

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

**DISSERTAÇÃO**

**Efeito de fungos entomopatogênicos sobre *Aedes aegypti*:  
influência na oviposição e perfil lipídico de adultos e  
avaliação de atividade antimicrobiana em larvas**

**Luisa Andrade Azevedo**

**2023**



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

**Efeito de fungos entomopatogênicos sobre *Aedes aegypti*: influência na oviposição e perfil lipídico de adultos e avaliação de atividade antimicrobiana em larvas**

**Luisa Andrade Azevedo**

*Sob a Orientação da Professora Doutora*  
**Isabele da Costa Angelo**

*E Coorientação do Doutor*  
**Ricardo de Oliveira Barbosa Bitencourt**

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

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2023

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

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

A994e Azevedo, Luisa Andrade, 1996-  
Efeito de fungos entomopatogênicos sobre *Aedes aegypti*: influência na oviposição e perfil lipídico de adultos e avaliação de atividade antimicrobiana em larvas / Luisa Andrade Azevedo. - Seropédica, 2023.  
59 f.: il.

Orientadora: Isabele da Costa Angelo.  
Coorientador: Ricardo de Oliveira Barbosa  
Bitencourt.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2023.

1. Controle biológico. 2. Mosquitos. 3. Morfologia de ovários. I. Angelo, Isabele da Costa, 1981-, orient. II. Bitencourt, Ricardo de Oliveira Barbosa, 1986-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 6261/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.083298/2023-11

Seropédica-RJ, 18 de dezembro de 2023.

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

**LUISA ANDRADE AZEVEDO**

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

TESE APROVADA EM 18/12/2023

*(Assinado digitalmente em 18/12/2023 17:22)*

ISABELE DA COSTA ANGELO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matrícula: ###602#7

*(Assinado digitalmente em 18/12/2023 12:22)*

PATRICIA SILVA GOLO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
AI-UFRRJ (12.28.01.00.00.50)  
Matrícula: ###218#5

*(Assinado digitalmente em 18/12/2023 15:28)*

WENDELL MARCELO DE SOUZA PERINOTTO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.188-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **6261**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **18/12/2023** e o código de verificação: **a581124ceb**

*“Sometimes I’ll start a sentence,  
and I don’t even know where it’s going.  
I just hope I find it along the way.”*

***Michael Scott***

*Dedico este trabalho aos meus pais e  
à minha irmã pelo apoio incondicional  
e a Diva, Joy e Pluma pela amizade eterna.*

## AGRADECIMENTOS

Os dois últimos anos foram de muito aprendizado para mim. Não só em conhecimento acadêmico, mas em autoconhecimento também. Aprendi a improvisar para resolver situações inesperadas, muitas vezes sozinha. Aprendi a não ter medo do novo e do diferente. Aprendi que estar longe de quem eu amo não faz esse sentimento diminuir. E aprendi a me amar da forma que sou e a valorizar a minha companhia nos momentos de solidão. Graças aos meus esforços que concluo essa etapa da minha vida, mas os últimos anos seriam ainda mais desafiadores sem vocês. Assim, agradeço a:

Meus pais por sempre me incentivarem a enfrentar cada desafio e concluir cada etapa da minha vida com dedicação. São eles os responsáveis pelos valores de responsabilidade e seriedade que possuo hoje. Minha mãe, *Cátia*, ensinou-me a correr atrás do que eu quero, tendo força e empatia. Meu pai, *Célio*, ensinou-me a nunca perder o humor nas coisas, além de me permitir crescer e amadurecer sem perder a criança que tenho dentro de mim.

Minha irmã *Laura* pelos conselhos e por sempre se preocupar com o meu melhor, fazendo o que está ao seu alcance para me ver sorrindo.

*Diva* e *Joy* pela amizade pura e eterna. Tenho muita sorte de ter crescido com vocês do meu lado. *Pluma* pelo divertimento e músicas cantadas. Fico feliz de você ter nos adotado.

*Tina*, *Wender* e *Lili*, pelo apoio que me deram no Rio. Obrigada pela companhia que foi tão importante para mim.

*Rafael* e *Vinicius* por sempre me entenderem e estarem sempre dispostos a me ouvir. Como é bom saber que nossa amizade continua mais forte a cada ano.

Minha orientadora *Isabele Angelo* pela confiança e apoio. Obrigada por me ajudarem a acreditar um pouco mais em mim e nas minhas conquistas e por me receber de braços abertos na Rural. Sou eternamente grata pelos ensinamentos que foram além da vida acadêmica. E meu coorientador *Ricardo Bitencourt* pelo direcionamento e paciência, do início ao fim.

Meus companheiros de pesquisa *Haika Moreira*, *Bruna Martinatt*, *Kamila Leite*, *Victor Hugo Luques*, *Aimée Freitas* e *Isabelle Santiago* não só pela ajuda que foi fundamental para o desenvolvimento dos experimentos, mas pela amizade e parceria.

Toda *equipe do Laboratório de Controle Microbiano* pelos ensinamentos, conversas e risadas que me proporcionaram. Tenho muito orgulho de ter feito parte desse grupo brilhante de pesquisadores.

Professora *Adriana Ventura*, *Thereza Patricio* e professora *Shana Mattos* e pela parceria realizada e suporte técnico.

*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pelo financiamento desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)* - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

A todos que passaram pela minha vida durante esses anos, sou grata pelos ensinamentos que foram além da vida acadêmica.

## BIOGRAFIA

Luisa Andrade Azevedo, filha de *Célio Edson Alves de Azevedo Júnior* e *Cátia Alessandra Andrade Azevedo*, nasceu em 03 de maio de 1996 no município de Timóteo, Minas Gerais.

Estudou no Colégio Lúcia Casassanta até a antiga terceira série do ensino fundamental e se mudou para o Colégio São Francisco Xavier, onde estudou até a metade do primeiro ano do Ensino Médio. Transferiu para o Centro Educacional Católica do Leste de Minas Gerais no primeiro ano, na metade de 2011 e ficou até o meio de 2012, quando realizou o intercâmbio de ensino médio no colégio Loreto Secondary School em Clonmel, Irlanda. Ao voltar para o Brasil, finalizou o terceiro ano do ensino médio no Colégio São Francisco Xavier em 2013.

Em agosto de 2015 ingressou no curso de Bacharelado em Medicina Veterinária do Centro Universitário de Belo Horizonte. Durante a graduação, Luisa se envolveu em projetos institucionais, sob mentoria do Prof. Dr. *Gabriel Almeida Dutra* e da Profa. Dra. *Prhiscylla Sadanã Pires*, que a motivaram e inspiraram a se aventurar no mundo acadêmico. Em julho de 2020, se formou como médica veterinária e, no final do mesmo ano, iniciou a Pós-Graduação em Saúde Única: Animal, Humana e Ambiental no Centro Universitário Internacional Uninter, que a conferiu o título de Especialista em Saúde Única: Animal, Humana e Ambiental, no meio do ano seguinte.

No final de 2021 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Profa. Dra. *Isabele da Costa Angelo* e coorientação do Dr. *Ricardo de Oliveira Barbosa Bitencourt*.



## RESUMO

AZEVEDO, Luisa Andrade. **Efeito de fungos entomopatogênicos sobre *Aedes aegypti*: influência na oviposição e perfil lipídico de adultos e avaliação de atividade antimicrobiana em larvas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O mosquito *Aedes aegypti* possui grande importância na cadeia epidemiológica de arboviroses que afetam a Saúde Pública. Pensando na resistência a inseticidas químicos e soluções de controle mais ecológicas, estuda-se cada vez mais o uso de fungos entomopatogênicos como alternativa de controle de *A. aegypti*. Esse trabalho investigou os efeitos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre a oviposição, morfologia ovariana e perfil lipídico no corpo gorduroso e ovários de fêmeas expostas aos fungos, além de investigar a atividade antimicrobiana em larvas de *A. aegypti* desafiada por esses fungos. Para avaliar o efeito da exposição fúngica sobre a oviposição e morfologia de ovários, fêmeas com 6 a 8 dias pós-emergência foram alimentadas com sangue de camundongo e expostas ou não a *M. anisopliae* CG 153 na concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL por 24h, sendo formados os seguintes grupos: G1= exposto ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentado 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentado 24h após exposição fúngica; CTR= exposto à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação. Ovários foram dissecados em 0, 24, 48 e 72h e a investigação foi realizada por histopatologia. Não foi observada diferença estatística nos seguintes parâmetros: quantidade de fêmeas ingurgitadas em cada grupo ( $P=0,6358$ ); quantidade de ovos totais produzidos ( $P \sim 0,5948$ ); comparação entre a quantidades de ovos por fêmea alimentada ( $P=0,3191$ ); ou na quantidade de mosquitos vivos no final dos experimentos ( $P=0,7507$ ). Os folículos ovarianos dos mosquitos expostos a *M. anisopliae* CG 153 apresentaram perda da arquitetura tecidual após 48h de tratamento, com rompimento do epitélio folicular, redução do número de ovócitos e alterações na morfologia de *nurse cells*. Para avaliar o efeito da exposição fúngica sobre o perfil lipídico, fêmeas foram expostas a *M. anisopliae* CG 153 ou *B. bassiana* CG 479 na concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL ou Tween 80 a 0,03%. Após 24, 48 ou 72h de exposição, os ovários e corpo gorduroso das fêmeas foram dissecados para extração de lipídios e posterior análise de lipídios neutros por cromatografia em camada delgada unidimensional. Não houve diferença estatística no perfil de ácido graxo e colesterol no corpo gorduroso ( $P=0,7705$  e  $P \sim 0,8365$ ) e ovários ( $P=0,9798$  e  $P > 0,9999$ ) nos tempos observados após a exposição. Grupos de 700 larvas de segundo estágio foram imersas em 700 mL de suspensão de *B. bassiana* CG 479 na concentração  $1 \times 10^6$  conídios/mL ou Tween 80 a 0,03%. Após 16, 24, 40 e 48h de exposição, um *pool* de 60 larvas foram maceradas para avaliação da atividade antimicrobiana através da realização de antibiograma sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* sp. resistentes e sensíveis a betalactâmicos. No entanto, não foi identificada atividade antimicrobiana em macerado de larvas mesmo após 48 horas de exposição a *B. bassiana* CG 479. Assim, a exposição de fêmeas de *A. aegypti* com *M. anisopliae* CG 153 por 24 horas não influenciou na oviposição, mas foi capaz de alterar a morfologia dos ovários no tratamento 48 horas após a alimentação; o tratamento com *M. anisopliae* CG 153 e *B. bassiana* CG 479 por 24, 48 ou 72 horas não interferiu na quantidade de AG e CHO em ovário e corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti*; e a exposição a *B. bassiana* CG 479 durante 48 horas não foi capaz de estimular a ação antimicrobiana por larvas de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** Controle biológico, mosquitos, morfologia de ovários

## ABSTRACT

AZEVEDO, Luisa Andrade. **Effect of entomopathogenic fungi on *Aedes aegypti*: influence on oviposition and lipid profile of adults and evaluation of antimicrobial activity in larvae.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The *Aedes aegypti* mosquito is of great importance in the epidemiological chain of arboviruses that affect Public Health. Thinking about resistance to chemical insecticides and more ecological control solutions, the use of entomopathogenic fungi is increasingly being studied as an alternative to control *A. aegypti*. This work investigated the effects of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on oviposition, ovarian morphology and lipid profile in the fat body and ovaries of females exposed to the fungi, in addition to investigating the antimicrobial activity in *A. aegypti* larvae challenged by these fungi. To evaluate the effect of fungal exposure on oviposition and ovary morphology, females 6 to 8 days post-emergence were fed with mouse blood and exposed or not to *M. anisopliae* CG 153 at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/mL for 24h., with the following groups being formed: G1= exposed to the fungus minutes before feeding; G2= fed 24h before fungal exposure; G3= fed 24h after fungal exposure; CTR= exposed to 0.03% Tween 80 minutes before feeding. Ovaries were dissected at 0, 24, 48 and 72h and investigation was carried out by histopathology. No statistical difference was observed in the following parameters: number of engorged females in each group ( $P=0,6358$ ); quantity of total eggs produced ( $P \sim 0,5948$ ); comparison between the quantity of eggs per female fed ( $P=0,3191$ ); or the number of live mosquitoes at the end of the experiments ( $P=0,7507$ ). The ovarian follicles of mosquitoes exposed to *M. anisopliae* CG 153 showed loss of tissue architecture after 48 hours of treatment, with rupture of the follicular epithelium, reduction in the number of oocytes and changes in the morphology of nurse cells. To evaluate the effect of fungal exposure on the lipid profile, females were exposed to *M. anisopliae* CG 153 or *B. bassiana* CG 479 at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/mL or Tween 80 at 0.03%. After 24, 48 or 72 hours of exposure, the ovaries and fat body of the females were dissected for lipid extraction and subsequent analysis of neutral lipids by one-dimensional thin layer chromatography. There was no statistical difference in the fatty acid and cholesterol profile in the fat body ( $P=0,7705$  and  $P \sim 0,8365$ ) and ovaries ( $P=0,9798$  and  $P > 0,9999$ ) at the times observed after exposure. Groups of 700 second stage larvae were immersed in 700 mL of *B. bassiana* CG 479 suspension at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia/mL or 0.03% Tween 80. After 16, 24, 40 and 48h of exposure, a pool of 60 larvae were macerated to evaluate antimicrobial activity by performing an antibiogram on strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* sp. resistant and sensitive to beta-lactams. However, no antimicrobial activity was identified in larvae macerate even after 48 hours of exposure to *B. bassiana* CG 479. Therefore, the exposure of *A. aegypti* females to *M. anisopliae* CG 153 for 24 hours did not influence oviposition, but was able to alter the morphology of the ovaries in the treatment 48 hours after feeding; treatment with *M. anisopliae* CG 153 and *B. bassiana* CG 479 for 24, 48 or 72 hours did not affect the amount of FA and CHO in ovaries and fat bodies of *A. aegypti* females; and exposure to *B. bassiana* CG 479 for 48 hours was unable to stimulate antimicrobial action by *A. aegypti* larvae.

**Keywords:** Biological control, mosquitoes, ovarian morphology

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> sensu lato (s.l), hospedeiro do qual foi isolado e local de isolamento. ....	19
<b>Tabela 2</b> – Padrões lipídicos utilizados na cromatografia em camada delgada. ....	24
<b>Tabela 3</b> – Cepas de bactérias utilizadas no ensaio para avaliação do efeito antimicrobiano de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a <i>Beauveria bassiana</i> CG 479. ....	25

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Anatomia simplificada da fêmea de <i>Aedes aegypti</i> . ....	8
<b>Figura 2</b> – Método de exposição de adultos (A) e de larvas (B) de <i>Aedes aegypti</i> . ....	19
<b>Figura 3</b> – Alimentação de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> utilizando camundongos anestesiados (A); papel de filtro sendo umedecido para realização de oviposição (B); contagem de ovos em microscópio estereoscópio (C). ....	21
<b>Figura 4</b> – Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a fungos entomopatogênicos (A); dissecação para exposição de órgãos de interesse (B); tecidos selecionados para extração e análise de lipídios (C). ....	23
<b>Figura 5</b> – Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> ingurgitadas após alimentação com sangue de camundongo distribuídas em quatro Grupos (G). G1, G2 e G3 foram expostos a <i>Metarhizium anisopliae</i> CG 153. G1= exposto ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentado 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentado 24h após exposição fúngica; CTR= grupo controle exposto à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo. ....	26
<b>Figura 6</b> – Quantidade de ovos após postura realizada por fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ou não a <i>Metarhizium anisopliae</i> CG 153 distribuídas em quatro Grupos (G): G1, G2 e G3 expostos ao fungo. G1= expostas ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentadas 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentadas 24h após exposição fúngica; CTR= grupo controle expostas à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo. ...	25
<b>Figura 7</b> – Quantidade de ovos por fêmea após postura realizada por fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ou não a <i>Metarhizium anisopliae</i> CG 153 distribuídas em quatro Grupos (G): G1, G2 e G3 expostos ao fungo. G1= expostas ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentadas 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentadas 24h após exposição fúngica; CTR= grupo controle expostas à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo. ..	27
<b>Figura 8</b> – Sobrevivência de mosquitos (machos e fêmeas) ao fim dos experimentos de oviposição. G1, G2 e G3 foram expostos com <i>Metarhizium anisopliae</i> CG 153 distribuídas em	

quatro Grupos (G). G1= expostas ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentadas 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentadas 24h após exposição fúngica; CTR= grupo controle expostas à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo. ..28

**Figura 9** – Cortes histológicos de ovários de *Aedes aegypti* expostos a *Metarhizium anisopliae* CG 153 por 48 horas em diferentes grupos (G1, G2, G3). \*= ovariolos; A= ovócito; B= epitélio folicular cúbico com núcleo esférico; C= grânulos de vitelo; D= cálice; E= nurse cells. ....30

**Figura 10** – Cortes histológicos de ovários de *Aedes aegypti* expostos ao papel impregnado com Tween 80 a 0,03% em diferentes tempos pós alimentação (24, 48 e 72h). \*= ovariolos; A= ovócito; B= epitélio folicular cúbico com núcleo esférico; C= grânulos de vitelo; D= cálice; E= nurse cells. ....28

**Figura 11** – Composição de lipídios neutros em ovário de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas ou não a suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae*. Pontos 1, 4 e 7= tratados pós 24h; pontos 2, 5 e 8= tratados por 48h; pontos 3, 6 e 9= tratados por 72h; CHOE= colesterol esterificado; TG= triacilglicerol; AG= ácido graxo; CHO= colesterol; MG= monoacilglicerol. ....32

**Figura 12** – Quantidade em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de lipídios neutros por ovários de fêmea de *Aedes aegypti* expostas a Tween 80 a 0,03% (CTR), *Metarhizium anisopliae* CG 153 ou *Beauveria bassiana* CG 479 em diferentes tempos de tratamento. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. AG= ácido graxo; CHO= colesterol; ns= não significativo. ....33

**Figura 13** – Quantidade em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de lipídios neutros por corpo gorduroso de fêmea de *Aedes aegypti* expostas a Tween 80 a 0,03% (CTR), *Metarhizium anisopliae* CG 153 ou *Beauveria bassiana* CG 479 em diferentes tempos de tratamento. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. AG= ácido graxo; CHO= colesterol; ns= não significativo. ....34

**Figura 14** – Quantidade em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de lipídios neutros por tecido de fêmea de *Aedes aegypti* expostas a Tween 80 a 0,03% (CTR), *Metarhizium anisopliae* CG 153 ou *Beauveria bassiana* CG 479 em diferentes tempos de tratamento. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Tecidos representados em A e B= ovários e em C e D= corpo gorduroso; AG= ácido graxo; CHO= colesterol. ....35

**Figura 15** – Placas de antibiograma contendo amostra de macerado de larvas de *Aedes aegypti* expostas a *Beauveria bassiana* CG 479. Discos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8= larvas maceradas 16, 24, 40 e 48 horas após exposição, respectivamente; disco 9= Ertapenem; disco 10= solução salina tamponada com fosfato ou coquetel inibidor de protease. ....36

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AG	cido graxo
BDA	Batata dextrose gar
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CEUA	Comit de tica no Uso de Animais
CG	Corpo gorduroso
CHO	Colesterol
CHOE	Colesterol esterificado
CIP	Coquetel inibidor de protease
CTR	Controle
DG	Diacilglicerol
EG	Ergosterol
FEPs	Fungos entomopatogênicos
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
LCM	Laboratório de Controle Microbiano
MG	Monoacilglicerol
MIV	Manejo Integrado de Vetores
OV	Ovários
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
TG	Triacilglicerol
TLC	Cromatografia em camada delgada unidimensional/ <i>thin layer chromatography</i>
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Breve história e importância do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	3
2.2 Biologia, fisiologia e comportamento de <i>Aedes aegypti</i> .....	6
2.2.1 Metabolismo lipídico de <i>Aedes aegypti</i> .....	8
2.2.2 Ação antimicrobiana em insetos .....	10
2.4 Controle de <i>Aedes aegypti</i> .....	11
2.4.1 Manejo integrado, educação em saúde e saneamento básico.....	11
2.4.2 Controle mecânico .....	12
2.4.3 Controle químico.....	13
2.4.4 Controle biológico.....	14
2.4.4.1 <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> no controle de <i>Aedes aegypti</i> .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Local de realização de experimentos .....	17
3.2 Obtenção e manutenção da colônia de <i>Aedes aegypti</i> .....	18
3.3 Obtenção e manutenção dos isolados fúngicos.....	18
3.4 Preparo e viabilidade das suspensões fúngicas.....	19
3.5 Oviposição de <i>Aedes aegypti</i> expostos a <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	20
3.6 Histopatologia de ovários de <i>Aedes aegypti</i> expostas a <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	21
3.7 Perfil lipídico de ovários e corpo gorduroso de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a fungos entomopatogênicos .....	22
3.7.1 Extração e análise de lipídios.....	23
3.8 Atividade antimicrobiana de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a <i>Beauveria bassiana</i> .....	24
3.9 Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS .....	26
4.2 Oviposição de <i>Aedes aegypti</i> expostos a <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	26

4.3 Análise histopatológica de ovários de <i>Aedes aegypti</i> expostos a <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	28
4.4 Análise do perfil lipídico de ovários e corpo gorduroso de <i>Aedes aegypti</i> expostos a fungos entomopatogênicos .....	32
4.4 Atividade antimicrobiana de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a <i>Beauveria bassiana</i> .	35
5. DISCUSSÃO .....	36
6. CONCLUSÕES .....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## 1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) está entre os mosquitos de maior importância médica e é vetor de arboviroses emergentes de grande preocupação para a Saúde Pública. *A. aegypti* pode ser encontrado em ambientes urbanos, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, causando alta morbidade. Em 2023, até agosto o mês de agosto, foram registrados, respectivamente, 1,5 milhão, 146 mil e 8 mil casos prováveis de dengue, chikungunya e Zika no país. Dentro desses, foram confirmados mais de 21 mil casos graves de dengue e pelo menos 1024 óbitos por dengue e chikungunya

O controle de insetos vetores visa interromper seu ciclo evolutivo. Assim, as principais recomendações de controle contra o mosquito incluem o uso de inseticidas, manejo ambiental para diminuir e monitorar os criadouros domiciliares e promoção da vigilância e monitoramento epidemiológico, bem como o uso de *Bacillus thuringiensis* como controle biológico.

O uso de inseticidas sintéticos é o mais utilizado para o controle do vetor. Embora a indústria farmacêutica tenha desenvolvido fórmulas químicas menos agressivas, as bases químicas utilizadas ainda oferecem riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Além disso, já existem relatos de resistência de *A. aegypti* a inseticidas sintéticos em muitos países, incluindo o Brasil. Assim, formas alternativas de controle de *A. aegypti*, como o biológico, são cada vez mais objetos de estudo de pesquisadores no mundo todo.

No controle biológico de insetos utiliza-se vírus, bactérias, fungos e nematodos específicos como componentes de estratégias de manejo integrado de pragas em plantações, florestas, habitats urbanos e insetos de importância médica e veterinária. O uso de fungos entomopatogênicos (FEPs), como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, no controle biológico de insetos representa uma alternativa aos inseticidas químicos, e envolve a penetração ativa na cutícula do hospedeiro-alvo, posteriormente promovendo a destruição de seus tecidos, alterando a fisiologia do artrópode infectado, com isso, impedindo o seu desenvolvimento e causando a sua morte.

A produção de *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresenta vantagens como a fácil produção, possibilidade de produção em grande escala, variabilidade genética que permite o uso de espécies seletivas para um determinado inseto-alvo, além de serem seguros para humanos, animais e meio ambiente. Dessa forma, pode-se considerar que o controle biológico utilizando FEPs é uma opção mais ecológica, quando comparada a inseticidas químicos. Embora o potencial desses fungos no controle de insetos tenha sido demonstrado por diversos autores,



entender a interação destes fungos com seu hospedeiro é de extrema importância para se desenvolver um inseticida biológico baseado em FEPs.

Durante o processo de infecção pelo FEP a resposta imune do artrópode é ativada e concomitantemente, o metabolismo lipídico do artrópode é alterado em resposta à infecção. Lipídios são moléculas orgânicas, armazenadas no corpo gorduroso, que estão presentes em diversos tecidos de artrópodes e envolvidos em distintas funções fisiológicas como desenvolvimento, maturação de ovos e sistema imunológico. O corpo gorduroso é o órgão responsável pelo armazenamento de lipídios que, por sua vez, é a maior fonte de energia de insetos. As células do corpo gorduroso controlam a síntese e utilização de reservas de energia; sintetizam a maior parte proteica da hemolinfa e metabólitos circulantes; e, durante a fase reprodutiva de adultos, possuem a função vital de sintetizar e secretar a vitelogenina, principal proteína da gema.

Os ovos precisam conter as substâncias necessárias para o desenvolvimento do embrião, por isso, durante a oogênese, proteínas, carboidratos e lipídios são acumulados para crescimento de ovócitos e essas reservas são utilizadas durante a embriogênese. O desenvolvimento de ovos de insetos envolve a lipoproteína denominada lipoforina, que realiza uma mobilização substancial de reservas lipídicas do corpo gorduroso para os ovários, assim seria vantajoso identificar moléculas ovarianas com potenciais alvos para o controle, culminando na redução da oogênese e da embriogênese, e conseqüentemente reduzindo a taxa reprodutiva.

Para o desenvolvimento de um bioinseticida promissor, é necessário entender a relação parasita-hospedeiro e os impactos, não somente na sobrevivência do mosquito adulto, mas em seus processos fisiológicos. Além disso, a redução de ovos disponíveis no meio ambiente também impactará na diminuição de mosquitos chegando ao estágio adulto, cujas fêmeas são responsáveis pela transmissão de agentes etiológicos para o homem e animais.

Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar e correlacionar o potencial adulticida dos isolados CG 153 de *M. anisopliae* e CG 479 de *B. bassiana* sobre a oviposição e seu efeito sobre a morfologia de ovários, além de analisar o perfil lipídico de corpo gorduroso e ovários de fêmeas de *A. aegypti* em diferentes tempos de exposição.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Breve história e importância do mosquito *Aedes aegypti*

De origem egípcia, o mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) chegou ao Brasil, possivelmente, através de embarcações durante o período de colonização (POWELL et al., 2018). É quase certo que o ancestral do que hoje é considerado um mosquito doméstico se habitava na África Subsaariana, onde habitat larval, assim como o local de oviposição, eram ambientes que naturalmente acumulavam água de chuva, mas os adultos se alimentavam de sangue de animais não humanos (POWELL; TABACHNICK, 2018). O mosquito se encontra predominantemente em países tropicais e subtropicais (KAMAL et al., 2018; WHO, 2020), estando presente em todas as regiões do continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até a região de Buenos Aires, na Argentina (NOBRE et al., 1994).

O Brasil enfrenta há séculos o mosquito e os vírus por ele transmitidos, possuindo epidemias de febre amarela urbana descritas em diversos momentos desde o no século XVII (LITVOC et al., 2017), incluindo a epidemia ocorrida em Recife no ano de 1685, em Salvador no ano de 1849 e na cidade do Rio de Janeiro em 1903, controlada em 1907 pelo diretor de Saúde Pública Oswaldo Cruz, que adotou medidas inovadoras semelhantes ao modelo cubano de controle do mosquito (COSTA et al., 2011).

Em 1947, o Brasil participou da campanha de erradicação continental de *A. aegypti*, coordenada pela Organização Pan-Americana da Saúde e a Organização Mundial da Saúde, e teve êxito na primeira eliminação do vetor em 1955 (BRAGA; VALLE, 2007). Em 1967, confirmou-se a reintrodução do mosquito no país e, em 1973, foi eliminado o último foco do vetor, que novamente passou a ser considerado como erradicado do território brasileiro. Apesar disso, devido ao cenário de urbanização acelerada da época somado às mudanças sociais e ambientais e falhas na vigilância epidemiológica do país, o retorno do vetor retornou em 1976 (BRAGA; VALLE, 2007). Assim, abandonou-se a meta de erradicar *A. aegypti* do país e objetivou-se controlar o vetor dos municípios com maior transmissão de dengue (FUNASA, 2001).

O mosquito *A. aegypti* está entre os artrópodes de maior importância médica, sendo vetor de arboviroses emergentes de grande preocupação para a Saúde Pública, como dengue, febre amarela urbana, chikungunya e Zika vírus (HUANG et al., 2017). A distribuição geográfica dessas doenças é mundial, principalmente em países tropicais e subtropicais (BRAGA; VALLE, 2007). Longevidade, fecundidade e alimentação sanguínea são os fatores mais

importantes que afetam a possibilidade de os mosquitos transmitirem doenças (SCHOLTE et al., 2006).

Uma fêmea pode se infectar com um dos vírus após se alimentar de sangue de algum indivíduo virêmico, com posterior replicação viral do epitélio de seu intestino médio, de onde o vírus pode se disseminar para tecidos secundários, incluindo as glândulas salivares que, finalmente passam a possuir partículas virais através de sua saliva, caso inseto seja permissivo. Em seguida, a fêmea, através da picada, injeta essa saliva infecciosa em um hospedeiro humano durante uma refeição de sangue, determinando a transmissão do agente infeccioso (CDC, 2019; CHOUIN-CARNEIRO et al., 2020).

A dengue é a doença mais prevalente causada por vírus transmitidos por *A. aegypti* (WHO, 2020) e pode ser assintomática, clássica ou hemorrágica (MARTINA et al., 2009). Quando clássica, as manifestações clínicas podem incluir febre, náusea, vômito, dor atrás dos olhos, irritação na pele e dor articular, muscular e óssea e normalmente persistem por até uma semana; e quando hemorrágica, além dos sintomas clássicos, em 24 a 48h após a febre cessar, o paciente pode apresentar dor abdominal, sangramento nasal e/ou gengival, hematêmese, hematoquezia, cansaço e irritabilidade, além de vômitos recorrentes (WHO, 2022; CDC, 2021).

A infecção pelo vírus da chikungunya causa nos afetados uma síndrome febril e dores articulares nos enfermos, ambas com potencial debilitante (HONÓRIO et al., 2015). Diferente das outras doenças transmitidas por *A. aegypti*, a doença é geralmente sintomática e o quadro de artralgia pode durar meses e até anos (PATTERSON et al., 2016).

Em 2015, o Brasil vivenciou um surto de Zika, no qual o vírus apresenta um grande risco para gestantes, pois pode originar Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ), que causa microcefalia e outras anormalidades de desenvolvimento fetal, incluindo alterações visuais, auditivas e neuropsicomotoras, além do nascimento prematuro do bebê, perda fetal e natimortalidade (WHO, 2018). Os sintomas clássicos, quando presentes, são parecidos com os das demais doenças transmitidas por *A. aegypti* (HEUKELBACH et al., 2016).

Não existe um tratamento específico para essas doenças, apenas trata-se dos sintomas apresentados pelos pacientes e indica-se repouso e hidratação (DA SILVA et al., 2020). O desafio no diagnóstico clínico diferencial entre essas três doenças destaca a importância dos exames diagnósticos laboratoriais para confirmação (PAIXÃO et al., 2017).

Ademais, as infecções causadas pela dengue, Zika e chikungunya podem desencadear a Síndrome de Guillain-Barré, que origina complicações neurológicas, podendo incluir fraqueza

muscular que pode afetar os músculos que controlam a respiração, disfunção simultânea de nervos periféricos e, em casos mais severos, paralisia e até a morte (WHO, 2019, DA SILVA et al., 2021).

Além das doenças previamente mencionadas, *A. aegypti* também pode ser vetor da Febre do Vale do Rift, uma doença viral de caráter zoonótico que atinge principalmente animais domésticos, e que é capaz de acometer humanos que foram picados por um mosquito infectado previamente com o vírus da doença (WHO, 2018).

Devido à pandemia de COVID-19, acredita-se que de 2019 a 2021 houve uma subnotificação de casos suspeitos de doenças transmitidas pelo mosquito, já que os hospitais e sistemas de saúde dos países foram desafiados a fugir dos programas de saúde habituais, adquirindo novas estratégias para combater a pandemia (CASTAÑEDA-GÓMEZ et al., 2021). Ainda assim, no ano de 2020 foram notificados mais de 1 milhão de casos e em 2021 foram notificados mais de 600 mil casos prováveis de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *A. aegypti* no Brasil (dengue, chikungunya e Zika), apresentando uma redução de 43,4% de casos registrados quando comparados ao ano anterior (BRASIL, 2021 a; BRASIL, 2021 b). Em 2022, foram notificados mais de 1,6 milhão casos prováveis de doenças transmitidas por *A. aegypti* no país, representando um aumento de 162,5% de casos quando comparados a 2021 (BRASIL, 2023 a). Em 2023, até agosto o mês de agosto, foram registrados, respectivamente, 1,5 milhão, 146 mil e 8 mil casos prováveis de dengue, chikungunya e Zika no país. Dentro desses, foram confirmados mais de 21 mil casos graves de dengue e pelo menos 1024 óbitos por dengue e chikungunya (BRASIL, 2023 b).

Essas doenças não só são de importância para a Saúde Pública no país, mas também por fatores relacionados ao impacto econômico acarretado por elas, gerando perdas significativas nas regiões endêmicas (HAYD et al., 2020). Devido ao grande número de enfermos pelas arboviroses causadas por *A. aegypti*, só em 2016 o Brasil gastou mais de R\$ 2,3 bilhões em custos diretos e indiretos do manejo das doenças virais transmitidas pelo mosquito. Esses custos, justificados pela sintomatologia das arboviroses, englobam programas de prevenção de doença, aquisição de inseticidas e larvicidas, custos médicos incluindo atendimento ambulatorial, internações e medicações. Ainda, muitos dos enfermos acabam faltando ao trabalho devido aos sintomas, o que acaba afetando a produtividade individual e até mesmo coletiva, além da qualidade de vida, considerada um custo indireto (TEICH et al., 2017).

## **2.2 Biologia, fisiologia e comportamento de *Aedes aegypti***

O mosquito *A. aegypti* possui metamorfose completa (ciclo holometábolo), compreendendo os estádios de ovo, larva, pupa e adulto. O mosquito é adaptado ao ambiente urbano, reproduzindo-se em reservatórios de águas limpas, embora possa se adequar às novas situações impostas pelo homem, como depósitos de água suja (BESERRA et al., 2008).

Quando os ovos entram em contato com a água, larvas eclodem e passam por 4 estádios evolutivos (BAR; ANDREW, 2013). A duração da fase larvária pode durar de 5 dias quando em condições ótimas, ou até algumas semanas, dependendo da disponibilidade de alimento, temperatura e densidade da população larval no reservatório (NELSON, 1986). As larvas possuem o corpo vermiforme, dividido em cabeça, tórax e abdômen (8 segmentos). São sensíveis a movimentos bruscos na água e a luminosidade e deslocam-se com rapidez, realizando movimento de serpente ou em “S”. Possuem aparelho bucal do tipo mastigador-raspador e, no geral, se alimentam de algas, bactérias, esporos de fungos e outras partículas de matéria orgânica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; BECKER et al., 2003). Essa fase é o período de alimentação e crescimento do inseto que, nesse período de vida possui hábitos alimentares não seletivos, facilitando, assim, a utilização de larvicidas de ação digestiva (FORATTINI, 1962).

As pupas não se alimentam e, durante seus 2 a 3 dias de vida, estão quase sempre paradas em contato com a superfície da água. As pupas têm “aspecto de vírgula” quando vistas de lado e possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen (ANDREW; BAR, 2013). No geral, as pupas fêmeas são maiores que machos. Assim como as larvas, as pupas possuem sensibilidade a luz e vibrações na superfície aquática, porém são menos responsivas a esses estímulos (CHRISTOPHERS, 1960; OECD, 2018).

Os adultos de *A. aegypti* possuem o corpo escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos das patas e manchas brancas por todo o corpo e apresentam aparelho bucal adaptado do tipo picador, adaptado à punção (BECKER et al., 2003). As principais formas de diferenciação entre os sexos são os formatos das antenas e palpos, que, em machos são plumosas e mais longas e, em fêmeas são pilosas e menos longas, respectivamente (SÁNCHEZ; LÍRIA, 2018). Os adultos vivem em média de 30 a 35 dias na natureza, onde se alimentam de seiva, flores e frutos, já que seu metabolismo depende da ingestão de carboidratos.

Os adultos representam a fase reprodutora do inseto e, dentro de 24 horas após emergência, fêmeas e machos são capazes de realizar o acasalamento (NELSON, 1986). Apenas as fêmeas são hematófagas e realizam o repasto sanguíneo, que está diretamente

relacionado ao desenvolvimento de ovos e o suprimento proteico desses (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; MULLEN; DURNER, 2019). Fêmeas são capazes de realizar ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, o que amplia a sua capacidade de transmissão viral (ZARA et al, 2016).

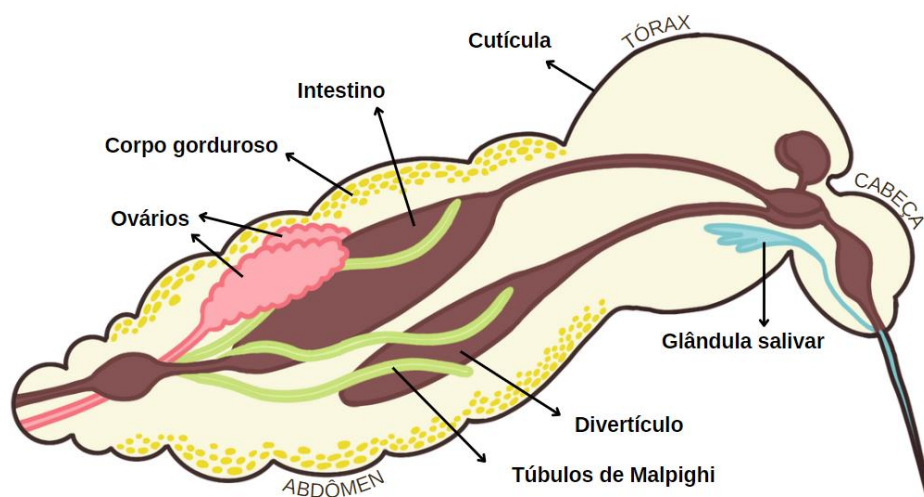
Em cada ciclo reprodutivo, cada fêmea de *A. aegypti* é capaz de ovipor cerca de 100 ovos. Após a alimentação sanguínea, as fêmeas ovipõem ovos brancos em superfícies próximas à superfície de água ou outros locais úmidos, mas rapidamente se tornam pretos e brilhantes, devido à melanização (CLEMENTS, 2013; FARNESI et al., 2017). Em condições ideais de umidade, temperatura e abrigo, as fêmeas de *A. aegypti* iniciam a oviposição em até três dias após a alimentação com sangue e finalizam, também, em três dias. *Aedes spp.* têm preferência por sangue de mamíferos em sua alimentação (FORATTINI et al., 1987; BAAK-BAAK et al., 2018), incluindo humanos, roedores, bovinos, cães, gatos e suínos (PONLAWAT; HARRINGTON, 2005).

Os locais de preferência para oviposição de *A. aegypti* incluem recipientes artificiais abandonados a céu aberto, como reservatórios de água de chuva, pneus, garrafas e outros materiais, e aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico, como as caixas d'água e piscinas (ZARA et al, 2016). A oviposição é feita em diferentes locais de modo a evitar superlotação de larvas, competição alimentar e minimizar os riscos inerentes aos locais de oviposição. Assim, cada fêmea seleciona diversos locais de oviposição, possibilitando maior quantidade de criadouros do mosquito e, conseqüentemente, maior distribuição da espécie na natureza. Fatores que influenciam no local de postura escolhido pela fêmea incluem intensidade luminosa ou ausência de luz, diferentes temperaturas, graus de salinidade e presença de vegetais e microorganismos ou dos seus produtos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; TSUNODA et al., 2010).

Ovos de *A. aegypti* podem demorar até 4,5 dias para eclodirem (BESERRA; CASTRO JR., 2008; ARÉVALO-CORTÉS et al., 2022). Os ovos são pequenos (aproximadamente 1mm de comprimento), alongados e fusiformes e, mesmo após meses desde a sua produção, são capazes de eclodir e dar origem a uma progênie viável e com potencial infeccioso (CHEN; WILCON, 2020). Depois de maduros, ovos entram em contato com a água, originando as larvas (BAR; ANDREW, 2013).

A fêmea de *A. aegypti* possui um par de ovários do tipo meroístico politrófico, com cada um contendo cerca de 100 ovariolos unidos pela membrana ovariolar e acompanhados por uma ou mais células nutridoras e envolto por uma camada de células foliculares, formando o folículo

ovariano. Ovócitos são formados por folículos primários, secundários e terciários (ZHANG et al., 2023). O ovo se origina de um folículo ovariano primário, formando uma túnica própria, células foliculares, células acessórias (*nurse cells*) e um ovócito maduro (PARKS et al., 1965; FORATTINI, 1996). O corpo gorduroso sintetiza e libera proteínas a fim de produzir a fonte de nutrientes para o embrião, sendo esse processo denominado vitelogênese. Diversos hormônios são secretados desde o início ao fim da vitelogênese, que se inicia a partir da alimentação com sangue bem-sucedida realizada pela fêmea (CLEMENTS, 1992).



**Figura 1** – Anatomia simplificada da fêmea de *Aedes aegypti*. (AZEVEDO, 2023)

### 2.2.1 Metabolismo lipídico de *Aedes aegypti*

Lipídios são moléculas orgânicas que estão presentes em diversos organismos, inclusive em insetos e tecidos de artrópodes, possuindo envolvimento em distintas funções fisiológicas como desenvolvimento, maturação de ovos e sistema imunológico (GONDIM et al., 2018; TOPRAK et al., 2020).

O corpo gorduroso é o órgão responsável pelo armazenamento de lipídios que, por sua vez, é a maior fonte de energia de insetos (ZIEGLER; IBRAHIM, 2001). As células do corpo gorduroso controlam a síntese e utilização de reservas de energia; sintetizam a maior parte proteica da hemolinfa e metabólitos circulantes; e, durante a fase reprodutiva de adultos, possuem a função vital de sintetizar e secretar vitelogenina, principal proteína da gema (ARRESE; SOULAGES, 2010).

Ainda que o corpo gorduroso seja considerado o centro do metabolismo lipídico dos insetos, o intestino médio e os ovários são os outros locais que coordenam as operações do metabolismo lipídico (TOPRAK et al., 2020). O armazenamento de lipídios na fase larval está

diretamente relacionado ao sucesso reprodutivo e longevidade, sendo o corpo gorduroso um órgão crítico nesse processo (GONDIM et al., 2018).

O metabolismo lipídico é fundamental para a vida e, em insetos, é essencial para a diapausa, voo, desenvolvimento embrionário, metamorfose e gerenciamento de energia, já que estes podem hibernar por vários meses, migrar longas distâncias, superar longos períodos de fome e se reproduzir tremendamente (GONDIM et al., 2018; TOPRAK et al., 2020). De maneira geral, a larva acumula reservas lipídicas enquanto o adulto as consome, o que faz com que, durante o desenvolvimento do inseto, o corpo gorduroso mude de um tecido armazenador de lipídios para um tecido mobilizador de lipídios (ARRESE et al., 2001).

Muitos são os envolvimento de lipídios no organismo de *A. aegypti*. Na digestão de insetos, por exemplo, enzimas denominadas lipases realizam hidrólise de triacilgliceróis, diacilgliceróis e fosfolipídios liberando ácidos graxos que são absorvidos pelo epitélio intestinal (BRIEGEL et al., 2002; PETERSON, 1977). Os ovos de *A. aegypti* precisam conter as substâncias necessárias para o desenvolvimento do embrião, por isso, durante a oogênese, acumulam lipídios para crescimento de ovócitos e essas reservas são utilizadas durante a embriogênese (GONDIM et al., 2018). O desenvolvimento de ovos de insetos envolve a lipoproteína denominada lipoforina (formada principalmente por triacilglicerol), que realiza uma mobilização substancial de reservas lipídicas do corpo gorduroso para os ovários (ARRESE; SOULAGES, 2009). Assim, seria vantajoso identificar moléculas ovarianas com potenciais alvos para o controle, culminando na redução da oogênese e da embriogênese, e conseqüentemente reduzindo a taxa reprodutiva.

Os insetos utilizam esteróis, derivados do colesterol, como componentes estruturais na bicamada fosfolipídica das membranas das células e organelas, como precursores de hormônios esteroides, como moléculas reguladoras de crescimento e padronização do organismo e têm sido associados à defesa contra agentes patogênicos e parasitoides. Esteróis são adquiridos em insetos de carga parental durante a ovogênese ou alimentação (JING; BEHMER, 2020). Além da utilização de esteróis como constituintes das membranas celulares e subcelulares, os insetos utilizam um esterol como hormônio da muda (CHINO; GILBERT, 1967).

O corpo gorduroso também é capaz de sintetizar ácidos graxos (ARRESE; SOULAGES, 2010). Alguns ácidos graxos cuticulares são tóxicos e fungistáticos, mas outros podem estimular o crescimento de fungos; por exemplo, o ácido palmitoleico aumenta o crescimento micelial, mas é tóxico para os conídios de *Erynia variabilis* (KERWIN, 1984).



Lipídios são armazenados no corpo gorduroso dos insetos como triacilgliceróis, em gotículas de lipídios (ARRESE; SOULAGES, 2001). Para que ocorra a mobilização dessas reservas, é necessária a atuação de uma triacilglicerol lipase, enzima que hidrolisa os triacilgliceróis liberando principalmente ácidos graxos e diacilglicerol, sendo esses últimos, então, transferidos para a lipoforina hemolinfática, a qual os transporta para os locais de utilização (ARRESE; SOULAGES, 2010).

Logo após emergirem, fêmeas adultas dos mosquitos se alimentam de néctar de flores, o que aumenta a quantidade de lipídios no corpo gorduroso antes de adquirirem a capacidade de se alimentar de sangue. Esse acúmulo lipídico ocorre pela ação de enzimas lipogênicas, que convertem o açúcar em ácidos graxos de modo que, após a refeição sanguínea, quando se inicia a vitelogênese, os lipídios são mobilizados e transferidos do corpo gorduroso para o ovário pela lipoforina, para fornecer lipídios para o crescimento de ovócitos e proteção dos ovos (GONDIM et al., 2018).

### **2.2.2 Ação antimicrobiana em insetos**

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas naturais componentes do sistema imune inato, que é a primeira linha de defesa do corpo contra infecções (MISHRA et al., 2017), e defendem os seres vivos contra infecções por microrganismos, incluindo infecções por fungos, bactérias, parasitas e vírus (BOPARI; SHARMA, 2020) e, ainda, apresentam ação contra células cancerígenas (ZHANG et al, 2021). São sintetizados pelo corpo gorduroso durante a resposta sistêmica contra patógenos e são então secretados na hemolinfa (LI et al., 2012).

Os PAMs atuam diretamente na membrana celular do microrganismo alvo, causando sua lise (SEYFI et al., 2019). Alguns PAMs podem alterar a permeabilidade da membrana, permitindo que as substâncias tóxicas entrem na célula, enquanto outros podem formar poros na membrana, causando a perda de conteúdo celular (ZHANG et al, 2021).

Presentes em todos os seres vivos, PAMs são eficazes contra diversos microrganismos, incluindo patógenos resistentes a antibióticos. Assim, apresentam várias vantagens em relação aos antibióticos convencionais, já que são eficazes contra uma ampla variedade de microrganismos, incluindo patógenos resistentes a antibióticos (HANEY et al., 2017). PAMs são candidatos importantes para o desenvolvimento de novos antibióticos, pois podem reduzir a chance de desenvolvimento de resistência (BALTZER; BROWN, 2011; GHOSH; HALDAR, 2015).

## **2.4 Controle de *Aedes aegypti***

O controle de *A. aegypti* visa interromper o ciclo evolutivo do mosquito (LIMA et al., 2015) e as principais recomendações incluem o uso de inseticidas, manejo ambiental para diminuir e monitoramento de criadouros domiciliares, além de ações de promoção da vigilância e monitoramento epidemiológico. O controle de vetores, atualmente, exige uma abordagem integrada que envolva múltiplos parceiros dentro e fora do setor de saúde e, particularmente, ações governamentais somadas com o envolvimento da comunidade, indo além dos controles mecânico, químico e biológico (WHO, 2017).

### **2.4.1 Manejo integrado, educação em saúde e saneamento básico**

O Manejo Integrado de Vetores (MIV) é um processo racional de tomada de decisão visando o uso otimizado de recursos para controle vetorial, que busca agregar os diferentes meios disponíveis para impactar na dinâmica de transmissão das doenças transmitidas por vetores, baseando-se em evidências e gestão integrada na escolha de intervenções de controle de vetores (AVENDANHO; SAID, 2019; WHO, 2004). Em um estudo realizado em 2018, pesquisadores relataram que a densidade de fêmeas de *A. aegypti* diminuiu significativamente ao integrar o uso de larvicidas com a modificação do ambiente larval (incluindo eliminação de ambientes propícios para oviposição e crescimento de larvas) e o aprisionamento de adultos através de armadilhas específicas (BARRERA et al., 2018). Embora o MIV busque melhorar a eficácia, custo-benefício e a sustentabilidade aplicada no controle de vetores de doenças, a aceitação tem sido baixa, devido à adesão política insuficiente para a reorientação de programas de apoio à abordagem harmonizada de controle de vetorial (WHO, 2017).

A educação em saúde inclui educar a população em massa para aumentar sua consciência de autoproteção, evitar sair na natureza ou no campo sem qualquer proteção e promover o uso de mosquiteiros, telas e outras instalações anti-mosquito para reduzir probabilidade de picadas de mosquito (FENG et al., 2022). Ademais, o controle de vetores pode ser aprimorado educando e capacitando as comunidades a identificar, esvaziar, remover e/ou tratar os habitats aquáticos das larvas dos mosquitos dentro e ao redor de suas casas.

Acredita-se que são necessárias intervenções de comunicação e educação em saúde, visando produzir sentido na população sobre as diretrizes propostas pelo governo e comunidade científica, com foco em informações inovadoras e importantes para a participação efetiva da comunidade no controle da infestação do mosquito. Além disso, é essencial que os órgãos de saúde promovam e reforcem a importância das ações preventivas domésticas, como o uso

racional de repelentes e inseticidas, enfatizando à população de forma clara e acessível, como essas ações, se conduzidas adequadamente, podem trazer benefícios à sua qualidade de vida (NAVARRO, 2021).

Diversos trabalhos confirmam a importância da educação em saúde no controle de vetores. Teenu e colaboradores (2022) observaram uma redução significativa nos índices de larvas de *Aedes albopictus* na aldeia que recebeu intervenção, quando comparada ao controle. Reportaram, também, que o impacto da campanha de educação no controle de mosquitos vetores ajudará a obter apoio da comunidade para reduzir a doença transmitida por vetores e outros programas de eliminação vetorial. Kosasih e colaboradores (2021) afirmaram que a educação interativa afeta o aumento do conhecimento e das atitudes dos alunos do ensino fundamental sobre a dengue hemorrágica. Cesarino e colaboradores (2014) relataram que a inserção dos agentes de controle de vetores da dengue junto às equipes de saúde das unidades básicas otimizou recursos e contribuiu para a melhoria das relações entre trabalhadores e usuários e entre os próprios trabalhadores da equipe de saúde para o controle da dengue, bem como outras situações identificadas no território. Além disso, possibilitou identificar aspectos importantes do processo de descentralização das ações de controle da doença.

Ambientes urbanos com fornecimento de água encanada que evita o armazenamento de água e gerenciamento de resíduos sólidos também podem reduzir os habitats de larvas de *A. aegypti* e as habitações protegidas por tela reduzirão as densidades de mosquitos que picam humanos. Essa abordagem multifacetada exige que o setor de saúde trabalhe em estreita colaboração com os envolvidos no planejamento urbano, água, saneamento, gestão de resíduos sólidos e projeto e construção de moradias para garantir uma gestão adequada dos habitats domésticos e peridomésticos (WHO, 2017).

#### **2.4.2 Controle mecânico**

Como primeiro método de escolha, o controle mecânico de vetores visa realizar a eliminação de criadouros através da destruição, drenagem e destinação adequada de reservatórios (VALLE et al., 2021), para evitar a oviposição pelas fêmeas e, consequentemente, interromper o ciclo do vetor. Isso implica em adotar medidas que dificultem ou eliminem o acesso de vetores de doenças a locais com potencial de se tornarem criadouros (como calhas, caixas d'água, potes e até pneus que possam acumular água parada), pensando em reduzir o contato do mosquito com o homem, podendo envolver, também, a captura destes (ZARA et al.,

2016). A instalação de telas em janelas e portas de casas, isolamento de doentes e captura de mosquitos somam às práticas desse tipo de controle (BRAGA; VALLE, 2007).

O controle mecânico deve ser realizado não só por moradores, mas em colaboração com os Agentes Comunitários de Saúde, em conjunto as equipes de Atenção Básica/Saúde da Família e profissionais das Equipes Saúde da Família. É necessário que as ações de controle do vetor sejam planejadas e direcionadas pelos gestores municipais (OPAS, 2020). Os Agentes de Controle de Endemias, por exemplo, são responsáveis pela eliminação de criadouros de difícil acesso, como caixas d'água, ou pelo uso de larvicidas (biológicos ou químicos) em domicílios (BRASIL, 2009 b).

### **2.4.3 Controle químico**

O controle químico consiste no uso de produtos químicos como larvicidas e adulticidas, e é recomendado que seja utilizado de forma racional, complementar às ações de vigilância e manejo ambiental, devido à possibilidade de seleção de vetores resistentes aos produtos e da geração de impactos ambientais (FUNASA, 2001; OPAS, 2019). O uso de inseticidas sintéticos é o mais utilizado no controle de mosquitos e larvas de *A. aegypti* e os principais produtos químicos utilizados são organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides, através de produtos aerossóis, dispersão de fumaça química (VALLE et al., 2021).

No geral, podem ser aplicados diretamente em locais com larvas e pupas, em paredes externas dos criadouros e situados em pontos estratégicos ou por aspersão aeroespacial utilizando carros, em épocas de surtos ou epidemias (ZARA et al., 2016).

Apesar de já existirem fórmulas químicas menos agressivas quando comparadas a produtos da classe dos organofosforados (RAGHAVENDRA et al., 2010), por exemplo, essas bases químicas ainda são utilizadas devido ao custo-benefício do produto, oferecendo risco para a saúde humana e ambiental (BHATT et al., 2021). Os organofosforados são facilmente degradados no meio ambiente e não se acumulam no tecido de mamíferos, apesar de sua toxicidade. Atualmente, *themephós* é o principal inseticida organofosforado utilizado no país. Carbamatos já são menos utilizados e piretróides agem de maneira semelhante ao diclorodifeniltricloroetano (DDT) e apresentam alta toxicidade a peixes (BRAGA; VALLE, 2007). Além disso, as taxas de aplicação para o controle eficaz de mosquitos não apenas afetam organismos não-alvo, como as abelhas, por exemplo (MCGREGOR; CONNELLY, 2021).

A resistência em populações de insetos vetores é dependente tanto do volume quanto da frequência de aplicações da base química utilizada e características inerentes da espécie a ser

controlada também podem facilitar o desenvolvimento de resistência a produtos químicos, o que é o caso do mosquito *A. aegypti*, que possui seu ciclo de vida curto com progênie abundante (HEMINGWAY; RANSON, 2000). A resistência já foi confirmada em todos os grupos de compostos químicos, porém o uso deles ainda é aplicado mesmo com o desenvolvimento de outras formas de controle (BRAGA; VALLE, 2007). Um exemplo é o DDT, que foi introduzido pela primeira vez para o controle de mosquitos em 1946 e um ano depois já foi relatada a resistência de mosquitos ao produto (BROWN, 1986). Já existem relatos de resistência de *A. aegypti* a inseticidas sintéticos em diversos países, incluindo o Brasil (ZULFA et al., 2022; CAMPOS et al., 2023; LOVE et al., 2023).

Ademais, pesticidas químicos são poluentes persistentes e, mesmo após anos, apresentam altos níveis residuais na natureza, além de causar bioacumulação em anfíbios, peixes e, conseqüentemente, em mamíferos, incluindo humanos (GERBER et al., 2016; WOLMARANS et al., 2021; AKINSANYA et al., 2021).

#### **2.4.4 Controle biológico**

Visando reduzir a população vetorial, o controle biológico utiliza predadores ou patógenos específicos no controle de pragas e vetores de doenças, existindo diversas alternativas disponíveis para essa forma de controle, como peixes, invertebrados aquáticos, produtos à base de plantas, bactérias e fungos (ZARA et al., 2016; HUANG et al. 2017). Introduzido no Brasil em 1967 para controlar pragas agrícolas (PARRA et al., 2019), o controle biológico deve ser incentivado pela redução do consumo de inseticidas químicos e pela possibilidade de maior envolvimento das comunidades locais no programa integrado de controle de vetores e, conseqüentemente, menor custo (PAMPLONA et al., 2009).

Peixes larvófagos, como *Gambusia affinis*, *Betta splendens*, *Trichogaster trichopterus* e *Poecilia reticulata*, são utilizados desde o início do século XX como controle populacional de larvas de vetores patógenos causadores de doenças (PAMPLONA et al., 2007; PAIVA et al., 2014; HUANG et al. 2017; NOREEN et al., 2017), de modo que são colocados no ambiente aquático junto às larvas de *A. aegypti*. Ainda que a presença de uma comunidade diversificada de peixes em habitats de reprodução, quando se pensa no biocontrole de larvas de *A. aegypti* por peixes, acredita-se que a utilização desses peixes deve ser estimulada juntamente com outros métodos de controle (PAMPLONA et al., 2014; RANATHUNGE et al., 2021). Ainda pensando em organismos aquáticos, larvas de mosquitos do gênero *Toxorhynchites* (COLLINS; BLACKWELL, 2000; ALBENY et al., 2011; VINIGRADOV et al., 2022), crustáceos

copépodes (HUANG et al., 2017), girinos (HAMED et al., 2022) e a planta carnívora aquática *Utricularia macrorhiza* (COURET et al., 2020) apresentam elevado comportamento predatório a larvas de *A. aegypti*.

Extrato purificado de microalgas do gênero *Chlorella* (SIGAMANI et al., 2020) e de *Melaleuca leucadendra* (PORUSIA; SEPTIYANA, 2021) e óleos essenciais de diversas espécies de plantas (VERA et al., 2014; CASTILLO et al., 2017; RÍOS et al., 2017; NORRIS, et al., 2021; BHARATHITHASAN et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2022; CANSIAN et al., 2023) possuem potencial de agirem como repelente natural e/ou contém propriedades larvicidas contra o mosquito. Óleos essenciais associados a outras formas de controle biológico, como o uso de fungos entomopatogênicos, também demonstram potencial de controle do mosquito (BITENCOURT et al., 2022).

Um dos organismos mais utilizados para o controle biológico de *A. aegypti* é a bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), capaz de produzir proteínas endotóxicas que causam lise nas células intestinais de larvas e, conseqüentemente, sua morte (HAMED et al., 2022). Com segurança humana, baixo desenvolvimento de resistência e possibilidade de uso com produtos químicos garantem o futuro promissor de *Bti* no controle biológico de *A. aegypti* (POLANCZYK et al., 2003). Apesar das vantagens no biocontrole, Carvalho e colaboradores (2021) expuseram *A. aegypti* a *Bti* por 29 gerações e, embora não tenham apresentado características de vida alteradas, as fêmeas apresentaram um aumento no status de suscetibilidade ao vírus da Zika, associado a uma maior disseminação.

A introdução de machos de *A. aegypti* infectados com a bactéria endossimbiótica *Wolbachia* sp. é outra forma de controle biológico (HAMED et al., 2022). Esses machos são considerados hospedeiros permanentes de bactéria e podem reduzir o tempo de vida de fêmeas infectadas, alterar o comportamento alimentar das fêmeas e, ainda, causar esterilidade induzida em fêmeas, que passam a produzir menos ovos e ovos inviáveis (ITURBE-ORMAETXE et al., 2011; HUANG et al., 2017; ALLMAN et al., 2020). Os descendentes de uma fêmea não infectada e um macho infectado tornam-se inviáveis, devido à incompatibilidade citoplasmática. Além disso, a bactéria é capaz de reduzir a infectividade do mosquito para vários arbovírus, incluindo vírus da dengue, chikungunya, febre amarela e Zika vírus (HOFFMANN et al., 2011; DUTRA et al., 2016; ZHANG.; LUI., 2020).

Diversos fungos entomopatogênicos (FEPs) são estudados como controle biológico de larvas e adultos de *A. aegypti*, tais como os do gênero *Cercospora* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Galactomyces* sp. (ACOTTI et al., 2021; ABRAR et al., 2023), além de *Beauveria*

*bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (BITENCOURT et al., 2018; FALVO et al., 2020; CAROLINO et al., 2021; BITENCOURT et al., 2022). Segundo Alves (1998), os FEPs foram pioneiros no controle microbiano de artrópodes, sendo uma opção mais ecológica quando comparada a inseticidas químicos (HUANG et al., 2017). Diversos autores já demonstraram o potencial de FEPs para controle de artrópodes, incluindo carrapatos (ANGELO et al., 2014), ácaros (PEREIRA et al., 2019) e mosquitos (LIMA et al., 2015; BITENCOURT et al., 2021). Embora esse potencial de controle seja reportado, entender a interação destes fungos com seu hospedeiro é de extrema importância para se desenvolver um inseticida biológico baseado em FEPs.

#### **2.4.4.1 *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Aedes aegypti***

Inicialmente usados no controle biológico de pragas agrícolas (FARIA; MAGALHÃES, 2001; MICHEREFF FILHO et al., 2009), *B. bassiana* e *M. anisopliae* são fungos com grande potencial não só no controle de *A. aegypti* (HUANG et al., 2017; DE PAULA et al., 2021; KURNIAWAN et al., 2021; QUINTERO-ZAPATA et al., 2022, ZAMORA-AVILÉS et al., 2022), mas também de diversos outros insetos (NOGUEIRA et al., 2020; BAYMAN et al., 2021; GEBREMARIAM et al., 2022; KARABÖRKLÜ, 2022). Ambas as espécies são naturalmente encontradas no solo e possuem alta virulência contra diversos insetos terrestres (HUANG et al., 2017). Sabe-se que FEPs apresentam maior resistência a estresses abióticos ambientais quando comparados a inseticidas químicos e demonstram aumento da virulência acima das cepas do tipo selvagem específica ao alvo, que representa uma barreira na possibilidade de desenvolvimento de resistência no inseto-alvo do que outras abordagens (ORTIZ-URQUIZA et al., 2014).

A infecção fúngica ocorre através da adesão de conídios (GREENFIELD et al., 2014), seguida da germinação e penetração ativa na cutícula do hospedeiro-alvo por meio da pressão mecânica e ação enzimática (AW; HUE, 2017). Posteriormente, a produção de blastosporos na hemocele do artrópode somada à liberação de toxinas promovem a destruição de tecidos do inseto. O desenvolvimento de hifas leva a colonização e esporulação fúngica na superfície do hospedeiro (MORA et al., 2016; HUANG et al., 2017; WANG; WANG, 2019; BITENCOURT et al., 2021).

Os FEPs sintetizam metabólitos tóxicos para insetos, geralmente sintetizados quando o fungo penetra o exoesqueleto e alcança a hemocele, o que é considerado como propriedade inseticida e anti-alimentar, apresentando, assim, potencial comercial como agente de controle

de insetos (MORA et al., 2016). Os efeitos biológicos causados em insetos por toxinas de FEPs incluem indução da despolarização da membrana via abertura de canais de cálcio, resultando em paralisia tetânica e morte; alterações morfológicas no citoesqueleto e nos plasmócitos, afetando a resposta imune envolvendo encapsulação e fagocitose; redução da expressão de peptídeos antimicrobianos cruciais na resposta imunológica humoral dos insetos; alterações estruturais nas células epiteliais, levando à ruptura da membrana; indução de estresse oxidativo, inibindo a secreção de fluido nos túbulos de Malpighi; redução da mobilidade e alimentação (SAMUELS et al., 1988; VEY et al., 2002; PAL et al., 2007; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Uma diferença entre o processo de infecção de larvas em mosquitos é que os conídios não se fixam na cutícula das larvas, como normalmente fazem na superfície dos insetos terrestres, por meio de interações hidrofóbicas. Essa diferença provavelmente se deve ao fato desses fungos serem normalmente encontrados no solo e, por isso, não evoluíram para interagir com as larvas do mosquito através das mesmas interações hidrofóbicas na água. Assim, em larvas, a principal via de entrada é a ingestão de conídios (HUANG et al., 2017; BITENCOURT et al., 2021 a). A infecção por *B. bassiana* reduz a sobrevivência, sucesso de repasto sanguíneo e fecundidade de *A. aegypti* (DARBRO et al., 2012) e a suscetibilidade de fêmeas adultas infectadas por *M. anisopliae* é modificada após a alimentação sanguínea (PAULA et al., 2011).

Ambos os fungos permitem o uso associado a óleos essenciais e outros tipos de formulações, que já vem sendo pesquisados, tanto em *A. aegypti* quanto em outros artrópodes, visando na melhor apresentação comercial de um produto com certa resistência a fatores ambientais (NOGUEIRA et al., 2020; BITENCOURT et al., 2022; ROCHA, 2022; ZAMORA-AVILÉS et al., 2022).

A produção de *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresenta vantagens, quando comparadas a outros métodos de controle do mosquito, como a fácil produção, possibilidade de produção em grande escala, variabilidade genética que permite o uso de espécies seletivas para um determinado inseto-alvo, além de serem seguros para mamíferos, incluindo humanos, aves, animais aquáticos e plantas (ZIMMERMANN, 2007 a; b; MORA et al., 2016; HUANG et al., 2017).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de realização de experimentos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano, localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Daniel Neitz, no



Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária e no Laboratório de Controle de Artrópodes de Importância em Saúde Pública pertencente ao Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária e no Laboratório de Histologia e Embriologia, pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizados no município de Seropédica (22° 44' 38" S 43° 42' 28" O), estado do Rio de Janeiro.

### **3.2 Obtenção e manutenção da colônia de *Aedes aegypti***

Os ovos de *A. aegypti* (cepa Rockefeller) foram cedidos pelo Laboratório de Bioquímica de Biologia Molecular de Artrópodes/Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ, cuja manutenção da colônia foi aprovada pelo CEUA/ICBS número 23083007342/2016-59.

Antes de cada experimento, aproximadamente 2 mil ovos de *A. aegypti* foram colocados em bandeja plástica contendo 2 L de água destilada. Após a eclosão, as larvas foram separadas por densidade em diversas bandejas plásticas (200 larvas para cada 1 L de água), alimentadas com ração de peixe estéril triturada (Alcon Koi®) diariamente (500 mg/L) e mantidas em temperatura e umidade relativa (UR) controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ ) (BITENCOURT et al., 2021 a).

Após a metamorfose das larvas, as pupas (N=40 pupas) foram transferidas para potes plásticos (9 x 15 x 13 cm) com tampas adaptadas com furos para garantir a circulação de ar, contendo 100 mL de água destilada. Durante a emergência dos adultos, a solução de sacarose a 10% foi oferecida *ad libitum*. A água era escoada após todos os adultos emergirem de cada pote. Os mosquitos também foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controlados ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ ).

### **3.3 Obtenção e manutenção dos isolados fúngicos**

Os isolados de *M. anisopliae* sensu lato (s.l) CG 153 e de *B. bassiana* CG 479 foram obtidos da coleção de fungos entomopatogênicos do LCM, cedidos pelo Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Ambos isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidos no laboratório em temperatura e umidade específicas ( $27^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ ) por 14 dias. Posteriormente, foram mantidos refrigerados a  $4^\circ\text{C}$  até a realização dos ensaios biológicos ou

por até 3 meses. A identificação dos isolados, seus respectivos hospedeiros originais de isolamento e seus locais de origem estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l), hospedeiro do qual foi isolado e local de isolamento.

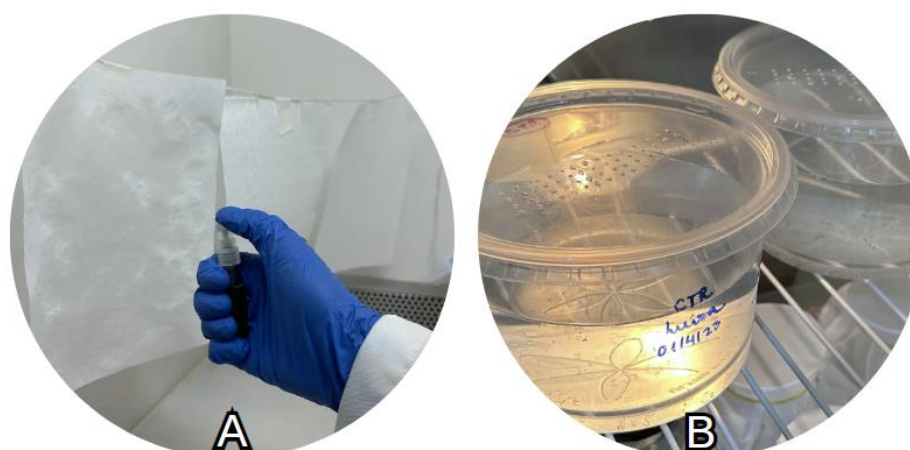
Isolado	Hospedeiro do isolamento	Origem geográfica
CG 153	Hymenoptera: Vespidae	Santana do Ipanema, AL
CG 479	<i>Deois incompleta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Altamira, PA

A seleção dos isolados entomopatogênicos foi baseada em experimentos em condições *in vitro* e semi campo previamente realizados pelo grupo de pesquisa (BITENCOURT et al., 2018; BITENCOURT et al., 2022; MOREIRA, 2022), onde foi demonstrado seu potencial larvicida e adulticida.

### 3.4 Preparo e viabilidade das suspensões fúngicas

Em fluxo laminar, conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* foram raspados da superfície do meio de cultivo e transferidos para tubos do tipo Falcon contendo solução de Tween 80 a 0,03%. As suspensões foram homogêneas em vórtex, quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para as concentrações de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  conídios/mL, segundo Alves (1998). Para os grupos controle, foram utilizadas apenas a solução estéril de Tween 80 a 0,03%.

Nos experimentos com adultos, a suspensão fúngica ou a solução controle foi pulverizada em papel filtro (gramatura 32), com auxílio de um spray borrifador, e posicionado em potes



plásticos, e no experimento com larvas, a suspensão foi despejada em bandejas, sendo considerado 1 mL de suspensão para cada larva exposta (BITENCOURT et al., 2021 a).

**Figura 2** – Método de exposição de adultos (A) e de larvas (B) de *Aedes aegypti*.

Para viabilidade das suspensões conidiais, alíquotas de 10 µL de suspensões na concentração  $10^5$  conídios/mL de cada isolado fúngico foram inoculadas em placa de Petri contendo BDA e cloranfenicol a 0,5% e incubadas à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$  por 17 horas. Após o período de incubação, foram inoculados 10 µL de azul de algodão nas alíquotas de suspensão e foi posicionada uma lamínula para avaliação da viabilidade, realizada com auxílio de um microscópio.

O cálculo do percentual de germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998), avaliando e quantificando 300 conídios para obtenção do percentual de conídios germinados e de não germinados. Conídios foram considerados germinados quando foi possível observar o desenvolvimento de tubo germinativo e hifas e não germinados quando essas estruturas estavam ausentes. Experimentos que tiveram a viabilidade das suspensões conidiais menor que 95% não foram considerados.

### 3.5 Oviposição de *Aedes aegypti* expostos a *Metarhizium anisopliae*

Utilizando *M. anisopliae* CG 153 a  $1 \times 10^7$  conídios/mL, a metodologia utilizada para impregnação do papel filtro foi descrita no item 3.4, com modificações no volume da suspensão fúngica (5 mL) e tamanho do papel filtro (cortado para caber dentro do pote). Depois de secas dentro do fluxo, as folhas de papel filtro foram posicionadas em potes plásticos (15 cm  $\times$  13 cm) cobrindo toda sua superfície (Adaptado de DONG et al., 2012).

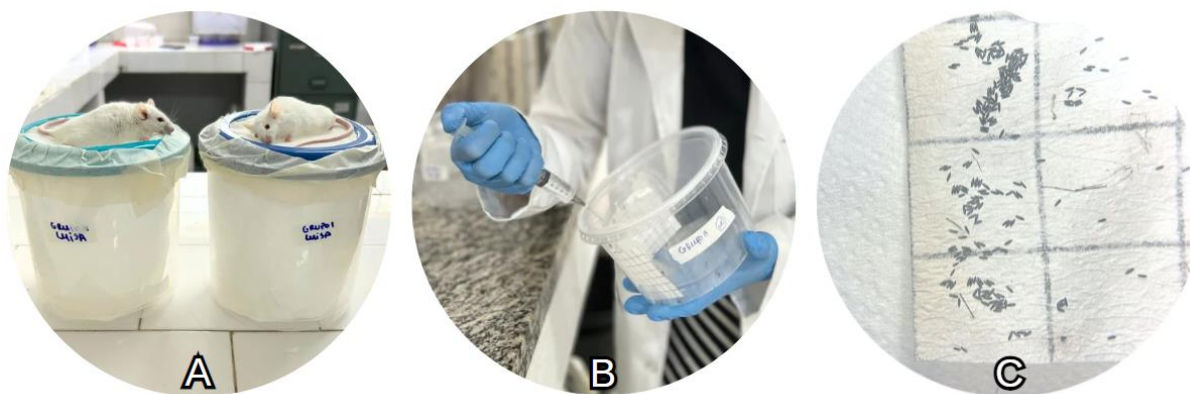
Adultos de *A. aegypti* (N=40, sendo 25 fêmeas e 15 machos com 6-8 dias pós-emergência), foram brevemente submetidos ao frio ( $-4^\circ\text{C}$ ) até adormecerem. Em seguida, com auxílio de pinças (nº5), as fêmeas foram gentilmente transferidas para potes plásticos, contendo cada pote, uma folha de papel filtro impregnado com *M. anisopliae* CG 153. O grupo controle foi exposto ao papel filtro impregnado com Tween 80 a 0,03%. Após 24h em contato com o papel filtro impregnado por suspensão fúngica, os adultos foram transferidos para potes plásticos contendo papel filtro (16 cm  $\times$  6 cm) para posterior oviposição.

Para a alimentação das fêmeas e posterior oviposição, um camundongo (*Mus musculus*, Linhagem Swiss) foi anestesiado com injeção subcutânea de cetamina (25%) e xilazina (75%), utilizando a dose de 0,1 mL para cada 10 g de animal e mantido na parte superior da gaiola contendo os mosquitos, durante 10 minutos. Três dias após a alimentação com sangue, o papel

filtro foi umedecido com 3 mL de água destilada e mantido na gaiola por três dias para realização da oviposição. Durante todo o experimento a solução de sacarose a 10% foi oferecida *ad libitum* e os potes contendo os mosquitos foram mantidos em temperatura e umidade controlados ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ ).

Cada grupo recebeu o tratamento em um momento específico, sendo que todos receberam alimentação com sangue de camundongo. O Grupo 1 (G1) foi exposto à suspensão fúngica minutos antes da alimentação, o Grupo 2 (G2) foi alimentado 24 horas antes da exposição fúngica, o Grupo 3 (G3) foi exposto à suspensão fúngica 24 horas antes da alimentação e o Grupo Controle (CTR) foi exposto à solução de Twen 80 a 0,03% minutos antes da alimentação.

O papel filtro foi separado no terceiro dia, armazenado em sacos de papel em temperatura ambiente e, posteriormente, os ovos foram quantificados utilizando microscópio estereoscópio (GOMES, 2019). Foram realizadas seis repetições em tempos distintos utilizando diferentes lotes de fungos e mosquitos. Além da quantidade de ovos por grupo, a quantidade de fêmeas ingurgitadas foi reportada ao fim da alimentação, assim como a quantidade de mosquitos vivos durante no final de cada experimento. Ambos foram analisados visualmente, já que fêmeas ingurgitadas apresentam corpo avermelhado e repleto de sangue e mosquitos mortos não apresentam atividade.



**Figura 3** – Alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* utilizando camundongos anestesiados (A); papel filtro sendo umedecido para realização de oviposição (B); contagem de ovos em microscópio estereoscópio (C).

### **3.6 Histopatologia de ovários de *Aedes aegypti* expostas a *Metarhizium anisopliae***

Seguindo a metodologia descrita no item 3.5, fêmeas de *A. aegypti* (sendo dois grupos de 20 e dois de 15 fêmeas) de 6-8 dias pós-emergência foram expostas ao fungo ou ao Tween 80 a 0,03%. A separação e identificação dos grupos, alimentação com sangue ou solução de sacarose e manutenção do experimento também foram similares às descritas no item 3.5.

Para dissecação de ovários, as fêmeas (N=42) foram adormecidas a frio e posicionadas em placa de Petri contendo PBS (tampão fosfato 10 mM pH 7,4 a 4 °C) para remoção de patas e asas utilizando duas pinças finas estéreis, sob microscópio estereoscópio. De cada grupo, 3 fêmeas (sem patas e asas) foram coletadas em cada momento, totalizando 14 subgrupos contendo o material coletado. Para G1 e G2 (N=9) os tempos de dissecação foram 24, 48 e 72h após a alimentação com sangue e para G3 e CTR (N=12) foram 0, 24, 48 e 72h após a alimentação com sangue.

Após a dissecação, o material, separado por tempo e por grupo, foi fixado em solução de Boiun (GREGORY, 1980) por 3 horas e posicionados em cassete histológico imersos em álcool 70. Em seguida, as amostras passaram por processo de desidratação em solução seriada de etanol (ETOH) a 70, 80, 90, 95 e 100% por 15 minutos a cada passagem. Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em solução xilol por três vezes, 15 minutos cada. Os tecidos foram inclusos em parafina e cortadas em micrótomo (HM360, MICRON®) com seções de 3 µm. O material foi disposto em lâminas, e corados com hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff ou metenamina de prata de Grocott e seladas com lamínulas (CORRÊA-DA-SILVA et al., 2006). Foram avaliadas 70 lâminas no total.

As imagens foram visualizadas utilizando microscópio de luz com câmera integrada AxioCam ICc 1 (ZEISS®) e fotografadas utilizando o programa Primo Star, ZEISS®.

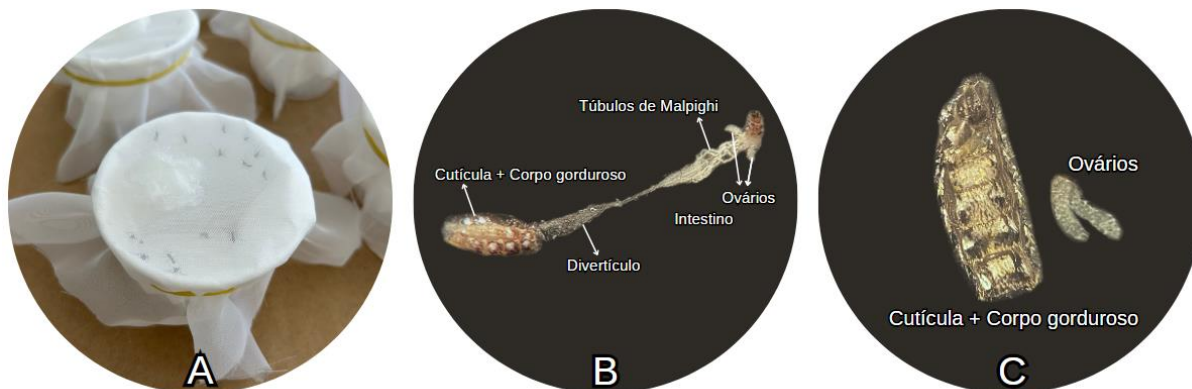
### **3.7 Perfil lipídico de ovários e corpo gorduroso de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas a fungos entomopatogênicos**

Utilizando *M. anisopliae* CG 153 e *B. bassiana* CG 479 a  $1 \times 10^7$  conídios/mL, a metodologia descrita no item 3.4 foi seguida com modificações no volume da suspensão fúngica (1 mL) e tamanho do papel filtro posicionado em copos plásticos descartáveis (5 cm × 5 cm). Depois de secos, cada copo recebeu 15 fêmeas de *A. aegypti* (N=45) de 6-8 dias pós-emergência previamente adormecidas a frio a -20°C (Figura 2A).

Após 24, 48 ou 72 horas de exposição (DONG et al., 2012), as fêmeas foram adormecidas a frio e preparadas para dissecação. Utilizando duas pinças finas estéreis, cada fêmea foi posicionada em placa de Petri contendo PBS para remoção da cabeça, tórax, asas e patas. Posteriormente, a dissecação das fêmeas foi realizada de forma que o penúltimo segmento era separado do restante do corpo, de modo a expor os ovários, intestino e túbulos de Malpighi (Figura 2B). Os ovários e o corpo gorduroso (corpo gorduroso + cutícula) foram separados e

acondicionados (Figura 2C), separadamente, em microtubos contendo 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Os tecidos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de lipídios.

**Figura 4** – Fêmeas de *Aedes aegypti* expostas a fungos entomopatogênicos (A); dissecação para exposição de



órgãos de interesse (B); tecidos selecionados para extração e análise de lipídios (C).

Os experimentos foram realizados em 3 tempos distintos utilizando diferentes lotes de fungos e mosquitos.

### 3.7.1 Extração e análise de lipídios

O pool de ovários e corpo gorduroso foram macerados e homogeneizados, separadamente, utilizando pistilos de Teflon e transferidos para tubos de extração de vidro identificados, onde foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de água destilada, 2 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio (BLIGH; DYER, 1959). Cada tubo foi agitado em vórtex 3 vezes por 3 minutos durante 1 hora e, posteriormente, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi despejado em segundo tubo de extração, deixando o depósito de proteínas no fundo dos tubos utilizados no primeiro momento. Para separação das fases orgânica e aquosa, foi adicionado ao sobrenadante 1 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio e os tubos foram novamente centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. A fase orgânica foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para um terceiro tubo de extração. A fase orgânica foi seca por arraste de Nitrogênio a  $45^{\circ}\text{C}$ , utilizando o Concentrador (TE-019, Tecnal®), e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise por cromatografia em camada delgada unidimensional ou *thin layer chromatography* (TLC) em placas de sílica (Merck®).

Os lipídios foram reconstituídos em 80  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e homogeneizados em vórtex por 1 minuto para aplicação das amostras nas placas de sílica. Para curva padrão, foram aplicados 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{g}$  de ácido graxo (AG), colesterol (CHO), colesterol esterificado

(CHOE) e triacilglicerol (TG) em 5 pontos de cada placa de sílica. Foram aplicados 2 µg de monoacilglicerol (MG), diacilglicerol (DG) e ergosterol (EG) em apenas um ponto. Como referência, foram utilizados padrões lipídicos mostrados na Tabela 3.

**Tabela 2** – Padrões lipídicos utilizados na cromatografia em camada delgada.

<b>Sigla</b>	<b>Padrão</b>	<b>Identificação Smigma-Aldrich</b>
AG	Ácido Graxo	Oleic acid - O1008-1G
CHO	Colesterol	Cholesterol Sigma Grade - C8667
CHOE	Colesterol Esterificado	Cholesteryl Palmitate 98+% - C6072
MG	Monoacilglicerol	1-Monooleoyl-rac-glycerol - M7765
DG	Diacilglicerol	1,3-Diolein - D3627
TG	Triacilglicerol	Triolein - 92860
EG	Ergosterol	Ergosterol - PHR1512

Após a aplicação e secagem de lipídios padrões e amostras, cada placa de sílica foi posicionada em cuba de vidro vedada contendo hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:1, v/v) previamente homogeneizados em balão volumétrico (KAWOOWA; LAW, 1988) para separação dos lipídios neutros. A corrida aconteceu até que os padrões e amostras percorressem 16 cm desde a linha onde estes foram aplicados. As placas foram retiradas da cuba e, após a evaporação dos solventes, foram imersas em solução de Cherring, composta por sulfato de cobre 10% (p/v) e ácido fosfórico 8% (v/v), e queimadas entre duas placas de vidro em forno Pasteur a 170°C (RUIZ; OCHOA, 1997) até que as manchas dos lipídios estivessem evidentes.

As imagens foram submetidas à densitometria através do programa Image Master Total Lab versão 1.11 (GE Healthcare® - Brazil Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil).

### **3.8 Atividade antimicrobiana de larvas de *Aedes aegypti* expostas a *Beauveria bassiana***

Utilizando *B. bassiana* CG 479 a  $1 \times 10^6$  conídios/mL, a metodologia descrita no item 3.4 foi seguida com modificações no volume da suspensão fúngica (700 mL) e tamanho do recipiente (1 L de capacidade). A suspensão foi despejada em potes plásticos contendo 700

larvas (L2). O grupo controle foi exposto a 700 mL de água destilada com Tween 80 a 0,03% e também possuía 700 larvas (L2).

Após 16, 24, 40 e 48 horas de exposição fúngica, foram coletadas 60 larvas de cada grupo (N=240), utilizadas pinças oftalmológicas esterilizadas. Estas foram, posteriormente, acomodadas em microtubos contendo 120 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou coquetel inibidor de protease (CIP). As larvas foram maceradas e o homogenato armazenado a -20 °C logo após a maceração. Foram realizados testes de difusão em disco (antibiograma), para detectar o efeito do macerado larval sobre o crescimento de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* sp. resistentes e sensíveis a betalactâmicos, descritas na Tabela 2.

**Tabela 3** – Cepas de bactérias utilizadas no ensaio para avaliação do efeito antimicrobiano de larvas de *Aedes aegypti* expostas a *Beauveria bassiana* CG 479.

<b>Cepa</b>	<b>Espécie</b>	<b>Identificação</b>
25922	<i>Escherichia coli</i>	Sensível
CMY	<i>Escherichia coli</i>	Resistente
25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sensível
43300	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente
111	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sensível
200	<i>Pseudomonas</i> sp.	Resistente

Utilizando-se pinça esterilizada, discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro previamente impregnados com 2µL do macerado foram colocados sobre a superfície do ágar Müeller-Hinton, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005), contendo cada uma das cepas bacterianas avaliadas. Dois dos discos posicionados em cada placa foram separados como controle, sendo que um deles continha apenas PBS ou CIP e o outro o antibiótico Ertapenem. Outros 8 discos foram utilizados para avaliação da atividade do macerado obtido a partir de cada tempo de exposição ao fungo (16, 24, 40 e 48h). As placas foram incubadas em estufa a 35 ± 1 °C por 24 horas. O halo de inibição do crescimento foi medido no verso de cada placa utilizando régua milimétrica, descartando-se



o diâmetro de leitura do disco. Os testes foram realizados em duplicatas e repetido 3 vezes, sendo que 24 placas foram avaliadas em cada repetição.

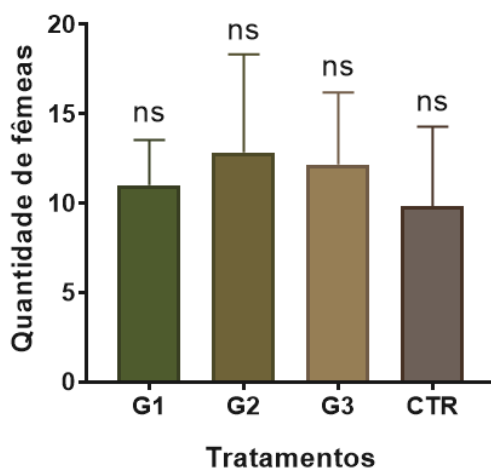
### 3.9 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk. Quando apresentaram distribuição normal, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) usando o Tukey para comparação múltipla e os que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância foi 95%. Todas as análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 8.0.1 (© GraphPad Software Inc., USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.2 Oviposição de *Aedes aegypti* expostos a *Metarhizium anisopliae*

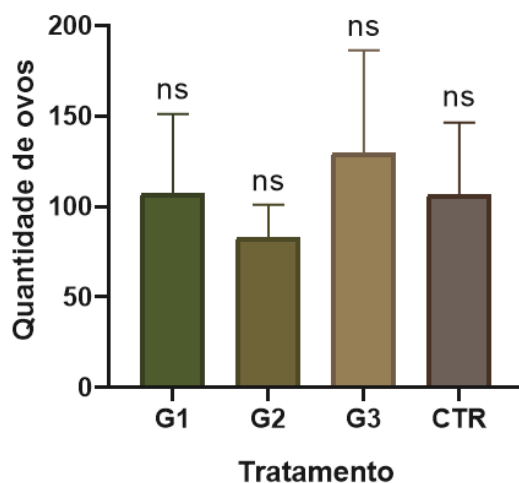
Ao realizar a alimentação, foi possível realizar a contagem de fêmeas ingurgitadas em cada grupo, o que não apresentou diferença estatística ( $P=0,6358$ ) (Figura 5). Os diferentes grupos foram comparados entre si (G1 vs. G2:  $P=0,9773$ ; G1 vs. G3:  $P=0,9638$ ; G1 vs. CTR:  $P=0,9638$ ; G2 vs. G3:  $P=0,9928$ ; G2 vs. CTR:  $P=0,6215$ ; e G3 vs. CTR:  $P=0,7790$ ).



**Figura 5** – Fêmeas de *Aedes aegypti* ingurgitadas após alimentação com sangue de camundongo distribuídas em quatro Grupos (G). G1, G2 e G3 foram expostos a *Metarhizium anisopliae* CG 153. G1= exposto ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentado 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentado 24h após exposição fúngica; CTR= exposto à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo.

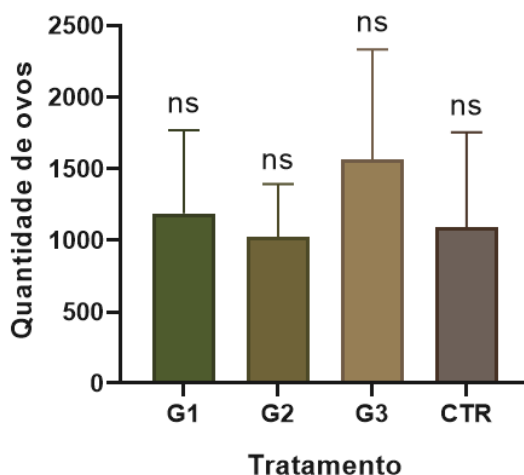
A exposição fúngica utilizando *M. anisopliae* CG 153 na concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL associada à alimentação com sangue de camundongo, independente do momento de alimentação, não influenciou na quantidade de ovos de *A. aegypti* nos diferentes grupos

( $P \sim 0,5948$ ), bem como quando os grupos foram comparados entre si ( $P > 0,9999$  para G1 vs. G2, G1 vs. G3, G1 vs. CTR, G2 vs. G3, G2 vs. CTR, G3 vs. CTR), como mostra a Figura 6.



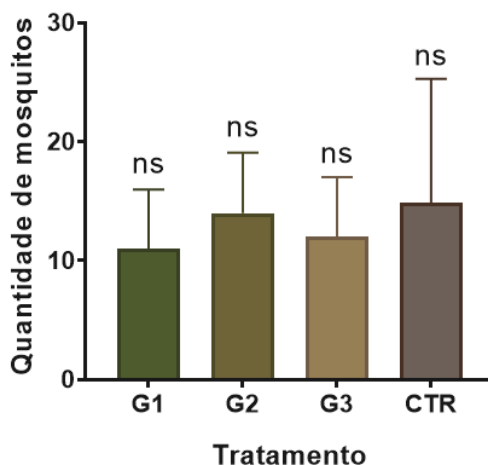
**Figura 6** – Quantidade de ovos após postura realizada por fêmeas de *Aedes aegypti* expostas ou não a *Metarhizium anisopliae* CG 153 distribuídas em quatro Grupos (G): G1, G2 e G3 expostas ao fungo. G1= expostas ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentadas 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentadas 24h após exposição fúngica; CTR= expostas à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo.

A comparação entre a quantidades de ovos por fêmea alimentada também não apresentou diferença estatística ( $P = 0,3191$ ), como mostra a Figura 7. Os diferentes grupos foram comparados entre si (G1 vs. G2:  $P = 0,7471$ ; G1 vs. G3:  $P = 0,7917$ ; G1 vs. CTR:  $P > 0,9999$ ; G2 vs. G3:  $P = 0,2466$ ; G2 vs. CTR:  $P = 0,7682$ ; e G3 vs. CTR:  $P = 0,7713$ ) também não apresentaram diferença estatística.



**Figura 7** – Quantidade de ovos por fêmea após postura realizada por fêmeas de *Aedes aegypti* expostas ou não a *Metarhizium anisopliae* CG 153 distribuídas em quatro Grupos (G): G1, G2 e G3 expostas ao fungo. G1= expostas ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentadas 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentadas 24h após exposição fúngica; CTR= controle expostas à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo.

A quantidade de mosquitos vivos em cada grupo, machos e fêmeas, ao final dos experimentos foi similar ( $P=0,7507$ ) (Figura 8). Os diferentes grupos também foram comparados entre si: G1 vs. G2:  $P=0,8692$ ; G1 vs. G3:  $P=0,9940$ ; G1 vs. CTR:  $P=0,7636$ ; G2 vs. G3:  $P=0,9558$ ; para G2 vs. CTR:  $P=0,9965$ ; G3 vs. CTR:  $P=0,8870$ . Assim, o resultado dessa avaliação também não apresentou diferença estatística.



**Figura 8** – Sobrevivência de mosquitos (machos e fêmeas) ao fim dos experimentos de oviposição. G1, G2 e G3 foram expostas com *Metarhizium anisopliae* CG 153 distribuídas em quatro Grupos (G). G1= expostas ao fungo minutos antes da alimentação; G2= alimentadas 24h antes da exposição fúngica; G3= alimentadas 24h após exposição fúngica; CTR= expostas à Tween 80 a 0,03% minutos antes da alimentação; ns= não significativo.

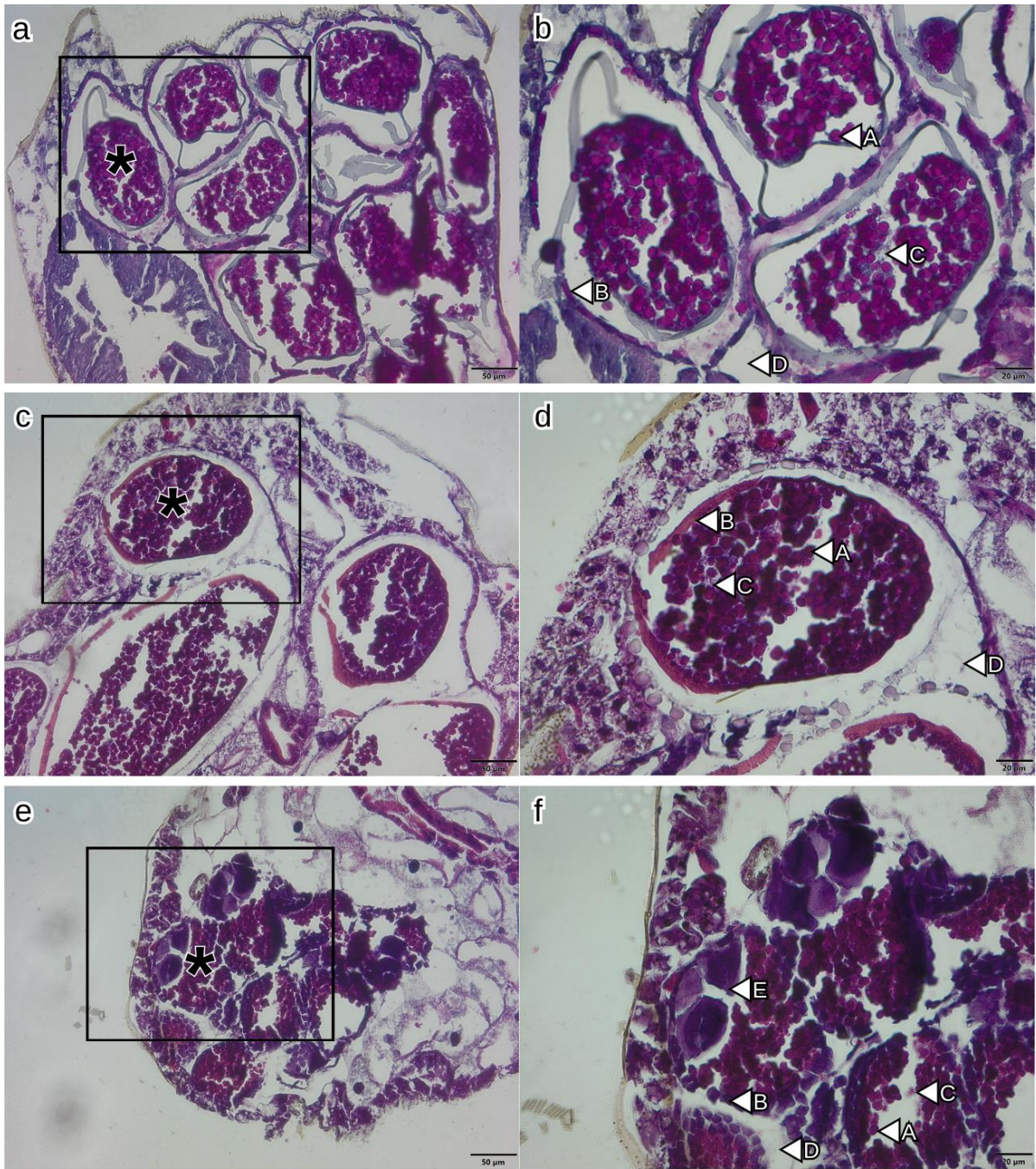
#### 4.3 Análise histopatológica de ovários de *Aedes aegypti* expostos a *Metarhizium anisopliae*

Ao realizar a leitura das lâminas coradas em HE ou PAS não foram encontradas estruturas leveduriformes nos ovários. Ainda assim, os folículos ovarianos dos mosquitos tratados com *M. anisopliae* CG 153 mostraram perda da arquitetura tecidual com rompimento do epitélio folicular, redução do número de ovócitos e alterações morfológicas nas células de sustentação (*nurse cells*) quando comparados histologicamente ao grupo controle.

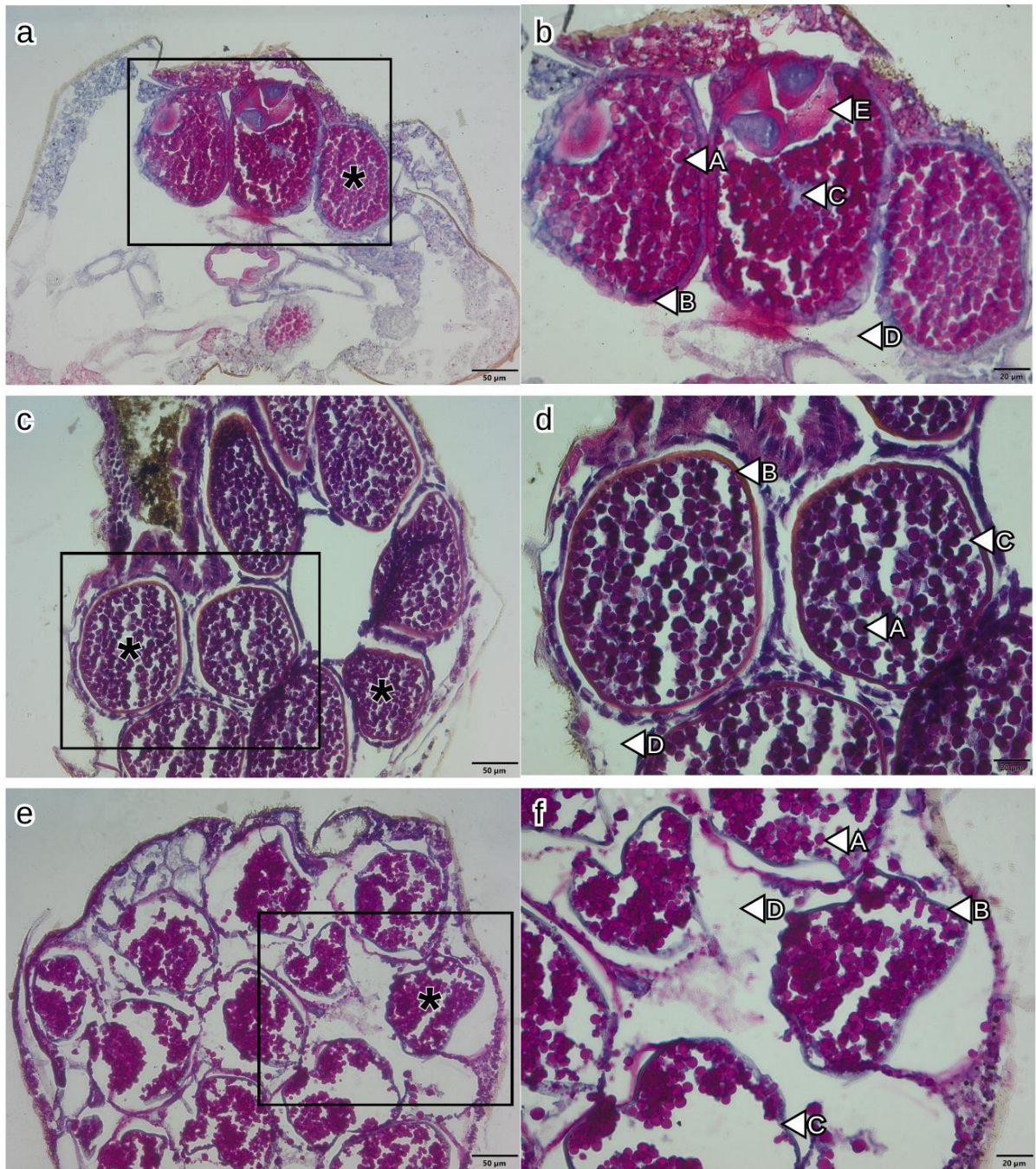
Nos grupos tratados por 48h, tanto CTR (Figura 9 c e d) quanto os grupos G1 (Figura 9 a e b), G2 (Figura 9 c e d) e G3 (Figura 9 e e f) tratados com fungo, ainda foi possível observar a presença de *nurse cells* em alguns ovariolos. Os ovariolos dos grupos tratados com fungo mostraram perda da arquitetura tecidual com rompimento do epitélio folicular; os ovócitos e ovogônias encontram-se dispersos pelo espaço entre os ovariolos (cálices). Alguns ovariolos encontram-se totalmente degenerados, sem a presença de ovócitos, ovogônias e *nurse cells*. Os ovariolos que *nurse cells* estão presentes mostram-se em estágio de degeneração (exibem núcleos de diferentes tamanhos e presença de células anucleadas).

Nos ovários das fêmeas tratadas com a solução controle por 72h (Figura 9 e e f), *nurse cells* estão ausentes. No grupo controle observou-se o epitélio folicular em fase inicial de degeneração, os ovariolos mostraram-se com menor quantidade de ovócitos, ovogônias e grânulos de vitelo em relação ao grupo 24h e 48h. Os ovariolos do grupo controle, apesar de parecerem estar em fase de degeneração, ainda exibiram organização tecidual em relação aos grupos tratados com 48h e 72h.

Após 24 horas, os ovários de *A. aegypti* do grupo controle (CTR) exibiram morfologia normal com epitélio folicular com células cúbicas baixas e núcleo esférico revestindo os ovariolos, além da presença de *nurse cells* (ou trofócitos ou células acessórias) localizadas em uma extremidade, ocupando um terço dos ovariolos (Figura 9 a e b). O restante dos ovariolos mostrou-se totalmente preenchido por células (ovócitos) e grânulos de vitelo. Em 48h (Figura 5 c e d), o epitélio germinativo mostrou-se íntegro; enquanto no grupo tratado, os ovariolos exibiram rompimento, possivelmente precoce, do epitélio folicular e redução do número ovócitos e grânulos de vitelo.



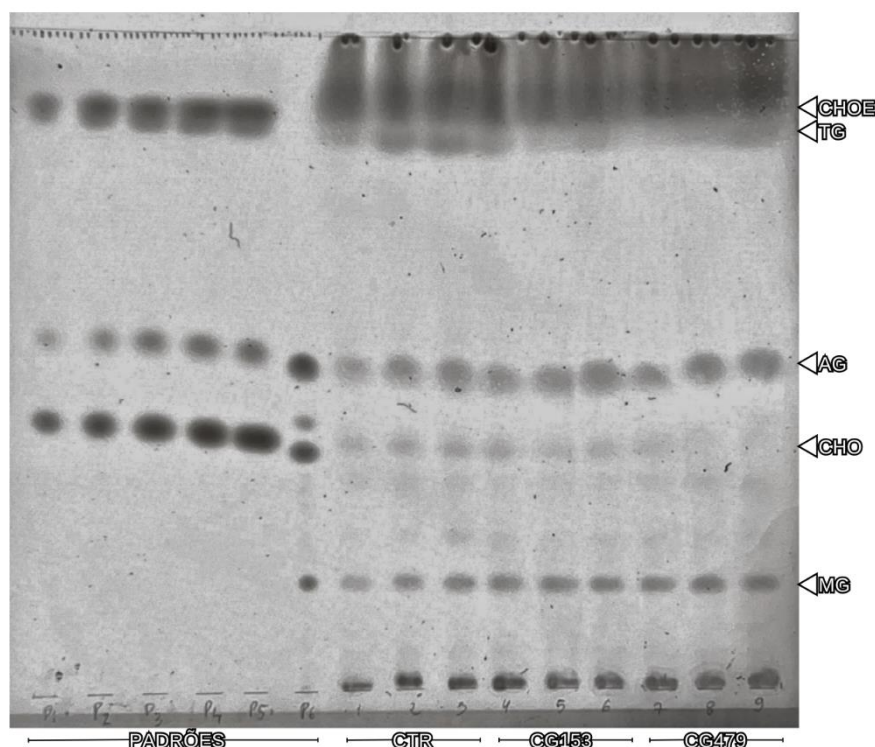
**Figura 9** – Cortes histológicos de ovários de *Aedes aegypti* expostos a *Metarhizium anisopliae* CG 153 por 48 horas em diferentes grupos (G1, G2, G3). \*= ovariolos; A= ovócito; B= epitélio folicular cúbico com núcleo esférico; C= grânulos de vitelo; D= cálice; E= nurse cells.



**Figura 10** – Cortes histológicas de ovários de *Aedes aegypti* expostos ao papel impregnado com Tween 80 a 0,03% em diferentes tempos pós alimentação (24, 48 e 72h). \*= ovariolos; A= ovócito; B= epitélio folicular cúbico com núcleo esférico; C= grânulos de vitelo; D= cálice; E= nurse cells.

#### 4.4 Análise do perfil lipídico de ovários e corpo gorduroso de *Aedes aegypti* expostos a fungos entomopatogênicos

Foram identificados em ovários e corpo gorduroso os seguintes lipídios neutros: colesterol esterificado (CHOE), monoacilglicerol (MG), triacilglicerol (TG), colesterol (CHO) e ácido graxo (AG) ao comparar com os padrões (Figura 11), sendo possível realizar a quantificação apenas dos dois últimos (Figura 12).

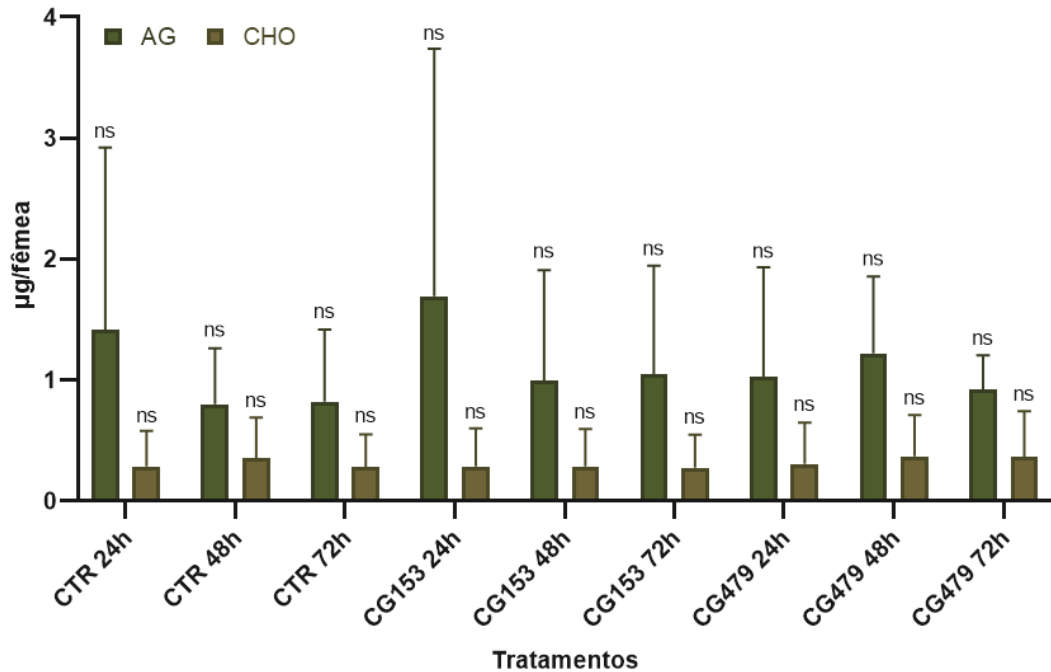


**Figura 11** – Composição de lipídios neutros em ovário de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas ou não a suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae*. Pontos 1, 4 e 7= tratados pós 24h; pontos 2, 6 e 8= tratados por 48h; pontos 3, 6 e 9= tratados por 72h; CHO= colesterol esterificado; TG= triacilglicerol; AG= ácido graxo; CHO= colesterol; MG= monoacilglicerol.

Baseado nas curvas padrão, foi possível notar que a quantidade de AG apresentou maior proporção quando comparado a CHO. Ainda assim, as suspensões fúngicas de *M. anisopliae* CG 153 e *B. bassiana* CG 479 na concentração  $1 \times 10^6$  conídios/mL não influenciaram na quantidade desses lipídios em ovários e corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* nos diferentes tempos de exposição (Figura 12).

Quando as classes de lipídio AG e CHO foram comparadas entre os grupos nos três tempos de observação, não houve diferença estatística para amostras de ovário (OV) ( $P=0,9798$  e  $P>0,9999$ , respectivamente). Os grupos controle (CTR) nos diferentes tempos de tratamento não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si ( $P=0,6983$  para AG e

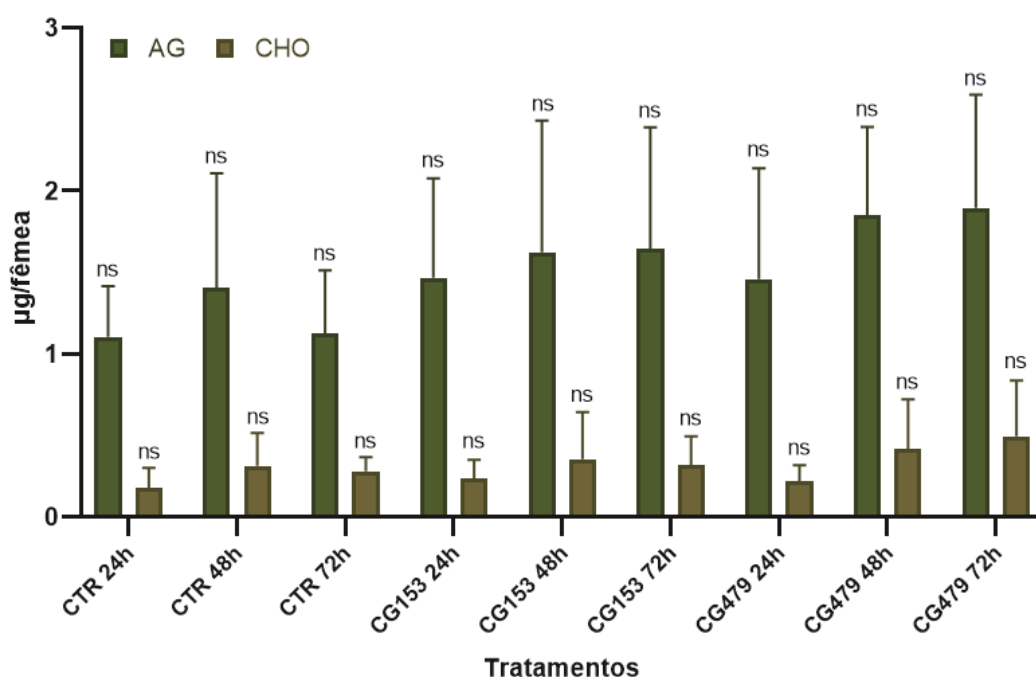
$P=0,9513$  para CHO). A comparação entre as amostras de OV nos diferentes tempos de tratamento com *M. anisopliae* CG 153 também não apresentou diferença estatística ( $P=0,7992$  para AG e  $P=0,9989$  para CHO), assim como a de *B. bassiana* CG 479 ( $P=0,8541$  para AG e  $P=0,7214$  para CHO) (Figura 12).



**Figura 12** – Quantidade em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de lipídios neutros por ovários de fêmea de *Aedes aegypti* expostas a Tween 80 a 0,03% (CTR), *Metarhizium anisopliae* CG 153 ou *Beauveria bassiana* CG 479 em diferentes tempos de tratamento. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. AG= ácido graxo; CHO= colesterol; ns= não significativo.

Quando as classes de lipídio AG e CHO foram comparadas entre os grupos nos três tempos de observação (Figura 13), não houve diferença estatística para amostras de corpo gorduroso (CG), apresentando valor de  $P=0,7705$  e  $P=0,8365$ , respectivamente. Os grupos controle nos diferentes tempos de tratamento não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si ( $P=0,7223$  para AG e  $P=0,5264$  para CHO). A comparação entre as amostras de CG nos diferentes tempos de tratamento com CG 153 também não apresentou diferença estatística ( $P=0,9495$  para AG e  $P=0,6735$  para CHO), assim como a de CG 479 ( $P=0,7691$  para AG e  $P=0,9712$  para CHO).

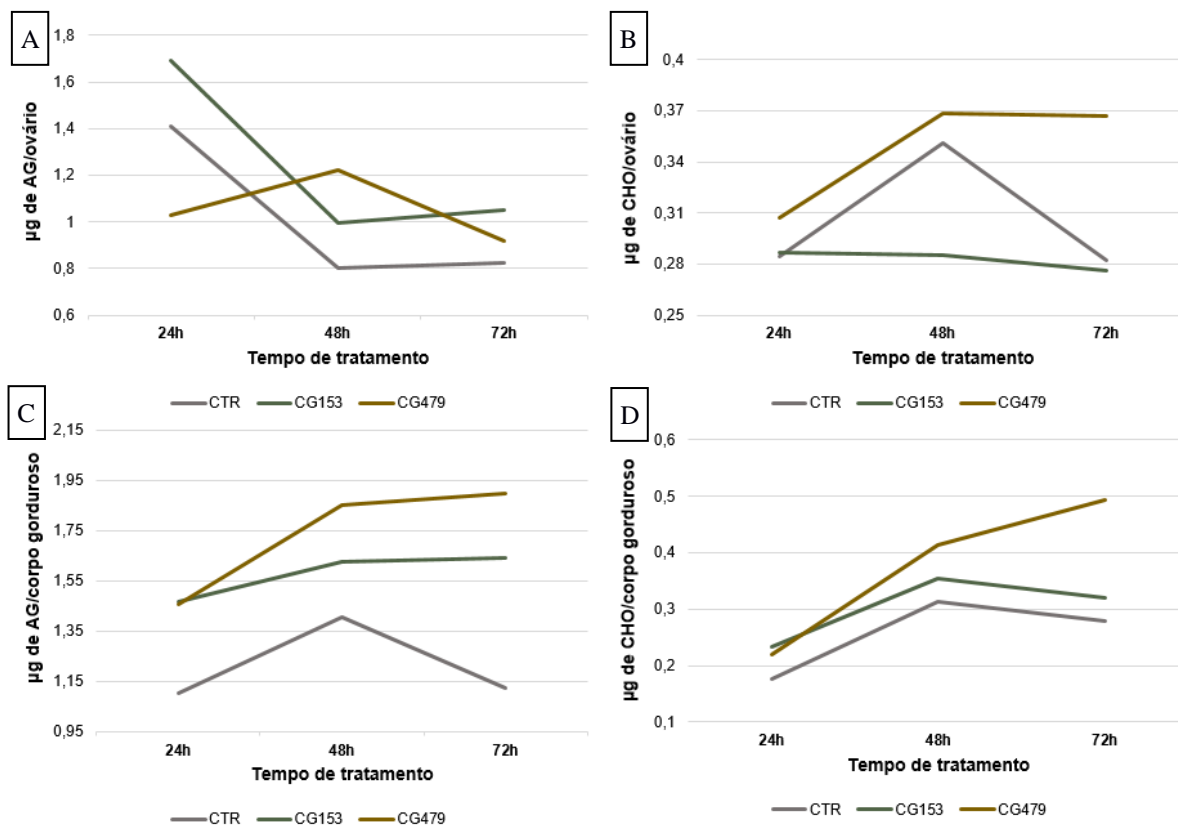




**Figura 13** – Quantidade em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de lipídios neutros por corpo gorduroso de fêmea de *Aedes aegypti* expostas a Tween 80 a 0,03% (CTR), *Metarhizium anisopliae* CG 153 ou *Beauveria bassiana* CG 479 em diferentes tempos de tratamento. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. AG= ácido graxo; CHO= colesterol; ns= não significativo.

Ao comparar os tempos separadamente, também não foi encontrada nenhuma diferença estatística. Para amostras de OV, os lipídios AG (Figura 14 A) e CHO (Figura 14 B) no tratamento de 24h apresentaram valor de  $P=0,8736$  e  $P=0,9954$ , respectivamente; no tratamento de 48h apresentaram  $P=0,7688$  e  $P=0,9485$ ; e no tratamento de 72 horas apresentaram valor de  $P=0,9111$  e  $P=0,9236$ , respectivamente.

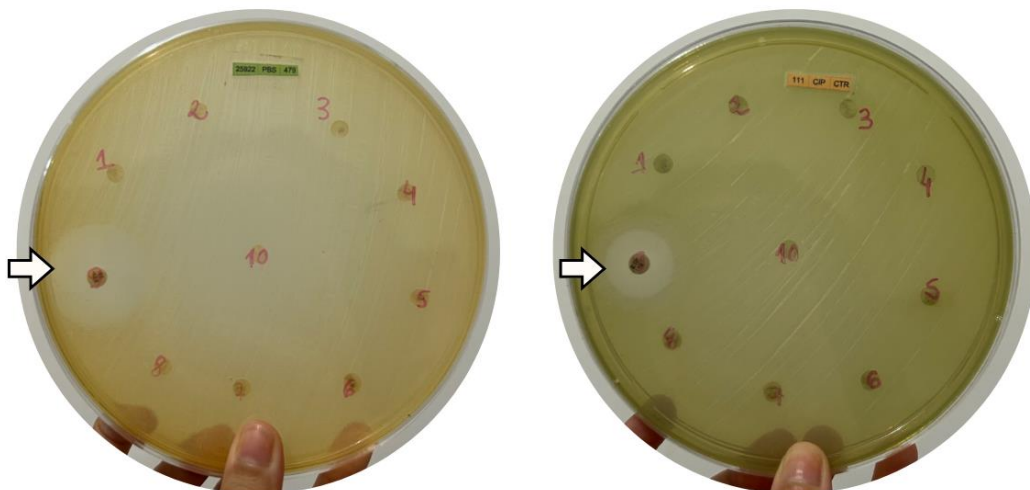
Para amostras de CG, os lipídios AG (Figura 14 C) e CHO (Figura 14 D) no tratamento por 24 horas apresentaram valor de  $P=0,6783$  e  $P=0,8128$ , no tratamento por 48 horas apresentaram  $P=0,7416$  e  $P=0,9009$ ; e no tratamento de 72 horas apresentaram valor de  $P=0,3716$  e  $P=0,5093$ , respectivamente.



**Figura 14** – Quantidade em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de lipídios neutros por tecido de fêmea de *Aedes aegypti* expostas a Tween 80 a 0,03% (CTR), *Metarhizium anisopliae* CG 153 ou *Beauveria bassiana* CG 479 em diferentes tempos de tratamento. Valores obtidos a partir da análise densitométrica. Tecidos representados em A e B= ovários e em C e D= corpo gorduroso; AG= ácido graxo; CHO= colesterol.

#### 4.4 Atividade antimicrobiana de larvas de *Aedes aegypti* expostas a *Beauveria bassiana*

O macerado das larvas de *A. aegypti* coletadas 16, 24, 40 e 48 horas após a exposição ao fungo *B. bassiana* CG 479 não apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *E. coli* ou *Pseudomonas* sp., incluindo as cepas resistentes e sensíveis. Dois exemplos de placas de antibiograma podem ser visualizados na Figura 10.



**Figura 15** – Placas de antibiograma contendo amostra de macerado de larvas de *Aedes aegypti* expostas a *Beauveria bassiana* CG 479. Discos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8= larvas maceradas 16, 24, 40 e 48 horas após exposição, respectivamente; disco 9= Ertapenem; disco 10= solução salina tamponada com fosfato ou coquetel inibidor de protease.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo mostra o efeito dos isolados fúngicos CG 153 de *M. anisopliae* e CG 479 de *B. bassiana* sobre a atividade antimicrobiana por larvas de *A. aegypti* e sobre a oviposição, morfologia ovariana e metabolismo lipídico corpo gorduroso e ovário de fêmeas do mosquito.

Diversos autores já demonstraram a eficácia de FEPs no controle de *A. aegypti* (LIMA et al., 2015; DANIEL et al., 2017; FALVO et al., 2020; KURNIAWAN et al., 2021; DE PAULA et al., 2021; BITENCOURT et al., 2021; ZAMORA-AVILÉS et al., 2022; ARROYO-GONZÁLEZ; GANDARILLA-PACHECO, 2022). A seleção dos isolados entomopatogênicos foi baseada em experimentos em condições *in vitro* e semi campo previamente realizados pelo grupo de pesquisa (BITENCOURT et al., 2018; BITENCOURT et al., 2022; MOREIRA, 2022), onde foi demonstrado o potencial larvicida e adulticida destes.

Blanford e colaboradores (2005) demonstraram a redução da alimentação sanguínea e a inibição do desenvolvimento de *Anopheles stephensi* como benefícios de uma infecção fúngica. Apesar de se tratar de uma espécie diferente de mosquito, o mesmo não foi observado neste trabalho, visto que o grupo que recebeu alimentação com sangue depois a exposição fúngica não só teve quantidade média de fêmeas ingurgitadas não muito diferente da dos grupos alimentados antes ou no mesmo dia da exposição fúngica, como também não obteve diferença estatística na oviposição.

Diferente dos resultados do presente trabalho, a taxa de fecundidade (considerada como a soma dos ovos postos e retidos do primeiro ciclo gonotrófico), reduziu de 95% e 60% para dois isolados de *B. bassiana* testados por García-Munguía e colaboradores (2011). Porém, Darbro e colaboradores (2012) evidenciaram que, apesar de se alimentarem menos de sangue, *A. aegypti* expostos a FEPs são capazes de realizar a oviposição normalmente. Além de gêneros dos FEPs, ambos os pesquisadores utilizaram sangue humano para alimentação de fêmeas, sendo que o segundo realizou a alimentação duas vezes (dois e quatro dias após a exposição fúngica).

Ao avaliar a quantidade de fêmeas ingurgitadas, apesar de não encontrar diferença estatística, notou-se que poucas fêmeas se alimentaram. Das 25 fêmeas alocadas em cada pote, calculando a média total de 11 fêmeas alimentadas (44% alimentadas, redução de 56%). Na repetição onde o maior e menor número de fêmeas ingurgitadas foi observado o percentual da média de fêmeas alimentadas foi respectivamente de 36% e 61%, correspondendo na redução de 64% e 39% de fêmeas alimentadas. Darbro e colaboradores (2012) demonstraram a redução de 80% na alimentação sanguínea em uma repetição durante seus ensaios de semi campo com *B. bassiana*. Paula et al. (2011) e Cabral et al. (2020) relataram que fêmeas ingurgitadas se tornam menos suscetíveis a infecção fúngica de *M. anisopliae* do que quando alimentadas com solução açucarada, devido à rápida indução das vias imunológicas Toll e IMD.

Ainda que não tenha sido avaliada a viabilidade dos ovos provenientes dos experimentos de oviposição e a longevidade das larvas nascidas desses, a infecção de *A. aegypti* por CG 153 *M. anisopliae*, assim como por CG 479 *B. bassiana*, reduziu a longevidade (MOREIRA, 2022) ao mesmo tempo que permitiu a oviposição, tornando a sua utilização um método potencialmente eficaz.

Na leitura das lâminas de histopatologia coradas em HE ou PAS não foram encontradas estruturas leveduriformes nos ovários. Apesar disso, os folículos ovarianos dos mosquitos tratados com *M. anisopliae* mostraram perda da arquitetura tecidual com rompimento do epitélio folicular, redução do número de ovócitos e alterações morfológicas de *nurse cells* (responsáveis pelo desenvolvimento inicial e nutrição de ovócitos) quando comparados histologicamente ao grupo controle. O grupo controle se apresentou similar ao reportado por Mahmood et al. (1991), onde *A. aegypti* foi tratado com ivermectina antes da análise de histopatologia.

Dessa forma, devido ao tempo de exposição, sugerimos que as alterações tenham sido causadas pelas toxinas de *M. anisopliae* que foram transportadas via hemolinfa até os ovários,

já que essas causam alterações estruturais nas células epiteliais, levando a ruptura de membrana (SOWJANYA; PADMAJA, 2008; MORA et al., 2016). A infecção em larvas acontece em menor tempo, já que nelas a principal via de entrada do fungo no organismo é a ingestão de conídios (HUANG et al., 2017) previamente dispersos na água durante o preparo da suspensão. No caso de adultos, a infecção leva mais tempo já que envolve a adesão de conídios (GREENFIELD et al., 2014) e penetração ativa na cutícula do hospedeiro-alvo, seguida da germinação e ruptura da cutícula por pressão mecânica e ação enzimática (AW & HUE, 2017). Assim, o curto tempo entre a infecção, alimentação e posterior oviposição possivelmente não foram suficientes para que o fungo tenha atingido os tecidos envolvidos na postura de ovos. Isso se comprova pela ausência de hifas na histopatologia realizada no presente trabalho. Portanto, mais experimentos com maior tempo de exposição são necessários para avaliar a patogênese, órgãos infectados, assim como mais análises histológicas associadas a ferramentas quantitativas.

O metabolismo lipídico de insetos é fundamental para a diapausa, voo, desenvolvimento embrionário e gerenciamento de energia (GONDIM et al., 2018; TOPRAK et al., 2020). Na análise do perfil lipídico de ovário e corpo gorduroso de *A. aegypti* e, por fim, ao ser exposto aos fungos *M. anisopliae* CG 153 e *B. bassiana* CG 479 por 24, 48 ou 72 horas o perfil lipídico de AG e CHO do mosquito não parece ser afetado quando comparado com o grupo controle. Nos experimentos com *Rhipicephalus microplus* realizados por Angelo et al. (2010), o perfil lipídico da hemolinfa nos grupos tratados com fungos não apresentou alterações em comparação ao grupo controle, porém resultados diferentes foram encontrados em amostras de hemócitos de fêmeas ingurgitadas. Carrapatos imersos em suspensões de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* reduziram respectivamente aproximadamente 40% e 10% os níveis de CHO 24 horas após o tratamento.

Nas pesquisas de Xavier (2019) em *R. microplus* e de Entringer et al. (2021) com *Rhodnius prolixus*, os resultados demonstram que o metabolismo de CHO é uma via com potencial de ser usada como alvo em novos métodos de controle do inseto. A inibição das proteínas transportadores de CHO proveniente da dieta diminui a capacidade reprodutiva de fêmeas e inviabiliza o desenvolvimento embrionário. Além disso, os ovos tornam-se suscetíveis à colonização por bactérias. Pelos resultados desse trabalho, os FEPs não parecem agir de tal forma. Os fungos utilizados no presente trabalho não influenciaram na quantidade de CHO de ovário ou corpo gorduroso, porém mais estudos seriam necessários para compreender os efeitos no organismo de *A. aegypti* como um todo, incluindo as proteínas transportadoras.

As diferentes condições de exposição ao fungo *M. anisopliae* e alimentação de fêmeas com sangue de camundongo não influenciaram na quantidade de ovos, corroborando a ausência de visualização dos fungos no ovário e ausência de alteração na quantidade de lipídios AG e CHO no período avaliado, quando foi utilizada a concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL através da técnica do papel filtro impregnado. Ainda, não foi possível observar atividade de inibição no crescimento de bactérias a partir de macerado de larvas expostas à suspensão conidial de *B. bassiana*.

De todos os antibiogramas avaliados utilizando amostras de larvas de *A. aegypti* tratadas com *B. bassiana* CG 479 por 16, 24, 40 e 48 horas, não foi observada presença de halo inibidor de crescimento bacteriano em nenhuma placa para nenhuma das seis cepas bacterianas testadas. Cruz et al. (2018) utilizaram, com sucesso, 16 tipos de PAMs para inibir *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* resistente a metilcilina. Picoli et al. (2017) isolaram melitina, um tipo de PAM, do veneno de *Apis mellifera* e provaram seu potencial na destruição e inibição do biofilme produzido por *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A partir disso, acredita-se que seria necessária a utilização de um *pool* com maior de larvas e/ou extração de PAMs mais específicos oriundos de larvas de *A. aegypti* para estudos mais aprofundados.

Embora não tenhamos avaliado experimentalmente o crescimento larval, assim como observado por Bitencourt et al. (2021) e Moreira (2022), as larvas expostas a *B. bassiana* aparentaram ter crescimento acelerado quando comparadas ao grupo controle. São necessários mais estudos para avaliar a precisão das alterações no crescimento larval causadas por infecções fúngicas.

As diferentes condições de exposição ao fungo *M. anisopliae* e alimentação de fêmeas com sangue de camundongo não influenciaram na quantidade de ovos, corroborando a ausência de visualização dos fungos no ovário e ausência de alteração na quantidade de lipídios AG e CHO no período avaliado, quando foi utilizada a concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL através da técnica do papel filtro impregnado. Ainda, não foi possível observar atividade de inibição no crescimento de bactérias a partir de macerado de larvas expostas à suspensão conidial de *B. bassiana*. A partir dos apresentados, ressalta-se a importância de metodologias diferentes e mais aprofundadas para compreender a dinâmica da infecção fúngica em *A. aegypti* e suas consequências.

## 6. CONCLUSÕES

Após avaliar os resultados deste trabalho, conclui-se que:

1. A exposição de fêmeas de *A. aegypti* com *M. anisopliae* CG 153, através da técnica do papel impregnado, por 24 horas não influenciou na oviposição.
3. A exposição de fêmeas de *A. aegypti* com *M. anisopliae* CG 153 por 24 horas foi capaz de alterar a morfologia dos ovários no tratamento 48 horas após a alimentação.
4. A exposição de fêmeas de *A. aegypti* com *M. anisopliae* CG 153 e *B. bassiana* CG 479 por 24, 48 ou 72 horas não interferiu na quantidade de AG e CHO em ovário e corpo gorduroso
5. A exposição ao fungo *B. bassiana* CG 479 durante 48 horas não permitiu a identificação de atividade antimicrobiana no macerado de larvas de *A. aegypti*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAR, A.; SARWAR, S.; ABBAS, M.; CHAUDHRY, H.; GHANI, N.; FATIMA, A.; TAHIRA, A. Identification of locally isolated entomopathogenic *Fusarium* species from the soil of Changa Manga Forest, Pakistan and evaluation of their larvicidal efficacy against *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Biology**, 83, e246230, 2023.
- ADAM, A.; JASSOY, C. Epidemiology and Laboratory Diagnostics of Dengue, Yellow Fever, Zika, and Chikungunya Virus Infections in Africa. **Pathogens**, 10, 1324, 2021.
- AKINSANYA, B.; OLALERU, F.; SAMUEL, O.B.; AKEREDOLU, E.; ISIBOR, P.O.; ADENIRAN, O.S.; SALIU1, J.K.; AKHIROMEN, D.I. Bioaccumulation of Organochlorine Pesticides, *Procamallanus* sp. (Baylis, 1923) infections, and Microbial Colonization in African Snakehead fish Sampled from Lekki Lagoon, Lagos, Nigeria. **Brazilian Journal of Biology**, 81(4), p.1095-1105, 2021.
- ALBENY, D.S.; MARTINS, G.F.; ANDRADE, M.R.; KRÜGER, R.F.; VILELA, E.F. *Aedes aegypti* survival in the presence of *Toxorhynchites violaceus* (Diptera: Culicidae) fourth instar larvae. **Zoologia**, 28(4): 538-540, 2011.
- ALLMAN, M.J.; FRASER, J.E.; RITCHIE, S.A.; JOUBERT, D.A.; SIMMONS, C.P.; FLORES, H.A. *Wolbachia's* Deleterious Impact on *Aedes aegypti* Egg Development: The Potential Role of Nutritional Parasitism. **Insects**, 11(735), 2020.
- ALVES, S.B., **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1163p, 1998.
- ANDREW, J.; BAR, A. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. **Annual Research & Review in Biology**, 3(1), 52-69, 2013.
- ANGELO, I.C. Avaliação dos perfis protéico e lipídico na resposta de *Rhipicephalus microplus* à infecção com fungos. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro. 2011.
- ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Haemolymph Protein and Lipid Profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Infected by Fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**, 57, 79-83, 2010.
- ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; CAMPANHON, I.B.; BRAZ, G.R.C.; SOARES, M.R.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V.R.P. Detection of serpins involved in cellular immune response of *Rhipicephalus microplus* challenged with fungi. **Biocontrol Science and Technology**, 24, 351-360, 2014.



ANGELO, I.C.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; PERINOTTO, W.M.S., GÔLO, P.S. CAMARGO, M.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Physiological changes in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) experimentally infected with entomopathogenic fungi. **Parasitology Research**, 114(1), 2190-225, 2014.

ARÉVALO-CORTÉS, A.; GRANADA, Y.; TORRES, D.; TRIANA-CHAVEZ, O. Differential Hatching, Development, Oviposition, and Longevity Patterns among Colombian *Aedes aegypti* Populations. **Insects**, 13, 536, 2022.

ARRESE, E.L.; CANAVOSO, L.E.; JOUNI, Z.E.; PENNINGTON, J.E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 31, 7-17, 2001.

ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, 55:207-25, 2010.

ATELLA, G.C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K.C. Metabolismo de Lipídeos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Capítulo 6, 2012.

AVENDANHO, F.C.; SAID, R.F.C. Manejo integrado de vetores. **Consensus**. Brasília, 34-37, 2019.

AW, K.M.S.; HUE, S.M. Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. **Journal of Fungi**, 3(30), 2017.

BAAK-BAAK, C.M.; CIGARROA-TOLEDO, N.; CRUZ-ESCALONA G.A.; MACHAIN-WILLIAMS, C.; RUBI-CASTELLANOS, R.; TORRES-CHABLE, O.M.; TORRES-ZAPATA R.; GARCIA-REJON, J.E. Human blood as the only source of *Aedes aegypti* in churches from Merida, Yucatan, Mexico. **Journal of Vector Borne Diseases**, 55, 2018.

BALTZER, S.A.; BROWN, M.H. Antimicrobial Peptides – Promising Alternatives to Conventional Antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 20(4), 228-235, 2011.

BAR, A.; ANDREW, J. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Larvae. **Annual Research & Review in Biology**, 3(1), 1-21, 2013.

BARRERA, R.; AMADOR, M.; MUNOZ, J.; ACEVEDO, V. Integrated vector control of *Aedes aegypti* mosquitoes around target houses. **Parasites & Vectors**, 11:88, 2018.

BAYMAN, P.; MARIÑO, Y.A.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, N.M.; ODUARDO-SIERRA, O.F.; REHNER, S.A. Local isolates of *Beauveria bassiana* for control of the coffee berry borer

*Hypothenemus hampei* in Puerto Rico: Virulence, efficacy and persistence. **Biological Control**, 155, 104533, 2021.

BECKER, N.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASE, C.; DAHL, C.; LANE, J.; KAISER, A. Mosquitoes and Their Control, Springer Science+Business Media, NY, 2003.

BESERRA, E.B.; CASTRO JR., F.P. Biologia Comparada de Populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, 37(1), 2008.

BHARATHITHASAN, M.; RAVINDRAN, D.R.; RAJENDRAN, D.; CHUN, S.K.; ABBAS, S.A.; SUGATHAN, S.; YAHAYA, Z.S.; SAID, A.R.; OH, W-D.; KOTRA, V.; MATHEWS, A.; AMIN, M.F.M.; ISHAK, I.H.; RAVII, R. Analysis of chemical compositions and larvicidal activity of nut extracts from *Areca catechu* Linn against *Aedes* (Diptera: Culicidae). **PLoS ONE**, 16(11), 2021.

BHATT, P.; ZHOU, X.; HUANG, Y; ZHANG, W.; CHEN, S. Characterization of the role of BITENCOURT, R.O.B.; FARIA, F.S.; MARCHESINI, P.; SANTOS-MALLET, J.R.; CAMARGO, M.G.; BITTENCOURT, A.R.E.P.; PONTES, E.G.; PEREIRA, D.B.; DOUGLAS CHAVES, D.S.A.; ANGELO, I.S. Entomopathogenic fungi and *Schinus molle* essential oil: The combination of two eco-friendly agents against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 194, 2022.

BITENCOURT, R.O.B.; FARIA, F.S.; MARCHESINI, P.; SANTOS-MALLET, J.R.; CAMARGO, M.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; PONTES, E.G.; PEREIRA, D.B.; CHAVES, D.S.A.C.; ANGELO, I.C. Entomopathogenic fungi and *Schinus molle* essential oil: The combination of two eco-friendly agents against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 194, 107827, 2022.

BITENCOURT, R.O.B.; FARIAS, F.S.; FREITAS, M.C.; BALDUINO, C.J.R.; MESQUITA, E.S.; CORVAL, A.R.C.; GÔLO, 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. **International Journal of Bioengineering and Life Sciences**, 12(10), 2018.

BITENCOURT, R.O.B.; MALLET, J.R.S.; MESQUITA, E.; GÔLO, P.S.; FIOROTTI, J.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; PONTES, E.G.P.; ANGELO, I.C. Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. **Acta Tropica**, 213, 2021 a.

BITENCOURT, R.O.B.; SALCEDO-PORRAS, N.; UMAÑA-DIAZ, C.; ANGELO, I.C.; LOWENBERGER, C. Antifungal immune responses in mosquitoes (Diptera: Culicidae): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, 178, 2021 b.

BLANFORD, S. Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission. **Science**, 308(5728), 1638-1641, 2005.

BOPARI, J.K.; SHARMA, P.K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein & Peptide Letters**, 27(1), 2020.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: History of Control in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 16(2), 113-118, 2007.

BRASIL. Boletim Epidemiológico 01. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. Semanas epidemiológicas 1 a 53, 54, 2023 a.

BRASIL. Boletim Epidemiológico 13. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023, 54, 2023 b.

BRASIL. Boletim Epidemiológico 03. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. Semanas epidemiológicas 1 a 53, 52, 2021 a.

BRASIL. Boletim Epidemiológico 48. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 51, 2021. Semanas epidemiológicas 1 a 53, 52, 2021 b.

BRASIL. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 2009 a.

BRASIL. O agente comunitário de saúde no controle da dengue. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Brasília, 2009 b.

BRIEGEL, H.; HEFTI, M.; DIMARCO, E. Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, 48, p.547-554. 2002.

BROWN, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 2:123-40, 1986.

BUENO, M.R; DA CUNHA, J.P.A.R. Environmental risk for aquatic and terrestrial organisms associated with drift from pesticides used in soybean crops. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 92, 2020.

CABRAL, S.; PAULA, A.; SAMUELS, R.; FONSECA, R.; GOMES, S.; SILVA, J.R.; MURY, F. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Immune Responses with Different Feeding Regimes Following Infection by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Insects**, 11(95), 2020.

CAMPOS, K.B.; ALOMAR, A.A.; EASTMOND, B.H.; OBARA, M.T.; DIAS, L.S.; RAHMAN, R.U.; ALTO, B.W. Assessment of insecticide resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to insect growth regulator pyriproxyfen, in the northeast region of Brazil. **Journal of Vector Ecology**, 48(1):12-18, 2023.

CANSIAN, R.L.; STAUDT, A.; BERNARDI, J.L.; PUTON, B.M.S; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; GOMES, A.A.C.; ANDRADE, B.C.O.P.; LEAL, I.C.R.; SIMAS, N.K.; ZENI, J.; JUNGUES, A.; DALLAGO, R.M.; BACKES, G.T.; PAROUL, N. Toxicity and larvicidal activity on *Aedes aegypti* of citronella essential oil submitted to enzymatic esterification. **Brazilian Journal of Biology**, 83, e244647, 2023.

CAROLINO, A.T.; TEODORO, T.B.P; GOMES, S.A.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. Production of conidia using different culture media modifies the virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Vector Borne Diseases**, 58, 2021.

CARVALHO, K. DA S.; D.R.D.; DUARTE GUEDES, D.R.D.; CRESPO, M.M.; DE MELO-SANTOS, M.A.V.; SILVA-FILHA, M.H.N.L. *Aedes aegypti* continuously exposed to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* does not exhibit changes in life traits but displays increased susceptibility for Zika virus. **Parasites & Vectors**, 14:379, 2021.

CASTAÑEDA-GÓMEZ, J.; GONZÁLES-ACOSTA, C.; JAIME-RODRÍGUEZ, J.L.; VILLEGAS-TREJO, A.; MORENO-GARCÍA, M. COVID-19 y su impacto en el control del mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* y la vigilancia epidemiológica de infecciones por arbovirus. **Gaceta Médica de México**, 157:194-200, 2021.

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**, 33(1):25–35, 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue, Symptoms and Treatment, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/symptoms/index.html> Acesso em: 13/09/2022

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue, Transmission, Through Mosquito Bites, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/transmission/index.html> Acesso em: 14/09/2022.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Zika and Guillain-Barré Syndrome, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/healtheffects/gbs-qa.html> Acesso em: 14/09/2022.

CESARINO, M.B.; DIBO, M.R.; IANNI, A.M.Z.; VICENTINI, M.E.; FERRAZ, A.A.; CHIARAVALLOTTI-NETO, F. A difícil interface controle de vetores - atenção básica: inserção dos agentes de controle de vetores da dengue junto às equipes de saúde das unidades básicas no município de São José do Rio Preto, SP. **Saúde Soc.** São Paulo, 23(3):1018-1032, 2014.

CHEN, L.L.; WILCON, M.E. Yellow fever control: current epidemiology and vaccination strategies. **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**, 6:1, 2020.

CHINO, H.; GILBERT, L.I. The uptake and transport of cholesterol by haemolymph lipoproteins. **Insect Biochemistry**, 1(3):337-347, 1971.

CHOUIN-CARNEIRO, T.; DAVID, M.R.; DE BRUYCKER NOGUEIRA, F.; DOS SANTOS, F.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Zika vector transmission is virus dose and temperature-dependent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 14(9), 2020.

CHRISTOPHERS, S.S.R. *Aedes aegypti* (L.) The Yellow Fever Mosquito: Its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, 1960.

CHUNG, H.N.; RODRIGUEZ, S.D.; CARPENTER, V.K.; VULCAN, J.; BAILEY, C.D.; NAGESWARA-RAO, M.; LI, Y., ATTARDO, G.M.; HANSEN, I.A. Fat Body Organ Culture System in *Aedes aegypti*, a Vector of Zika Virus. **Journal of Visualized Experiments**, 126, e55508, 2017.

CLEMENTS, A.N. Development, nutrition and reproduction. The Biology of Mosquitos, v.1, Chapman & Hall, 1992.

CLEMENTS, A.N. The physiology of mosquitoes. International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. Zoology Division. Volume 17. Pergamon Press. Oxford, England, United Kingdom, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA, 2005.

COLLINS, L.E.; BLACKWELL, A. The biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents. **Biocontrol News and Information**, 21(4), 2000.

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

CORRÊA-DA-SILVA, M.S.; FAMPA, P.; LESSA, L.P.; SILVA, E.R.; MALLETT, J.R.S.; SARAIVA, E.M.B.; MOTTA, M.C.M. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. **Parasitology Research**, 99:384-391, 2006.

COSTA, Z.G.A.; ELKHOURY, A.N.M.; ROMANO, A.P.M.; FLANNERY, B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 2(1):11-26, 2011.

COURET, J.; NOTARANGELO, M.; VEERA, S.; LECLAIRE-CONWAY, N.; GINSBERG, H.S.; LEBRUN, R.L. Biological control of *Aedes* mosquito larvae with carnivorous aquatic plant, *Utricularia macrorhiza*. **Parasites & Vectors**, 13:208, 2020.

CRUZ, J.; RONDON-VILLARREAL, P.; TORRES, R.G.; URQUIZA, M.; GUZMAN, F.; LVAREZ, C.; ABENGOZAR, M.A.; SIERRA, D.A.; RIVAS, L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ORTIZ, C.C. Design of Bactericidal Peptides Against *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Medicinal Chemistry**, 14(7), 2018.

DA SILVA, J.F.L.M.; REIS, K.M.N., SILVA, L.V.; SILVA, A.H.; CRUZ, A.R.; PADILHA, J.B.; FREITAS, R.B. Aspectos epidemiológicos e distinção entre Chikungunya, Dengue e Zika Vírus. **Revista Científica UNIFAGOC-Saúde**, 5(2):39-49, 2021.

DANIEL, J.F.S.; SILVA, A.A.; NAKAGAWA, D.H.; MEDEIROS, L.S.; CARVALHO, M.G.; TAVARES, L.J.; ABREUD, L.M.; RODRIGUES-FILHO, E. Larvicidal Activity of *Beauveria bassiana* Extracts against *Aedes aegypti* and Identification of Beauvericins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 28(6), 2017.

DARBRO, J.M.; RITCHIE, S.A.; THOMAS, M.B.; JOHNSON, P.H.; RYAN, P.A.; KAY, B.H. Effects of *Beauveria bassiana* on Survival, Blood-Feeding Success, and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-Field Conditions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 86(4):656-664, 2012.

DONG, Y.; MORTON, J.C.; RAMIREZ, J.L.; SOUZA-NETO, J.A.; DIMOPOULOS, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 42(2):126:132, 2012.

DOS SANTOS, A.R.; SANTOS, A.M.; DE ALMEIDA, F.H.O.; DE MEDEIROS, V.F.A.; MATOS, A.A.; DE CARVALHO, T.F.; SOUZA, C.A.S.; LIMA, T.C.; DA SILVA, F.A. Medicinal plants with mosquitoes repellent activity: a systematic review. **Research, Society and Development**, 11(1), 2022.

DUTRA, H.L.C.; ROCHA, M.N.; DIAS, F.B.S.; MANSUR, S.B.; CARAGATA, E.P.; MOREIRA, L.A. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**, 19:771-774, 2016.

ENTRINGER, P.F.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K.C. The Fate of Dietary Cholesterol in the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. **Frontiers in Physiology**. 12:654565, 2021.

esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides, **Journal of Hazardous Materials**, 411:125026, 2021.

FALVO, M.L.; MUSSO, A.; ORDOQUI, E.; LASTRA, C.C.L.; LUZ, C.; GARCÍA, J.J. Adulticidal Activity of *Metarhizium anisopliae* s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Native Strains From Argentina Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, 57(2), 2020.

FARIA, M.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência**, 22:18-21, 2001.

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**, 11(10):e0006063, 2017.

FENG, X.; FENG, J.; ZHANG, L.; TU, H.; XIA, Z. Vector control in China, from malaria endemic to elimination and challenges ahead. **Infectious Diseases of Poverty**, 11:54, 2021.

FERNANDES, K.M.; DE MAGALHÃES JÚNIOR, M.J.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; MARTINS, G.F. Proteomic analysis of *Aedes aegypti* midgut during post-embryonic development and of the female mosquitoes fed different diets. **Parasitology International**, 2016.

FORATTINI, O.P. Entomologia Médica. Vol. 1. Faculdade de Higiene e Saúde Pública. São Paulo, 662p, 1962.

FORATTINI, O.P. Família Cuclidae - Morfologia. **Cuclidologia Médica**, 1, São Paulo: Edusp, 1996.

FORATTINI, O.P; GOMES, A. DE C.; NATAL, D; KAKTIANI, I; MARUCCI, D. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista Saúde pública**, São Paulo, 21:171-87, 1987.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Dengue – Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor – Manual de Normas Técnicas, 3ª ed. Brasília, DF, 84p, 2001.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue. Brasília. Funasa, 2001.

GARCÍA-MUNGUÍA, A.M.; GARZA-HERNÁNDEZ, J.A.; REBOLLAR-TELLEZ, E.A.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A.; REYES-VILLANUEVA, F. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, 4:24, 2011.

GEBREMARIAM, A.; CHEKOL, Y.; FASSIL ASSEFA, F. Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **BMC Research Notes**, 15:117, 2022.

GERBER, R.; SMIT, N.J.; VUREN, J.H.J.V.; NAKAYAMA, S.M.M.; YOHANNES, Y.B.; IKENAKA, Y.; ISHIZUKA, M.; WEPENER, V. Bioaccumulation and human health risk assessment of DDT and other organochlorine pesticides in an apex aquatic predator from a premier conservation area. **Science of the Total Environment**, 550:522–533, 2016.

GHOSH, C.; HALDAR, J. Membrane-active small molecules: designs inspired by antimicrobial peptides. **ChemMedChem**, 10(10):1606-1624, 2015.

GOMES, C.R.P. Estratégias de controle biológico de larvas de mosquito *Aedes aegypti* com fungos entomopatogênicos. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. Rio de Janeiro, p.50, 2009.

GONDIM, K.C.; ATELLA, G.C.; PONTES, E.G.; MAJEROWICZ, D. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2018.

GRAULT, C.E.; COSTA, M.A.M.; SANTOS, V.V.C.M.; SILVA, C.C.M. Políticas públicas para doenças transmitidas por vetores: situação atual e Educação como alternativa. **Revista de Políticas Públicas**, 22:1172-1193, 2018.

GREGORY, G.E. Alcoholic Bouin fixation of insect nervous systems for bodian silver staining. III. A shortened, single impregnation method. **Stain Technology**, 55:161-165, 1980.

HAMED, A.M.R.; EL-SHERBINI, M.S.; ABDELTAWAB, M.S.A. Eco-Friendly Mosquito-Control Strategies: Advantages and Disadvantages. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, 14(1):17-31, 2022.



HAYD, R.L.N.; GUIMARÃES, T.M.; HABERT, E.N.; ALMEIDA, N.C.V. Impacto econômico das principais arbovirose urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* em um estado do extremo Norte do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência da Amazônia**, 9(1):9-18, 2020.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**, 45(1):371-391, 2000.

HOFFMANN, A.A.; MONTGOMERY, B.L.; POPOVICI, J.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JOHNSON, P.H.; MUZZI, F.; GREENFIELD, M.; DURKAN, M.; LEONG, Y.S.; DONG, Y.; COOK, H.; AXFORD, J.; CALLAHAN, A.G.; KENNY, N.; OMODEI, C.; MCGRAW, E.A.; RYAN, P.A.; RITCHIE, S.A.; TURELLI, M.; O'NEILL, S.L. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, 476(7361):454-457, 2011.

HONÓRIO, N.A.; CÂMARA, D.C.P.; CALVET, G.A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 31(5): 906-908, 2015.

HUANG, Y.S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D.L. Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. **Insects**, 2017.

ITURBE-ORMAETXE, I.; WALKER, T.; O' NEILL, S.L. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. **EMBO Reports**, 12(6):508-518, 2011.

JIANG, W.; LUO, Y.; CONKLE, J.L.; LI, J.; GAN, J. Pesticides on residential outdoor surfaces: environmental impacts and aquatic toxicity. **Pest Management Science**, 72(7):1411-1420, 2015.

JING, X.; BEHMER, S.T. Insect Sterol Nutrition: Physiological Mechanisms, Ecology, and Applications. **Annual Review of Entomology**, 65:251-271, 2020.

KAMAL, M.; KENAWY, M.A.; RADY, M.H.; KHALED, A.S.; SAMY, A.M. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. **PLoS ONE**, 13(12):e0210122, 2018.

KARABÖRKLÜ, S. Biocontrol potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from turkey against *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) larvae under laboratory and field conditions. **Bioscience Journal**, 38:e38015, 2022.

KAWOOYA, J. K.; LAW, J.H. Role of lipophorin in lipid transport to insect egg. **The Journal of Biological Chemistry**, 263:8748-8753, 1988.

KERWIN, J.L. Fatty acid regulation of the germination of *Erynia variabilis* conidia on adults and puparia of the lesser housefly, *Fannia canicularis*. **Canadian Journal of Microbiology**, 30(2):158-161, 1984.

KOSASIH, C.E.; LUKMAN, M.; SOLEHATI, T.; MEDIANI, H.S. Effect of dengue hemorrhagic fever health education on knowledge and attitudes, in elementary school children in West Java, Indonesia. **Linguistics and Culture Review**, 5(S1):191-200, 2021.

KURNIAWAN, E.; MULIA, Y. S.; DEWI, N. U.; SANITAVIA, W. H.; KRISTIYANTI, Y. AKTIVITAS LARVASIDA JAMUR *Metarhizium anisopliae* TERHADAP LARVA *Aedes aegypti* DI LABORATORIUM DAN UJI COBA LAPANGAN. **JURNAL RISET KESEHATAN POLTEKKES DEPKES BANDUNG**, 13(1):64-73, 2021.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, 132:1-41, 2015.

LEE, G.-H.; CHOI, K.-C. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 235:108789, 2020.

LEE, Y.-H.; KIM, H.-H.; LEE, J.-I.; LEE, J.-H.; KANG, H.; LEE, J.-Y. Indoor contamination from pesticides used for outdoor insect control. **Science of The Total Environment**, 625:994-1002, 2018.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, 37:207-215, 2012.

LIMA, E.P.; GOULART, M.O.F.; ROLIM NETO, M.L. Meta-analysis of studies on chemical, physical and biological agents in the control of *Aedes aegypti*. **BMC Public Health**, 15(1):858, 2015.

LITVOC, M.N.; NOVAES, C.T.G.; LOPES, M.I.B.F. Yellow Fever. **Revista da Associação Médica Brasileira** 2018, 64(2):106-113, 2017.

LOVE, R.R.; SIKDER, J.R.; VIVERO, R.J.; MATUTE, D.R.; SCHRIDER, D.R. Strong Positive Selection in *Aedes aegypti* and the Rapid Evolution of Insecticide Resistance. **Molecular Biology and Evolution**, 40(4), 2023.

MAHMOOD, F.; WALTERS, L.L.; GUZMAN, H.; TESH, R.B. Effect of Ivermectin on the Ovarian Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, 28(5), 1991.

MARTINA, B.E.E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews**, 22(4):564-581, 2009.

MARTINS, G.F.; SERRÃO, J.E.; RAMALHO-ORTIGÃO, J.M.; PIMENTA, P.F.P. A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 106(6):742-747, 2011.

MCGREGOR, B.; CONNELLY, R. A Review of the Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Continental United States. **Journal of Medical Entomology**, 12:58(1):10-25, 2021.

MEHMOOD, N.; HASSAN, A.; ZHOU, W.; USMAN, H.M.; HUI AI, H.; HUANG, Q. Behavioural alterations in female *Aedes aegypti* mosquito in response to entomopathogenic fungal infections. **Pest Management Science**, 78(5), 2022.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S.P.; SILVA, K.F.A.S. MicoInseticidas e micoacaricidas no brasil: como estamos após quatro décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, 76(4), 2009.

MORA, M.A.E.; CASTILHO, A.M.C.; FRAGA, M.E. Fungos entomopatogenicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, 18(3):335-349, 2016.

MOREIRA, H.V.S. Atividade de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* contra *Aedes aegypti* em condições in vitro e em semicampo. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro, p.62, 2022.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and Human Chronic Diseases; Evidences, Mechanisms, and Perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 268(2):157-177, 2013.

MULLEN, G.R.; DURDEN, L.A. Medical and Veterinary Entomology. Third Edition. Academic Press, Elsevier Inc, 2019.

NAQQASH, M.N.; GÖKÇE, A.; BAKHSH, A.; SALIM, M. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. **Parasitology Research**, 115(4):1363-1373, 2016.

NAVARRO, J.P.; ESPINOSA, M.M.; TERÇAS-TRETTE, A.C.P.; DA SILVA, J.H.; SCHULER-FACCINI, L.; ATANAKA, M. Knowledge and actions for the control of the vector *Aedes aegypti* in a municipality in the Legal Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 63:e64, 2021.

NELSON, M.J. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Pan American Health Organization. Washington, DC, 1986.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUILL, P.L. Febre Amarela e Dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, (Supl. III):59-66, 1994.

Nogueira, M.R.S.; Camargo, M.G.; Rodrigues, C.J.B.C.; Marciano, A.F.; Quinelato, S.; Freitas, M.C.; FIOROTTI, J, SÁ. F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. In vitro efficacy of two commercial products of *Metarhizium anisopliae* s.l. for controlling the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 29(2):e000220, 2020.

NOGUEIRA, M.R.S; CAMARGO, M.G.; RODRIGUES, C.J.B.C.; MARCIANO, A.F.; QUINELATO, S.; DE FREITAS, M.C.; FIOROTTI, J.; DE SÁ, F.A; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. In vitro efficacy of two commercial products of *Metarhizium anisopliae* s.l. for controlling the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 29(2), 2020.

NOREEN, M.; ARIJO, A.G.; AHMAD, L.; SETHAR, A.; LEGHARI, M.F.; BHUTTO, M.B.; LEGHARI, I.H.; MEMON, K.H.; SHAHANI, S.; VISTRO, W.A.; SETHAR, G.H.; KHAN, N. Biological control of mosquito larvae using edible fish. **International Journal of Innovative and Applied Research**, 5(8), 2017.

NORRIS, E.J.; BLOOMQUIST, J.R. Co-Toxicity Factor Analysis Reveals Numerous Plant Essential Oils Are Synergists of Natural Pyrethrins against *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Insects**, 12:154, 2021.

OECD. Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 8: OECD Consensus Document of the Biology of Mosquito *Aedes aegypti*. Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, OECD Publishing, Paris, 2018.

OPAS. Controle do *Aedes aegypti* em cenário de transmissão simultânea de COVID-19. Organização Pan-Americana da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/control-aedes-aegypti-escenario-transmission-simultanea-covid-19> Acesso em: 18/10/2023

OPAS. Documento operacional para a execução do manejo integrado de vetores adaptado ao contexto das Américas. Organização Pan-Americana da Saúde, 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51762> Acesso em: 18/10/2023

ORTIZ-URQUIZA, A.; LUO, A.; KEYHANI, N.O. Improving mycoinsecticides for insect biological control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99(3):1057-1068, 2014.

PAIVA, C.N.; LIMA, J.W.O.; CAMELO, S.S.; LIMA, C.F.; PAMPLONA, L.G.C. Survival of larvivorous fish used for biological control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) combined with different larvicides. **Tropical Medicine & International Health**, 19(9):1082-1086, 2014.

PAIXÃO, E.S.; TEIXEIRA, M.G.; RODRIGUES, L.C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, 3:e000530, 2017.

PAL, S.; ST LEGER, R.J.; WU, L.P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*, **Journal of Biological Chemistry**, 282:8969-8977, 2007.

PAMPLONA, L.C.G.; DE PAULA JÚNIOR, F.J.; PONTES, R.J.S.; HEUKELBACH, J.; LIMA, J.W.O. Survival of Larvivorous Fish Used for Biological Control of *Aedes aegypti* Larvae in Domestic Containers With Different Chlorine Concentrations. **Journal of Medical Entomology**, 46(4):841-844, 2009.

PAMPLONA, L.C.G.; DE PAULA, F.J.; PONTES, R.J.S.; REGAZZI, A.C.F.; DE PAULA JÚNIOR, F.J.; FRUTUOSO, R.L.; SOUZA, E.P.; DANTAS FILHO; F.F.; LIMA, J.W.O. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, 41(4):638-644, 2007.

PARKS, J.J.; LARSEN, J.R. A Morphological Study of the Female Reproductive System and Follicular Development in the Mosquito *Aedes aegypti* (L.). **Transactions of the American Microscopical Society**, 84(1):88-98, 1965.

PARRA, J.R.P.; COELHO, A. Applied Biological Control in Brazil: From Laboratory Assays to Field Application. **Journal of Insect Science**, 19(2), 2019.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, 17(6), 2016.

PAULA, A.R., SILVA, L.E.I., RIBEIRO, A. DA SILVA, G.A.; SILVA, C.P.; BUTT, T.M.; SAMUELS, R.I. *Metarhizium anisopliae* blastospores are highly virulent to adult *Aedes aegypti*, an important arbovirus vector. **Parasites Vectors**, 14:555, 2021.

PAULA, A.R.; CAROLINO, A.T.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. **Parasites & Vectors**, 4:91, 2011.

PEREIRA, S.L. REIS, T.C.; DE OLIVEIRA, I.T.; FERREIRA, E.A.; CASTRO, B.M.C.; SOARES, M.A.; RIBEIRO, V.H.V. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria*

*bassiana* fungi to *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 86(7):e0272018, 2019.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, 356:346-356, 1977.

PICOLI, T.; PETER, C.M.; ZANI, J.L.; WALLER, S.B.; LOPES, M.G.; BOESCHE, K.N.; VARGAS, G.D'A., HÜBNER, S.O.; FISCHER, G. Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. **Microbial Pathogenesis**, 112:57-62, 2017.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L.C. Blood Feeding Patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **Journal of Medical Entomology**, 42(5), 2005.

PORUSIA, M.; SEPTIYANA, D. Larvicidal Activity of *Melaleuca leucadendra* Leaves Extract Against *Aedes aegypti*. **Journal of Chemical Health Risks**, 12(1):63-71, 2022.

POWELL, J.R.; GLORIA-SORIA, A.; KOTSAKIOZI, P. Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. **BioScience**, 68(11), 2018.

POWELL, J.R.; TABACHNICK, W.J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 108:11-17, 2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE RIBEIRÃO PRETO. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Controle de Zoonozes, Divisão de controle de vetores e animais peçonhentos. Ribeirão Preto, 2001.

QUINTERO-ZAPATA, I.; FLORES-GONZÁLEZ, M.S.; LUNA-SANTILLANA, E. J.; ARROYO-GONZÁLEZ, N.; GANDARILLA-PACHECO, F.L. Late effects of *Beauveria bassiana* on larval stages of *Aedes aegypti* Linneo, 1762 (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, 82:e237789, 2022.

RAGHAVENDRA, K.; BARIK, T.K.; REDDY, B.P.N.; SHARMA, P.; DASH, A.P. Malaria vector control: from past to future. **Parasitology Research**, 108(4):757-779, 2011.

RANATHUNGE, T.; KUSUMAWATHIE, P.H.D.; ABEYEWICKREME, W. UDAYANGA, L.; FERNANDO, T.; HAPUGODA, M. Biocontrol potential of six locally available fish species as predators of *Aedes aegypti* in Sri Lanka, **Biological Control**, 160:e104638, 2021.

RÍOS, N.; STASHENKO E.E.; DUQUE, J.E. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 61:307-311, 2017.

ROCHA, I.U. Uso de fungos entomopatogênicos e óleo essencial de *Illicium verum* (Illiciaceae) no controle in vitro de *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro, 2022.

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

ROSILAWATI, R.; NABILA, R.; SITI FUTRI FARAHININAJUA, F.; NAZNI, W.A.; LEE, H.L. A preliminary proteomic study of permethrin resistant and susceptible *Aedes aegypti* (L.). **Tropical Biomedicine**, 36(4):855-865, 2019.

SAMUELS, R.I.; CHARNLEY, A.K.; REYNOLDS, S.E. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Mycopathologia**, 104:51-58, 1988.

SÁNCHEZ; E.; LIRIA, J. Dimorfismo sexual alar en *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) de Venezuela. **Acta Biologica Venezuelica**, 37(2):163-170, 2018.

SCHOLTE, E.J.; KNOLS, B.G.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, 91(1):43-49, 2006.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, 56:1267-1274, 2010.

SEYFI, R.; KAHAKI, F.A.; EBRAHIMI, T.; MONTAZERSAHEB, S.; EYVAZI, S.; BABAEIPOUR, V.; TARHRIZ, V. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 2019.

SOUZA, R.L.; MUGABE, V.A.; PAPLOSKI, I.A.D.; RODRIGUES, M.S.; MOREIRA, P.S.S.; NASCIMENTO, L.C.J.; RIBEIRO, G.S. Effect of an intervention in storm drains to prevent *Aedes aegypti* reproduction in Salvador, Brazil. **Parasites & Vectors**, 10(1), 2017.

SOWJANYA, K.; PADMAJA, V. Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. **Toxicon**, 51:1140-1150, 2008.

TAWIDIAN, P.; RHODES, V.L.; MICHEL, K. Mosquito-fungus interactions and antifungal immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 111:e103182, 2019.

TEENUS, S.R.; SRUTHI, M.R.; SAJU, C.R.; MOHAMMED RAFI, M. The Role of Health Education on Larval Indices and Fever Cases from Rural Area of Thrissure District, Kerala: A

Quasi Randomized Control Study. **Clinical Medicine and Health Research Journal**, 2(2):87-91, 2022.

TEICH, R. A., FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil *Aedes aegypti* and society: the economic burden of arboviruses in Brazil Vanessa. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, 9(3):267-276, 2017.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, 9(3):267-276, 2017.

TOPRAK, U.; HEGEDUS, D.; DOĞAN, C.; GÜNEY, G. A journey into the world of insect lipid metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, e21682, 2020.

TSUNODA, T.; FUKUCHI, A.; NANBARA, S.; TAKAGI, M. Effect of body size and sugar meals on oviposition of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, 35:56-60, 2010.

VALLE, D.; AGUIAR, R.; PIMENTA, D.N.; FERREIRA, V. *Aedes* de A a Z. Temas em Saúde Collection. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2021.

VERA, S.S.; ZAMBRANO, D.F.; MÉNDEZ-SANCHEZ, S.C.; RODRÍGUEZ-SANABRIA, F.; STASHENKO, E.E.; DUQUE LUNA, J.E. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, 113(7):2647-2654, 2014.

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. **Fungi as biocontrol agents progress: problems and potential**, CABI Publishing, Wallingford, 311-346, 2001.

VINIGRADOV, D.D.; SINEV, A.Y.; TIUNOV, A.A. Predators as Control Agents of Mosquito Larvae in Micro-Reservoirs (Review). **Inland Water Biology**, 15(1):39-53, 2022.

WANG, G; WANG, S. Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. **Annual Review of Entomology**, 62:73-90, 2017.

WEI, D.; Li, R.; ZHANG, M.-Y.; LIU, Y.-W.; ZHANG, Z.; SMAGGHE, G.; WANG, J.-J. Comparative Proteomic Profiling Reveals Molecular Characteristics Associated with Oogenesis and Oocyte Maturation during Ovarian Development of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). **International Journal of Molecular Sciences**, 18(7):1379, 2017.

WHO. World Health Organization. Dengue and severe dengue, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Acesso em: 12/07/2021.



WHO. World Health Organization. Global Strategic Framework for Integrated Vector Management, 2004. Disponível em [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68624/WHO\\_CDS\\_CPE\\_PVC\\_%202004%20\\_10.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68624/WHO_CDS_CPE_PVC_%202004%20_10.pdf?sequence=1) Acesso em: 30/08/2022.

WHO. World Health Organization. Global Vector Control Response (GVCR) 2017–2030, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978> Acesso em: 30/08/2022.

WHO. World Health Organization. Global Vector Control Response (GVCR) 2017–2030, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978> Acesso em: 30/08/2022.

WHO. World Health Organization. Rift Valley fever, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rift-valley-fever> Acesso em: 13/09/22.

WHO. World Health Organization. Vector control. Regional Committee Document, 2017. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258546/sea--rc70-10.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 30/08/2022.

WHO. World Health Organization. Vector-borne diseases, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> Acesso em: 13/07/2021.

WHO. World Health Organization. Yellow fever, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever> Acesso em: 15/09/2022.

WOLMARANS, N.J.; BERVOETS, L.; GERBER, R.; YOHANNES, Y.B.; NAKAYAMA, S.M.; IKENAKA, Y.; WEPENER, V. Bioaccumulation of DDT and other organochlorine pesticides in amphibians from two conservation areas within malaria risk regions of South Africa. **Chemosphere**, 274:129956, 2021.

WYCKHUYS, K.; SASIPRAPA, W.; TAEKUL, C.; KONDO, T. Unsung heroes: fixing multifaceted sustainability challenges through insect biological control. **Current Opinion in Insect Science**, 2020.

XAVIER, M.A. Metabolismo de lipídeos na reprodução de carrapatos. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2019.

ZAMORA-AVILÉS, N.; OROZCO-FLORES, A.A.; GOMEZ-FLORES, R.; DOMÍNGUEZ-GÁMEZ, M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A.; TAMEZ-GUERRA, P. Increased Attraction and Stability of *Beauveria bassiana*-Formulated Microgranules for *Aedes aegypti* Biocontrol. **Journal of Fungi**, 8:828, 2022.

- ZARA, A.L.S.A.; SANTOS, S.M.; OLIVEIRA, E.S.F.; CARVALHO, E.S.F.; COELHO, G.E. *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Revista Epidemiologia e Serviço de Saúde**, 25(2):391-404, 2016.
- ZHANG, H.; GOH, F.G.; NG, L.C.; CHEN, C.H.; CAI, Y. *Aedes aegypti* exhibits a distinctive mode of late ovarian development. **BMC Biology**, 21:11, 2023.
- ZHANG, H.; LUI, R. Releasing *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* to prevent the spread of dengue virus: A mathematical study. **Infectious Disease Modelling**, 142-160, 2020.
- ZHANG, Q-Y.; YAN, Z-B.; MENG, Y-M.; HONG, X-Y.; SHAO, G.; MA, J-J.; CHENG, X-R.; LIU, J.; KANG, J.; FU, C-Y. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, 8:48, 2021.
- ZIEGLER, R.; IBRAHIM, M.M. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, 47:623-627, 2001.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, 17(6):553-596, 2007 a.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, 17(9):879-920, 2007 b.
- ZULFA, R.; LO, W-C.; CHENG, P-C.; MARTINI, M; CHUANG, T-W. Updating the Insecticide Resistance Status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 7:306, 2022.