial de *S. molle*. A suspensão do mesmo isolado sem adição de óleo não apresentou resultados estatisticamente significativo ($P=0,0905$) em comparação ao controle oleoso.

É interessante destacar que o tempo médio de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* foi de apenas um dia após exposição ao isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. associado ou não ao óleo (Tabela 5).

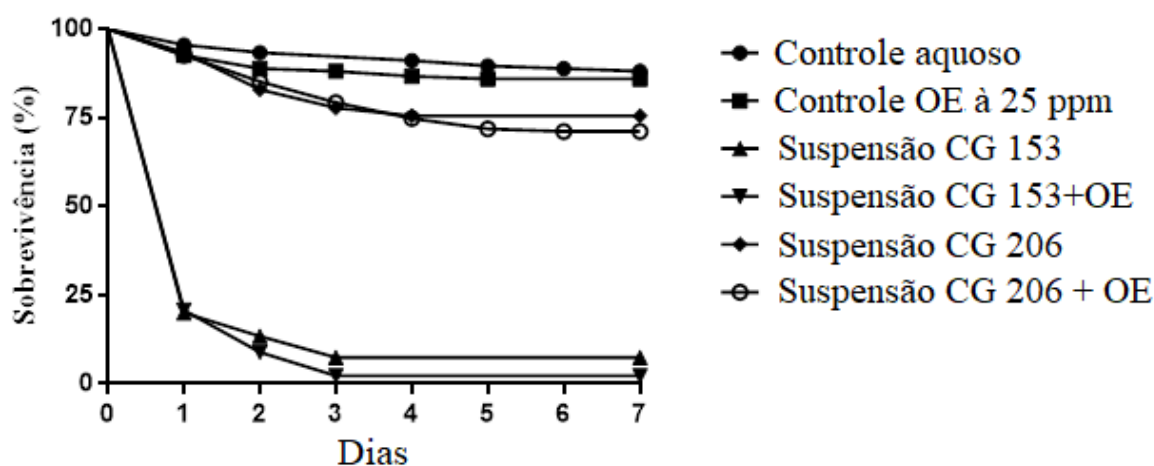


Figura 13. Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de exposição as suspensões de isolados CG 153 de *Metarhizium* sp. ou CG 206 de *Beauveria* sp. foram preparadas com óleo essencial de *Schinus molle* a 0,0025% (25ppm). Grupo controle expostos

somente a água desclorada estéril + Tween 80 0,01% ou óleo essencial de *Schinus molle* a 0,0025% (25ppm).

Tabela 5. Média e desvio padrão da sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* expostas a aos fungos CG 153 de *Metarhizium* sp. ou CG 206 de *Beauveria* sp. utilizados isoladamente ou associados ao óleo essencial de *Schinus molle* a 25ppm. Grupo controle exposto somente a água desclorada estéril + Tween 80 0,01% (Controle aquoso) ou óleo essencial de *Schinus molle* a 25ppm (Controle oleoso). Tempo médio de sobrevivência (S_{50}). ND= não determinado.

Tratamento	Sobrevivência (%)	S_{50}
Controle aquoso	88,89 da \pm 5,77	ND
Controle OE à 25ppm	86,67 a \pm 5,77	ND
<i>Metarhizium</i> sp.	0,74 c \pm 2,22	1
<i>Metarhizium</i> sp.+ OE à 25 ppm	0,74 c \pm 2,22	1
<i>Beauveria</i> sp.	74,07 db \pm 9,68	ND
<i>Beauveria</i> sp.+ OE à 25 ppm	71,11b \pm 8,16	ND

*Resultados seguidos de mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de formulações com baixo impacto ambiental vem sendo alvo de diversos estudos para o combate do mosquito *Aedes aegypti*. Mascarin et al. (2018) definem que novos produtos desenvolvidos a partir da combinação de inseticidas obtidos de compostos naturais ou químicos convencionais podem proporcionar oportunidades para ampliar a faixa alvo de pragas e eficácia, já que existem diversos empecilhos para a produção massiva de conídios de fungos entomopatogênicos.

Estudos mostram que os fungos *Metarhizium sp.* e *Beauveria sp.* possuem ação eficaz no controle de larvas de *A. aegypti* e, de acordo com Butt et al. (2013) *Metarhizium sp.* apesar de ser um fungo de ação em hospedeiros terrestres, possui ação larvicida porém sem adesão a cutícula do hospedeiro, por mecanismos próprios de infecção ainda não completamente elucidados. Falvo et al. (2018) observaram que a profundidade da água e os níveis de radiação UV-B avaliados em seus testes não reduziu significativamente a virulência e germinação dos conídios de *Metarhizium sp.* e, portanto, apresenta um bom potencial para uso em ambiente aquático.

Segundo Alkhaibari et al. (2017) há uma diferença baixa na mortalidade de larvas de *A. aegypti* utilizando-se suspensões fungicas de *Metarhizium anisopliae*. nas concentrações 1×10^7 ou 1×10^8 conídios mL^{-1} , sugerindo um limiar acima do qual não se alcançariam níveis de controle ou benefício econômico mais altos. No presente estudo, a concentração 1×10^7 conídios mL^{-1} foi utilizada para ambos os fungos e mostrou-se eficaz no controle de *A. aegypti* com o fungo *Metarhizium sp.* e, quando comparados ambos, a espécie fúngica entomopatogênica *Beauveria sp.* apresentou uma maior taxa de sobrevivência das larvas, indicando assim um diferencial na virulência das espécies utilizadas, sendo portanto *Metarhizium sp.* mais virulento.

O óleo essencial escolhido para compor os testes de associação realizados no estudo e verificar sua ação sobre *Metarhizium sp.* e *Beauveria sp.*, segundo Santos (2010) é encontrado de Pernambuco ao Rio Grande do Sul, ou seja, em boa parte do território brasileiro e, apesar de Prado et al. (2019) terem observado a ação antifúngica do óleo essencial de *S. molle* sobre o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, mostrou ação fraca sobre *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton quinckeanum* e nenhuma ação sobre *Candida sp.*, sendo assim, o óleo mostra um potencial antifúngico, porém com um número limitado de espécies sensíveis a sua ação.

Durante a verificação da compatibilidade do óleo essencial de *S. molle* com os fungos *Metarhizium sp.* e *Beauveria sp.*, os resultados indicam ser compatíveis nas concentrações testadas, já que seu crescimento não foi inibido e, assim, observamos que em concentrações testadas, realizadas a partir de diluições seriadas (25 e 75 ppm), o fungo não tem seu desenvolvimento impedido, sendo assim, é possível que a ação dos fungos sobre o hospedeiro alvo não seja impedida pela ação concomitante do óleo.

Bitencourt et al. (2018) obtiveram uma relação positiva na associação entre óleo mineral e suspensão conidial de *Beauveria sp.* e Gomes et al. (2015) observaram que adição de óleo de neem às suspensões conidiais elevou a virulência, e reduziu o tempo de sobrevivência de larvas. Já no presente trabalho, comprovou-se que o uso do óleo essencial de *S. molle*, em na concentração de 25 ppm não alterou a eficiência do fungo no controle de larvas e não apresentou efeito deletério com valores semelhantes na sobrevivência de larvas com e sem adição do óleo. O óleo essencial poderá ser futuramente testado em novas concentrações e em associação a óleos vegetais carreadores, beneficiando-se dessa associação, reduzindo sua concentração utilizada.

No presente estudo observamos também que o óleo essencial de *S. molle* possui boa ação quando utilizado no controle de larvas de *A. aegypti* que deve ser explorada na indústria

de pesticidas, como sugerido por Batista, et al. (2016) em sua pesquisa de ação do óleo de *S. molle* sobre a espécie *Ctenocephalides felis felis*. Duarte et al. (2018) analisaram efeitos genotóxicos por parte do óleo essencial e concluíram que células linfocitárias não sofreram danos nas concentrações testadas de óleo nem efeitos mutagênicos, apenas em concentrações acima de 42,07µl/ml ocorreram efeitos citotóxicos somente em macrófagos apresentando maior frequência de micronúcleos, sendo seu uso seguro em doses baixas, como as que utilizamos nos testes, dando assim maior segurança na sua aplicabilidade.

No teste de ação do óleo sobre larvas do mosquito, os resultados apresentados mostram uma ação larvicida positiva do óleo nas concentrações acima de 50 ppm, esses resultados observados assemelham-se com o estudo de Procópio et al. (2015) que utilizou o óleo essencial de uma planta do mesmo gênero, a *Schinus terebinthifolius*, e obteve um resultado positivo no controle de larvas de *A. aegypti*, onde observaram danos ao intestino médio das larvas analisadas pelos autores. Estudos afim de esclarecer os mecanismos de ação do OE de *S. molle* deverão ser realizados, comprovando sua eficácia e ação sobre larvas do mosquito.

Corroborando com o estudo de Mamprim et al. (2013) onde o tratamento com associação a diversos extratos vegetais em diferentes concentrações influenciou na formação de colônias e principalmente na viabilidade (com redução variando de 50 a 80%) verificou-se a compatibilidade para todos os extratos. Porém, no presente trabalho não houve grande redução no percentual de germinação da suspensão fúngica em relação a formulação acrescida de óleo. No presente estudo o óleo essencial e os fungos testados também foram compatíveis.

Na avaliação de unidades formadoras de colônia observou-se um atraso no crescimento do fungo, apesar de não causar uma redução no percentual de germinação como citado anteriormente e não alterar o diâmetro das colônias avaliadas. TAMAI et al. (2002) propõem em seus estudos que a aplicação do produto aditivo a ação do fungo seja feita após 48h, pois esse é o tempo necessário para germinação do conídio e ação do mesmo sobre o hospedeiro alvo. O presente estudo não apresentou uma relação de potencialização do efeito de *M. sp.* e *B. sp.* sobre as larvas de *A. aegypti*, assim a adição de óleo essencial posteriormente a 48h citadas é uma possível solução.

Dong et al. (2012) observaram que os fungos *Metarhizium sp.* e *Beauveria sp.* reduziram a expectativa de vida de mosquitos adultos, portanto, sugere-se que estudos continuados utilizando diferentes concentrações tanto de *M. sp.* e *B. sp.* e *S. molle* sejam realizados para que se verifique seu potencial para o combate de mosquitos adultos bem como seu efeito residual e no ambiente.

6. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *Schinus molle* nas concentrações de 25 ppm e 75 ppm é compatível com os fungos *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp.
- O óleo essencial de *S. molle* utilizado nas concentrações 25 ppm e 75 ppm interfere na formação de colônias e do isolado CG 153 de *Metarhizium* sp. e CG 206 de *B. sp.* os retardandos.
- O óleo essencial de *S. molle* é ativo contra larvas L₂ de *Aedes aegypti* nas concentrações de 50 ppm, 75 ppm e 100 ppm;
- O uso concomitante de suspensões fúngicas de *Metarhizium* sp. ou *Beauveria* sp. associadas ao óleo essencial de *S. molle* não apresentou melhora no desempenho do fungo, porém, não interferiu no desempenho do mesmo, podendo-se associar os dois métodos de controle sem efeitos deletérios a ambos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O manejo integrado continua sendo a forma mais eficaz no controle do mosquito. Novos estudos podem ser realizados testando-se diferentes concentrações de óleo essencial e de suspensões fúngicas, assim como diferentes isolados fúngicos, afim de verificar a eficiência de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp. associados à *Schinus molle* em larvas e em mosquitos adulto de *Aedes aegypti* bem como seu período residual no ambiente.

\

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKHAIBARI, A. M.; CAROLINO A. T.; J. C.; SAMUELS R. I.; BUTT T. M.; Differential Pathogenicity of *Metarhizium* blastospores and conidia against larvae of three mosquito species. **J Med Entomol.** v.54 n.3 p 696–704 mai. 2017.
- ALVES, S. B.; **Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle microbiano de insetos.** FEALQ: Piracicaba,289–382p. 1998.
- ARAÚJO JR, J. M.; MARQUES, E. J.; OLIVEIRAJ. V. D. Potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates and Neem oil to control the aphid *Lipaphiserysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology** v.38 n.4 p.520-525. 2009.
- ARAÚJO, H. R. C.; CARVALHO, D. O.; IOSHINO, R. S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L. *Aedes aegypti* Control Strategies im Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v.6 n. 2 p. 576-594, jun. 2015
- BARATA, E. A. M. D. F.; COSTA, A. I. P. D.; NETO, F. C.; GLASSER, C. M. BARATA, J. M. S.; NATA, D.; População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 237-242, jun. 2001.
- BARRERA, R.; AMADOR, M.; MUNOZ, J.; ACEVEDO, V. Integrated vector control of *Aedes aegypti* mosquitoes around target houses. **Parasites & Vectors**, v. 11, fev. 2018.
- BATISTA, L.C.D S.O.; CID, Y.P.; ALMEIDA, A.P.D.; PRUDÊNCIO, E.R.; RIGER, C.J.; SOUZA, M.A.A.D.; COUMENDOUROS, K.; CHAVES, D.S.A. In vitro efficacy of essential oil sand extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**. v. 143, n. 5, p. 627-638, abr. 2016.
- BERNARDO, C. C. **Conídios e blastosporos de *Metarhizium spp.* e *Beauveria bassiana*: virulência para *Rhipicephalus microplus* e resposta ao calor e à radiação UV-B.** 2016. 93p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2016.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; et al. The global distribution and burden of Dengue. *Nature*. v. 496. p. 504-507, abr. 2013.
- BITENCOURT, R. O. B.; FARIA, F. S.; RODRIGUES, C. J. B. C.; SILVA, E. M.; CORVAL, A. R. C.; GOLO, P. S.; PONTES, E. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ANGELO, I. C. *In vitro* Control of *Aedes aegypti* Larvae Using *Beauveria bassiana*.. **WORLD ACADEMY OF SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY**, v. 12, p. 400-404, 2018.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 29, n.2, p. 351-354, 1999.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.16, n.2, p. 113-118, jun. 2007a.

BRAGA, I. A.; VALLE, D.; *Aedes aegypti*: insecticides: mechanisms of action and resistance. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 179-293, dez. 2007b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Avaliação da eficácia de análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina no controle de *Aedes aegypti* Brasília: **Ministério da Saúde**; set. 2005.

BUTT, T. M.; GREENFIELD, B. P. J.; GREIG, C.; MAFFEIS, T. G. G.; TAYLOR, J. W. D.; PIASECKA, J.; EASTWOOD, D. C. *Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death. **PLoS ONE**, v.8 n. 12, 2013.

CAROLINO, A.T.; PAULA, A.R.; SILVA, C.P.; BUTT, T.M.; SAMUELS, R.I. Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasit. Vectors**, Campos de Goytacazes, v. 198 abri. 2014.

CASTILLO, R. M.; STASHENKO, E.; DUQUE, J. E. Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.33, n.1, p. 25–35, mar. 2017.

CERNY, T.; SCHWARZ, M.; SCHWARZ, U.; LEMANT, J.; GÉRARIN, P.; KELLER, E. The range of neurological complications in chikungunya fever. **Neurocritic Care**. v. 27 n.3 p. 447-57, dez. 2017.

CHAVES, B.A.; JUNIOR A.B.V.; SILVEIRA K.R.D.; PAZ, A.D.C.; VAZ, E.B.D.C.; et al. Vertical Transmission of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) in Amazonian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Delays Egg Hatching and Larval Development of Progeny. **Journal of Medical Entomology**. jul. 2019.

COITINHO, R.L.B.C.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, M.G.C.G; CÂMARA, C.A.G.; Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais Motschulsky*, 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.35, n.1, p. 172-178, fev. 2011.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 228p. 1994.

DANIEL, J. F. S.; SILVA, A. A.; NAKAGAWA, D. H.; MEDEIROS, L. S. D.; CARVALHO, M. G.; TAVARES, L. J.; ABREU, L. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; Larvicidal Activity of *Beauveria bassiana* Extracts against *Aedes aegypti* and Identification of Beauvericins. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v.28, n.6, p. 1003-1013, jun. 2017.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**, v.113(2), p. 565–592, fev. 2014.

DONG, Y.; MORTON J.C.; RAMIREZ, J.L.; SOUZA-NETO. J.; DIMOPOULOS, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. activate Toll and JAK-STAT pathway controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 42 p.126-132 Baltimore, fev. 2011

DUARTE, J. A.; ZAMBRANO, L. A. D. B.; QUINTANA, L. D.; ROCHA, M. B.; SCHMITT, E. G. Immuno toxicological Evaluation of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) Essential Oil in Lymphocytes and Macrophages, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2018, Art. 6541583, out. 2018.

ELANDT-JOHNSON, R. & JOHNSON, N. L. **Survival models and data analysis John Wiley and Sons**, New York, 1980

FALVO, M. L.; MEDINA, P. A.; RODRIGUES, J.; LASTRA, C. C. L.; GARCÍA, J. J.; FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C. Effect of UV-B Irradiation on Water-Suspended *Metarhizium anisopliae* s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Conidia and Their Larvicidal Activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), **Journal of Medical Entomology**, v. 55 n. 5 p. 1330-1333, set. 2018

FARNESI, L.C.; VARGAS H.C.M.; VALLE, D.; REZENDE G.L.; Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors **PLoS neglected tropical diseases** v. 11, p. e0006063, 2017.

FERREIRA, A. B. H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p.1314, 1986.

FUNASA. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. - 3. ed., rev. - Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 84 p., 2001.

FUNASA. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V.; Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology** 34: p.843-847, 2005.

GOMES, S.A; PAULA, A.R; RIBEIRO, A; MORAES, C.A.P; SANTOS, J.W.A.B; SILVA, C.P; SAMUELS, R.L.; Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & Vectors**, v.8, p.1280-1289, 2015.

GREENFIELD B. P. J.; LORD, A. M.; DUDLEY E., BUTT, T. M. Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* fail to adhere to mosquito larval cuticle **R. Soc. open sci.** out.2014.

KAVALLIERATOS, N. G.; ATHANASSIOU, C. G.; AOUNTALA, M. M.; KONTODIMAS, D. C. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Isaria fumosorosea* for Control of *Sitophilus oryzae*. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 87-93, jan. 2014.

KRAMER, M. U. G.; REINER JUNIOR, R. C.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; GILBERT, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 854–863, mar. 2019.

- LIU, C. P.; LIU, S. D. Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. **Journal of Microencapsulation**, v. 26 n.5, p. 377-384. 2009.
- JIANG A.; YUAN Y.; YANG, R.; ZHANG, N.; XIE, Y.; LAI, W.; PENG, X.; YANG, G.; GU, X. *Beauveria bassiana*. is a potential effective biological agent against *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* mites, **Biological Control**, v. 131, p.43-48, abr. 2019
- MAMPRIM, A. P., ALVES, L. F. A., PINTO, F. G. DA S., FORMENTINI, M. A., MARTINS, C. C., & BONINI, A. K. Efeito de defensivos agrícolas naturais e extratos vegetais sobre parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34 n.4, 2013.
- MARQUES, E. J.; ALVES, S. B.; MARQUES, I. M.R. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. A *Diatraeasaccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **An. Soc. Entomol. Bras.**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 303-307, jun. 2000.
- MARTIANASARI, R.; HAMID, P. H. Larvicidal, adulticidal, and oviposition-deterrent activity of *Piper betle* L. essential oil to *Aedes aegypti*. **Veterinary world**, v.12 n.3, p. 367–371. Mar 2019.
- MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA JR.C. Í., FERNANDES, É. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M.; Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial Control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology** in impression,2018.
- MERTZ, M. R.; ALVES, L. F. A.; MARCOMINI, A. M.; OLIVEIRA, D. G. P.; SANTOS, J. C. D. Efeito de produtos fitossanitários naturais sobre *Beauveria basiana* (Bals.) Vuill. *in vitro*. **Biossay**, Lavras, v. 5, n. 3, p. 1-10, 2010.
- MORRISON, A.C.; ZIELINSKI-GUTIERREZ, E.; SCOTT, T.W.; ROSENBERG, R. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Med** v.5, mar. 2008.
- MUTURI, E.J.; RAMIREZ, J.L.; DOLL, K.M.; BOWMAN, M.J. Combined Toxicity of Three Essential Oils Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. **J Med Entomol**. V.54 n. 6 p. 1684-1691.nov. 2017
- NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, J. M. D.; GOLDING N.; KRAEMER M. U. G.; OLIVEIRA L. F. D. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, p. 102, abr. 2016.
- PAMPLONA, L. G. C.; LIMA, J. W. D. O.; CUNHA, J. C. D. L.; SANTANA, E. W. D. P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de cimento do município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 37, n. 5, p. 400-404, out. 2004.

PEREIRA, B.B.; OLIVEIRA, E.A.D. Determinação do potencial larvófago de *Poecilia reticulata* em condições domésticas de controle biológico. **Cad. saúde colet.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 241-245, Set. 2014 .

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. D. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 813-816, dez. 2003

PROCÓPIO, T. F.; FERNANDES, K.M.; PONTUAL E.V.; XIMENES, R.M.; DE OLIVEIRA, A.R.C.; SOUZA, C. D. S.; MELO, A. M. M. D. A.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; PAIVA, P. M. G.; MARTINS, G. F.; NAPOLEÃO, T. H. *Schinus terebinthi folius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **PLoS ONE** v.10 n. 5. mai. 2015.

REYES-VILLANUEVA, F.; GARZA-HERNANDEZ, J.A.; GARCIA-MUNGUIA, A.M.; TAMEZ-GUERRA, P.; HOWARD, A.F.; RODRIGUEZ-PEREZ, M.A. Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. **Parasites Vectors**, v. 4, p.1–7, Tamaulipas, set. 2011.

REZENDE, G. L., MARTINS, A. J., GENTILE, C., FARNESI, L. C., PELAJO-MACHADO, M., PEIXOTO, A. A., & VALLE, D. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Dev Biol**. V. 8 n.82. Set. 2008.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEPMVZ-Editora, 265p. 2002.

SANTOS, A. C. A. D.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B., SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthi folius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Rev. bras. farmacogn**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SCHOLTE, E.J.; TAKKEN,W.; KNOLS B.G. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica** v. 102 n. 3 p. 151-158 jul 2017.

SCHULER-FACCINI, L.; RIBEIRO, E.M.; FEITOSA, I.M.L.; HOROVITZ, D.D.; CAVALCANTI, D.P.; et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly – Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal WklyRep** v. 65 p. 59–62, jan. 2016.

SHI, W.B.; FENG, M.G. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus chuscinna barinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system, **Biological Control**, v. 30, p. 165-173, jun. 2004.

SILVA, R. Z.; NEVES, P.M.OJ; SANTORO, P.H.; CAVAGUCHI, S.A. Efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre a viabilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **Biossay**, v.1, p. 1-5, 2006.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. *Anacardiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4398>>

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

STANAWAY, J. D.; SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E.A.; HALASA, Y. A.; COFFENG, L. E.; et al. The Global Burden of Dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet Infect. Dis.** v. 16, n. 6, p. 712–723, jun. 2016

TAMAI, M. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; FAION, M.; PADULLA, L. F. L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 89-96, 2002.

THANGAMANI, S.; HUANG, J.; HART, C. E.; GUZMAN, H.; TESH, R. B. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene** v. 95 n. 5 p. 1169-1173, nov. 2016.

TRITSCH, S.R.; ENCINALES, L.; PACHECO, N.; CADENA, A.; CURE, C. Chronic joint pain 3 years after chikungunya virus infection largely characterized by relapsing-remitting symptoms. **J Rheumatol**, v. 46 n. 7 jul. 2019.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control**. Segunda edição. Blackwell Publishing Limited, Oxford, UK. 2001

WHITE, M. K.; WOLLEBO, H. S.; DAVID BECKHAM, J.; TYLER, K. L.; KHALILI, K. Zika virus: an emergent neuropathological agent. **Ann. Neurol.** v. 80, p. 479–489, out. 2016
WHO. Novaluron in drinking-water: use for vector control in drinking-water sources and containers. **World Health Organization**, Genebra, p. 1-6, 2007.

ZARA, A.L.S.A.; SANTOS, S.M.; OLIVEIRA, E.S.F; CARVALHO, R.B.; COELHO, G.E. Estratégias de Controle do *Aedes aegypti*: Uma Revisão. **Epidemiol Serv Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, jun. 2016.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C.; MOSIMANN, A. L.; SANTOS, G. I.; SANTOS, C. N.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, jun. 2015.