



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA ALVES

CONTROLE INTEGRADO DO VETOR DE VIROSES HUMANAS *Aedes Aegypti*: O MODELO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DA PLANTA *Eugenia brejoensis* DA CAATINGA BRASILEIRA

Recife
2021

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA ALVES

CONTROLE INTEGRADO DO VETOR DE VIROSES HUMANAS *Aedes Aegypti*: O MODELO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DA PLANTA *Eugenia brejoensis* DA CAATINGA BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Augusto Schrank

Coorientador (a): Marcia Vanusa da Silva

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Alves, João Victor de Oliveira

Controle integrado do vetor de viroses humanas *Aedes aegypti* : o modelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* associado ao óleo essencial da planta *Eugenia brejoensis* da caatinga brasileira / João Victor de Oliveira Alves - 2021.

70 f. : il.

Orientador: Augusto Schrank.

Coorientadora: Marcia Vanusa da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Arboviroses. 2. Inseticidas virais. 3. Plantas da Caatinga. I. Scharank, Augusto (orientador). II. Silva, Marcia Vanusa da (coorientadora). III. Título.

616.9185

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-048-2022

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA ALVES

CONTROLE INTEGRADO DO VETOR DE VIROSES HUMANAS *Aedes Aegypti*: O MODELO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DA PLANTA *Eugenia brejoensis* DA CAATINGA BRASILEIRA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 31/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Augusto Schrank (Orientador)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^o. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Nicolau Sbaraini Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

“Dedico esse trabalho aos meus pais Djair (in memorian) e Rosiane, que sempre me apoiaram e nunca perderam a fé nos meus sonhos”

.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais que sempre foram minhas maiores fontes de amor, força e de apoio, sendo suporte nos dias difíceis e comemorando cada pequena vitória.

Agradeço aos meus amigos por todo o incentivo e demonstrações de apoio e carinho em todos os momentos da minha jornada acadêmica. Obrigado, ao meu pequeno grupo da turma Ciências Biológicas Ambientais 2014.2, aos amigos do Nbiocaat e Cbiot/UFRGS. GRATIDÃO!

Aos meus professores pelas conversas e por ter me mostrado que, mesmo dentro da academia, podemos encontrar seres humanos que representam leveza e iluminação. Em especial, aos meus orientadores Augusto Schrank e Marcia Vanusa por toda paciência, compreensão e disponibilidade, por serem exemplos de profissionais humanos, generosos e inspiradores em momentos tão adversos que vivemos nos dias atuais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE.

Aos professores Emannuel Pontual e Nicolau Sbaraini por fazerem parte da minha banca da defesa final.

A CAPES pelo financiamento da pesquisa.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta nessa conquista.

“Nos sonhos nós entramos em um mundo inteiramente nosso. Deixe-o nadar no oceano mais profundo ou flutuar na mais alta nuvem”

- Alvo Dumbledore

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é altamente antropofílico presente no ambiente domiciliar, sendo um dos principais vetores de arboviroses graves como dengue, chikungunya e zika. O controle desse vetor é baseado no uso de inseticidas formulados com substâncias de origem natural ou sintética que são utilizadas para diminuir a incidência de insetos em diferentes fases do seu ciclo de vida. Na literatura, os óleos essenciais e fungos entomopatogênicos são descritos como alternativas naturais para o controle do *Ae. aegypti*. Nesta Dissertação investigamos a susceptibilidade das larvas do *Ae. aegypti* a formulações contendo o OE da *Eugenia brejoensis* e conídios do *Metarhizium anisopliae*. *E. brejoensis* é uma planta da Caatinga e seu OE foi caracterizado por CG/EM, apresentando o δ -cadinene (17,6%), E-caryophyllene (16,3%), Epi- α -muurolol (9,3%), bicyclogermacrene (8,1%), α -cadinol (7,3%) e Spathulenol (6,6%) como compostos majoritários. O OE apresenta CL50 de $200,4 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$ contra as larvas de *Ae. aegypti*. Todas as linhagens de *M. anisopliae* testadas apresentaram atividade larvicida em *Ae. aegypti*, com destaque para a linhagem E6 com TL50 1,5 dias (Concentração 1×10^8). Já nos ensaios de atividade larvicida com formulações contendo ambos componentes o OE e o fungo (Eb+Ma) ($100 \mu\text{g/mL}$ de OE da *E. brejoensis* e 1×10^6 de conídios de *M. anisopliae*) atingem TL50 1,5 dias. As formulações Eb+Ma apresentaram menores curvas de sobrevivência e tempo letal em relação aos dois componentes isoladamente. Portanto, propomos formulações Eb+Ma para o desenvolvimento de controle biológico integrado de larvas de *Ae. aegypti*.

Palavras chaves: Bioinseticida; Caatinga; Controle Biológico Integrado; Entomopatogênico.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is highly anthropophilic and present in the home environment, being one of the main vectors of serious arboviroses such as dengue, chikungunya and zika. The control of this vector is based on the use of insecticides formulated with substances of natural or synthetic origin that are used to reduce the incidence of insects in different stages of their life cycle. In the literature, essential oils and entomopathogenic fungi are described as natural alternatives for the control of *Ae. aegypti*. In this dissertation we investigated the susceptibility of *Ae. aegypti* larvae against formulations containing the EO of the Caatinga plant *Eugenia brejoensis* and conidia of *Metarhizium anisopliae*. *E. brejoensis* is a Caatinga plant and its EO was characterized by GC/MS, showing δ -cadinene (17.6%), E-caryophyllene (16.3%), Epi- α -muurolol (9.3%), bicyclogermacrene (8.1%), α -cadinol (7.3%) and Spathulenol (6.6%) as majority compounds. The EO shows LC₅₀ of 200.4 $\pm$ 0.4 μ g/mL against *Ae. aegypti* larvae. All tested *M. anisopliae* strains showed larvicidal activity, especially strain E6 with LT50 1.5 days (Concentration 1X10⁸). In the larvicidal activity assays with formulations containing both the EO and the fungus (Eb+Ma) (100 μ g/mL of *E. brejoensis* EO and 1X10⁶ of *M. anisopliae* conidia) reached LT50 1.5 days. Eb+Ma formulations showed lower survival curves and lethal time compared to the two components alone. Therefore, we propose Eb+Ma formulations for the development of integrated biological control of *Ae. aegypti* larvae.

Key words: Bioinsecticide; Caatinga; Integrated Biological Control; Entomopathogenic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1 –	Distribuição <i>do Ae. aegypti</i> com base nas condições climáticas atuais	19
Figura 2 –	Modelagem da distribuição global modelada de <i>Ae. aegypti</i> sob as condições climáticas atuais com projeção até 2050	19
Figura 3 –	Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	21
Figura 4 –	Ciclo de transmissão de Zoonoses	23
Figura 5 –	Ocorrências globais em nível de país das doenças arbovirais	24
Figura 6 –	Exsicata botânica da planta da Caatinga <i>E. brejoensis</i>	36

ARTIGO 1

Figura 1 –	Efeito inibitório da AChE causado pelo OE de <i>E. brejoensis</i>	46
Figura 2 –	Curvas de sobrevivência das larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas as suspensões de conídios de <i>M. anisopliae</i>	47
Figura 3 –	Curva de crescimento <i>M. anisopliae</i> E6 em meio de cultura com OE da <i>E. brejoensis</i>	48
Figura 4 –	Curva de sobrevivência das larvas de <i>Ae. aegypti</i> em formulações contendo conídios <i>M. Anisopliae</i> E6 e EO da <i>E. brejoensis</i>	49

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO

Tabela 1 –	Fungos com atividade de controle de <i>Ae. aegypti</i>	29
Tabela 2 –	OE de plantas de ocorrência no domínio Caatinga com atividade de controle de mosquito <i>Ae. Aegypti</i>	34

ARTIGO 1

Tabela 1 –	Linhagens de <i>M. anisopliae</i> utilizadas neste trabalho	42
Tabela 2 –	Composição química do OE de folhas da planta da Caatinga <i>E. brejoensis</i>	44
Tabela 3 –	Ensaio larvicida do OE de <i>E. brejoensis</i>	45
Tabela 4 –	Efeito inibitório da AChE pelo Eb	46
Tabela 5 –	Taxa de sobrevivência e tempo médio de letalidade das larvas de <i>Ae. aegypti</i> em formulações contendo conídios de <i>M. anisopliae</i>	47
Tabela 6 –	Taxa de sobrevivência da interação <i>M. Anisopliae</i> E6 e EO de <i>E. brejoensis</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChe	Acetilcolinesterase
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelenses</i>
CG	Cromatografia gasoso
CL	Concentração letal
DO	Densidade óptica
EM	Espectrometria de massa
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
OE	Óleo essencial
OMS	Organização mundial de saúde
RCP	Vias de concentração representativas
S	Sobrevivência
SAD	Sabouraud Agar Dextrose
SCD	Síndrome do choque da dengue
SNC	Sistema nervoso central
TL	Tempo letal
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Ultra violeta
UR	Umidade relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
μ	Micro
mm	Milímetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBEJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	O MOSQUITO <i>Aedes Aegypti</i>	18
3.1.1	Ciclo de vida do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	20
3.1.2	Arboviroses transmitidas pelo mosquito <i>Ae. aegypti</i>	22
3.1.3	Métodos tradicionais de controle de vetores de doenças	25
3.2	MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE DE <i>AE. AEGYPTI</i>	26
3.2.1	Controle biológico	26
3.2.1.1	<i>FUNGOS ENTOMOPATÓGENICOS COM AÇÃO DE CONTROLE DE <i>AE. AEGYPTI</i></i>	28
3.2.1.2	O FUNGO BIOCONTROLADOR <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	31
3.2.2	Produtos naturais vegetais para o controle de mosquitos	31
3.2.2.1	ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA CAATINGA COM AÇÃO DE CONTROLE DE <i>AE. AEGYPTI</i>	32
3.2.2.2	A PLANTA DA CAATINGA <i>EUGENIA BREJOENSIS</i>	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	ARTIGO 1 - FORMULAÇÃO DE CONÍDIOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>EUGENIA BREJOENSIS</i> PARA O CONTROLE INTEGRADO DO VETOR DE ARBOVIROSES <i>Aedes Aegypti</i>	37
5	CONCLUSÕES	58
6	DECLARAÇÃO DO AUTOR	59
7	SÚMULA CURRICULAR	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são os principais causadores de doenças humanas, causando anualmente mais de 1 bilhão de infecções, 1 milhão de mortes no mundo (Iwamura, Guzman-Holst, and Murray 2020). O mosquito *Ae. aegypti* é um grave problema de saúde pública mundialmente, porque é vetor de vírus de doenças Humanas graves como Dengue, Zika, Febre Amarela e Chikungunya (Patterson, Sammon, and Garg 2016). As preocupações são potencializadas porque, apesar dos grandes esforços em pesquisa e desenvolvimento de vacinas, não há técnicas terapêuticas específicas ou eficazes na prevenção das infecções causadas pelos arbovírus (Tharmarajah *et al.*, 2017; OMS, 2017; Polônia *et al.*, 2018).

O controle de vetores com inseticidas sintéticos continua sendo a principal estratégia para mitigar a disseminação de doenças infecciosas (Cabral *et al.*, 2020; Marques *et al.*, 2017). Contudo, o aumento no uso de inseticidas químicos causa sérios riscos à saúde humana, danos ao meio ambiente e aumento da resistência aos inseticidas nas populações de pragas (Marques *et al.*, 2017; de Oliveira Barbosa Bitencourt *et al.*, 2020).

Por esses motivos, atualmente as indústrias visam desenvolver métodos alternativos para o controle do mosquito *Ae. Aegypti*, desenvolvendo pesticidas ecologicamente sustentáveis com extratos vegetais, óleos essenciais ou controle biológico utilizando fungos e bactérias (Achee *et al.*, 2019; Benelli *et al.*, 2019; Pavela *et al.*, 2019).

As larvas dos mosquitos apresentam suscetibilidade a fungos entomopatogênicos e seus metabolitos. Assim, representam uma alternativa aos inseticidas químicos sintéticos. O uso de fungos entomopatogênicos possui uma abordagem comprovada devido à sua toxicidade seletiva e pronta decomposição no ecossistema (Bilal, Hassan, and Khan 2012). *Metarhizium* e *Beauveria* são os gêneros de fungos mais promissores no controle de insetos (Marques *et al.*, 2017).

Os biopesticidas baseados em produtos naturais de plantas oferecem uma fonte promissora de novos produtos mais seguros ao homem e meio ambiente, devido aos resíduos mínimos de sua degradação natural no solo e na água, minimizando as

perturbações nos ecossistemas (Silvério *et al.*, 2020). Dentre os produtos vegetais, os óleos essenciais (OE) apresentam maior potencial inseticida, sendo constituídos por compostos voláteis, que oferecem uma vantagem importante de não persistência no meio ambiente (Manh 2020).

O OE são produtos do metabolismo secundário vegetal e desempenham uma variedade de funções nas plantas e sua produção é fortemente regulada pelas condições ambientais que podem alterar sua composição, afetando suas possíveis atividades biológicas (Marques *et al.*, 2020). Dessa forma, algumas regiões podem receber certo destaque na busca por compostos bioativos, uma vez que as pressões naturais exercidas sobre as espécies induzem a produção de compostos como forma de adaptação ao ambiente (Li *et al.*, 2020).

Nesse cenário encontra-se a Caatinga, uma região de clima semiárido que ocupa quase toda a região Nordeste do Brasil, sendo considerado um bioma exclusivamente brasileiro (Moro *et al.*, 2016). Apresenta condições ambientais extremas como baixa disponibilidade hídrica e altas temperaturas na maior parte do ano. Esta região possui uma grande variedade de espécies vegetais e um alto grau de endemismo, sendo considerada uma das regiões semiáridas mais biodiversa da Terra (Câmara *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2014). Devido às suas características ambientais, a Caatinga é uma região promissora na busca por compostos bioativos (Silva *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014). Há vários relatos na literatura das propriedades dos OE de suas plantas endêmicas sobre o *Ae. aegypti* (Carvalho, *et al.*, 2016; Cruz, *et al.*, 2017; Doria, *et al.*, 2010; Gois *et al.*, 2011; Lima, *et al.*, 2013; Pinto, *et al.*, 2015; Ricarte *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020).

O potencial do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* como método alternativo para o controle de larvas do *Ae. aegypti* já são bem descritos (Cabral *et al.*, 2020; Greenfield *et al.*, 2014). Contudo, ao expor as suspensões de conídios em recipientes com água, a meia-vida dos conídios diminui para cerca de dez dias em condições de laboratório (Paula *et al.*, 2019). Portanto, é necessário desenvolver métodos para aumentar a persistência do fungo na água, usando adjuvantes adequados.

Estudos relatam que formulações contendo óleos, podem aumentar a

persistência do fungo quando usado contra *Ae. aegypti* (Gomes *et al.*, 2015). Os conídios são esporos hidrofóbicos mais comuns usados em bioprodutos para o controle de pragas agrícolas (Mascarin *et al.*, 2016). Estudos indicam o uso de óleos essenciais e fixos para melhorar a ação larvicida dos fungos entomopatogênicos (Gomes *et al.*, 2015; Paula *et al.*, 2019). Os óleos nas soluções com os conídios podem auxiliar a adesão do fungo e aumentar a tolerância do fungo contra a variação dos fatores abióticos negativos, como desidratação, radiação UV e altas temperaturas (Bukhari, Takken, and Koenraadt 2011). No estudo atual, foi investigado a susceptibilidade das larvas do *Ae. aegypti* a formulações contendo o OE da *Eugenia brejoensis* e conídios do *Metarhizium anisopliae*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial larvicida de formulações contendo conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* combinados com OE de *Eugenia brejoensis* para o controle de larvas do vetor *Ae. aegypti*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição de óleos essenciais de extraídos da planta *Eugenia brejoensis*;
- Avaliar o potencial larvicida de preparações de OE extraídos de *E. brejoensis* no controle de *Ae. aegypti*;
- Avaliar o efeito inibitório da acetilcolinesterase pelo OE extraídos de *E. brejoensis*;
- Avaliar o potencial larvicida de linhagens de *M. anisopliae*;
- Avaliar o potencial larvicida de formulações contendo conídios de *M. anisopliae* e OE da *E. brejoensis* e comparar com os componentes isoladamente.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O MOSQUITO VETOR DE DOENÇAS HUMANAS *Aedes Aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera e família Culicidae (Vogel; Brown; Strand, 2015). A origem do nome *Ae. aegypti* vem do grego e significa “desagradável” e do latim “do Egito”, região onde se originou este mosquito. Sua disseminação geográfica começou inicialmente em regiões de climas subtropicais por volta do século XVI, através do transporte de escravos em navios negreiros pelo mundo (Fiocruz, 2019). No processo de colonização o *Ae. aegypti* chegou até as Américas e passou a se proliferar em ambientes urbanos que continham água parada (Fonseca; Braz, 2010).

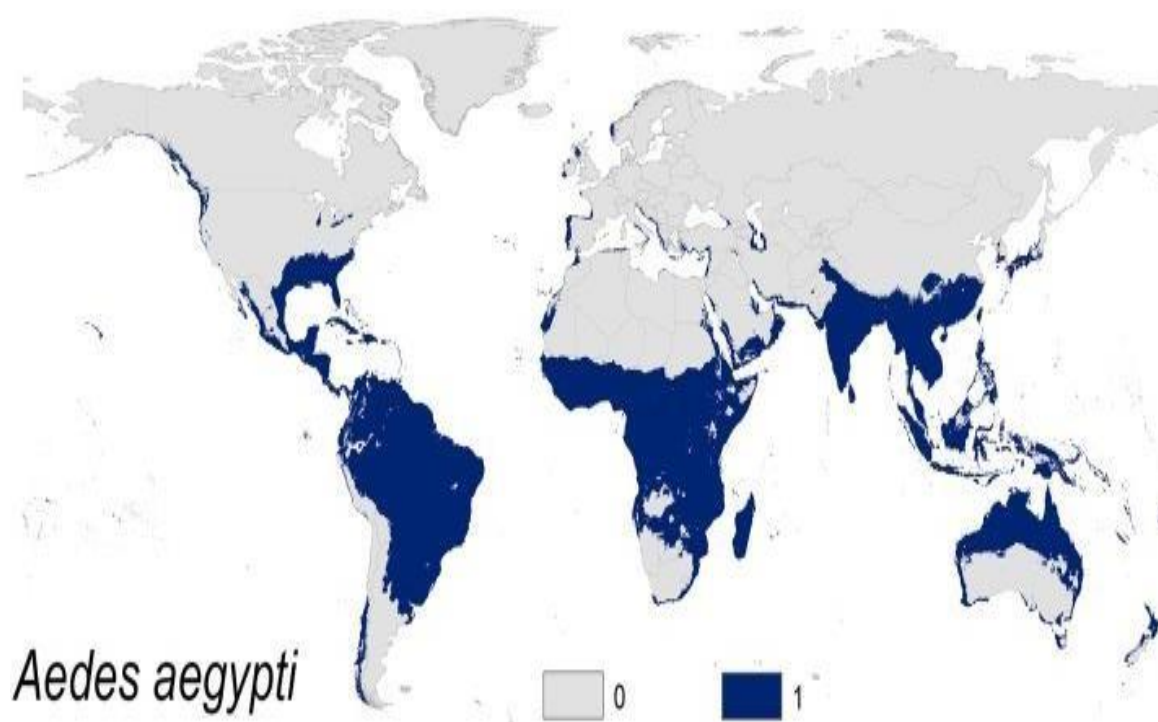
O mosquito *Ae. aegypti* é um modelo primordial para pesquisas sobre a evolução da associação humana com consequências a saúde pública. Há relatos que o *Ae. aegypti* se originou na África Subsaariana de uma espécie ancestral selvagem e zoofílica chamada *Ae. aegypti formosus* (Brown *et al.*, 2014). A espécie antropofílica é vetor de diversas arboviroses humanas, incluindo febre amarela, dengue, chikungunya e Zika com ocorrência em grande parte do mundo nos últimos séculos (Brown *et al.*, 2011; Kraemer *et al.*, 2015; Matthews 2019).

As doenças arbovirais mencionadas acima são uma preocupação de saúde pública global, pois podem levar a complicações incapacitantes ou até fatais e são transmitidas a milhões de pessoas todos os anos (Schulte *et al.*, 2021). Nos últimos 30 anos, a disseminação e os impactos na saúde pública desses arbovírus aumentaram significativamente (Carlson, Dougherty, and Getz 2016; Hafiz *et al.*, 2016; Leta *et al.*, 2018).

O mosquito *Ae. aegypti* já está associado à habitação humana e onde é onipresente em áreas povoadas de regiões subtropicais e tropicais (Figura 1) com clima quente e úmido, onde pode ser encontrado no meio rural e urbano (Eisen and Moore 2013). A urbanização descontrolada com serviços sanitários deficientes é considerado um fator importante para o crescimento da proliferação do *Ae. aegypti*, principalmente em países em desenvolvimento (IOC, 2020). Uma ampla variedade de recipientes de retenção de água naturais e artificiais dentro e ao redor de habitações

humanas são explorados como locais para oviposição e desenvolvimento de imaturos (Eisen *et al.*, 2014).

Figura 1 - Distribuição atual do *Ae. aegypti* com base nas condições climáticas atuais

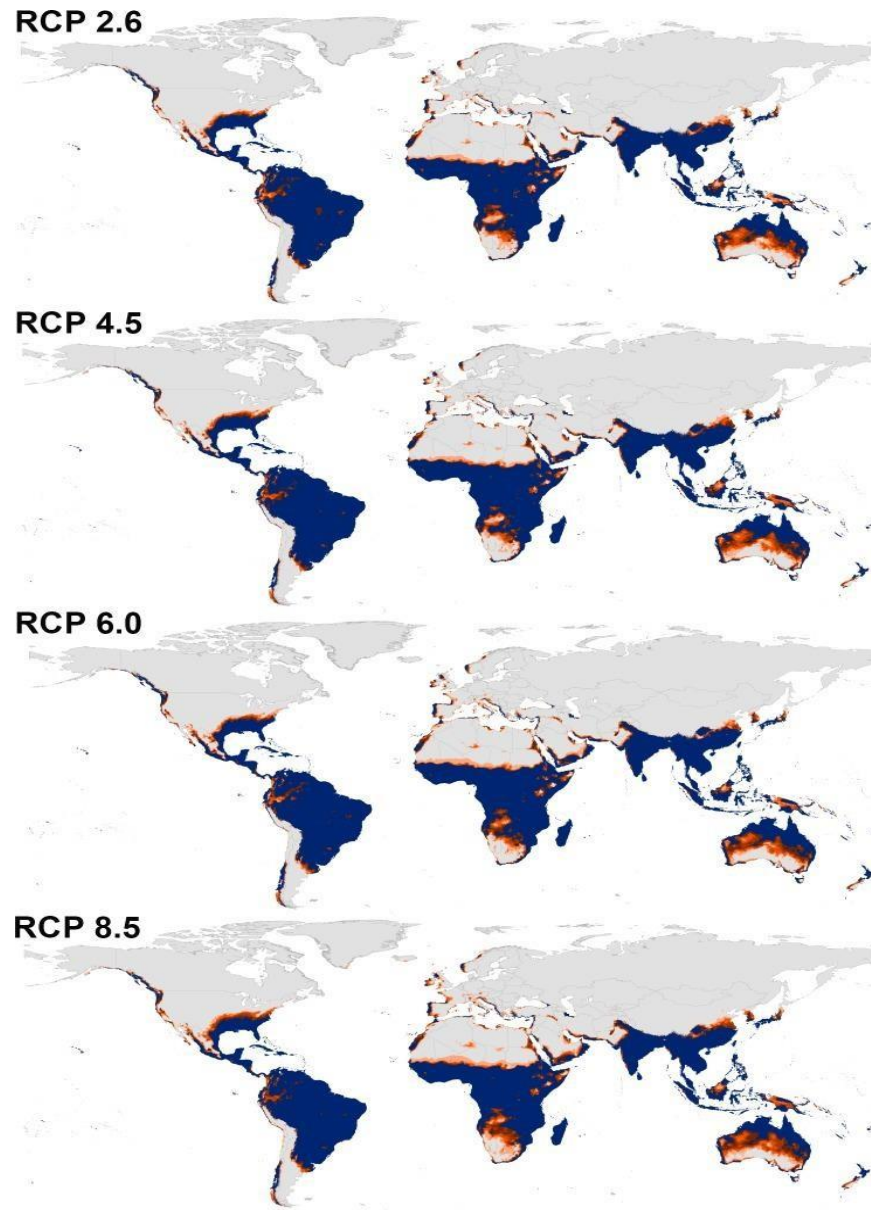


Fonte: Kamal *et al.*, (2018).

As áreas sombreadas em azul marinho foram modeladas como adequadas para presença do *Ae. aegypti*, enquanto as áreas cinzas foram modeladas como inadequadas.

Os impactos antropogênicos são frequentemente associados a efeitos prejudiciais às espécies, no entanto, as modificações humanas na paisagem podem contribuir para o surgimento de novos nichos aos quais outras espécies podem se adaptar (Brown *et al.*, 2011). A distribuição global do *Ae. aegypti* é influenciada principalmente pelas condições climáticas e fatores demográficos (Ducheyne *et al.*, 2018). Segundo Kamal *et al.*, (2018), nas previsões das condições climáticas atuais e futuras (Figura 2), a distribuição *Ae. aegypti* do ficaria concentrado nas regiões tropicais e subtropicais.

Figura 2 – Modelagem da distribuição global modelada de *Ae. aegypti* sob as condições climáticas atuais e futuras em 2050



Fonte: Kamal *et al.*, (2018).

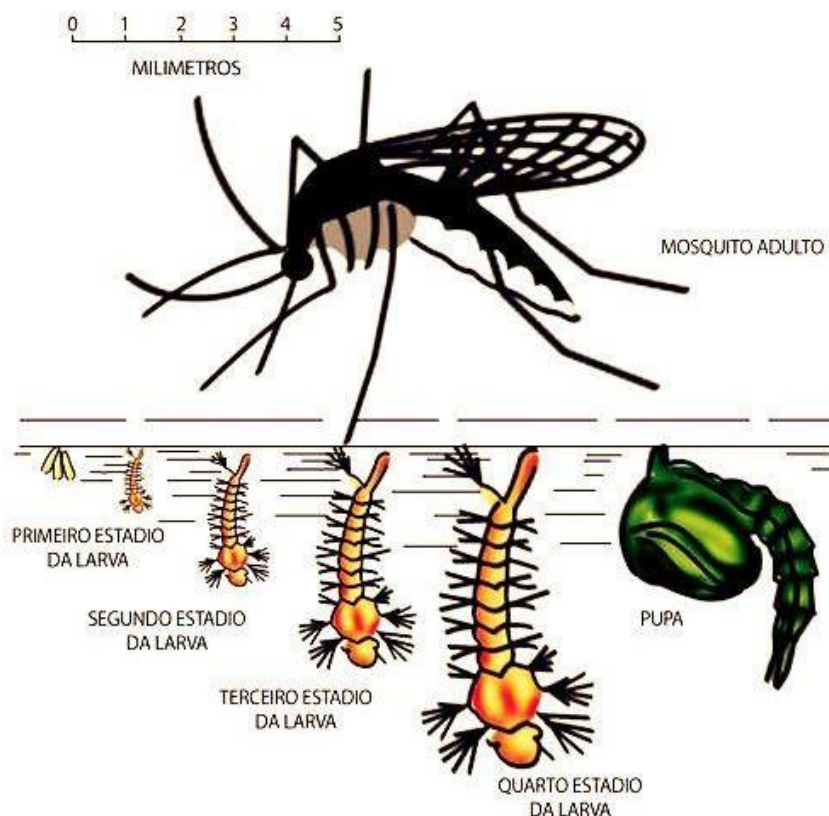
Previsões no presente e no futuro da distribuição do *Ae. aegypti* sob as condições climáticas, e para ilustrar as diferenças entre as vias de concentração representativas (RCP). O azul marinho representa a estabilidade do modelo nas condições atuais e futuras, o laranja escuro representa o acordo entre todos os modelos climáticos na previsão das áreas de distribuição potenciais no futuro e o laranja claro indica a baixa concordância entre os diversos modelos no que diz respeito ao potencial distributivo no futuro.

3.1.1 Ciclo de vida do Mosquito *Ae. aegypti*

Mosquitos *Ae. aegypti* são insetos holometábolos, ou seja, que passam por metamorfoses até chegar na sua fase adulta (LIMA, 2015). O ciclo de vida do *Ae. aegypti* dura em média de 30-35 dias podendo sofrer variações influenciadas pelos fatores ambientais, tais como, temperatura, umidade e pluviosidade. Basicamente, seu ciclo é composto por quatro fases bem definidas: ovos, quatro estágios larvais

(L1, L2, L3 e L4), pupas e formas adultas (Figura 3).

Figura 3 – Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*



Fonte: <https://deleonscarlett.wordpress.com/2012/11/25/ciclo-de-vida-del-aedes-aegypti-2/> Acessado 06/07/2021.

A fase de ovo tem a duração em média de 2 a 3 dias (Santos, 2016). Ovos apresentam forma oval de cor esbranquiçada, que com o tempo vão se escurecendo devido a oxidação da sua membrana externa e podem medir cerca de 0,4 mm. (Feitosa *et al.*, 2018). Curiosamente, os ovos de *Ae. aegypti* podem ser ovipositados em “saltos” com o espalhamento dos ovos em diferentes pontos estratégicos, aumentando as taxas de sobrevivência e dispersão (Reiter, 2007) ou ovos “superresistentes” que podem permanecer viáveis em estado de latência por até 450 dias em caso de condições ambientais adversas (Brasil, 2009). Esses mecanismos auxiliam na expansão geográfica da espécie. Contudo, podem dificultar as ações de controle do *Ae. aegypti* (Braga *et al.*, 2000).

A fase larval ocorre após a eclosão do ovo dando origem a larvas aquáticas que

se alimentam de detritos orgânicos e microrganismos depositados nos criadouros. As larvas de *Ae. aegypti* possuem 4 estágios larvais para poderem pupar, apresentando uma cor esbranquiçada no estágio L1 que irá se intensificar com as mudanças de estágios larval e sempre em formato vermiforme. A duração do desenvolvimento larval pode variar de 4 a 7 dias para ocorrer a transformação das larvas em pupas (Santos, 2016). As larvas possuem dois tipos de comportamento alimentar: coletor-filtrador consiste num mecanismo de filtragem bem desenvolvido, de modo que a obtenção de alimento é mediada através de correntes aquáticas promovidas pelas escovas bucais ricas em cerdas que carregam as partículas alimentares até a abertura bucal. Já o método coleta-reunidora é gerado pela ressuspensão de partículas aderidas nas superfícies através dos movimentos das escovas bucais (Merritt, Dadd, and Walker 1992).

A fase de pupa também é aquática e marca a transição entre o meio hídrico e o terrestre. É nesta fase irão ocorrer as profundas metamorfoses, eliminando os órgãos larvais para a preparação da emergência do mosquito adulto. Nessa etapa há ausência de alimentação e natação, com duração de média de 3 dias.

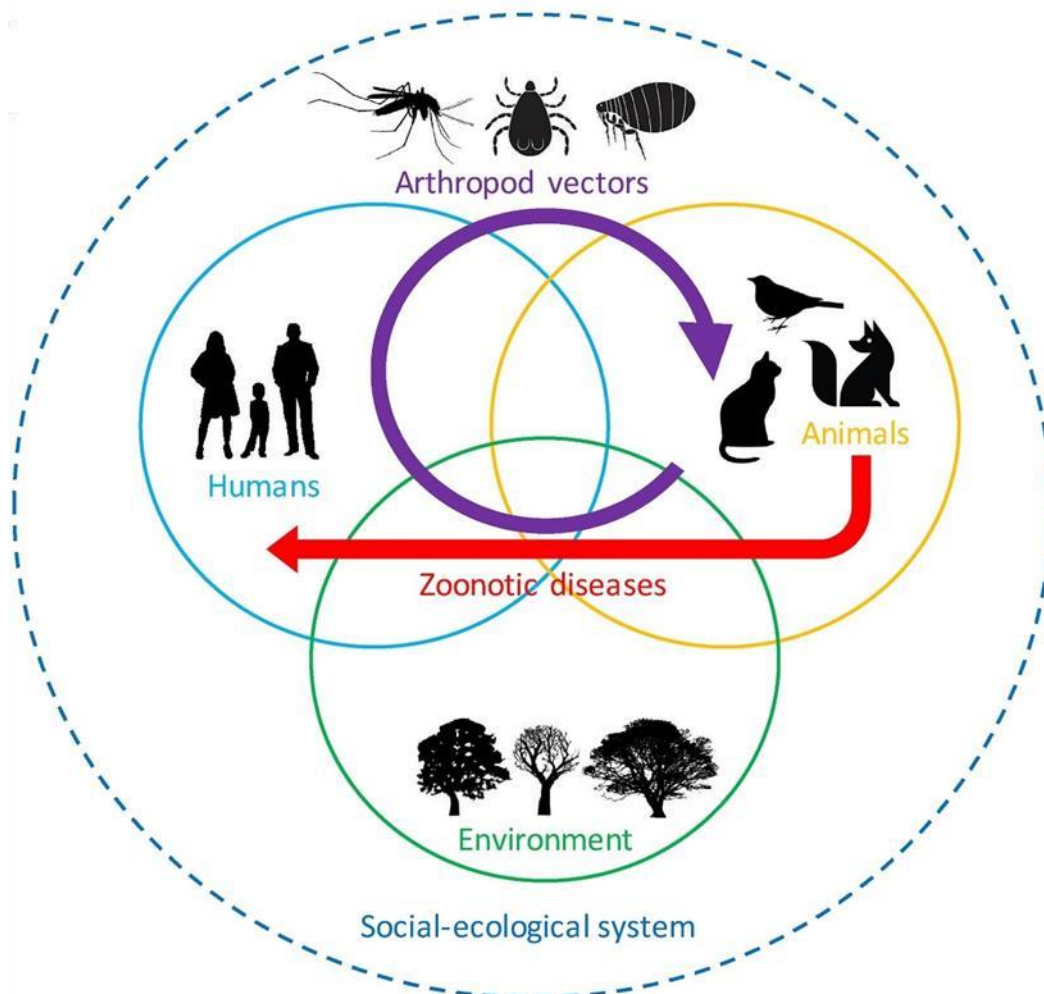
A fase adulta do mosquito apresenta coloração escura com manchas brancas, com aparelho bucal picador sugador e com hábitos diurnos (Queiroz *et al*, 2016). Após emergirem, os mosquitos procuram uma superfície para repousar enquanto ocorre o endurecimento das asas e do exoesqueleto. Os machos precisam repousar por até 24 h para que aconteça a rotação da genitália em 180° ao redor do eixo longitudinal do corpo. Após endurecer o tegumento corporal, as duas formas maduras estão prontas para a cópula, que acontece comumente durante o voo. As fêmeas costumam se alimentar de sangue após a cópula, com esse hábito alimentar as fêmeas podem adquirir vírus de animais infectados e se transformarem em vetores de arbovírus (Monteiro, 2016).

3.1.2 Arboviroses transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*

Zoonoses são doenças ou infecções-transmitidas naturalmente de animais vertebrados para humanos por contato direto ou indireto (Figura 4). A transmissão de um agente infeccioso de um animal vertebrado para um humano por um vetor artrópode é caracterizado por transmissão indireta da doença zoonótica (Go,

Balasuriya, and Lee 2014). Os arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, são um grupo de vírus taxonomicamente diverso transmitidos entre vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados (Harapan *et al.*, 2020).

Figura 4 – Ciclo de transmissão de zoonoses

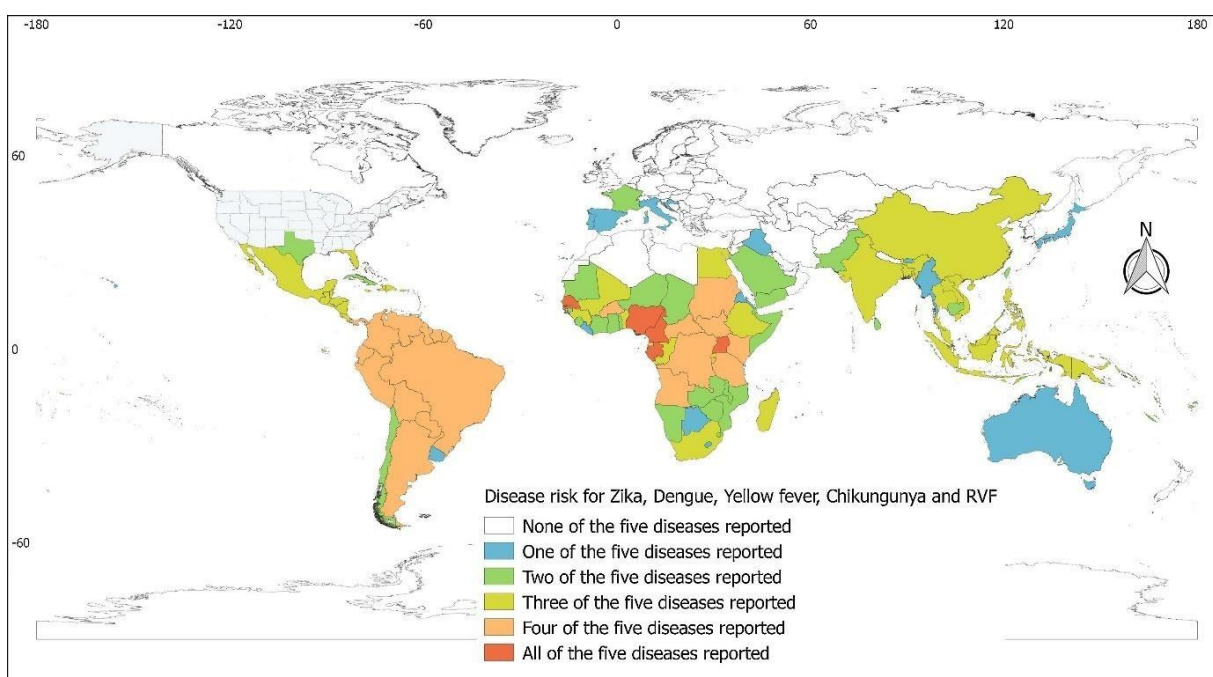


Fonte: Benelli and Duggan (2018).

Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae e Reoviridae são as famílias que apresentam espécies de arbovírus (Go, Balasuriya, and Lee 2014). Os arbovírus mais significativos clinicamente estão presente nos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*, *pertencente* à família Flaviviridae e Togaviridae (Wilder-Smith *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, cinco arbovírus epidêmicos humanos surgiram ou reemergiram no mundo: vírus da dengue (DENV), vírus Zika (ZIKV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus chikungunya (CHIKV) (Gould *et al.*, 2017; Wilder-Smith *et al.*, 2017)

Os vírus da DENV, CHIKV e ZIKV são os mais importantes do ponto de vista epidemiológico (Gould *et al.*, 2017; Paixão, Teixeira, and Rodrigues 2018). Os dados atuais estimam que aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas, vivendo em mais de 120 países, correm o risco de ser infectado pelos vírus da DENV, CHIKV e ZIKV (Harapan *et al.*, 2020). Assim, ocasionando diversos surtos epidêmicos urbanos envolvendo arbovírus silvestres, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Figura 5)(de Mendonça *et al.*, 2021).

Figura 5 - Ocorrências globais em nível de país das doenças arbovirais



Fonte: Leta *et al.*, (2018).

O mapa mostra as ocorrências de doenças arbovirais selecionadas desde nenhuma ocorrência, mostradas em branco, até a ocorrência de todas as doenças arbovirais selecionadas, mostradas em vermelho.

O DENV segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), está disseminado por todos os trópicos, com fatores de risco influenciados por variações locais de precipitação, temperatura, umidade relativa, grau de urbanização e qualidade dos serviços de controle de vetores em áreas urbanas. Os DENV possuem quatro sorotipos, sendo transmitidos aos humanos por mosquitos *fêmeas* *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e causam a febre da dengue (FD) (Cabral *et al.*, 2021). A FD é uma infecção sistêmica e dinâmica com amplo espectro clínico, que inclui manifestações clínicas graves e não graves. Essa

infecção na sua forma mais crítica é caracterizada por sintomas de febre hemorrágica, conhecida como febre hemorrágica da dengue (FHD), e síndrome do choque da dengue (SCD) (Salles *et al.*, 2018).

O CHIKV é um dos patógenos prioritários segundo a lista do Projeto da OMS (<https://www.who.int/blueprint/en/>) e os casos de infecção pelo vírus vêm aumentando sem precedentes. Sua disseminação é relatada em mais de 100 países afetando milhões de pessoas, ocasionando impactos econômicos e sociais nos países em desenvolvimento em geral (Paul and Sadanand 2018; Vairo *et al.*, 2019). A febre chikungunya afeta homens e mulheres de todas as faixas etárias, sendo caracterizada pelo início abrupto de febre alta, poliartrite incapacitante e erupção maculopapular associada a outros sintomas, incluindo cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos (Amaral, Bilsborrow, and Schoen 2020).

O ZIKV está distribuído globalmente, sendo registrado em 87 países e está presente em quatro das seis regiões da OMS (Pielnaa *et al.*, 2020). Em 2015 a epidemia de ZIKV foi o início de uma crise de saúde pública internacional, tendo chegado ao continente americano e com 33 países relatando transmissão autóctone da infecção pelo ZIKV com aumento na incidência de casos de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (Ferraris, Yssel, and Missé 2019). A infecção pelo ZIKV apresenta sintomas de febre leve, erupção cutânea e/ou artralgia. Contudo, o aumento coincidente de casos de microcefalia no Brasil durante o surto epidemiológico gerou preocupações sobre o potencial de letalidade do ZIKV e seu impacto no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Christian, Song, and Ming 2019).

3.1.3 Métodos tradicionais de controle de vetores de doenças

Os métodos de controle do *Ae. aegypti* incluem medidas para prevenir a picar dos mosquitos adultos em seres humanos, assim como, eliminar as larvas, pupas e mosquitos adultos (Benelli and Duggan 2018). Atualmente, os investimentos no controle de vetores têm se concentrado principalmente em larvicidas e pulverização espacial de organoclorados, organofosforados, diflubenzuron e piretróides (cipermetrina e deltametrina). Estes métodos tem vários impactos negativos, incluindo o alto custo, a resposta operacional lenta, a

baixa adesão da comunidade e tempo ineficaz de aplicação (de Carvalho *et al.*, 2019; Moyes *et al.*, 2021).

O grande problema na utilização de produtos químicos é a rápida disseminação da resistência, reduzindo a eficácia das estratégias atuais de controle à base de inseticidas químicos (Corbel *et al.*, 2016). Os mecanismos de resistência a inseticidas em mosquitos podem incluir a redução da penetrabilidade dos inseticidas aos insetos, mutações não sinônimas que afetam as proteínas direcionadas por inseticidas (mutações no local alvo) ou biodegradação enzimática aumentada ou sequestro (resistência metabólica) (Moyes *et al.*, 2021). Assim, para evitar problemas de resistência, é necessário buscar novas alternativas de inseticidas.

3.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE DE *Aedes Aegypti*

3.2.1 Controle Biológico

Por conta dos efeitos danosos dos inseticidas químicos normalmente utilizados no combate ao *Ae. aegypti*, novas abordagens mais sustentáveis foram desenvolvidas como alternativas no controle desse mosquito. Sendo assim, esse controle vem sendo realizado com diferentes abordagens, visando reduzir as populações do mosquito seja por controle biológico, por produtos de origem vegetal, bem como por técnicas genéticas (Zara *et al.*, 2016). Por possuírem modos de ação distintos, estas novas tecnologias reduzem em muito o surgimento de resistência por parte do vetor bem como a contaminação do ambiente (Braga and Valle 2007). Como forma de controle biológico de *Ae. aegypti*, tem sido bastante relatada a utilização de peixes e microrganismos entomopatogênicos, como fungos, bactérias e nematoides, em condições experimentais (Cavalcanti *et al.*, 2007; Evans, Elliot, and Barreto 2018; Walker *et al.*, 2011).

A utilização de microrganismos patogênicos no controle biológico de mosquitos vetores de doenças têm sido estudada ao longo de décadas, e mais recentemente, diversos estudos tem sido realizados em relação ao combate ao *Ae. aegypti* (Evans, Elliot, and Barreto 2018; Silva *et al.*, 2018). Em seu estudo com isolados do fungo *Tolypocladium cylindrosporum*, Rocha *et al.*, (2015) reportaram que a suspensão aquosa dos conídios dessa espécie foi eficiente no combate à diferentes fases de

desenvolvimento de *Ae. aegypti*. Daniel *et al.*, (2017) destacaram a atividade larvicida a partir de extratos metanólico e de acetato de etila de *Beauveria bassiana*. Estes autores também identificaram depsipeptídios cíclicos como beauvericina, beauvericina A ou F, beauvericina E e bassianolide, associando a atividade larvicida à presença destes compostos.

A atuação dos fungos na mortalidade dos mosquitos adultos também é amplamente investigada (Falvo *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2018). Nesse intuito, Leles *et al.*, (2010), testou a atividade de diferentes espécies de diferentes gêneros quanto a sua capacidade adulticida. Estes autores mostraram que todas as espécies utilizadas foram eficazes na redução do tempo de vida dos adultos de *Ae. aegypti*, destacando espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Isaria*, *Paecilomyces* e *Lecanicillium* como as mais expressivas.

O exemplo mais conhecido no uso de bactérias no controle de *Ae. aegypti* é o do *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti), uma bactéria gram-positiva, isolada das mais variadas fontes e que possui comprovada atividade larvicida (Palma *et al.*, 2014). Essa atividade é decorrente da produção de toxinas protéicas em forma de cristais por parte das cepas de Bti. Ao serem ingeridos pelas larvas, estes cristais são solubilizados e as toxinas ativadas no intestino de organismos susceptíveis, ocasionando rompimento de membranas e a consequente morte da larva (Boyce *et al.*, 2013; Palma *et al.*, 2014). O uso de larvicida biológico a base dessa bactéria já é amplamente realizada no combate às larvas do *Ae. aegypti*, e tem se mostrado eficaz no controle desse vetor (Araújo *et al.*, 2013; Jacups *et al.*, 2013; Ritchie, Rapley, and Benjamin 2010; Setha *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2012). Além do Bti, estudos buscando novos agentes bacterianos de controle ao *Ae. aegypti* tem sido desenvolvidos utilizando isolados de bactérias simbiotes. Entre estas, os gêneros *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, bactérias gram-negativas associadas a nematoides entomopatogenicos, apresentaram considerável atividade larvicida (Suwannaroj *et al.*, 2020; Yooyangket *et al.*, 2018).

Estudos com cepas do gênero *Wolbachia*, também uma bactéria gram-negativa e simbiote com a maioria dos insetos (Hoffmann 2020), mostraram que estas bactérias podem atuar tanto no controle de populações do mosquito, bem como reduzir sua capacidade de transmissão de patógenos, bloqueando a infecção do vetor,

tendo impacto direto na redução da disseminação de doenças por parte do *Ae. aegypti* (Nazni *et al.*, 2019; Ryan *et al.*, 2020; Terradas and McGraw 2017).

Além de fungos e bactérias, a utilização de nematoides entomopatogênicos também surge como alternativa de controle ao *Ae. aegypti* (María, Cagnolo, and Walter 2014). Em estudo utilizando estes organismos, Cardoso *et al.*, (2015) observaram uma alta taxa de mortalidade larval por consequência da infecção por nematoides nos 3º e 4º instares utilizando espécies do gênero *Heterorhabditis*, destacando a espécie *Heterorhabditis indica*, em laboratório. Estes autores citam que a maior mortalidade de larvas nos 3º e 4º instares está relacionada ao tamanho do seu aparelho bucal, sendo assim, capazes de ingerir os nematoides, diferentes dos 1º e 2º instares.

3.2.1.1 FUNGOS ENTOMOPATÓGENICOS COM ATIVIDADE DE CONTROLE DE *AE. AEGYPTI*

Os fungos entomopatogênicos são os agentes causadores de doenças mais prevalentes em insetos, além de desempenhar um papel crucial na manutenção dos serviços ecossistêmicos, os fungos patogênicos de insetos estão sendo usados como método alternativo aos inseticidas químicos (Lovett and St. Leger 2017). Os fungos são patógenos naturais dos artrópodes, exibindo cerca de 700 espécies de fungos e pouco mais de 90 gêneros patogênicos a insetos (Khan *et al.*, 2012). Dentre as ordens de artrópodes afetadas pelos os fungos entomopatogênicos temos os Acari, Coleoptera, Diplopoda, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Blattodea, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonoptera, Thysanoptera (Khan *et al.*, 2012; Lacey *et al.*, 2015).

Entre os benéficos da utilização dos fungos entomopatogênicos no controle biológico destaca-se seu largo espectro de ação, a plasticidade de infectar o hospedeiro em todos os estádios de desenvolvimento e por diversas vias, com boa capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, e não serem patológicos aos mamíferos (Alves *et al.*, 2008, Lacey *et al.*, 2015, Khan *et al.*, 2015).

Além disso, outra característica dos fungos entomopatogênicos, ao contrário de outros patógenos de insetos, como bactérias ou vírus, é a capacidade de infectar seus hospedeiros através da penetração da cutícula sem a necessidade de serem ingeridos. Assim, podendo controlar insetos sugadores, que são pragas agrícolas

como os pulgões, cigarrinhas, percevejos, tripes. Como também, vetores de doenças tais como mosquitos, percevejos beijadores, moscas tsé-tsé (Mannino *et al.*, 2019).

O potencial biocontrolador dos fungos entomopatogênicos em populações de mosquitos tem impulsionado amplamente a pesquisa sobre as interações fungo-mosquito ao longo de mais de um século (Lovett and St. Leger 2017; Luis *et al.*, 2019; Muturi *et al.*, 2016). Diversos fungos entomopatogênicos possuem atividade contra o *Ae. aegypti* (Tabela 1) em várias fase de seu desenvolvimento (Daniel *et al.*, 2017; C. Luz *et al.*, 2010; Noskov *et al.*, 2019; Vivekanandhan *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Fungos com atividade de controle de *Ae. aegypti*

Família e gênero	Espécie	Atividade	Referência
Ancylistaceae			
<i>Conidiobolus</i>	<i>Conidiobolus macrosporus</i>	Adulticida	(Montalva <i>et al.</i> , 2016)
Cordycipitaceae			
<i>Akanthomyces</i>	<i>Lecanicillium muscarium</i>	Adulticida	(Luz <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Verticillium. lecanii</i>	Larvicida	(Vivekanandhan, Bedini, and Shivakumar 2020)
<i>Beauveria</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Larvicida	(Vivekanandhan, Bedini, and Shivakumar 2020)
<i>Cordyceps</i>	<i>Isaria tenuipes</i>	Ovicida e larvicida	(Karthi <i>et al.</i> , 2020)
Clavicipitaceae			
<i>Culicinomyces</i>	<i>Culicinomyces bisporalis</i>	Ovicida, larvicida e adulticida	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Culicinomyces clavisporus</i>	Ovicida, larvicida e adulticida	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Larvicida	(Vivekanandhan, Bedini, and Shivakumar 2020)
<i>Metarhizium</i>	<i>Metarhizium brunneum</i>	Larvicida	(Alkhaibari <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Metarhizium humberi</i>	Adulticida	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Metarhizium robertsii</i>	Larvicida	(Noskov <i>et al.</i> , 2019)
Saprolegniaceae			

<i>Leptolegnia</i>	<i>Leptolegnia chapmanii</i>	Larvicida	(López Lastra <i>et al.</i> , 2004)
Ophiocordycipitaceae			
<i>Tolypocladium</i>	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	Ovicida, larvicida e adulticida	(Rocha <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: O autor (2021).

Os fungos entomopatogênicos infectam os mosquitos por diferentes mecanismos, incluindo a penetração ativa na parede do corpo, por meio de lesões na cutículas ou por ingestão, dependendo do patógeno, bem como o estágio de vida do mosquito (Greenfield *et al.*, 2014). Fungos no ambiente aquático podem entrar no corpo do mosquito passivamente por meio de diversos comportamentos alimentares das larvas, incluindo coleta-filtragem, bem como pastagem e trituração de matéria orgânica viva e em decomposição (Yee, Kesavaraju, and Juliano 2004).

A absorção oral de fungos pode ser benéfica para os mosquitos, os fungos atuam como alimento e fornecem nutrientes para o desenvolvimento das larvas do mosquito, como é o caso das leveduras que possuem valor nutricional e auxiliam no desenvolvimento larval (Tawidian, Rhodes, and Michel 2019). Todavia, a ingestão ou o contato superficial com entomopatógenos fúngicos leva à colonização do mosquito, ocasionando efeitos letais para o hospedeiro (Tawidian, Rhodes, and Michel 2019).

No *Ae. aegypti*, os principais locais de infecção foram a cabeça e a região anal quando alimentados com conídios de *B. bassiana* e para seu desenvolvimento o intestino larval foi o mais propício (Miranpuri and Khachatourians 1991). Nos mecanismos envolvidos na ingestão de conídios por larvas de mosquitos demonstraram que não ocorrem germinação dos conídios e sejam expelidos em pelotas fecais, a mortalidade dos insetos parece estar ligada à autólise desencadeada por caspases (Butt *et al.*, 2013). Entretanto, as *Culicinomyces* spp., fungo entomopatogênico aquático, possuem a capacidade de infectar larvas aquáticas de dípteros culicídeos, podendo se aderir e colonizar o inseto por adesão à papila anal e não à cutícula (Rodrigues *et al.*, 2018).

Os conídios de *M. anisopliae* possuem uma superfície hidrofóbica que lhe permite flutuar na água (Mannino *et al.*, 2019). Assim, quando ocorre a abertura das

válvulas perispiraculares para a entrada de ar nas larvas, os conídios podem fixar na ponta do sifão, permitindo que as hifas crescem na traqueia e podendo matar o inseto por asfixia (Tawidian, Rhodes, and Michel 2019). Além disso, os conídios podem se depositar no fundo do recipiente e servir de alimento para as larvas. Os conídios podem ser encontrados no intestino larval e matar o inseto pela secreção de toxinas, mas não provocam infecção generalizada no hospedeiro (Mannino *et al.*, 2019).

3.2.1.2 O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

As espécies do grupo *M. anisopliae* têm distribuição cosmopolita, predominantemente patogênicos a insetos e possuem grande versatilidade metabólica e ecológica (Brancini *et al.*, 2018). O gênero *Metarhizium* abriga espécies especialistas que infectam uma menor gama de inseto, como o *Metarhizium acridum* e *Metarhizium album*. Como também, apresenta espécies generalista que infectam uma ampla gama de insetos, entre eles temos o *M. anisopliae*, *Metarhizium brunneum* e *Metarhizium robertsii* (Hu *et al.*, 2014; Rehner and Kepler 2017). Portanto, as espécies de *Metarhizium*, exibem um grande número de modelos de adaptação a diversos ambientes e insetos hospedeiros (Leger and Wang 2020).

Conídios de *Metarhizium* spp. são aplicados mundialmente para controlar insetos praga agrícolas e vetores de doenças (Lacey *et al.*, 2015). Os produtos comercializados legalmente contêm conídios e/ou micélios do fungo, sendo aplicado no campo para o controle de pragas agrícolas e carrapatos e uso interno contra insetos domésticos, como baratas, moscas, pulgas e cupins (Brancini *et al.*, 2018; Lacey *et al.*, 2015).

M. anisopliae (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae) é conhecido por causar a “doença da muscardina verde”, sendo descrito pela primeira vez por Metchnikoff (1879) infectando um besouro do trigo *Anisoplia austriaca* (escaravelho, *Coleoptera*) na Rússia (Zimmermann *et al.*, 1995). Os países como Brasil, Irã, Japão, Tailândia e EUA usam o *M. anisopliae* no controle de insetos pragas, sendo uma alternativa ambientalmente segura para o uso de pesticidas químicos (Beys-da-Silva *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020; Mongkolsamrit *et al.*, 2020; Of *et al.*, 2013; Thongkaewyuan and Chairin 2018).

3.2.2 Produtos naturais vegetais para o controle de mosquitos

Diante da problemática existente pelo uso de compostos sintéticos, a utilização de plantas medicinais no combate ao *Ae. aegypti* torna-se uma alternativa promissora de controle vetorial, devido algumas substâncias encontradas em óleos essenciais e extratos, que apresentam atividades inseticida, larvicida e ovicida, interagindo no desenvolvimento e na reprodução do mosquito (Silva *et al.*, 2017). Com base em estudos etnobotânicos, o conhecimento popular contribui de forma significativa para a identificação de muitas espécies das quais apresentam importantes substâncias bioativas.

Sabe-se que as plantas produzem uma grande variedade de substâncias incluindo metabolismos primários (açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos e nucleotídeos) e secundários (terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados) (Pacheco Borges and Amorim 2020). Dentre as substâncias do metabolismo secundários temos os OE, que são uma mistura complexa de metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas (Bezerra Filho *et al.*, 2020). Os OE são misturas complexas de compostos voláteis que possuem várias funções nas plantas, auxiliando na polinização, na proteção contra radiação solar, defesa contra pragas e microrganismos (Pavela, 2015).

Pesquisas visando a utilização de derivados vegetais no combate ao *Ae. aegypti* tem sido realizadas em diversas regiões, investigando o potencial de diferentes famílias botânicas no controle deste vetor e nestes esforços são utilizadas todas as partes da planta, na busca por compostos bioativos com atividades contra *Ae. aegypti* (Al-Massarani *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2010). Desse modo, a eficiência de produtos derivados de plantas no combate ao mosquito tem sido constatada a partir das mais variadas fontes. Barbosa *et al.*, (2014) demonstrou a eficiência do extrato de sementes de espécies ocorrentes na caatinga no combate à diferentes fases de desenvolvimento do mosquito. Já da Silva *et al.*, (2020) evidenciou o potencial larvicida de espécies do gênero *Croton* a partir dos extratos foliares. Santos *et al.*, (2017) encontraram uma boa atividade larvicida a partir do OE das sementes de *Syagrus coronata*.

3.2.2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA CAATINGA COM ATIVIDADE

DE CONTROLE DE *AE. AEGYPTI*

O Brasil é um país rico em diversidade floral e com maior índice de endemismo, o que é essencial para a indústria de biotecnologia pelo seu grande potencial econômico (Paulo Farias *et al.*, 2020). Nesse cenário encontra-se a Caatinga, uma região que ocorre numa das maiores áreas de clima semiárido do planeta, ocupando quase toda a região Nordeste do Brasil, sendo considerado um bioma exclusivamente brasileiro (Moro *et al.*, 2016). Apesar de apresentar condições ambientais adversas com baixa disponibilidade hídrica e altas temperaturas na maior parte do ano, nesta região possui uma grande variedade de espécies e um alto grau de endemismo, sendo considerada uma das regiões semiáridas mais biodiversa no mundo (Câmara *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2014).

Devido às suas características, a Caatinga é uma região promissora na busca por compostos bioativos. Mesmo possuindo uma rica biodiversidade vegetal, ainda tem sido pouco estudada em relação às potencialidades que suas espécies vegetais possuem (Cunha e Silva *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014). As plantas encontradas nessas regiões vêm chamando atenção pela grande diversidade de espécies aromáticas que apresentam uma alta variedade de compostos ativos, devido aos fatores físicos e químicos do ambiente como: a alta incidências solar, baixa distribuição de chuvas, salinidade do solo entre outros (Morais, 2009). Essas espécies, ao longo do processo evolutivo foram capazes de desenvolver diversas respostas adaptativas devido as condições adversas do ambiente tornando essas espécies exclusivas da região (Figueiredo *et al.*, 2008).

Sendo os OE produtos do metabolismo secundário vegetal e uma interface de comunicação entre planta e ambiente, estes são fortemente influenciados pelas condições ambientais que podem alterar sua composição, afetando suas possíveis atividades biológicas (Marques *et al.*, 2020). Dessa forma, algumas regiões podem receber certo destaque na busca por compostos bioativos, uma vez que as pressões naturais exercidas sobre as espécies induzem a produção de compostos como forma de adaptação ao ambiente (Li *et al.*, 2020).

Muitos estudos tem demonstrado a capacidade dos OE de algumas espécies, não apenas só em repelir insetos, mas também sua ação inseticida, onde o contato

direto ou através de vias aéreas podem interferir nos processos biológicos (Prajapati *et al.*, 2005). OE, por sua vez, é um dos derivados vegetais mais investigados na bioprospecção, sendo utilizados para os mais variados fins e com ação comprovada no controle de *Ae. aegypti*, principalmente por sua atividade larvicida (Luz *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2015; Sarma *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019). Diversas espécies endêmicas da caatinga são descritas com ação sobre as várias fases de vida do *Ae. aegypti* (Tabela 2).

Tabela 2 – OE de plantas de ocorrência no domínio Caatinga com atividade de controle de mosquito *Ae. Aegypti*

Família e espécie	Atividade	Referência
Burseraceae		
<i>Commiphora leptophloeos</i>	Larvicida	Silva <i>et al.</i> , (2015)
Euphorbiaceae		
<i>Croton argyrophyllus</i>	Larvicida e adulticida	Cruz, <i>et al.</i> , (2017)
<i>Croton heliotropifolius</i>	Larvicida	Doria, <i>et al.</i> , (2010)
<i>Croton jacobinensis</i>	Larvicida	Pinto, <i>et al.</i> , (2015)
<i>Croton nepetaefolius</i>	Larvicida	Santos, <i>et al.</i> , (2017)
<i>Croton piauhiensis</i>	Larvicida	Silva, <i>et al.</i> , (2019)
<i>Croton pulegioidorus</i>	Larvicida	Doria, <i>et al.</i> , (2010)
<i>Croton sonderianus</i>	Larvicida; pupicida e ovicida	Lima, <i>et al.</i> , (2013)
<i>Croton tetradenius</i>	Larvicida e adulticida	Carvalho, <i>et al.</i> , (2016)
<i>Croton zehntneri</i>	Larvicida; pupicida; ovicida e oviposição	Lima, <i>et al.</i> , (2013)
Fabaceae		
<i>Bauhinia acuruana</i>	Larvicida	Gois <i>et al.</i> , (2011)
<i>Bauhinia cheilantha</i>	Larvicida	Silva <i>et al.</i> , 2020
Lamiaceae		
<i>Ocimum carnosum</i>	Larvicida	Ricarte <i>et al.</i> , (2020)
<i>Ocimum campechianum</i>	Larvicida	Ricarte <i>et al.</i> , (2020)

<i>Vitex agnus-castus</i>	Larvicida	Ricarte <i>et al.</i> , (2020)
<i>Vitex gardneriana</i>	Larvicida	Pereira <i>et al.</i> , (2019)
Myrtaceae		
<i>Eugenia brejoensis</i>	Larvicida	Silva, <i>et al.</i> , (2015)
Verbenaceae		
<i>Lippia gracillis</i>	Larvicida	Galvão, <i>et al.</i> , (2018)
<i>Lippia pedunculosa</i>	Larvicida	Nascimento, <i>et al.</i> , (2017)
<i>Lippia sinoides</i>	Larvicida; pupicida; ovida e oviposição	Lima, <i>et al.</i> , (2013)

Fonte: O autor (2021).

3.2.2.2 A PLANTA DA CAATINGA *EUGENIA BREJOENSIS*

A família Myrtaceae possui aproximadamente 145 gêneros e 6.000 espécies de arbustos e árvores aromáticas nas regiões tropicais e subtropicais (The Plant List, 2021), sendo uma das principais famílias de árvores frutíferas comerciais do mundo. Os gêneros *Syzygium*, *Eugenia* e *Campomanesia* são constituídos por uma grande variedade de espécies frutíferas com grande potencial econômico, valor nutricional e por apresentarem fitoquímicos como compostos fenólicos, carotenoides e compostos voláteis (Farag *et al.*, 2018; de Paulo Farias *et al.*, 2020).

Eugenia é o gênero com mais de 1000 espécies distribuídas em todo o mundo (The Plant List, 2021). O gênero está presente na América do Norte e do Sul (800 espécies), África (60 espécies), Malásia (60 espécies), Nova Caledônia (50 espécies) e foi recentemente introduzido no Egito pela Tailândia (Farag *et al.*, 2018). OE das *Eugenia* apresentaram diversas atividades biológicas, principalmente antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana), anticolinesterásica, anticâncer (mama, gástrica, melanoma, próstata), antiprotozoária (*Leishmania* spp.), antioxidante, acaricida, antinociceptiva e antiinflamatória (Costa *et al.*, 2020).

E. brejoensis (Figura 6), conhecida popularmente como “cutia”, é uma planta da família Myrtaceae que foi descrita como uma espécie endêmica no Brasil

presente nos estados de Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Espírito Santo (Mazine and De Faria 2013; Mendes *et al.*, 2018).

Figura 6 – Exsicata botânica da *E. brejoensis*



Herbarium Network disponível em:

<<https://intermountainbiota.org/portal/taxa/index.php?taxon=167944>> acessado em: 27/05/2021

O OE de *E. brejoensis* é composto principalmente por sesquiterpenos (como δ -cadineno, β -cariofileno e α -muurolol) mostrou ações larvicida contra o *Ae. aegypti* (Silva *et al.*, 2015) e efeito anti-*Trypanosoma cruzi* (Oliveira de Souza *et al.*, 2017). Em relação à atividade antibacteriana, (Bezerra Filho *et al.*, 2020) relata atividade antimicrobiana e antivirulência contra *S. aureus* utilizando modelos de invertebrados *in vitro* e *in vivo* (*Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella*) e (Mendes *et al.*, 2018) nanoemulsões com OE da *E. brejoensis* foram capazes de

inibir o desenvolvimento de *Pseudomonas fluorescens*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentarei meus resultados na forma de artigo, formatado nas normas do periódico “Journal of Applied Microbiology”.



4.1 ARTIGO 1

FORMULAÇÃO DE CONÍDIOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* COM ÓLEO ESSENCIAL DE *EUGENIA BREJOENSIS* PARA O CONTROLE INTEGRADO DO VETOR DE ARBOVIROSES *Aedes Aegypti*

João Victor De Oliveira Alves^{1,2,4}, Paloma Maria da Silva^{1,2}, Daniela Maria Do Amaral Ferraz Navarro³, Alexandre Gomes da Silva⁵, Maria Tereza Correia Dos Santos^{1,2}, Marcia Vanusa Da Silva^{1,2}, Augusto Schrank⁴.

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

² Núcleo de bioprospecção da caatinga, Campina Grande, Brasil;

³ Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

⁴ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

⁵ *in memoriam*.

*Auto correspondente: jv-bio@hotmail.com

Resumo

Objetivo

investigamos a susceptibilidade das larvas do *Ae. aegypti* a formulações contendo o OE da *Eugenia brejoensis* e conídios do *Metarhizium anisopliae*.

Métodos e Resultados

E. brejoensis é uma planta da Caatinga e seu OE foi caracterizado por CG/EM, apresentando o δ -cadinene (17,6%), E-caryophyllene (16,3%), Epi- α -muurolol (9,3%), bicyclogermacrene (8,1%), α -cadinol (7,3%) e Spathulenol (6,6%) como compostos majoritários. O OE apresenta CL₅₀ de 200,4 $\pm$ 0,4 μ g/mL contra as larvas (3 instar) de *Ae. aegypti*. Todas as linhagens de *M. anisopliae* testadas apresentaram atividade larvicida em *Ae. aegypti*, com destaque para a linhagem E6 com TL₅₀ 1,5 dias (Concentração 1X10⁸). Já nos ensaios de atividade larvicida com formulações contendo ambos componentes o OE e o fungo (Eb+Ma) (100 μ g/mL de OE da *E. brejoensis* e 1X10⁶ de conídios de *M. anisopliae*) atingem TL₅₀ 1,5 dias.

Conclusões As formulações Eb+Ma apresentaram menores curvas de sobrevivência e tempo letal em relação aos dois componentes isoladamente.

Significância e impacto: Formulações contendo OE de *E. brejoensis* e conídios do *M.anisopliae* pode ser um método alternativo e promissor no controle biológico integrado de larvas de *Ae. aegypti*.

Palavras chaves: Bioinseticida. Caatinga. Controle Biológico Integrado. Entomopatogênico.

INTRODUÇÃO

Os arbovírus são os principais causadores de doenças humanas, causando anualmente mais de 1 bilhão de infecções, 1 milhão de mortes no mundo (Iwamura, Guzman-Holst, and Murray 2020). O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de arboviroses (Cabral *et al.*, 2020). O mosquito *Ae. aegypti* é um grave problema de saúde pública mundialmente, porque é vetor de vírus de doenças Humanas graves como Dengue, Zika, Febre Amarela e Chikungunya (Patterson, Sammon, and Garg 2016). As preocupações são potencializadas porque, apesar dos grandes esforços em pesquisa e desenvolvimento de vacinas, não há técnicas terapêuticas específicas ou eficazes de prevenção das infecções dos arbovírus (Tharmarajah *et al.*, 2017; OMS, 2017; Polônia *et al.*, 2018).

O controle de vetores com inseticidas sintéticos continua sendo a principal estratégia para mitigar a disseminação de doenças infecciosas (Cabral *et al.*, 2020; Marques *et al.*, 2017). Contudo, o aumento no uso de inseticidas químicos causa sérios riscos à saúde humana, danos ao meio ambiente e aumento da resistência aos inseticidas nas populações de pragas (Marques *et al.*, 2017; de Oliveira Barbosa Bitencourt *et al.*, 2020).

Por esses motivos, atualmente as indústrias visam desenvolver métodos alternativos para o controle do mosquito *Ae. Aegypti*, desenvolvendo pesticidas ecologicamente sustentáveis com extratos vegetais, óleos essenciais ou controle biológico utilizando fungos e bactérias (Achee *et al.*, 2019; Benelli *et al.*, 2019; Pavela *et al.*, 2019).

As larvas dos mosquitos apresentam suscetibilidade a fungos entomopatogênicos e seus metabolitos. Assim, representam alternativa aos inseticidas químicos sintéticos. O uso de fungos entomopatogênicos possui uma abordagem comprovada devido à sua toxicidade seletiva e pronta decomposição no ecossistema (Bilal, Hassan, and Khan 2012). *Metarhizium* e *Beauveria* são os gêneros de fungos mais promissores no controle de insetos (Marques *et al.*, 2017).

Os biopesticidas baseados em produtos naturais de plantas oferecem uma fonte promissora de novos produtos mais seguros ao homem e meio ambiente, devido aos resíduos mínimos de sua degradação natural no solo e na água, minimizando as perturbações nos ecossistemas (Silvério *et al.*, 2020). Dentre os produtos vegetais, os óleos essenciais (OE) apresentam maior potencial inseticida, sendo constituídos por compostos voláteis, que oferecem uma vantagem importante de não persistência no meio ambiente (Manh 2020).

Os OE são produtos do metabolismo secundário vegetal e desempenham uma variedade de funções nas plantas e sua produção é fortemente regulada pelas condições ambientais que podem alterar sua composição, afetando suas possíveis atividades biológicas (Marques *et al.*, 2020). Dessa forma, algumas regiões podem receber certo destaque na busca por compostos bioativos, uma vez que as pressões naturais exercidas sobre as espécies induzem a produção de compostos como forma de adaptação ao ambiente (Li *et al.*, 2020).

Nesse cenário encontra-se a Caatinga, uma região de clima semiárido que ocupa quase toda a região Nordeste do Brasil, sendo considerado um bioma exclusivamente brasileiro (Moro *et al.*, 2016). Apresenta condições ambientais extremas como baixa disponibilidade hídrica e altas temperaturas na maior parte do ano. Esta região possui uma grande variedade de espécies vegetais e um alto grau de endemismo, sendo considerada uma das regiões semiáridas mais biodiversa da Terra (Câmara *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2014). Devido às suas características ambientais, a Caatinga é uma região promissora na busca por compostos bioativos (Silva *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014). Há vários relatos na literatura das propriedades dos OE de suas plantas endêmicas sobre o *Ae. aegypti* (Carvalho, *et al.*, 2016; Cruz, *et al.*, 2017; Doria, *et al.*, 2010; Gois *et al.*, 2011; Lima, *et al.*, 2013; Pinto, *et al.*, 2015; Ricarte *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020).

O potencial do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* como método alternativo para o controle de larvas do *Ae. aegypti* já são bem descritos (Cabral *et al.*, 2020; Greenfield *et al.*, 2014). Contudo, ao expor as suspensões de conídios em recipientes com água, a meia-vida dos conídios diminui para cerca de dez dias em condições de laboratório (Paula *et al.*, 2019). Portanto, é necessário desenvolver métodos para aumentar a persistência do fungo na água, usando adjuvantes adequados.

Estudos relatam que formulações contendo óleos, podem aumentar a persistência do fungo quando usado contra *Ae. aegypti* (Gomes *et al.*, 2015). Os conídios são esporos hidrofóbicos mais comuns usados em bioprodutos para o controle de pragas agrícolas (Mascarin *et al.*, 2016). Estudos indicam o uso de óleos essenciais e fixos para melhorar a ação larvicida dos fungos entomopatogênicos (Gomes *et al.*, 2015; Paula *et al.*, 2019). Os óleos nas soluções com os conídios podem auxiliar a adesão do fungo e aumentar a tolerância do fungo contra a variação dos fatores abióticos negativos, como desidratação, radiação UV e altas temperaturas (Bukhari, Takken, and Koenraadt 2011). No estudo atual, foi investigado a susceptibilidade das larvas do *Ae. aegypti* a formulações contendo o OE da *E. brejoensis* e conídios do *M. anisopliae*. Assim como, avaliar seus efeitos isolados sob as larvas do *Ae. aegypti* e o potencial do EO da *E. brejoensis* em inibir a acetilcolinesterase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Folhas de *E. brejoensis* (84 033 IPA) foram coletadas de diferentes espécimes no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil), uma unidade de conservação situada nos municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, no Estado de Pernambuco. O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel, devidamente etiquetados e levados ao Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco. Paralelamente foram coletados ramos férteis para incorporação ao Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

Extração e caracterização química do óleo essencial

As folhas de *E. brejoensis* foram separadas, pesadas e trituradas com água destilada. A solução foi colocada em balão de 6 L, com auxílio de funil, para a extração do OE. O OE foi extraído através da técnica de hidrodestilação por 3 h (Azmir *et al.*, 2013), no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica, da UFPE. Após a extração os óleos extraídos foram secos com NaSO₄ anidro, acondicionados em frascos âmbar e armazenados a -20°C. A identificação química dos compostos presentes no OE foi realizada por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM). As substâncias foram identificadas por comparação dos seus espectros de massas com os espectros da base de dados NIST 98 (NIST Mass Spectral Library, 1998) e os registrados na literatura (Adams 2007) e por comparação de seus índices de retenção, obtidos a partir do algoritmo de Kovats modificado, utilizando como padrões uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares de C₉H₂₀ (nonano) a C₂₆H₅₄ (hexacosano), com os índices de retenção registrados na literatura (Adams 2007).

Ensaio com Ae. aegypti

Insetos

A colônia de insetos usada nos experimentos pertence à cepa Rockefeller. A sala de criação foi mantida a 25-27°C e 75-80% de umidade, com fotoperíodo claro-escuro 12:12. Ovos de *Ae. aegypti* foram incubados em água destilada em tigelas de plástico a uma temperatura variando de 25–27°C e comida de gato (Whiskas ®) foi oferecida às larvas. Os adultos foram mantidos em gaiolas (30 × 30 × 30 cm) e foram alimentados com solução de glicose a 10%. As fêmeas consumiam sangue com sangue de galinha adquirido em fazendas locais e oferecido usando um comedouro artificial.

Ensaio larvicide utilizando óleo essencial de Eb

Ao atingir o terceiro estágio inicial (L3), as larvas foram coletadas e utilizadas nos bioensaios. A atividade larvicide foi avaliada por uma adaptação do método da Organização Mundial da Saúde (2005). A solução estoque do OE de *E. brejoensis* foi diluída em água destilada para fornecer soluções de teste na faixa de concentração de 50-300 µg/mL. O volume final de cada ensaio larvicide foi de 20 mL de solução teste ou controle negativo (0,2%, v/v, Tween 80 em água destilada) e continha 25

larvas com três repetições. A taxa de mortalidade (%) foi determinada após 24 e 48h de incubação a 25–27°C e fotoperíodo claro-escuro 12:12. As larvas que não conseguiram alcançar a solução de superfície ou não responderam ao estímulo mecânico foram consideradas mortas. Os valores das concentrações letais para CL₅₀ e CL₉₀ foram calculados pela análise de Probit usando o StatusPlus 2006 software (Autran *et al.*, 2009).

Inibição da acetilcolinesterase – AChE

O protocolo Ellman *et al.* (1961) foi aplicado para detecção da inibição da acetilcolinesterase pelo Eb, no ensaio foi utilizado acetilcolinesterase da Sigma-Aldrich (tipo VI-S). Mistura-se 200 µL do reagente cromogênico DTNB (0,25 mM) em Tris-HCl 0,5 M pH 7.4, a 20 µL de OE. A reação é iniciada pela adição do substrato (20 µL de iodeto de acetilcolina 62 mM). O branco é preparado com tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7.4 em substituição ao OE. A degradação da acetiltiocolina é mensurada ao final de 3 min a 405 nm. A inibição (%) foi calculada para ambas as atividades usando a seguinte equação:

$$I (\%) = 100 - (\text{amostraDO} / \text{controleDO}) \times 100$$

I = inibição em porcentagem, DO = densidade óptica.

Ensaio Larvicida de conídios de M. anisopliae

Isolado fúngico e preparação de suspensões

As linhagens de *M. anisopliae* (Tabela 1) foram cultivados em Agar Sabouraud Dextrose (Dextrose 10g; Peptona 2,5g; Extrato de Levedura 2,5g; Agar 20g em 1L H₂O) a 27°C por 15 dias antes de serem usados em experimentos. As suspensões fúngicas foram inicialmente preparadas em Tween 80 (0,05% em água destilada estéril) e as concentrações (1x10⁸, 1x10⁷ e 1x10⁶ conídios/ml) de conídios determinada em hemocitômetro de Neubauer.

Tabela 1 – Linhagens de *M. anisopliae* utilizadas neste trabalho

Linhagem	Hospedeiro e origem geográfica
<i>M. anisopliae</i> CARO14	Aeneolamia sp., Mexico
<i>M. anisopliae</i> E6	Deois flavopicta. Espírito Santo/BR
<i>M. anisopliae</i> M5	Deois sp., Pernambuco/BR

Ensaio larvicidas das linhagens do *M. anisopliae*

A atividade larvicida foi avaliada por uma adaptação do método da Organização Mundial da Saúde (2005). O volume final de cada ensaio larvicida foi de 20 mL de solução teste ou controle negativo (0,2%, v/v, Tween 80 em água destilada) e continha 25 larvas com três repetições. A taxa de mortalidade (%) foi determinada a cada 24h por sete dias.

Efeito do EO de E. brejoensis no desenvolvimento do fungo M. anisopliae E6

Crescimento radial

Nesse ensaio o fungo foi inoculado na concentração de 1×10^6 conídios/ml em meio de cultura SDA que foi formulado com três concentrações (100; 50 e 10 $\mu\text{g/mL}$) do OE. O tratamento controle foi feito com o fungo e tween 80. As suspensões foram preparadas, em seguida foram retiradas alíquotas de 5 μl de cada suspensão e inoculada no centro das placas de Petri. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 27°C e 70 $\pm$ 10% UR (umidade relativa) por até 7 dias. Diariamente, utilizando um paquímetro, foi avaliado o crescimento radial (mm) do fungo durante o período de sete dias.

Unidades formadoras de colônias – UFC

Suspensões de conídios da linhagem E6 (1×10^6 conídios/ml) e OE de *E. brejoensis* (100 $\mu\text{g/mL}$) foram plaqueadas em SDA e incubadas a 27°C. Após 48h foi realizada a contagem de colônias crescidas e compradas com o inóculo sem a presença do OE.

Ensaio larvicidas de formulações contendo conídios de *M. anisopliae* e OE de *E. brejoensis*

As formulações foram elaboradas com 100 $\mu\text{g/mL}$ do OE de *E. brejoensis*, conídios de *M. anisopliae* em concentrações de 1×10^8 , 1×10^7 e 1×10^6 conídios diluídos e solução de Tween 80 (0,2%, v/v) em água destilada. O volume final de cada ensaio larvicida foi de 20 mL de solução teste ou controle negativo (0,2%, v/v, Tween 80 em água destilada) e continha 25 larvas em triplicatas. A taxa de mortalidade (%) foi

determinada a cada 24h por sete dias.

RESULTADOS

Extração e caracterização química do OE

A hidrodestilação de folhas de *E. brejoensis* produziu 0,25% de OE. Os 35 compostos (Tabela 2) identificados no OE das folhas de *E. brejoensis* representaram 96,92% dos componentes detectados nas análises CG. O OE é constituído principalmente sesquiterpenos (62,6%) e sesquiterpenos oxigenados (26,6%) e os principais constituintes foram δ -cadinene (17,6%), E-caryophyllene (16,2%), Epi- α -muurolol (9,3%), bicyclogermacrene (8,1%), α -cadinol (7,3%) e Spathulenol (6,6%).

Tabela 2 - Composição química do OE de folhas da planta da Caatinga *E. brejoensis*

Composto	R.I. Lit.	RI. Cal.	A%	DP
δ -elemene	1335	1335	0.29	0.01
α -cubebene	1348	1348	3.57	0.01
α -copaene	1374	1374	0.59	0.01
β -bourbonene	1387	1387	0.87	0.01
β -elemene	1390	1390	1.56	0.01
α -Gurjunene	1409	1409	1.72	0.30
E-caryophyllene	1417	1417	16.27	0.29
β -gurjunene	1431	1431	0.15	0.00
Aromadendrene	1439	1439	1.32	0.01
Cis-muurola-3,5-diene	1448	1448	0.01	0.00
Trans-muurola-3,5-diene	1451	1451	0.01	0.00
α -humulene	1452	1452	2.66	0.01
Allo-aromadendrene	1458	1458	2.32	0.00
Trans-cadina-1(6),4-diene	1475	1475	2.57	0.01
γ -Muurolene	1478	1478	0.79	0.03
Germacrene-D	1480	1480	0.01	0.00
β -selinene	1489	1489	0.59	0.02
Trans-muurola-4(14),5diene	1493	1493	0.01	0.00
bicyclogermacrene	1500	1500	8.17	0.05
α -muurolene	1500	1500	0.20	0.01
Aromadendra-1(10),4(15)-diene	1512	1512	0.01	0.00
γ -cadinene	1514	1514	2.18	0.14
δ -cadinene	1522	1522	17.61	0.18
Trans-cadina-1,4-diene	1533	1533	0.75	0.00
α -cadinene	1537	1537	0.84	0.00

α -calacorene	1544	1544	0.44	0.01
Palustrol	1567	1567	0.82	0.01
Spathulenol	1577	1577	6.67	0.10
caryophyllene oxide	1582	1582	2.64	0.12
Viridiflorol	1592	1592	0.93	0.01
ledol	1602	1602	1.72	0.01
1-epi-cubenol	1627	1627	1.29	0.00
Epi- α -muurolol	1640	1640	9.33	0.04
α -muurolol	1644	1644	0.67	0.01
α -cadinol	1652	1652	7.31	0.04
Total			96.92	

Índice de Retenção (RI) literatura e calculado; Porcentagem relativa da área do pico no cromatograma (A%); Desvio padrão (DP).

Ensaio larvica da OE

O OE de *E. brejoensis* apresentou CL_{50} de $200,4 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$. A atividade larvica máxima se deu na concentração de 300 ppm, com taxa de 45% de sobrevivência das larvas (Tabela 3), na menor concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$) obtivemos 95% de sobrevivência.

Tabela 3 – Ensaio larvica da OE de *E. brejoensis*

Concentrações	Eb
50 $\mu\text{g/mL}$	$95,0 \pm 0,03$
100 $\mu\text{g/mL}$	$70,0 \pm 0,05$
150 $\mu\text{g/mL}$	$60,0 \pm 0,06$
200 $\mu\text{g/mL}$	$55,0 \pm 0,02$
250 $\mu\text{g/mL}$	$40,0 \pm 0,04$
300 $\mu\text{g/mL}$	$45,0 \pm 0,03$
Controle	$100 \pm 0,0$
Média $\pm$ DP	

Inibição da acetilcolinesterase – ACHE

O OE de *E. brejoensis* apresentou efeito inibitório sobre acetilcolinesterase (Figura 1). Os resultados foram expressos por porcentagem de inibição e comparado com o organofosforado temefós (1000 $\mu\text{g/mL}$), que é o mais utilizado no combate das larvas do *Aedes aegypti* devido ao seu efeito neurotóxico (OMS 2016).

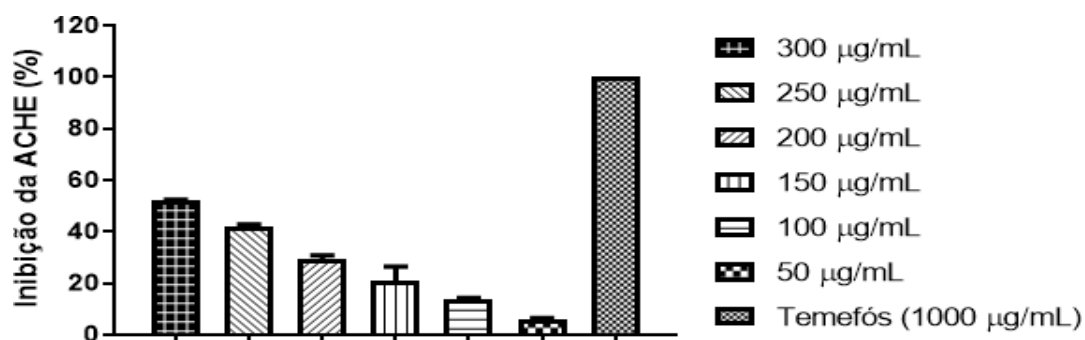


Figura 1 – Efeito inibitório da AChE causado pelo OE de *E. brejoensis*

Todas as concentrações das soluções com o OE de *E. brejoensis* apresentaram capacidade de inibir a AChE. A solução na concentração de 300 µg/mL obtivemos a inibição de $52,35 \pm 0,77\%$ de AChE. Enquanto, o temefós (100 µg/mL) inibiu $100,0 \pm 0,03$ (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito inibitório da AChE pelo Eb

Amostra	Concentrações	Inibição da AChE (%)
<i>Eb</i>	50 µg/mL	$5,9 \pm 0,14$
	100 µg/mL	$13,65 \pm 0,49$
	150 µg/mL	$20,3 \pm 0,56$
	200 µg/mL	$29,05 \pm 0,21$
	250 µg/mL	$41,85 \pm 0,35$
	300 µg/mL	$52,35 \pm 0,77$
Temefós	1000 µg/mL	$100,0 \pm 0,03$
		Média ± DP

Ensaio larvicida com linhagens de M. anisopliae

As linhagens de *M. anisopliae* (tabela 1) foram ativas contra as larvas do *Ae. aegypti*. Todavia, a linhagem E6 demonstrou a menor curva de sobrevivência e menor tempo de letalidade (6 a 1,5 dias), tendo uma taxa de sobrevivência variando entre 50 a 10% entre as concentrações (Figura 2).

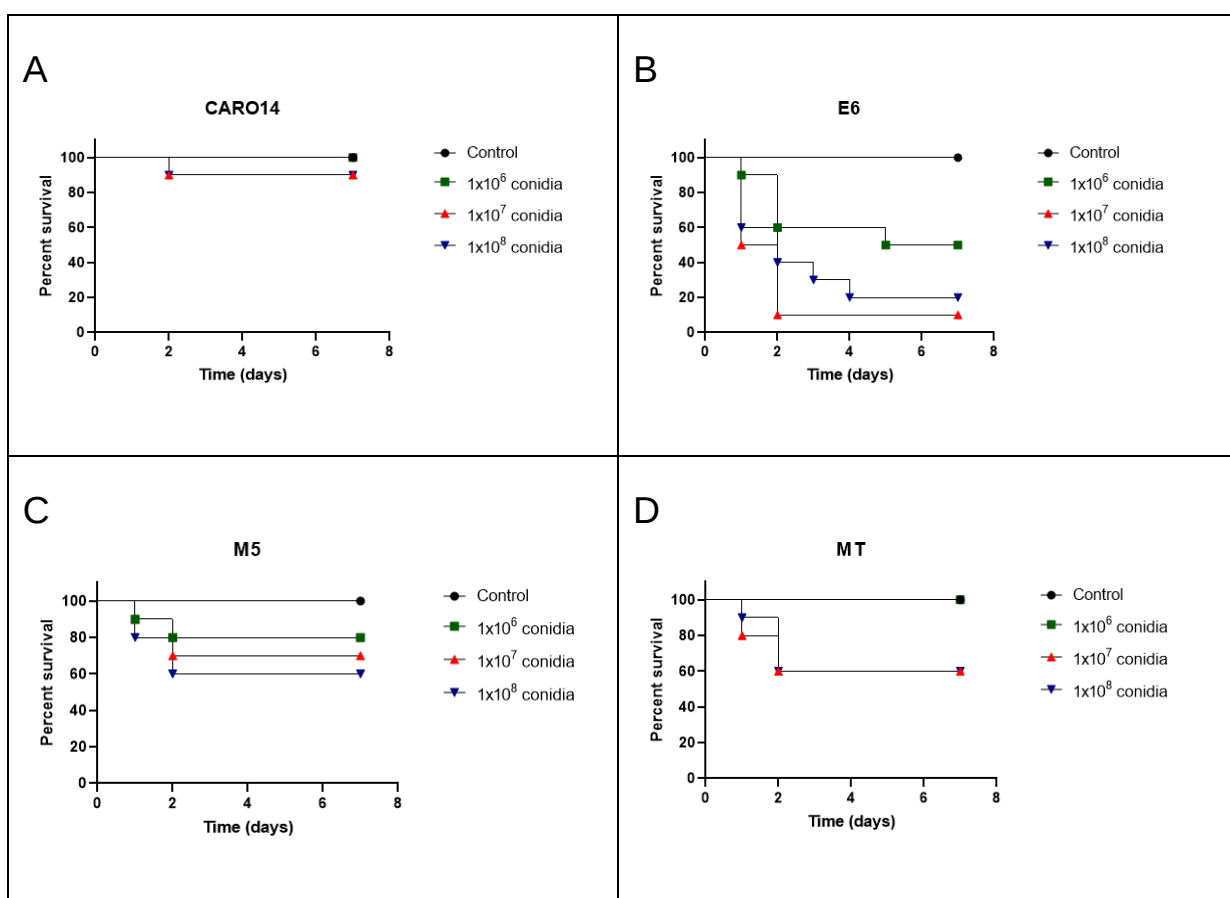


Figura 2 - Curvas de sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* expostas as suspensões de conídios de *M. anisopliae*

Curvas de sobrevivência diária das larvas de *Ae. aegypti* expostas as suspensões de conídios das linhagens *M. anisopliae*. Os resultados são as médias ($\pm$ SE) de três experimentos para cada tratamento com 25 insetos usados por tratamento para cada experimento. Controle: Tween 80.

Enquanto, as demais linhagens apresentaram uma taxa de letalidade entre 10% a 20%. As linhagens CARO14, M5 e MT não apresentaram taxas de letalidade suficientes para determinar tempo médio de sobrevivência (TL₅₀) (tabela 5).

Tabela 5 – Taxa de sobrevivência e tempo médio de letalidade das larvas de *Ae. aegypti* em formulações contendo conídios de *M. anisopliae*

Tratamento		% Sobrevivência	TL ₅₀
CARO14	1X10 ⁶	100 $\pm$ 5 ^a	nd
	1X10 ⁷	90 $\pm$ 10 ^a	nd
	1X10 ⁸	90 $\pm$ 5 ^a	nd
E6	1X10 ⁶	50 $\pm$ 2,5 ^b	6
	1X10 ⁷	20 $\pm$ 7,5 ^b	2

	1×10^8	10 ± 5^b	1,5
M5	1×10^6	80 ± 10^a	nd
	1×10^7	70 ± 10^b	nd
	1×10^8	$60 \pm 2,5^b$	nd
MT	1×10^6	100 ± 5^a	nd
	1×10^7	$60 \pm 2,5^b$	nd
	1×10^8	60 ± 5^b	nd
Controle		95 ± 10^a	nd

Sobrevivência (%) $\pm$ Desvio Padrão e Sobrevivência Mediana para larvas de *Ae. aegypti* expostas aos conídios de *M. anisopliae*. Os resultados seguidos pela mesma letra (comparando linhas dentro do mesmo tratamento) não indicam diferenças significativas ao usar o teste post-hoc de Duncan (5% de probabilidade). Os valores para TL_{50} foram calculados usando análise de sobrevivência Log-rank. ND = Não determinado.

Efeito do EO da *E. brejoensis* sob do *M. anisopliae*

O OE de *E. brejoensis* causou a redução das colônias (Figura 3) em todas as concentrações (100;50 e 10 $\mu\text{g/mL}$). As reduções foram de 49,9% 36,7% e 24,5% respectivamente. Já, os valores de UFC foram de 23 ± 2^a para suspensão com OE e 25 ± 3^a para o controle.

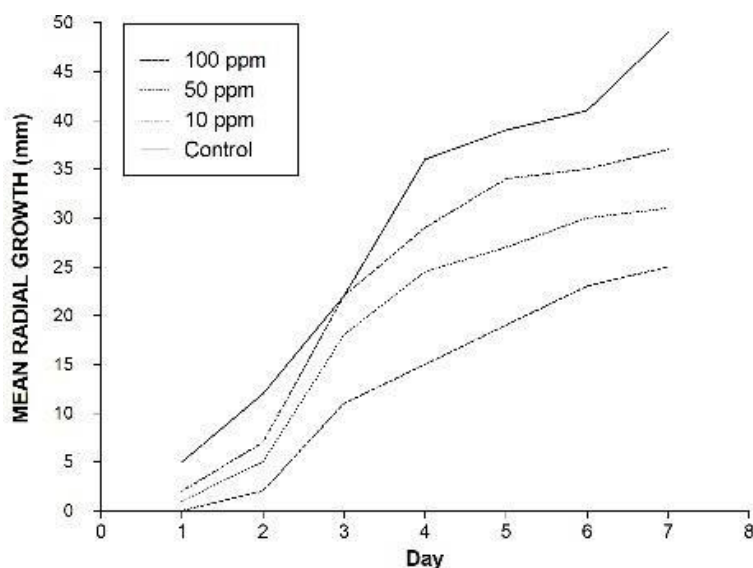


Figura 3 – Curva de crescimento *M. anisopliae* E6 em meio de cultura com OE da *E. brejoensis*

Ensaio da interação *M. anisopliae* e OE da *E. brejoensis*

As curvas de sobrevivência das larvas do *Ae. aegypti* as formulações foram realizadas usando $1/2$ da CL_{50} do OE de *E. brejoensis* e conídios do *M. anisopliae* (1×10^8 , 1×10^7 e 1×10^6 conídios /ml) (Figura 4).

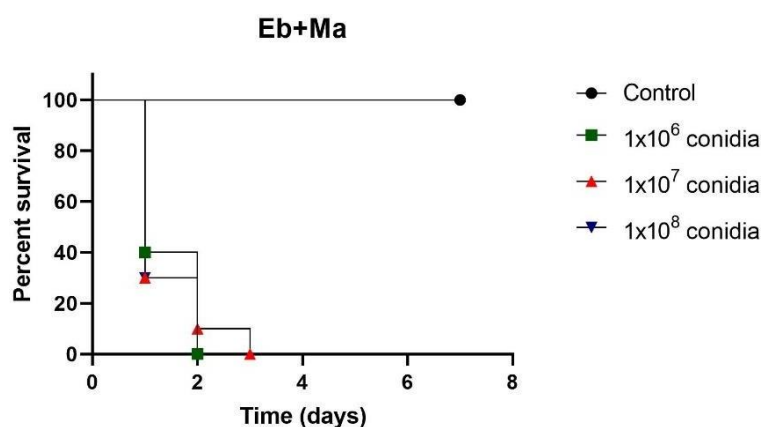


Figura 4 - Curva de sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* em formulações contendo conídios *M. Anisopliae* E6 e EO da *E. brejoensis*

Curva de sobrevivência diária das larvas de *Ae. aegypti* expostas a formulações uma combinação de Eb+Ma. Os resultados são as médias ($\pm$ SE) de três experimentos para cada tratamento com 25 insetos usados por tratamento para cada experimento. Controle: Tween 80.

Todas as combinações obtiveram 100% de letalidade em três dias, diferindo apenas no tempo médio de sobrevivência, variando de 1 a 1,5 dias (tabela 6).

Tabela 6 – Taxa de sobrevivência da interação *M. Anisopliae* E6 e EO da *E. brejoensis*

Tratamento		% Sobrevivência	TL ₅₀
E6	1X10 ⁶	50 $\pm$ 2,5 ^b	6
	1X10 ⁷	20 $\pm$ 7,5 ^b	2
	1X10 ⁸	10 $\pm$ 5 ^b	1,5
E6 + Eb	1X10 ⁶	0 $\pm$ 5 ^b	1,5
	1X10 ⁷	0 $\pm$ 2,5 ^b	1
	1X10 ⁸	0 $\pm$ 2,5 ^b	1
Controle		95 $\pm$ 10 ^a	nd

Sobrevivência (%) $\pm$ Desvio Padrão e Sobrevivência Mediana para larvas de *Ae. aegypti* expostas a uma combinação de E6 + Eb. Os resultados seguidos pela mesma letra (comparando linhas dentro do mesmo tratamento) não indicam diferenças significativas ao usar o teste post-hoc de Duncan (5% de probabilidade). Os valores para TL₅₀ foram calculados usando análise de sobrevivência Log-rank. ND = Não determinado.

DISCUSSÃO

A implementação de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas e vetores de doenças humanas é dificultada pela redução da meia-vida das suspensões fúngicas em condições de campo. Com o objetivo de aumentar a persistência desses fungos e melhorar sua eficácia diversos estudos têm sido realizados em diferentes tecnologias de formulação. Dentre eles, diversas formulações à base de óleo têm sido

utilizadas como adjuvantes de fungos (Camargo *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2015; Paula *et al.*, 2019).

Nossos experimentos demonstraram o potencial de isolados da espécie *M. anisopliae* no controle de larvas de *Ae. aegypti* e pela primeira vez foi observado o efeito larvicida combinatório entre os conídios do *M. anisopliae* associado ao OE de *E. brejoensis*, possibilitando o controle integrado de larvas do mosquito.

A composição química do OE de *E. brejoensis* foi primeiramente relatada por Silva *et al.*, (2015), onde OE era constituído por 31 compostos dentre eles o Δ -cadineno, β -caryophyllene, α -muurolol, α -cadinol e bicyclogermacrene como compostas majoritários. As características químicas e rendimentos dos OE podem variar pela diversidade genéticas, ambientais e fisiopatológicas que influenciam o metabolismo vegetal (Dias *et al.*, 2015). As espécies como *M. sylvatica*, *M. erythroxylon*, *E. piauiensis*, *P. myrsinites* e *P. guajava* pertencentes a família Myrtaceae já foram relatadas apresentando Bicyclogermacrene, E-Cariofileno δ -Cadineno como compostos majoritários (Dias *et al.*, 2015; Mendes *et al.*, 2017; Rosa *et al.*, 2016).

Os OE das espécies da família Myrtaceae em especial pertencentes aos gêneros *Eugenia* L. e *Psidium* L são considerados ativos contra larvas de *Ae. Aegypti* (Park *et al.*, 2011). As espécies do gênero *Eugenia* como a *E. candolleana* com CL₅₀ de 300 ppm (Neves *et al.*, 2017) e *E. piauiensis* com CL₅₀ 230 mg/L já possui seu efeito larvicida descrito (Dias *et al.*, 2015). Segundo Silva *et al.*, (2015) o OE de *E. brejoensis* teve uma LC₅₀ de 214,4 ppm apresentando compostos como Bicyclogermacrene, E-Cariofileno, δ -Cadineno na composição do OE. (E)-cariofileno e seus derivados são frequentemente encontrados nos OE, sendo relatado com propriedades acaricidas, inseticidas, repelentes, atrativas e antifúngicas (Silva *et al.*, 2015).

Os OE possuem uma grande diversidade de classe de metabólitos secundários, sendo constituído principalmente por sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e triterpenos (Pavela *et al.*, 2019). O efeito inseticida dos OE pode ocorrer por meio de ação neurotóxica envolvendo diversos mecanismos, como por exemplo, GABA, sinapses de octopamina e a inibição da acetilcolinesterase (Oliveira *et al.*,

2019; Regnault-Roger, Vincent, and Arnason 2012). Em insetos, a inibição da AChE é estudada porque diversos inseticidas a base compostos organofosforados e carbamatos possuem o mecanismo de inibição de sua atividade, o que prolonga a ação sináptica da acetilcolina, seu substrato natural (Castillo-Morales *et al.*, 2019). Os inibidores deste tipo de mecanismo afetam a transmissão de impulsos nervosos, acumulando acetilcolina na sinapse causando superestimulação dos neurônios, paralisia do tecido neuromuscular, convulsões e morte de insetos (Demirci *et al.*, 2017; Voris *et al.*, 2018).

Dentre os compostos de OE que causam inibição da AChE em insetos estão aqueles com fração monoterpênica. Uma das principais características dos terpenos é a estrutura do hidrocarboneto, que conferem certas propriedades hidrofóbicas (Castillo-Morales *et al.*, 2019). Ryan and Byrne (1988) inferem que compostos hidrofóbicos estão associados à desativação de proteínas e inibição de enzimas; a acetilcolinesterase em particularmente é suscetível a esses compostos. Nossos achados com OE de *E. brejoensis* são corroborados com diversas literaturas. Por exemplo, O OE de *E. sucata* possui um alto teor de (*E*) -cariofileno (24,6%), apresentou atividade antiacetilcolinesterase (IC₅₀ 4,66 µg/mL) (Lima *et al.*, 2012). Segundo Siebert *et al.* (2015) o OE de *E. brasiliensis* apresentaram baixa atividade antiacetilcolinesterase (IC₅₀ > 1000 µg/mL), quando comparados à galantamina de controle (IC₅₀ 6,93 µg/mL). O OE rico em sesquiterpenos de *E. riedeliana* foi capaz de inibir a atividade enzimática até 88,9% na concentração de 600,0 µg.mL⁻¹ (Souza *et al.*, 2010).

A espécie *M. anisopliae* é alvo de diversos trabalhos que mostram a susceptibilidade do *Ae. aegypti* a esse fungo (Falvo *et al.*, 2020; Jemberie *et al.*, 2018; Vivekanandhan *et al.*, 2020). Devido a isto, esta espécie é considerada um bom agente de controle biológico e uma excelente candidata ao desenvolvimento de bioinseticidas para o manejo deste vetor (Falvo *et al.*, 2020; Jemberie *et al.*, 2018).

Os estudos de Gomes *et al.*, (2015) com a linhagem ESALQ818 exibiram uma TL₅₀ 3 dias em concentrações 1×10⁹ e 1×10⁸ conídios, assim corroborando com nossos achados. Já os relatos de Vivekanandhan, Bedini, and Shivakumar (2020) a maior eficácia foi observada nas larvas tratadas com o *M. anisopliae* -VKKH3 obteve uma TL₅₀ de 2,67, o que se assemelhar conosco na linhagem E6 com LT₅₀ de 3 dias.

No mesmo trabalho (Vivekanandhan, Bedini, and Shivakumar 2020) relata resultados com outras espécies de fungos entomopatogênicos com ação contra as larvas do *Ae. aegypti*, *bassiana* -VKBb03 (TL₅₀ 5,91) e *V. lecanii*- VKPH1 (7,17). O fungo *T. cylindrosporum* descrito por Rocha *et al.*, (2015) , apresentou TL₅₀ ($\leq 4 \cdot 6$ dias) e TL₉₀ ($\leq 7 \cdot 5$ dias) contra as larvas do *Ae. aegypti* na concentração 3.3×10^6 conídios/ml com a linhagem ARSEF 2912.

Os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* são adaptados para infectar hospedeiros terrestres, sendo que nas larvas de mosquitos não ocorre adesão dos conídios à superfície da cutícula e não germinem através de tegumentos na hemocele e nem penetram a parede intestinal (Noskov *et al.*, 2019). Assim, a interação patógeno-hospedeiro não ocorre de forma "clássica", a liberação de proteases ligadas nas superfícies dos conídios ingeridos, induzem um estresse oxidativo levando a uma apoptose induzida causando as mortes das larvas do *Ae. aegypti* (Butt *et al.*, 2013; Wasinpiyamongkol and Kanchanaphum 2019).

A eficiência da interação dos conídios do *M. anisopliae* com produtos naturais e sintéticos já foi relatada por outros autores, como Gomes *et al.*, 2015. Onde, as larvas do *Ae. aegypti* foram expostas há formulações de conídios e óleo fixo da semente de nim (*Azadirachta indica*). O valor de S₅₀ para larvas expostas apenas ao fungo foram de 3 dias, enquanto uma combinação de fungo (10^8 conídios ml⁻¹) e óleo fixo nim exibiu o valor TL₅₀ de 2 dias (Gomes *et al.*, 2015). Assim como nas larvas de *Ae. aegypti*, as formulações com óleo do nim e conídios *M. anisopliae* contra as larvas de *An. Gambiae* apresentaram resultados melhores do que separados (Seye *et al.*, 2013).

Em outro estudo, o *M. anisopliae* sl ou *B. bassiana* sl resultaram em TL₅₀ de 6 a 7 dias. Enquanto, a formulação com a combinação de óleo mineral e *M. anisopliae* sl ou *B. bassiana* sl resultou numa taxa de sobrevivência média 2 dias contra as larvas do *Ae. aegypti* para ambas combinações (Bitencourt *et al.*, 2018). O fungo *M. robertsii* e o antiparasitário avermectina resultaram em 55 e 57% de mortalidade, respectivamente sobre as larvas do *Ae. aegypti*, enquanto o tratamento combinado levou a 99% de mortalidade (Noskov *et al.*, 2019). Bukhari, Takken, and Koenraadt (2011) também relata o aumento da eficácia do *M. anisopliae* formulado com óleos sintéticos Shellsol T e Ondina para controle de larvas de *An. stephensi* e *A. gambiae*,

inferindo que ocorre uma melhor distribuição dos conídios na superfície da água, promovida pelos óleos. Os óleos minerais e vegetais são usados em formulações como adjuvantes para proteger conídios e maximizar o desempenho fungos entomopatogênicos (Camargo *et al.*, 2012). Os óleos auxiliam disseminação dos conídios nas soluções aquosas, maximizando o contato entre o sifão das larvas e os fungos (Bitencourt *et al.*, 2021).

A abordagem atual usando uma combinação OE e o fungo (Eb+Ma) possui vários benefícios. Além de aumentar a mortalidade larval total, também foi capaz de reduzir o tempo médio de mortalidade. Assim, exibindo ser um método alternativo e promissor no controle biológico integrado de larvas de *Ae. aegypti*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) e também ao projeto licuri (403583/2020-9).

Referência

- Achee, Nicole L. *et al.*, 2019. "Alternative Strategies for Mosquito-Borne Arbovirus Control." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(1): 1–22.
- Adams, Robert.P. 2007. "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition." *Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream*: 804–6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.018>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3853939&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.017>.
- Autran, E. S. *et al.*, 2009. "Chemical Composition, Oviposition Deterrent and Larvicidal Activities against *Aedes Aegypti* of Essential Oils from *Piper Marginatum* Jacq. (Piperaceae)." *Bioresource Technology* 100(7): 2284–88.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.055>.
- Azmir, J. *et al.*, 2013. "Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review." *Journal of Food Engineering* 117(4): 426–36.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
- Benelli, Giovanni *et al.*, 2019. "Carlina Oxide from *Carlina Acaulis* Root Essential Oil

Acts as a Potent Mosquito Larvicide.” *Industrial Crops and Products* 137(February): 356–66. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.037>.

Bilal, Hazrat, Soaib Ali Hassan, and Imtihan Akram Khan. 2012. “Isolation and Efficacy of Entomopathogenic Fungus (*Metarhizium Anisopliae*) for the Control of *Aedes Albopictus* Skuse Larvae: Suspected Dengue Vector in Pakistan.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(4): 298–300.

Bitencourt, R O B *et al.*, 2018. “In Vitro Control of *Aedes Aegypti* Larvae Using *Beauveria Bassiana*.” 12(10).

Bukhari, Tullu, Willem Takken, and Constantianus J.M. Koenraadt. 2011. “Development of *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* Formulations for Control of Malaria Mosquito Larvae.” *International Pest Control* 53(2): 84.

Butt, Tariq M. *et al.*, 2013. “*Metarhizium Anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death.” *PLoS ONE* 8(12).

Cabral, Sara *et al.*, 2020. “*Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Immune Responses with Different Feeding Regimes Following Infection by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae*.” *Insects* 11(2).

Camargo, Mariana G. *et al.*, 2012. “Effect of Oil-Based Formulations of Acaripathogenic Fungi to Control *Rhipicephalus Microplus* Ticks under Laboratory Conditions.” *Veterinary Parasitology* 188(1–2): 140–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.012>.

Dias, Clarice Noleto *et al.*, 2015. “Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal AMAZON Plants against *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae).” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015.

Falvo, Marianel L. *et al.*, 2020. “Adulticidal Activity of *Metarhizium Anisopliae* s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Native Strains from Argentina Against *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae).” *Journal of Medical Entomology* 57(2): 636–40.

Gomes, Simone A. *et al.*, 2015. “Neem Oil Increases the Efficiency of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae* for the Control of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae.” *Parasites and Vectors* 8(1): 1–8. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1280-9>.

Greenfield, Bethany P.J., Alex M. Lord, Ed Dudley, and Tariq M. Butt. 2014. “Conidia of the Insect Pathogenic Fungus, *Metarhizium Anisopliae*, Fail to Adhere to Mosquito Larval Cuticle.” *Royal Society Open Science* 1(2).

Iwamura, Takuya, Adriana Guzman-Holst, and Kris A. Murray. 2020. “Accelerating Invasion Potential of Disease Vector *Aedes Aegypti* under Climate Change.” *Nature Communications* 11(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16010-4>.

Jemberie, Wondmeneh *et al.*, 2018. “Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium Anisopliae* against Dengue Virus Mosquitoes *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae).” 43(1): 7–18.

Manh, Ho Dung. 2020. “Larvicidal and Repellent Activity of *Mentha Arvensis* L .” : 1–9.

Marques, André M. *et al.*, 2017. “Larvicidal Activity of *Ottonia Anisum* Metabolites against *Aedes Aegypti*: A Potential Natural Alternative Source for Mosquito Vector

Control in Brazil." *Journal of Vector Borne Diseases* 54(1): 61–68.

Mascarin, Gabriel Moura *et al.*, 2016. "Improved Shelf Life of Dried *Beauveria Bassiana* Blastospores Using Convective Drying and Active Packaging Processes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(19): 8359–70.

Mendes, Luiza Alves *et al.*, 2017. "Larvicidal Effect of Essential Oils from Brazilian Cultivars of Guava on *Aedes Aegypti* L." *Industrial Crops and Products* 108(July): 684–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.034>.

Neves, Ilzenayde De A. *et al.*, 2017. "Composition and Larvicidal Activity of Essential Oil of *Eugenia Candolleana* DC. (MYRTACEAE) against *Aedes Aegypti*." *Revista Virtual de Quimica* 9(6): 2305–15.

Noskov, Yuriy A. *et al.*, 2019. "Combined Effect of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Robertsii* and Avermectins on the Survival and Immune Response of *Aedes Aegypti* Larvae." *PeerJ* 2019(10): 1–23.

de Oliveira Barbosa Bitencourt, Ricardo *et al.*, 2020. "Larvicidal Activity, Route of Interaction and Ultrastructural Changes in *Aedes Aegypti* Exposed to Entomopathogenic Fungi." *Acta Tropica* 213(October 2020).

———. 2021. "Larvicidal Activity, Route of Interaction and Ultrastructural Changes in *Aedes Aegypti* Exposed to Entomopathogenic Fungi." *Acta Tropica* 213(August 2020).

de Oliveira, Bruna M.S. *et al.*, 2019. "Essential Oils from *Varronia Curassavica* (Cordiaceae) Accessions and Their Compounds (E)-Caryophyllene and α -Humulene as an Alternative to Control *Dorymyrmex Thoracius* (Formicidae: Dolichoderinae)." *Environmental Science and Pollution Research* 26(7): 6602–12.

Park, Hye Mi *et al.*, 2011. "Larvicidal Activity of Myrtaceae Essential Oils and Their Components against *Aedes Aegypti*, Acute Toxicity on *Daphnia Magna*, and Aqueous Residue." *Journal of Medical Entomology* 48(2): 405–10.

Patterson, Jessica, Maura Sammon, and Manish Garg. 2016. "Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World." *Western Journal of Emergency Medicine* 17(6): 671–79.

Paula, Adriano R. *et al.*, 2019. "Neem Oil Increases the Persistence of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae* for the Control of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae." *Parasites and Vectors* 12(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3415-x>.

Pavela, Roman, Filippo Maggi, Romilde Iannarelli, and Giovanni Benelli. 2019. "Plant Extracts for Developing Mosquito Larvicides: From Laboratory to the Field, with Insights on the Modes of Action." *Acta Tropica* 193(December 2018): 236–71.

Regnault-Roger, Catherine, Charles Vincent, and John Thor Arnason. 2012. "Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World." *Annual Review of Entomology* 57: 405–24.

Rocha, L. F.N. *et al.*, 2015. "Efficacy of *Tolypocladium Cylindrosporum* against *Aedes Aegypti* Eggs, Larvae and Adults." *Journal of Applied Microbiology* 119(5): 1412–19.

ROSA, C.S *et al.*, 2016. "Composição Química e Toxicidade Frente *Aedes Aegypti* L. e *Artemia Salina* Leach Do Óleo Essencial Das Folhas de *Myrcia Sylvatica* (G . Mey .) DC ." *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 18: 19–26.

- Seye, F *et al.*, 2013. "Laboratory and Semi-Field Environment Tests for the Control Efficacy of *Metarhizium Anisopliae* Formulated with Neem Oil (Suneem) against *Anopheles Gambiae* s.l. Adult Emergence." *Academia Journal of Biotechnology* 1(3): 46–52. http://academiapublishing.org/ajb/pdf/2013/March/Seye_et_al.,pdf.
- da Silva, Alexandre Gomes *et al.*, 2015. "Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia Brejoensis* Mazine (Myrtaceae)." *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 18(6): 1441–47.
- Da Silva, Rayane Cristine Santos *et al.*, 2015. "(E)-Caryophyllene and α -Humulene: *Aedes Aegypti* Oviposition Deterrents Elucidated by Gas Chromatography-Electrophysiological Assay of *Commiphora Leptophloeos* Leaf Oil." *PLoS ONE* 10(12): 1–14.
- Silvério, Máira Rosato Silveiral, Laila Salmen Espindola, Norberto Peporine Lopes, and Paulo Cézar Vieira. 2020. "Plant Natural Products for the Control of *Aedes Aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses." *Molecules* 25(15).
- Vivekanandhan, P., S. Bedini, and M. S. Shivakumar. 2020. "Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungus from Eastern Ghats of South Indian Forest Soil and Their Efficacy as Biopesticide for Mosquito Control." *Parasitology International* 76(June 2019).
- Vivekanandhan, Perumal *et al.*, 2020. "Larvicidal Toxicity of *Metarhizium Anisopliae* Metabolites against Three Mosquito Species and Non-Targeting Organisms." *PLoS ONE* 15(5): 1–18. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0232172>.
- Wasinpiyamongkol, Ladawan, and Panan Kanchanaphum. 2019. "Isolating and Identifying Fungi to Determine Whether Their Biological Properties Have the Potential to Control the Population Density of Mosquitoes." *Heliyon* 5(8): e02331. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02331>.

5 CONCLUSÕES

- O OE de *E. brejoensis* apresentou baixas concentrações letais contra as larvas do mosquito *Ae. aegypti*;
- O efeito larvicida do OE de *E. brejoensis* está associado a inibição da acetilcolinesterase;
- Todas as linhagens do *M. anisopliae* no presente estudo exibiram efeito larvicida com destaque para a linhagem E6, que exibiu os menores tempo de letalidade e taxa de sobrevivência;
- As formulações Eb+Ma foram mais efetivas em relação aos dois componentes isoladamente;
- Formulações contendo OE de *E. brejoensis* e conídios do *M. anisopliae* podem ser um método alternativo e promissor no controle biológico integrado de larvas de *Ae. aegypti*.

6 DECLARAÇÃO DO AUTOR

Em setembro de 2014 ingressei na Universidade Federal de Pernambuco, no curso de Ciências Biológicas com Ênfase em Ciências Ambientais. Nesta instituição tive a oportunidade de receber uma educação gratuita, de qualidade e humanística. No meu processo de formação profissional conheci pessoas que me mostraram o quanto a ciência é bela e importante para uma sociedade. Logo, já queria descobrir meu lugar na ciência.

Meus primeiros passos na ciência foram em 2015, como iniciação científica no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica, sob orientação da Profa. Dr. Márcia Vanusa. Nessa época, acompanhava os estudos sobre resistência bacteriana de isolados ambientais. Posteriormente, em meados de 2016, a pedido da Profa. Márcia, comecei a pesquisar sobre plantas da Caatinga e suas aplicações em atividades antioxidantes, antimicrobianas e inseticidas. Já nos dois últimos anos da graduação, me dediquei em desenvolver pesquisas para o controle do *Ae. aegypti*, juntamente com meu amigo e coorientador Dr. Alexandre Gomes, que na época era pós-doc do grupo Nbiocaat. Além disso, minha graduação não se limitou ao ensino e pesquisa. Sempre que podia, estava envolvido em ações de extensão, para popularização da ciência sobre as plantas medicinais da Caatinga em escolas da rede pública na região metropolitana do Recife e nas comunidades tradicionais do interior de Pernambuco e Bahia.

Em 2019, dando continuidade à minha formação acadêmica, ingressei no curso de mestrado do PPGCB/UFPE. Pude então vivenciar várias experiências engrandecedoras. Uma delas foi poder passar um semestre conhecendo e desenvolvendo projetos no Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular de Fungos do meu orientador Prof. Dr. Augusto Schrank no PPGBCM/UFRGS. Nesse período, aprendi e desenvolvi várias técnicas e habilidades que foram fundamentais no meu processo de formação. Não posso esquecer dos meus colegas de laboratório do CBIOT, que me proporcionaram grandes aventuras acadêmicas e pessoais. No mestrado também continuei atuando como extensionista com o projeto ECOLUMÉ, promovendo palestras e cursos em escolas do interior pernambucano.

Ademais, a ideia de desenvolver um método alternativo para controle do

mosquito *Ae. aegypti* na minha dissertação veio da necessidade de diminuir a incidência de casos de arboviroses no estado de Pernambuco. No processo de desenvolvimento desse método alternativo, pensamos em propor algo que atendesse os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Em particular, os objetivos de “produção e consumo sustentáveis” e “ecossistemas terrestres e biodiversidade”, trazendo notoriedade também para flora da Caatinga. Para isso, é fundamental estudar os potenciais da flora do bioma Caatinga, de modo a trazer o desenvolvimento sustentável e conservação para esta região. Assim, futuramente promover outras ODS como as de “redução das desigualdades” e “erradicação da pobreza”.

Por fim, sou extremamente grato por ter chegado até aqui, lutando contra todas as adversidades encontradas pelo meu caminho. Sou grato por ter criado várias relações pessoais e ter vivido experiências que me tornam um pesquisador mais habilidoso e comprometido.

Gratidão!

7 SÚMULA CURRICULAR

Artigo

- Chemodiversity and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Leaves of *Croton argyrophyllus*
Lidiane Gomes de Araújo, Germano Veras, João Victor de Oliveira Alves, Bruno Oliveira de Veras, Márcia Vanusa da Silva, José Filipe Bacalhau Rodrigues, Marcus Vinicius Lia Fook , Solomon Kweku Sagoe Amoah , Maria da Conceição de Menezes Torres
- <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000575>
- Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activity from *Hymenaea rubriflora* Ducke (Fabaceae) leaf extract
Paulo Henrique Oliveira de Miranda, Graziela Claudia da Silva, Luciclaudio Cassimiro de Amorim, João Victor de Oliveira Alves, Caio Rodrigo Dias de Assis, Michelle Melgarejo da Rosa, Maria Tereza dos Santos Correia, Márcia Vanusa da Silva -
<https://doi.org/10.34115/basrv4n5-038>

Coorientação

- Roger Luis da Silva (PIBIC/UFPE) – Atividade antimicrobiana e antivirulência do extrato aquoso da *Pseudobombax marginatum* frente à *Staphylococcus aureus*;
- Luiz Paulo Bezerra da Rocha (TCC) – Perfil fitoquímico e Análise da capacidade antioxidante e fotoprotetora de *Schinopsis brasiliensis* e *Cenostigma pyramidale*.

REFERÊNCIAS

- Achee, Nicole L. *et al.*, 2019. "Alternative Strategies for Mosquito-Borne Arbovirus Control." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(1): 1–22.
- Al-Massarani, Shaza *et al.*, 2019. "Assessment of Selected Saudi and Yemeni Plants for Mosquitocidal Activities against the Yellow Fever Mosquito *Aedes Aegypti*." *Saudi Pharmaceutical Journal* 27(7): 930–38.
- Alkhaibari, Abeer M. *et al.*, 2016. "Metarhizium Brunneum Blastospore Pathogenesis in *Aedes Aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality." *PLoS Pathogens* 12(7).
- Amaral, J. Kennedy, Joshua B. Bilsborrow, and Robert T. Schoen. 2020. "Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid Arthritis: What They Have in Common." *American Journal of Medicine* 133(3): e91–97.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.10.005>.
- Araújo, Ana Paula *et al.*, 2013. "The Susceptibility of *Aedes Aegypti* Populations Displaying Temephos Resistance to *Bacillus Thuringiensis* Israelensis: A Basis for Management." *Parasites and Vectors* 6(1): 1–9.
- Barbosa, Patrícia Batista Barra Medeiros *et al.*, 2014. "Evaluation of Seed Extracts from Plants Found in the Caatinga Biome for the Control of *Aedes Aegypti*." *Parasitology Research* 113(10): 3565–80.
- Benelli, Giovanni *et al.*, 2019. "Carlina Oxide from *Carlina Acaulis* Root Essential Oil Acts as a Potent Mosquito Larvicide." *Industrial Crops and Products* 137(February): 356–66. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.037>.
- Benelli, Giovanni, and Mary Frances Duggan. 2018. "Management of Arthropod Vector Data – Social and Ecological Dynamics Facing the One Health Perspective." *Acta Tropica* 182(January): 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.015>.
- Beys-da-Silva, Walter O. *et al.*, 2020. "Updating the Application of *Metarhizium Anisopliae* to Control Cattle Tick *Rhipicephalus Microplus* (Acari: Ixodidae)." *Experimental Parasitology* 208(August 2019): 107812.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>.
- Bezerra Filho, Clovis Macêdo *et al.*, 2020. "Antimicrobial and Antivirulence Action of *Eugenia Brejoensis* Essential Oil in Vitro and in Vivo Invertebrate Models." *Frontiers in Microbiology* 11(March): 1–11.
- Bilal, Hazrat, Soaib Ali Hassan, and Imtinan Akram Khan. 2012. "Isolation and Efficacy of Entomopathogenic Fungus (*Metarhizium Anisopliae*) for the Control of *Aedes Albopictus* Skuse Larvae: Suspected Dengue Vector in Pakistan." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(4): 298–300.
- Boyce, R. *et al.*, 2013. "*Bacillus Thuringiensis* Israelensis (Bti) for the Control of Dengue Vectors: Systematic Literature Review." *Tropical Medicine and International Health* 18(5): 564–77.
- Braga, Ima Aparecida *et al.*, 2000. "Comparação Entre Pesquisa Larvária e Armadilha de Oviposição, Para Detecção de *Aedes Aegypti*." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(4): 347–53.
- Braga, Ima Aparecida, and Denise Valle. 2007. "*Aedes Aegypti*: Inseticidas,

Mecanismos de Ação e Resistência .” *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 179–293.

Brancini, Guilherme T.P. *et al.*, 2018. “Species of the *Metarhizium Anisopliae* Complex with Diverse Ecological Niches Display Different Susceptibilities to Antifungal Agents.” *Fungal Biology* 122(6): 563–69.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.004>.

Brown, Julia E. *et al.*, 2011. “Worldwide Patterns of Genetic Differentiation Imply Multiple ‘domestications’ of *Aedes Aegypti*, a Major Vector of Human Diseases.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278(1717): 2446–54.

———. 2014. “Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes Aegypti*, the Dengue and Yellow Fever Mosquito.” *Evolution* 68(2): 514–25.

Bukhari, Tullu, Willem Takken, and Constantianus J.M. Koenraadt. 2011. “Development of *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* Formulations for Control of Malaria Mosquito Larvae.” *International Pest Control* 53(2): 84.

Butt, Tariq M. *et al.*, 2013. “*Metarhizium Anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death.” *PLoS ONE* 8(12).

Cabral, Aline Diniz *et al.*, 2021. “Original Article.” : 1–13.

Cabral, Sara *et al.*, 2020. “*Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Immune Responses with Different Feeding Regimes Following Infection by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae*.” *Insects* 11(2).

Cardoso, Denise de Oliveira, Vicente Martins Gomes, Claudia Dolinski, and Ricardo Moreira Souza. 2015. “Potential of Entomopathogenic Nematodes as Biocontrol Agents of Immature Stages of *Aedes Aegypti*.” *Nematoda* 2(1).

Carlson, Colin J., Eric R. Dougherty, and Wayne Getz. 2016. “An Ecological Assessment of the Pandemic Threat of Zika Virus.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(8): 1–19.

de Carvalho, George Harrison Ferreira *et al.*, 2019. “Larvicidal and Pupicidal Activities of Eco-Friendly Phenolic Lipid Products from *Anacardium Occidentale* Nutshell against Arbovirus Vectors.” *Environmental Science and Pollution Research* 26(6): 5514–23.

Cavalcanti, L.P.G. *et al.*, 2007. “Competência de Peixes Como Predadores de Larvas de *Aedes Aegypti*, Em Condições de Laboratório.” *Revista de Saúde Pública* 41(4): 638–44.

Christian, Kimberly M., Hongjun Song, and Guo Li Ming. 2019. “Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System.” *Annual Review of Neuroscience* 42: 249–69.

Corbel, Vincent *et al.*, 2016. “Tracking Insecticide Resistance in Mosquito Vectors of Arboviruses: The Worldwide Insecticide Resistance Network (WIN).” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(12): 10–13.

da Costa, Jamile S. *et al.*, 2020. “Essentials Oils from Brazilian *Eugenia* and *Syzygium* Species and Their Biological Activities.” *Biomolecules* 10(8): 1–36.

Daniel, J.F.S. *et al.*, 2017. “Larvicidal Activity of *Beauveria Bassiana* Extracts against *Aedes Aegypti* and Identification of Beauvericins.” *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28(6): 1003–13.

- Ducheyne, Els *et al.*, 2018. "Current and Future Distribution of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae) in WHO Eastern Mediterranean Region." *International Journal of Health Geographics* 17(1): 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12942-018-0125-0>.
- Eisen, Lars *et al.*, 2014. "The Impact of Temperature on the Bionomics of *Aedes* (*Stegomyia*) *Aegypti*, with Special Reference to the Cool Geographic Range Margins." *Journal of Medical Entomology* 51(3): 496–516.
- Eisen, Lars, and Chester G. Moore. 2013. "*Aedes* (*Stegomyia*) *Aegypti* in the Continental United States: A Vector at the Cool Margin of Its Geographic Range." *Journal of Medical Entomology* 50(3): 467–78.
- Evans, Harry C., Simon L. Elliot, and Robert W. Barreto. 2018. "Entomopathogenic Fungi and Their Potential for the Management of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 113(3): 206–14.
- Falvo, Marianel L. *et al.*, 2020. "Adulticidal Activity of *Metarhizium Anisopliae* s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Native Strains from Argentina Against *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae)." *Journal of Medical Entomology* 57(2): 636–40.
- Farag, Nermeen F. *et al.*, 2018. "Characterization of Essential Oils from Myrtaceae Species Using ATR-IR Vibrational Spectroscopy Coupled to Chemometrics." *Industrial Crops and Products* 124(August): 870–77.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.066>.
- Ferraris, Pauline, Hans Yssel, and Dorothée Missé. 2019. "Zika Virus Infection: An Update." *Microbes and Infection* 21(8–9): 353–60.
- Go, Yun Young, Udeni B. R. Balasuriya, and Chong-kyo Lee. 2014. "Zoonotic Encephalitides Caused by Arboviruses: Transmission and Epidemiology of Alphaviruses and Flaviviruses." *Clinical and Experimental Vaccine Research* 3(1): 58.
- Gomes, Simone A. *et al.*, 2015. "Neem Oil Increases the Efficiency of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae* for the Control of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae." *Parasites and Vectors* 8(1): 1–8.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1280-9>.
- Gould, Ernest *et al.*, 2017. "Emerging Arboviruses: Why Today?" *One Health* 4(July): 1–13.
- Greenfield, Bethany P.J., Alex M. Lord, Ed Dudley, and Tariq M. Butt. 2014. "Conidia of the Insect Pathogenic Fungus, *Metarhizium Anisopliae*, Fail to Adhere to Mosquito Larval Cuticle." *Royal Society Open Science* 1(2).
- Hafiz, Muhammad Yusuf, Syed Uzair Mahmood, Maria Shoaib, and Farah Hafiz Yusuf. 2016. "Concern over Zika Virus Outbreak: Another Alarming Global Threat." *Infection and Drug Resistance* 9: 149–51.
- Harapan, Harapan, Alice Michie, R. Tajo Sasmono, and Allison Imrie. 2020. "Dengue: A Minireview." *Viruses* 12(8): 1–35.
- Hoffmann, Ary. 2020. "Wolbachia." *Current Biology* 30(19): R1113–14.
- Hu, Xiao *et al.*, 2014. "Trajectory and Genomic Determinants of Fungal-Pathogen Speciation and Host Adaptation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(47): 16796–801.
- Iwamura, Takuya, Adriana Guzman-Holst, and Kris A. Murray. 2020. "Accelerating

- Invasion Potential of Disease Vector *Aedes Aegypti* under Climate Change.” *Nature Communications* 11(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16010-4>.
- Jacups, Susan P. *et al.*, 2013. “*Bacillus Thuringiensis* Var. *Israelensis* Misting for Control of *Aedes* in Cryptic Ground Containers in North Queensland, Australia.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88(3): 490–96.
- Kamal, Mahmoud *et al.*, 2018. “Mapping the Global Potential Distributions of Two Arboviral Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus* under Changing Climate.” *PLoS ONE* 13(12): 1–21.
- Karthi, Sengodan *et al.*, 2020. “Target Activity of *Isaria Tenuipes* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Fungal Strains against Dengue Vector *Aedes Aegypti* (Linn.) and Its Non-Target Activity against Aquatic Predators.” *Journal of Fungi* 6(4): 1–14.
- Khan, Sehroon *et al.*, 2012. “Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent.” *Molecular Plant Breeding* (January 2012).
- Kim, Jong Cheol *et al.*, 2020. “Colonization of *Metarhizium Anisopliae* on the Surface of Pine Tree Logs: A Promising Biocontrol Strategy for the Japanese Pine Sawyer, *Monochamus Alternatus*.” *Fungal Biology* 124(2): 125–34. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.12.006>.
- Kraemer, Moritz U.G. *et al.*, 2015. “The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus*.” *eLife* 4(JUNE2015): 1–18.
- Lacey, L. A. *et al.*, 2015. “Insect Pathogens as Biological Control Agents: Back to the Future.” *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- St. Leger, Raymond J., and Jonathan B. Wang. 2020. “*Metarhizium*: Jack of All Trades, Master of Many .” *Open Biology* 10(12): 200307.
- Leles, Renan Nunes *et al.*, 2010. “Pathogenicity of Some Hypocrealean Fungi to Adult *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae).” *Parasitology Research* 107(5): 1271–74.
- Leta, Samson *et al.*, 2018. “Global Risk Mapping for Major Diseases Transmitted by *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*.” *International Journal of Infectious Diseases* 67: 25–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>.
- López Lastra, C. C., A. C. Scorsetti, G. A. Marti, and J. J. García. 2004. “Host Range and Specificity of an Argentinean Isolate of the Aquatic Fungus *Leptolegnia Chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales), a Pathogen of Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae).” *Mycopathologia* 158(3): 311–15.
- Lovett, Brian, and Raymond J. St. Leger. 2017. “The Insect Pathogens.” *The Fungal Kingdom*: 925–43.
- Luis, Patricia *et al.*, 2019. “*Aedes Albopictus* Mosquitoes Host a Locally Structured Mycobiota with Evidence of Reduced Fungal Diversity in Invasive Populations.” *Fungal Ecology* 39: 257–66.
- Luz, Christian *et al.*, 2010. “A New Resting Trap to Sample Fungus-Infected Mosquitoes, and the Pathogenicity of *Lecanicillium Muscarium* to Culicid Adults.” *Acta Tropica* 116(1): 105–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.05.001>.
- Luz, Tássio Rômulo Silva Araújo, Ludmilla Santos Silva de Mesquita, Flavia Maria Mendonça do Amaral, and Denise Fernandes Coutinho. 2020. “Essential Oils and Their Chemical Constituents against *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Larvae.”

Acta Tropica 212(September): 105705.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105705>.

Manh, Ho Dung. 2020. "Larvicidal and Repellent Activity of *Mentha Arvensis* L ." : 1–9.

Mannino, M. Constanza, Carla Huarte-Bonnet, Belén Davyt-Colo, and Nicolás Pedrini. 2019. "Is the Insect Cuticle the Only Entry Gate for Fungal Infection? Insights into Alternative Modes of Action of Entomopathogenic Fungi." *Journal of Fungi* 5(2).

María, L, Susana R Cagnolo, and R Walter. 2014. "Susceptibility of Larvae of *Aedes Aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) to Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis Bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae)." *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 73(3–4): 99–108.

Marques, André M. *et al.*, 2017. "Larvicidal Activity of *Ottonia Anisum* Metabolites against *Aedes Aegypti*: A Potential Natural Alternative Source for Mosquito Vector Control in Brazil." *Journal of Vector Borne Diseases* 54(1): 61–68.

Mascarin, Gabriel Moura *et al.*, 2016. "Improved Shelf Life of Dried *Beauveria Bassiana* Blastospores Using Convective Drying and Active Packaging Processes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(19): 8359–70.

Matthews, Benjamin J. 2019. "*Aedes Aegypti*." *Trends in Genetics* 35(6): 470–71. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.03.005>.

Mazine, Fiorella F., and Jair Eustáquio Quintino De Faria. 2013. "A New Species of *Eugenia* (Myrtaceae) from South America." *Phytotaxa* 151(1): 53–57.

Mendes, J. F. *et al.*, 2018. "Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Eugenia Brejoensis* Essential Oil Nanoemulsions against *Pseudomonas Fluorescens*." *Lwt* 93(April): 659–64. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.015>.

de Mendonça, Silvana F. *et al.*, 2021. "Evaluation of *Aedes Aegypti*, *Aedes Albopictus*, and *Culex Quinquefasciatus* Mosquitoes Competence to Oropouche Virus Infection." *Viruses* 13(5).

Merritt, R. W., R. H. Dadd, and E. D. Walker. 1992. "Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes." *Annual Review of Entomology* 37(1): 349–76.

Miranpuri, G. S., and G. G. Khachatourians. 1991. "Infection Sites of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria Bassiana* in the Larvae of the Mosquito *Aedes Aegypti*." *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59(1): 19–27.

Mongkolsamrit, S. *et al.*, 2020. "Revisiting *Metarhizium* and the Description of New Species from Thailand." *Studies in Mycology* 95(May): 171–251.

Montalva, Cristian *et al.*, 2016. "Conidiobolus Macrosporus (Entomophthorales), a Mosquito Pathogen in Central Brazil." *Journal of Invertebrate Pathology* 139: 102–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.003>.

Moyes, Catherine L. *et al.*, 2021. "Correction to: Contemporary Status of Insecticide Resistance in the Major *Aedes* Vectors of Arboviruses Infecting Humans (PLoS Negl Trop Dis)." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15(1): 1–2.

Muturi, Ephantus J., Jeffrey J. Bara, Alejandro P. Rooney, and Allison K. Hansen. 2016. "Midgut Fungal and Bacterial Microbiota of *Aedes Triseriatus* and *Aedes Japonicus* Shift in Response to La Crosse Virus Infection." *Molecular ecology* 25(16): 1–12.

4075–90.

Nazni, Wasi A. *et al.*, 2019. “Establishment of Wolbachia Strain WALbB in Malaysian Populations of *Aedes Aegypti* for Dengue Control.” *Current Biology* 29(24): 4241-4248.e5.

Noskov, Yuriy A. *et al.*, 2019. “Combined Effect of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Robertsii* and Avermectins on the Survival and Immune Response of *Aedes Aegypti* Larvae.” *PeerJ* 2019(10): 1–23.

Of, Against J S, Heterodera Avenae, Samaneh Ghayedi, and Mohammad Abdollahi. 2013. “(Hypocreales : Clavicipitaceae), Isolated From Suppressive Soils of the Boyer-Ahmad Region.” *Journal of Plant Protection Research* 53(2): 165–71.

de Oliveira Barbosa Bitencourt, Ricardo *et al.*, 2020. “Larvicidal Activity, Route of Interaction and Ultrastructural Changes in *Aedes Aegypti* Exposed to Entomopathogenic Fungi.” *Acta Tropica* 213(October 2020).

Oliveira de Souza, Larissa Isabela *et al.*, 2017. “The Chemical Composition and Trypanocidal Activity of Volatile Oils from Brazilian Caatinga Plants.” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 96(August): 1055–64.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121>.

Oliveira, Patrícia V. *et al.*, 2010. “Larvicidal Activity of 94 Extracts from Ten Plant Species of Northeastern of Brazil against *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae).” *Parasitology Research* 107(2): 403–7.

Pacheco Borges, Larissa, and Víctor Alves Amorim. 2020. “Metabólitos Secundários De Plantas Secondary Plant Metabolites.” *Revista Agrotecnologia, Ipameri* (11): 54–67.

Paixão, Enny S., Maria Gloria Teixeira, and Laura C. Rodrigues. 2018. “Zika, Chikungunya and Dengue: The Causes and Threats of New and Reemerging Arboviral Diseases.” *BMJ Global Health* 3: 1–6.

Palma, Leopoldo *et al.*, 2014. “*Bacillus Thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity.” *Toxins* 6(12): 3296–3325.

Patterson, Jessica, Maura Sammon, and Manish Garg. 2016. “Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World.” *Western Journal of Emergency Medicine* 17(6): 671–79.

Paul, Binoy J., and Shajit Sadanand. 2018. “Chikungunya Infection: A Re-Emerging Epidemic.” *Rheumatology and Therapy* 5(2): 317–26. <https://doi.org/10.1007/s40744-018-0121-7>.

Paula, Adriano R. *et al.*, 2019. “Neem Oil Increases the Persistence of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae* for the Control of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae.” *Parasites and Vectors* 12(1): 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3415-x>.

de Paulo Farias, David, Iramaia Angélica Neri-Numa, Fábio Fernandes de Araújo, and Glaucia Maria Pastore. 2020. “A Critical Review of Some Fruit Trees from the Myrtaceae Family as Promising Sources for Food Applications with Functional Claims.” *Food Chemistry* 306(September 2019): 125630.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125630>.

Pavela, Roman, Filippo Maggi, Romilde Iannarelli, and Giovanni Benelli. 2019. “Plant

Extracts for Developing Mosquito Larvicides: From Laboratory to the Field, with Insights on the Modes of Action.” *Acta Tropica* 193(December 2018): 236–71.

Pielnaa, Paul *et al.*, 2020. “Zika Virus-Spread, Epidemiology, Genome, Transmission Cycle, Clinical Manifestation, Associated Challenges, Vaccine and Antiviral Drug Development.” *Virology* 543(October 2019): 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>.

Rehner, Stephen A., and Ryan M. Kepler. 2017. “Species Limits, Phylogeography and Reproductive Mode in the *Metarhizium Anisopliae* Complex.” *Journal of Invertebrate Pathology* 148(September 2016): 60–66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.05.008>.

Reiter, Paul. 2007. “Oviposition, Dispersal, and Survival in *Aedes Aegypti*: Implications for the Efficacy of Control Strategies.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7(2): 261–73.

Ritchie, Scott A., Luke P. Rapley, and Seleena Benjamin. 2010. “*Bacillus Thuringiensis* Var. *Israelensis* (Bti) Provides Residual Control of *Aedes Aegypti* in Small Containers.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82(6): 1053–59.

Rocha, L. F.N. *et al.*, 2015. “Efficacy of *Tolypocladium Cylindrosporum* against *Aedes Aegypti* Eggs, Larvae and Adults.” *Journal of Applied Microbiology* 119(5): 1412–19.

Rodrigues, Juscelino *et al.*, 2021. “Relative Humidity Impacts Development and Activity against *Aedes Aegypti* Adults by Granular Formulations of *Metarhizium Humberi* *Microsclerotia*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 105(7): 2725–36.

Rodrigues, Juscelino, Vitória C. Campos, Richard A. Humber, and Christian Luz. 2018. “Efficacy of *Culicinomyces* Spp. against *Aedes Aegypti* Eggs, Larvae and Adults.” *Journal of Invertebrate Pathology* 157(August): 104–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.010>.

Ryan, Peter A. *et al.*, 2020. “Establishment of WMel *Wolbachia* in *Aedes Aegypti* Mosquitoes and Reduction of Local Dengue Transmission in Cairns and Surrounding Locations in Northern Queensland, Australia.” *Gates Open Research* 3: 1547.

Salles, Tiago Souza *et al.*, 2018. “History, Epidemiology and Diagnostics of Dengue in the American and Brazilian Contexts: A Review.” *Parasites and Vectors* 11(1): 1–12.

Santana, H. T. *et al.*, 2015. “Essential Oils of Leaves of *Piper* Species Display Larvicidal Activity against the Dengue Vector, *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae).” *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 17(1): 105–11.

Santos, Leilane M.M. *et al.*, 2017. “Fatty Acid-Rich Volatile Oil from *Syagrus Coronata* Seeds Has Larvicidal and Oviposition-Deterrent Activities against *Aedes Aegypti*.” *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100: 35–40.

Sarma, Riju, Kamal Adhikari, Sudarshana Mahanta, and Bulbuli Khanikor. 2019. “Insecticidal Activities of *Citrus Aurantifolia* Essential Oil against *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae).” *Toxicology Reports* 6(July 2018): 1091–96.

Schulte, Heidi Luise *et al.*, 2021. “Degradation Evaluation and Toxicity Profile of Bilobol, a Promising Eco-Friendly Larvicide.” *Chemosphere* 263.

Setha, To, Ngan Chantha, Seleena Benjamin, and Doung Socheat. 2016. “Bacterial

- Larvicide, *Bacillus Thuringiensis* Israelensis Strain AM 65-52 Water Dispersible Granule Formulation Impacts Both Dengue Vector, *Aedes Aegypti* (L.) Population Density and Disease Transmission in Cambodia." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(9): 1–17.
- da Silva, Alexandre Gomes *et al.*, 2015. "Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia Brejoensis* Mazine (Myrtaceae)." *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 18(6): 1441–47.
- Silva, L. E.I. *et al.*, 2018. "A New Method of Deploying Entomopathogenic Fungi to Control Adult *Aedes Aegypti* Mosquitoes." *Journal of Applied Entomology* 142(1–2): 59–66.
- Silva, P. T. *et al.*, 2019. "Seasonal Variation in the Chemical Composition and Larvicidal Activity against *Aedes Aegypti* of Essential Oils from *Vitex Gardneriana* Schauer." *South African Journal of Botany* 124: 329–32.
- da Silva, Vitor Emanuel Sousa *et al.*, 2020. "Larvicide Potential of Genus *Croton* L. (Euphorbiaceae) in Biological Control of *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae)." *Acta Scientiarum - Biological Sciences* 42: 1–7.
- Silvério, Maíra Rosato Silveiral, Laila Salmen Espindola, Norberto Peoporine Lopes, and Paulo Cézar Vieira. 2020. "Plant Natural Products for the Control of *Aedes Aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses." *Molecules* 25(15).
- Suwannaroj, Manawat *et al.*, 2020. "Survey of Entomopathogenic Nematodes and Associate Bacteria in Thailand and Their Potential to Control *Aedes Aegypti*." *Journal of Applied Entomology* 144(3): 212–23.
- Tan, A.W.A. *et al.*, 2012. "Spray Application of *Bacillus Thuringiensis* Israelensis (Bti Strain Am65-52) against *Aedes Aegypti* (L.) And *Ae. Albopictus* Skuse Populations and Impact on Dengue Transmission in a Dengue Endemic Residential Site in Malaysia." *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* · 43(2).
- Tawidian, P., V. L. Rhodes, and K. Michel. 2019. "Mosquito-Fungus Interactions and Antifungal Immunity." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 111(June): 103182. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103182>.
- Terradas, Gerard, and Elizabeth A. McGraw. 2017. "Wolbachia-Mediated Virus Blocking in the Mosquito Vector *Aedes Aegypti*." *Current Opinion in Insect Science* 22: 37–44.
- Thongkaewyuan, Apivit, and Thanunchanok Chairin. 2018. "Biocontrol of *Meloidogyne Incognita* by *Metarhizium Guizhouense* and Its Protease." *Biological Control* 126(August): 142–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.005>.
- Vairo, Francesco *et al.*, 2019. "Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention." *Infectious Disease Clinics of North America* 33(4): 1003–25.
- Vivekanandhan, P., S. Bedini, and M. S. Shivakumar. 2020. "Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungus from Eastern Ghats of South Indian Forest Soil and Their Efficacy as Biopesticide for Mosquito Control." *Parasitology International* 76(June 2019).
- Vivekanandhan, Perumal *et al.*, 2020. "Larvicidal Toxicity of *Metarhizium Anisopliae* Metabolites against Three Mosquito Species and Non-Targeting Organisms." *PLoS ONE* 15(5): 1–18. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0232172>.

Walker, T. *et al.*, 2011. "The WMe1 Wolbachia Strain Blocks Dengue and Invades Caged *Aedes Aegypti* Populations." *Nature* 476(7361): 450–55.

Wilder-Smith, Annelies *et al.*, 2017. "Epidemic Arboviral Diseases: Priorities for Research and Public Health." *The Lancet Infectious Diseases* 17(3): e101–6.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30518-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30518-7).

Yee, Donald A, Banugopan Kesavaraju, and Steven A Juliano. 2004. "Larval Feeding Behavior of Three Co-Occurring Species of Container Mosquitoes." *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology* 29(2): 315–22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707290>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2582444>.

Yooyangket, Temsiri *et al.*, 2018. "Identification of Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and Larvicidal Activity of Symbiotic Bacteria against *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*." *PLoS ONE* 13(4): 1–19.

Zara, Ana Laura de Sene Amâncio *et al.*, 2016. "Estratégias de Controle Do *Aedes Aegypti*: Uma Revisão." *Epidemiologia e servicos de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil* 25(2): 391–404.