UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT

ATIVIDADE LARVICIDA DE FUNGOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

AUGUSTO BÜCKER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas.

Manaus – Amazonas

Abril, 2008

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT

ATIVIDADE LARVICIDA DE FUNGOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

Augusto Bücker

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas.

Manaus – Amazonas

Abril, 2008

FRASES

“Aquele que não ama não conhece a Deus, porque Deus é caridade”

1 João, 4:8

“Não é fácil, mas também não é tão difícil”

Alsídio Bücker

“Muitos são os desafios e as virtudes àquele que trilha o caminho do Amor”

Augusto Bücker

“A verdade sempre está muito mais próxima das essências”

Nelson Falcão Rodrigues

“Mas o que é bom se termina – Cumpriu-se o velho ditado”

Jayme Caetano Braun

“Saudade é dor que não dói,
Doce ventura cruel,
É talho que fecha em falso,
É veneno e sabe a mel...”

Camões (*Amor é fogo que arde sem se ver*)

SINOPSE

BÜCKER, Augusto (2008)

ATIVIDADE LARVICIDA DE FUNGOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS.

Manaus: UEA, 2008

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais - MBT

SINOPSE

Foram estudados extratos brutos de diversos fungos endofíticos e do fungo *Pycnoporus sanguineus* (Basydiomiceto, Polyporaceae), para avaliar a atividade larvicida em *Aedes aegypti* e *Anopheles nuneztovari,* em condições de laboratório. Quatro (4) dos nove (9) extratos de fungos analisados mostraram toxicidade contra larvas de *A. aegypti* para $CL_{50} < 500$ µg/ml. E três (03) dos sete (07) extratos de fungos estudados mostraram toxicidade contra larvas de *A. nuneztovari* para $CL_{50} < 500$ µg/ml.

Palavras-chave: larvicida, bioensaios, fungo endofítico, fungo basidiomiceto, *Aedes aegypti* e *Anopheles nuneztovari.*

DEDICATÓRIA

À minha família, pai Adelino de Souza Bücker, mãe Iris Hoppe, irmã Flávia Bücker e irmão Luciano Freitas de Oliveira.

À minha esposa, com amor, Nádia Cristina Falcão Bücker.

À família Falcão.

Aos meus avós, em memória.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pelo amor, pela família, pelos amigos e amigas, pelas pessoas de bom coração que ainda irei de conhecer, pela natureza imponente e pela oportunidade de conhecer e poder contribuir para a proteção deste pedaço do paraíso, a Amazônia.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA pelo convênio e possibilidade de realizar o curso de pós-graduação.

A Universidade do Estado do Amazonas – UEA, pelo curso de pós-graduação gerando oportunidade de estudo.

Ao Programa de Financiamento do Estado, FAPEAM.

A Fundação de Vigilância da Saúde (FVS) por me ajudar nas coletas.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, por me aceitar como orientado e oportunizar o trabalho construtivo.

Ao meu co-orientador Dr. Ademir Castro e Silva, por todo o apoio ao longo da participação de tantos congressos.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana da UFAM, Dra. Antonia Q.L. Souza, Dr. Afonso Q.L. Souza, Dr. José Odair Pereira e Auricélia Matos, por me ajudarem na elaboração, nos trabalhos práticos da dissertação e por me ajudarem sem reclamações ou empecilhos.

Aos amigos do Laboratório de Malária e Dengue – INPA, Fábio M. Costa, Ricardo A. Passos, Rachel G. Corrêa, Eunice S. Medeiros e Caroline Dantas de Oliveira, Dra. Iléia Brandão, Gláubio F. Silva, Carlos Praia, Waléria Dasso, Érica, Adelina e Maria do Desterro, por discussões científicas e pela amizade e preocupação incondicionais.

...

SUMÁRIO

Frases iii
Sinopse iv
Dedicatória v
Agradecimentos vi
Sumário vii
Lista de figuras ix
Lista de tabelas xii
Resumo xiv
Abstract xv

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Situação da Malária no Brasil 1
1.2. Malária no Estado do Amazonas 3
1.3 Espécies de *Anopheles* – incidência, distribuição e aspectos ecológicos 4

2. OBJETIVOS 7
Objetivo Geral 7
Objetivos Específicos 7

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 8
3.1 Estratégias de Controle de vetores 10
3.2. Controle químico 11
3.3 Controle biológico 12
3.4. Biodiversidade Microbiana 15
3.4.1. Fungos da Classe Basidiomycetes 16
3.4.2. Fungos Endofíticos 19
3.5. Metabólitos secundários 20

4. MATERIAL E MÉTODOS 22
4.1. Coleta e manejo dos mosquitos 22
***Aedes aegypti* Linnaeus, 1762** 22

Anopheles nuneztovari Gabaldón, 1940 23
4.2. Preparação dos Extratos 25
Extratos de *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. 25
Extratos dos Fungos Endofíticos 25
4.3. Bioensaios Seletivos 26
Crescimento e extração dos fungos selecionados 27

4.4. Bioensaios de Dose para obtenção das Concentrações Letais (CL_{50} - CL_{90}) 29

4.5 ANÁLISE DOS DADOS 30
4.5.1 Avaliação dos bioensaios seletivos 30
4.5.2 Avaliação dos bioensaios de dose 30
4.5.3 Concentração Letal Mediana - CL_{50} e CL_{90} 31

5. RESULTADOS 32
5.1 Avaliação dos bioensaios seletivos 32

5.2 Bioensaios de dose para obtenção das Concentrações Letais (CL_{50} - CL_{90})

- *Aedes aegypti* 33
- *Anopheles nuneztovari* 42

6. DISCUSSÃO 52

7. CONCLUSÕES 60

8. BIBLIOGRAFIA 61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Repasto sangüíneo das fêmeas de *A. aegypti* com sangue de *hamster* (*M. auratus*); (b) Verificação da oviposição das fêmeas de *A. aegypti* após o repasto sangüíneo; (c) Embrionamento para obtenção das larvas para os testes biológicos e continuidade da colônia. Fotos fonte: Bücker, A. 23

Figura 2. (a) Coleta de anofelinos em currais bovinos; (b) Acomodação dos mosquitos anofelinos; (c) Caixa de isopor contendo papel umidecidos e copos parafinados telados com os mosquitos anofelinos coletados. Fotos fonte: Bücker, A. 23

Figura 3. (a) Copos plásticos individuais para a oviposição das fêmeas de *Anopheles* sp.; (b) Ovos de *Anopheles* depositados em papel filtro; (c) Larva de *A. nuneztovari* em 3 º estádio. Fotos fonte: Costa, F.M. 24

Figura 4. Esquema das etapas realizadas na procura de substâncias bioativas de *Pestalotiopsis virgulata*. 28

Figura 5. Esquema das etapas realizadas na procura de substâncias bioativas de *Pycnoporus sanguineus.* 29

Figura 6. Placas de cultura celular para a realização dos bioensaios. 29

Figura 7. Representação gráfica das Concentrações Letais (CL_{50} e CL_{90} – ppm) dos extratos Pyc Micélio, Pyc MID, Pest. Meio 1, Pest. Micélio 1 e Pest. Micélio 2; contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* nos intervalos de leitura de 48 e 72 horas. 34

Figura 8. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 (A), Micélio 1 (B) e Micélio 2 (C) de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* nas leituras de 48 e 72 horas. 35

Figura 9. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Pest. Meio 1, Pest. Micélio 1 e Pest. Micélio 2 de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* na leitura de 72 horas. 36

Figura 10. Potência Relativa do extrato Pest. Micélio 2 de 7.87308 vezes maior que em relação ao extrato Pest Meio 1, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 37

Figura 11. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Micélio (A) e do Meio de Cultura - MID (B) de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* nas leituras de 48 e 72 horas. 37

Figura 12. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Micélio e do Meio de Cultura - MID de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* na leitura de 72 horas. 39

Figura 13. Potência Relativa do extrato Pyc Micélio de 2.20023 vezes maior que em relação ao extrato Pyc MID, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 39

Figura 14. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico de *Pestalotiopsis virgulata* e *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* na leitura de 72 horas. 40

Figura 15. O quadro retirado do Programa Polo-PC, mostra a Potência Relativa do extrato Pest. Micélio 2 de 2.22227 vezes maior que em relação ao extrato Pyc micélio, e nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 41

Figura 16. Mostra o gráfico com os 7 extratos com atividade larvicida que apresentaram 5% de probabilidade, e suas respectivas Concentrações Letais (CL_{50} e CL_{90} – ppm) nas leituras de 48 e 72 horas. 43

Figura 17. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 (A), Meio 1 F. Aquosa (B), Meio 2 (C) e Meio 2 F. Aquosa (D) de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* nas leituras de 48 e 72 horas. 44

Figura 18. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 versus Meio 1 F. Aquosa (A) e Meio 2 versus Meio 2 F. Aquosa (B), de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* na leitura de 72 horas. 45

Figura 19. Potência Relativa do extrato Pest. Meio 2 de 0.77066 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Meio 2 F. Aquosa, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 45

Figura 20. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 versus Meio 2 (A) e Meio 1 F. Aquosa versus Meio 2 F. Aquosa (B), de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* na leitura de 72 horas. 46

Figura 21. Potência Relativa do extrato Pest. Meio 2 de 1.41417 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Meio 1, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 46

Figura 22. Potência Relativa do extrato Pest. Meio 2 F. Aquosa de 3.14696 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Meio 1 F. Aquosa, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 47

Figura 23. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Micélio 2 (A) e sua Fração Aquosa (B), de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* nas leituras de 48 e 72 horas. 47

Figura 24. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Micélio 2 versus a Fração Aquosa do Micélio 2 de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* na leitura de 72 horas. 48

Figura 25. Potência Relativa do extrato Pest. Micélio 2 de 60.74410 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Micélio 2 F. Aquosa, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 48

Figura 26. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos tempos de leitura (48 e 72 horas) do extrato aceto-etanólico do Micélio de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari*. 49

Figura 27. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos miceliares de aceto-etanólico de *Pestalotiopsis virgulata* versus *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari*, nas leituras de 72 horas. 50

Figura 28. Potência Relativa do extrato Pest. Micélio 2 de uma concentração 3.78548 vezes maior que em relação ao extrato Pyc. nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99). 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentuais da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* de 3º estádio nas concentrações dos diferentes extratos de fungos endofíticos e do fungo basidiomiceto. 32

Tabela 2. Resultados dos bioensaios com larvas de *Aedes aegypti* (3º estádio) nas leituras de 48 e 72 horas nos diferentes extratos testados. 33

Tabela 3. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* nas leituras de 48 e 72 horas, mostando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.* 34

Tabela 4. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P). 35

Tabela 5. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* nas leituras de 48 e 72 horas, observando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.* 37

Tabela 6. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *A. aegypti* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P). 38

Tabela 7. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com os extratos miceliares dos gêneros *Pestalotiopsis* versus *Pycnoporus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e probabilidade (P). 40

Tabela 8. Resultados dos bioensaios com larvas de *Anopheles nuneztovari* (3º estádio) nas leituras de 48 e 72 horas nos diferentes extratos testados. 42

Tabela 9. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas (3º estádio) de *Anopheles nuneztovari* nas leituras de 48 e 72 horas, mostando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.* 43

Tabela 10. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P). 44

Tabela 11. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P). 46

Tabela 12. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* nas leituras de 48 e 72 horas, mostando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.* 47

Tabela 13. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extrato miceliar e Fração Aquosa de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e probabilidade (P). . 48

Tabela 14. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os dois tempos das leituras dos bioensaios realizados com extrato miceliar de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari.* Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e probabilidade (P). 49

Tabela 15. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com os extratos miceliares dos gêneros de *Pestalotiopsis* versus *Pycnoporus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e probabilidade (P). 50

RESUMO

Extratos de cinco gêneros de fungos endofíticos e uma espécie de fungo basidiomiceto foram utilizados para avaliar a atividade larvicida contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* e *Anopheles nuneztovari*. O material biológico, pertencente ao gênero *Pycnoporus* foi coletado na Reserva Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA , situada na periferia de Manaus – AM. As demais espécies de fungos endofíticos foram obtidas em colaboração com o Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Os fungos endofíticos são provenientes de plantas na Fazenda da Agronomia – UFAM, BR Manaus – Rio Branco. Foram utilizados os extratos do micélio e do meio metabólico dos fungos endofíticos, dos gêneros: *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Trichoderma, Xylaria* e um desconhecido (FED-15).

Os testes biológicos tiveram início com os bioensaios seletivos, realizados em larvas de 3º estádio de *A. aegypti.* Os extratos do fungo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* e do fungo endofítico *Pestalotiopsis virgulata* apresentaram os melhores rendimentos larvicidas. Na segunda etapa foram realizados os bioensaios de dose apenas com os fungos *P. sanguineus* e *P. virgulata.* Para a obtenção dos extratos brutos em escala preparativa os fungos foram cultivados em meio de cultura líquido – MID, obtendo com isso, dois tipos de extratos: extrato micelial aceto-etanólico e o extrato aceto-etanólico do meio metabólico.

Quatro (04) dos nove (09) extratos de fungos estudados mostraram toxicidade contra larvas de *A. aegypti* para CL_{50} < 500 µg/ml. E três (03) dos sete (07) extratos de fungos estudados mostraram toxicidade contra larvas de *A. nuneztovari* para CL_{50} < 500 µg/ml. Estes resultados sugerem que em ambos os extratos miceliais dos fungos *P. sanguineus* e *P. virgulata* testados, há a presença de substâncias bioativas capazes de causar mortalidade nas larvas dos mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles.*

1. INTRODUÇÃO

A malária continua sendo um grande problema de saúde pública em muitos países do mundo, e foi primeiramente citada na era pré-cristã por Hipócrates. É uma doença parasitária causada por um protozoário do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem por vetor específico, uma fêmea de mosquito do gênero *Anopheles*, previamente infectada (Alves, 1998; Neves, 2002, Tadei *et al*., 1998).

Aproximadamente 40% da população mundial vive em países mais pobres e apresentam maiores riscos de contato com a malária. As estimativas de incidência variam até 500 milhões de casos por ano. Os países mais afetados são os africanos, situados ao Sul do deserto do Saara. Por outro lado, outras regiões apresentam casos de malária como os do Sudeste Asiático e os da América Latina, particularmente os situados na grande região da Bacia Amazônica brasileira, fato pelo qual a maior extensão territorial da Floresta Amazônica pertencer ao Brasil (OPAS, 2001; WHO, 2000; 2005).

A doença representa um sério problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos. Essa situação interfere no crescimento de crianças, na capacidade produtiva dos trabalhadores, gerando obstáculos ao desenvolvimento sócio-economico desses países (Rozendaal, 1997; Wang´ombe & Mwabu, 1993).

Os vetores da malária humana são insetos da ordem Diptera, da família Culicidae, do gênero *Anopheles* (Russel *et al*., 1946; Lane, 1953; Forattini, 1962; Tadei, 1993). No Brasil, já foram encontradas 14 espécies de anofelinos naturalmente infectadas, porém somente algumas estão relacionadas com a transmissão da doença. Os mosquitos anofelinos têm como criadouros preferenciais, coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, situação muito freqüente na Região Amazônica (Deane, 1989; Oliveira-Ferreira *et al*., 1990; Póvoa *et al*., 2000; Tadei *et al*., 1993; 2004; 2005).

1.1 Situação da Malária no Brasil

Na região amazônica, concentram-se 99% dos casos de malária registrados no Brasil. Em 2007, foram registrados 540.047 casos de malária, segundo os

registros do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP–Malária) e Sistema de Informações Hospitalares (SIH/DATASUS).

Embora muitos progressos tenham sido obtidos na luta contra a doença nos últimos 60 anos, o número de casos registrados anualmente ainda é muito elevado. Desde o início da última década de 70, em decorrência da ocupação intensa e desordenada da Amazônia brasileira, a malária vem se constituindo em um dos principais problemas de saúde da região. Existem fatores favoráveis à transmissão da doença: temperatura, umidade, altitude e cobertura vegetal adequadas à proliferação do mosquito vetor e condições habitacionais e de trabalho facilitadoras do contacto deste vetor com os seres humanos (Deane, 1988; Tauil, 2005; Tadei *et al.* 1998).

Por isso, o controle da malária vem se tornando complexo em decorrência de múltiplos fatores. A resistência dos parasitos aos anti-maláricos demanda a utilização de drogas alternativas tendo consequências econômicas e de difícil manuseio nas múltiplas dosagens objetivando superar a resistência (Tadei *et al.* 2007).

O homem, como parte e modificador do meio ambiente, tem papel chave no processo de manutenção da malária. Diferentes autores têm enfatizado que alterações introduzidas no ecossistema, em regiões endêmicas da malária, podem modificar o grau de incidência da doença, uma vez que alteram todo o sistema de relacionamento entre os organismos e seu meio (Tadei, 1993; Tadei *et al.*, 1993; Tauil, 1992).

Os fenômenos relacionados aos processos de desenvolvimento da região Amazônica, contribuíram para introduzir ou intensificar a malária nesses locais. O desmatamento de extensas áreas para a realização de empreendimentos (pólos de colonização, rodovias, hidrelétricas, garimpos, bases militares, aldeias indígenas, etc.) vem causando desequilíbrio no complexo homem/vetor/parasito, desencadeando novos focos da doença (Tadei, 1993; Tadei *et al.*, 1993; Barata, 1995). Agravando essa situação, o fluxo migratório das populações humanas na região à procura de melhores condições de vida, provoca a formação de faixas de transmissão em áreas periféricas, causando grande impacto da doença, pois as populações migrantes apresentam frequentemente, maior susceptibilidade à

infecção por *Plasmodium*, contribuindo para a expansão do reservatório do parasito (PHA/WHO, 1991; Tadei, 1993; 2001).

1.2 Malária no Estado do Amazonas

O Estado do Amazonas é o maior estado brasileiro em extensão territorial, apresentando 1.577.748 km^2 e a população estimada em 2.840.889 habitantes. Esta característica torna-o operacionalmente em um dos mais difíceis Estados da Federação de ser administrado e proporcionar um serviço de saúde de elevado padrão à população. Além deste aspecto, a maioria das vias de transporte são fluviais, dificultando sobremaneira o pronto atendimento em surtos de endemias, nas diferentes localidades, especialmente a malária. Esta modalidade de transporte fluvial é de deslocamento lento e extremamente frágil no período do pulso da vazante, quando o nível dos rios abaixa cerca de 10 a 15 metros, atingindo até 20 metros em alguns pontos. Nesta fase, o acesso a determinadas localidades toma-se inviável (Tadei *et al.*, 1993, 1998).

O Estado do Amazonas tem mostrado aumentos significativos na incidência da malária no período 1995/2007. No cenário da Amazônia Legal, o Estado representava apenas 9% da malária em 1995 (52.602 casos). Aumentos sucessivos nos anos subseqüentes ocorreram e em 2007 atingiu a cifra de 33,4% (180.290 casos). Este aumento foi mais expressivo em regiões de intensa movimentação da população, assentamentos agrícolas e expansão urbana como nas regiões do Rio Negro, Manaus, Rio Madeira e Médio Solimões. Considerando o período de 1992 a 1996, os dados revelam que a população cresceu 10,4% e a incidência da malária aumentou em 132,2% (FUNASA- AM).

Neste cenário do aumento da incidência da malária no Estado, destaca-se como fator preponderante a malária urbana, um evento muito freqüente nas últimas décadas, especialmente nos últimos 10 anos. O intenso fluxo migratório das populações do interior para as áreas periféricas dos povoados e cidades contribuiu sobremaneira para um impacto maior da infecção malárica. A urbanização da malária se enquadra nessas condições, uma vez que o processo envolve profundas modificações ambientais nas periferias das cidades. No Estado do Amazonas, a

falta de incentivo fiscal às populações do interior, é um fator decisivo para o aumento da malária urbana. (Tadei, 2001; Tadei *et al*., 1988; 2007).

A expansão de Manaus tem sido rápida, devido a migrações do interior da Amazônia e de outros Estados. Esta população migrante frequentemente invade terrenos na periferia, ocupando espaços na interface mata virgem/cidade. As moradias são construídas de forma precária e estas "invasões" se tornam permanentes, constituindo uma das bases do problema da urbanização da malária em Manaus (Tadei, 1996; Tadei *et al.* 2007).

Nestas mesmas condições, está o Município de Coari, situado na região fisiográfica do médio Solimões, às margens do Lago de Coari, na confluência do Rio Solimões. A área urbana da cidade de Coari apresenta malária urbana e a transmissão é generalizada tanto na periferia da cidade como na zona rural. Nesta, a prestação de assistência tanto nas atividades preventivas quanto curativas, é mais complexa devido ao intenso fluxo migratório interno que contribui para o aumento do reservatório do *Plasmodium*. Este fato contribui para a disseminação da doença, dificultando o controle sobre o homem doente, que procura o diagnóstico e tratamento, tardiamente. Este comportamento favorece a conclusão do ciclo assexuado do *Plasmodium* no homem infectado, fazendo com que o portador torne-se fonte de novas infecções para os anofelinos (Tadei *et al.* 1993; Tadei, 1996; Greenwood *et al*., 2008).

1.3 Espécies de *Anopheles* – incidência, distribuição e aspectos ecológicos

No Brasil, de acordo com a literatura atual, são registradas 57 espécies de *Anopheles,* pertencendo à cinco subgêneros do gênero *Anopheles*, são eles: *Nyssorhyncus, Kerteszia, Stethomyia, Lphopodomyia e Anopheles.* As espécies de anofelinos reportadas como vetores de malária no país pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus e Kerteszia* (Deane, 1986; Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Tadei & Duraty-Thatcher, 2000).

O conhecimento da incidência e distribuição das espécies de *Anopheles* em regiões naturais e em áreas sob impacto ambiental é de fundamental importância no controle da malária. Estudos realizados em diferentes regiões da Amazônia permitem verificar que a diversidade de espécies se modifica conforme o local

considerado. *Anopheles darlingi, A. albitarsis, A. nuneztovari, A. oswaldoi* e *A. triannulatus* são espécies de ampla distribuição na Amazônia; e *A. apicimacula, A. squamifemur, A. rondoni, A. neivai e A. nimbus* mostram distribuição mais restrita (Tadei *et al*., 1993; 1998; 2007).

As diferentes regiões da Amazônia mostram ainda diferenciação quanto à prevalência das espécies. Os estudos no Estado de Rondônia revelaram uma elevada incidência de *A. darlingi*, especialmente quando as coletas foram feitas com iscas humanas no domicílio. Há localidades em que os registros mostraram valores de até 95% de *A. darlingi* em coletas de alados nas residências. Estes resultados contrastam com os obtidos na região da Hidrelétrica de Balbina, em que *A. darlingi* foi coletado apenas na BR-174 (Manaus/Boa Vista) contrastam também com os obtidos na Ilha de Maracá, onde a espécie representou apenas 3% do total de 3.564 exemplares capturados (Tadei *et al*., 1993; 1998).

Os estudos entomológicos possibilitam o conhecimento da diversidade e do índice epidemiológico das espécies, permitindo avaliar o nível de vulnerabilidade de uma determinada área, quantificando os fatores de risco (Tadei *et al*., 1998; Tosta, 2007)

Na Amazônia, onde é transmitida quase a totalidade da malária no país (99,7% em 1999 -FUNASA), à medida que os ambientes naturais vão sendo destruídos, a maioria dos anofelinos diminui muito em freqüência, com exceções de *A. darlingi, A. albitarsis*, *A. braziliensis e A. nuneztovari*. Estas espécies podem aumentar de freqüência em ambientes específicos. *A. darlingi* no entanto, se destaca pela intensidade que invade o domicílio para sugar sangue humano, mostrando acentuada antropofilia e alta susceptibilidade à infecção pelos plasmódios humanos (Lourenço de Oliveira, 1989; Tadei *et al*., 1998; Tosta, 2007).

O *Anopheles darlingi,* é apontado como principal vetor da malária humana na Amazônia, apresentando acentuada antropofilia (Deane *et al*., 1988). De acordo com Lourenço de Oliveira *et al.* (1987) e Tadei *et al*. (1998), os dados atuais obtidos por técnicas com monoclonais, coincidem com os de Deane *et al.* (1988), considerando as espécies de *Anopheles* e a transmissão de malária na região amazônica.

Anopheles nuneztovari Gabaldón (1940), é considerado o principal vetor da malária humana em áreas da Venezuela e Colômbia (Gabaldón, 1981; Ferreira,

1964). Na Amazônia brasileira, não existe correlacção entre a presença dessa espécie e endemicidade da malária (Deane, 1986). Porém, em estudos de infecção natural, utilizando monoclonais, essa espécie foi encontrada infectada pelo protozoário *Plasmodium* (Lourenço de Oliveira *et al.,* 1987; Tadei *et al*., 1991, 1998; Consoli & Oliveira, 1994;).

A malária é a primeira endemia a surgir em áreas de alteração. Este fato decorre principalmente dos parâmetros: (1) de distribuição do(s) vetor(es) nas áreas alteradas e (2) da susceptibilidade das populações imigrantes. Estas últimas mostram este aspecto porque procedem de regiões onde a malária nunca ocorreu, ou se existiu, foi erradicada (Tadei *et al*.,1986, 1998, 2007).

A importância epidemiológica de uma população de anofelinos está na dependência de muitos fatores. Entre os mais importantes estão: (1) número total de mosquitos; (2) grau de atividade; (3) intensidade de contato com o homem; (4) proporção que sobrevive a uma idade de importância epidemiológica; e (5) susceptibilidade à infecção pelo *Plasmodium* (Tadei, 1993; Tadei *et al*.,1998).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Preparar extratos a partir de um *screening* microbiano de fungos endofíticos da região Amazônica e da espécie da Classe Basidiomycetes (Fungi: Basidiomycota) *Pycnoporus sanguineus*, avaliando a atividade larvicida para contribuir na implementação das ações de controle de vetores.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar a eficiência dos extratos fúngicos contra larvas de terceiro estádio de *Aedes aegypti* e *Anopheles nuneztovari*.

- Proceder o fracionamento químico dos extratos promissores e realizar o biomonitoramento utilizando larvas de *Aedes aegypti*.

- Determinar a concentração letal mediana - CL_{50}, bem como a CL_{90}, nos intervalos de 48h e 72 horas de exposição para a leitura da mortalidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A malária tem se tornado um sério obstáculo ao desenvolvimento social e econômico, em muitas nações em via de desenvolvimento, nas áreas tropicais e subtropicais devido às muitas vítimas que incapacita em todo mundo (Gallup & Sachs, 1998). Os Programas de Controle Biológico de Vetores incentivam o desenvolvimento de novos agentes potenciais e a capacitação de técnicos para atuarem em programa nos diversos níveis (Central, Regional e Local) para os ensaios de avaliação dos produtos no laboratório e em campo.

No início do século XX o conhecimento sobre o ciclo de vida dos anofelinos e suas relações com as águas estagnadas estava bastante difundido, o que contribuiu para o entendimento da importância do combate às formas imaturas (Costa, 2007).

O controle de insetos, sejam eles nocivos à agricultura ou vetores de doenças, é feito, hoje, na sua maioria, por produtos químicos. O uso desses inseticidas vem causando danos ao homem e ao meio ambiente, atingindo inimigos naturais, contaminando alimento, solo, água e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes (Arantes *et al.*, 2002). A necessidade de reduzir o consumo de agroquímicos tem aumentado o interesse por estratégias de controle biológico de pragas e de doenças de inúmeras espécies cultivadas. Esse controle biológico pode ser feito alterando as condições ambientais que possibilitam o aparecimento de praga ou da doença, ou utilizando microrganismos com propriedades antagônicas aos patógenos (Azevedo *et al.*, 2002).

Biodiversidade é uma medida da variação ou variabilidade existente entre as espécies de seres vivos e dentro delas. O termo foi usado pela primeira vez em 1986, resultado da contração das palavras "diversidade biológica" ou "diversidade biótica", e mede, em princípio, toda a variação biológica do planeta Terra (Azevedo *et al.*, 2002).

A biodiversidade da Amazônia constitui uma fonte para elevar as condições sócio-econômicas da região e contribuir para melhoria da qualidade de vida das populações. A principal contribuição deste projeto será na prospecção de produtos da biodiversidade da Amazônia, identificando-se fungos com potencial larvicida para o controle de mosquitos que são os principais responsáveis pela transmissão

de doenças nesta região, especialmente a malária, a febre amarela e as arboviroses, onde está inserido o vírus da Dengue. Portanto, para se conseguir uma maior eficácia dos programas de controle de vetores, há necessidade da busca de medidas alternativas (Tadei & Thatcher, 2000; Tadei, 2001).

Há muitos trabalhos com o controle bacteriano e, neste projeto, foi enfocada a utilização de extratos a partir de fungos da região amazônica, com ênfase ao estudo de extratos obtidos a partir de espécies fúngicas de basidiomicetos e fungos endofíticos, como potenciais fontes de inseticidas naturais da região amazônica.

Muitos fungos têm sido testados para a produção de substâncias de interesse industrial, especialmente em indústrias de fermentação. Interesse existe também em explorar novos aspectos biotecnológicos como: biotecnologia ambiental; tratamento de resíduos líquidos e biorremediação de solos poluídos; mineralogia e biohidrometalurgia; empregos em controle biológico (Castro e Silva, 1996; Ferrara, 2006). Além de sua importância natural, os fungos estão presentes em nossa vida por ser um recurso de uso real e potencial como, por exemplo, nas indústrias alimentícia, farmacêutica (produção de metabólitos secundários, antifúngicos, antibacterianos) e cosmética (Kües & Liu, 2000; Shon & Nam, 2001; Stamets, 2002; Rosa *et al*., 2003). Por outro lado, estes mesmos organismos podem ser utilizados na recuperação ambiental, em processos de biodegradação e biorremediação (Hofrichter *et al*., 1999).

Outro aspecto importante da utilização desses bioenseticidas seria a descrição da ação tóxica em relação ao inseto alvo. Alguns trabalhos descrevem o comportamento desses agentes microbianos em diferentes tipos de insetos (Smith & Grula, 1983; Sosa-Gómes *et al*., 1994; Esposito & Azevedo, 2004; Ferrara, 2006; Park *et al*., 2002; Tadei *et al*., 2006). Ronchi (1985) descreve o modo de ação da bactéria *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* contra lagartas *Ascia monuste monuste* (Lepidopteras: Pieridae) tanto em aspectos histopatológicos como em sintomatológicos.

Na descoberta contínua de novas cepas fúngicas potencialmente tóxicas contra vetores de malária na Amazônia, neste projeto o desenvolvimento de ensaios em laboratório com diferentes cepas fúngicas extraindo extratos brutos, e fazendo um *screening* de seus compostos com diferentes solventes, foi o objetivo neste trabalho. O questionamento então a ser respondido, era se a ação tóxica dos

extratos obtidos destas cepas fúngicas apresentariam potencial biolarvicida, e com isso, selecionar os melhores resultados da atividade larvicida e dar seqüência ao processo na busca do princípio ativo.

Diante da necessidade de implementação de alternativas e/ou atividades complementares aos métodos atualmente empregados no controle das formas imaturas de vetores de doenças na Amazônia, neste projeto foi dada ênfase ao estudo de extratos obtidos a partir de espécies fúngicas da Classe Basidiomycetes e de fungos endofíticos, como potenciais fontes de larvicidas naturais contra espécies vetores da malária de ocorrência na região Amazônica, selecionando aqueles extratos com alta toxicidade que poderiam ser utilizadas em formulações de inseticidas biológicos.

3.1 Estratégias de Controle de vetores

A descoberta do inseticida DDT em 1943 revolucionou os métodos de controle da malária. O programa de tentativa de erradicação começou em 1957 e só em 1961 houve ampliação do controle em todo o mundo. As tentativas de controle foram diminuindo em 1967 quando se constataram alguns problemas técnicos como a grande resistência dos insetos e a poluição ambiental e a não especificidade. A Organização Mundial de Saúde - OMS adotou novas estratégias, propondo em 1980 o controle integrado da malária que consistia no emprego de todos os métodos disponíveis na luta contra endemias consideradas particularidades de cada área (Ivanissevich & Nussenzveig, 1991; Tadei *et al.* 2007).

Desde a segunda guerra mundial, os inseticidas químicos têm sido amplamente utilizados no controle de vetores de doenças. Após a descoberta do DDT, os programas de controle se apoiaram amplamente na sua aplicação em decorrência da sua eficácia e pela disponibilidade em baixos custos (Nicolas, 1986). Outros inseticidas de contato foram introduzidos no mercado como os organofosforados, carbamatos e os piretróides. Devido ao uso indiscriminado desses produtos, se instalou um processo seletivo que desencadeou a resistência dos insetos alvo. São relatos que já estão resistentes 51 espécies de anofelinos e

42 de culicídeos (WHO, 1970; 1980; 2008). Registros de danos ambientais foram constatados em várias localidades da África e do Sudeste Asiático (Nicolas, 1986; Guerra *et al.*, 2008). Considerando os vetores, a pressão seletiva dos inseticidas está levando cada vez mais à resistência das populações de mosquitos (Brown, 1986; Okoye *et al.*, 2008).

Portanto, somente o controle dos mosquitos adultos não é suficiente para diminuir a densidade do vetor. As formas imaturas desenvolvem-se em coleções hídricas, seus criadouros naturais, sob excelentes condições. Neles há abundância de matéria orgânica e condições de temperatua, luminosidade e pH suficientes para rapidamente se desenvolverem e atingirem a fase adulta (Tadei *et al.* 2007).

Em decorrência dessa pressão de seleção, há necessidade de novos produtos que levem a um mínimo de impacto para o ambiente, servindo de estímulo a busca por estratégias alternativas no controle de pragas (Van Rie *et al.,*1990).

Considerando as ações mal sucedidas colocadas em função da aplicação de inseticidas químicos detectou-se a necessidade de novas estratégias servindo como alternativa e/ou complemento para o controle de malária nas áreas endêmicas. O controle biológico consiste no uso de inimigos naturais tais como peixes, vírus, fungos e as bactérias entomopatogênicas (Rodrigues, 1996; Ghosh *et al.*, 2005; 2006; Ghosh & Dash, 2007).

O controle nas regiões onde a presença do parasita e o vetor são freqüentes é realizado através de uma consistente estratégia de controle e intesificação e manutenção do mesmo controle de vetores (FUNASA, 2003). Dentre as formas de controle disponíveis considera-se o emprego de inseticida químico e biológico.

3.2 Controle químico

Os organoclorados começaram a ser utilizados após a descoberta das propriedades inseticidas do DDT em 1939, por Paul Müller e colaboradores. O programa de tentativa de erradicação começou em 1957 e somente em 1961 houve ampliação do controle em todo o mundo (Cavalcante, 1993).

A utilização do DDT revolucionou os métodos de combate às pragas agrícolas e aos vetores de doenças. Em 1942, foi considerada como sendo “a era dos

pesticidas orgânicos" passando a ser conhecida como “a era do DDT". As tentativas de controle foram diminuindo em 1967 onde as maiores críticas atribuída ao seu uso estavam relacionadas ao fato de deixarem resíduos do produto ou de seus metabólitos no meio ambiente. Os vários efeitos adversos e ordem ecológicas a grande resistência dos insetos e a não especificidade fizeram dele um instrumento de ação não muito significativa a manutenção do controle de pragas agrícolas e agentes vetores de doenças (Ivanissevich & Nussenzveig, 1991; Okoye *et al.*, 2008).

A Organização Mundial de Saúde - OMS adotou novas estratégias, propondo em 1980 o controle integrado da malária que consistia no emprego de todos os métodos disponíveis na luta contra endemia consideradas particularidades de cada área (Ivanissevich & Nussenzveig, 1991).

Costa (2007) fez uma revisão bibliográfica completa sobre as formas de controle químico de mosquitos vetores de malária no Brasil, em duas formas de vida do mosquito: adulto e larva; também o controle químico com reguladores de crescimento de insetos.

3.3 Controle biológico

O controle biológico consiste na supressão de pragas e doenças através de agentes bióticos que lhes são tóxicos e/ou letais (Rodrigues, 1996; Alves, 1998). O objetivo desse tipo de controle é a redução da população de um organismo hospedeiro, com o uso de inimigos naturais. Por outro lado, a abundância destes hospedeiros influencia a população de inimigos naturais. Estas interações originam um equilíbrio dinâmico, onde nenhuma das populações suprime outra causando efeitos ecológicos indesejáveis (Fontes, 1992; Fowler & Di Romagnano, 1992).

O emprego de entomopatógenos, foi primeiramente proposto por Metsehnikoff em 1879, no seu clássico trabalho de controle de pragas, onde usou o fungo *Metarhizium anisopliae* no controle de larvas do beseouro *Anisopia austíaca* (Alves, 1986).

No Brasil, o controle biológico começou a ser utilizado com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e com o *Baculovírus*, no controle das

cigarrinhas da cana e das pastagens e no contrele da *Anticarsia gematalis* na soja, respectivamente. Na cultura do cacau, o fungo *Trichoderma* tem sido utilizado com sucesso em restos de ramos doentes para o controle do fungo *Moniliophthora,* agente causal da vassoura-de-bruxa (Azevedo *et al.,* 2002). A utilização desse tipo de controle apresenta inúmeras vantagens em relação aos inseticidas químicos convencionais, tais como:

a) a especificidade, apontada como vantajosa no caso do ataque direto ao inseto alvo e por não afetar parasitados e predadores dessas pragas como o fazem os inseticidas químicos, portanto não causando desequilíbrio ecológico;
b) a multiplicação e dispersão, a capacidade que os patógenos têm de persistir no ambiente por meio dos indivíduos da população mesmo de uma geração para outra como focos secundários, terciários e etc., por meio dos ovos dos insetos. Nesses efeitos secundários, além da mortalidade direta, os patógenos conseguem afetar as gerações seguintes diminuindo a ovoposição e a viabilidade dos ovos;
c) controle associado, pode ser empregado juntamente com inseticida seletivo em subdosagens visando a ação e, portanto, em controle mais rápido e eficaz da praga sem os inconvenientes das superdosagens dos inseticidas químico;
d) não são tóxicos, ou seja, não poluem o meio ambiente, portanto não afetam os animais e o próprio homem exceto para as populações alvos;
e) finalmente, o fato dos insetos não se tornarem resistentes aos patógenos por serem esses inimigos naturais (Alves, 1986).

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. A maioria dos gêneros entomopatogênicos já relatados ocorre no Brasil, sendo que, desses, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica. A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos. Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas pra serem utilizados como inseticidas microbianos (Alves, 1998).

Dentre as bactérias utilizadas no controle biológico destaca-se o gênero *Bacillus thuringiensis* por produzir proteínas Cry, codificadas por um único gene, que formam cristais protéicos com ação inseticida manifestada apenas quando

atingem o intestino médio da larva (Habib, 1989; Germani, 1993). Este controle das formas imaturas de mosquitos vem sendo empregada pela toxicidade de cerca de 130 espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera bem como os vetores de doenças humana, como contra os gêneros *Aedes, Culex, Anopheles* (Lereclus *et al.*, 1993; Bücker *et al.*, 2007a). Não há evidência de danos ao homem e ao meio ambiente produzidos por esse agente de controle nesses 60 anos de uso (Arantes *et al.*, 2002).

Mesmo fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e já largamente empregados no controle biológico de insetos-pragas da agricultura são encontrados como endófitos. Esse é o caso de *Beauveria bassiana,* encontrado como endófito no milho, protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos (Bing & Lewis, 1993). Muitos outros casos são relatados, como pode ser apreciado na revisão de Breen (1994).

Em certas gramíneas, a presença de fungos endofíticos reduz o ataque de insetos, como *Spodoptera frugiperda* e S. *eridana* (Breen, 1993). Nesse caso, é interessante o fato de S. *frugiperda* discriminar plantas infectadas por fungos endófitos do gênero *Acremonium.* Não sendo atacadas por insetos, essas plantas tornam-se mais vigorosas e, conseqüentemente, resistem mais ao ataque de doenças e são selecionadas. Essa é uma maneira de seleção de determinados endófitos dentro de plantas (Clay *et al.,* 1993). Também em algumas plantas de clima temperado, como os olmeiros, coleópteros transmitem certas doenças, como a causada pelo fungo *Ceratocystis ulmi.* Na presença do fungo endofítico *Phomopsis oblonga,* as árvores são menos afetadas pela doença graças à proteção que o fungo endofítico proporciona, por diminuição do ataque dos insetos. Casos específicos de proteção direta contra doenças de plantas, proporcionados por microrganismos endofíticos, serão vistos no próximo seguinte.

O controle biológico se constitui em uma ferramenta fundamental nas ações de combate á malária. No entanto, não é suficiente apenas introduzir as medidas para o controle. As atividades devem ser implementadas dento de determinadas normas, específicas para cada área da Amazônia, estabelecidas a partir das condições locais, conhecendo-se a dinâmica de transmissão (Tadei *et al.*, 1998; Tadei 2001; Tadei & Pinheiro, 2002).

O uso de bioinseticidas bacterianos no controle de vetores da malária na Amazônia é de grande relevância, quando se considera a preservação ambiental, além da busca de métodos eficazes para atuação contra as formas imaturas. Como microrganismo patógeno para insetos, as bactérias têm sido amplamente utilizadas, em decorrência de seu modo de ação e especificidade. Dentre as espécies do gênero *Bacillus*, geralmente gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e formadores de endósporos (Melo, 1998), são entomopatógenos mais efetivos as estirpes de *Bacillus sphaericus* e de *Bacillus thuringiensis* (Tadei & Rodrigues, 2002).

3.4 Biodiversidade Microbiana

Biodiversidade é uma medida da variação ou variabilidade existente entre as espécies de seres vivos e dentro delas. O termo foi usado pela primeira vez em 1986, resultado da contração das palavras "diversidade biológica" ou "diversidade biótica", e mede, em princípio, toda a variação biológica do planeta Terra (Azevedo, 2001b).

Sabe-se atualmente que os microrganismos como bactérias e fungos, além de responsáveis por importantes transformações metabólicas, pelo controle biológico de doenças e pragas, pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico, pela degradação de resíduos vegetais e outros produtos, inclusive tóxicos, são também um manancial de fármacos, corantes, enzimas e ácidos orgânicos, entre muitos outros produtos úteis e ainda inexplorados. Ou seja, além de exercerem um papel na sobrevivência de outras espécies e na manutenção do equilíbrio entre elas, são fonte de produtos que contribuem para o bem-estar da população humana, inclusive remediando o mal que a própria espécie humana produz no ambiente. Em outras palavras, a importância dos microrganismos para a ecologia e biotecnologia é inquestionável (Straatsma *et al.*, 2001; Azevedo, 2001b).

Como Olembo (1995) salienta muito bem, a relação entre biodiversidade e biotecnologia é de dependência mútua. Biodiversidade é a base genética da qual a

biotecnologia se vale para desenvolver processos e produtos de interesse econômico e/ou social.

3.4.1 Fungos da Classe Basidiomycetes

Os fungos são organismos de grande importância, pois participam praticamente de quase todas as transformações físicas ou químicas que acontecem na natureza, seja no macro ou micro ambiente, estando, assim, intimamente ligados à manutenção da vida na terra. Em ambientes tropicais chegam a compor 90% da biomassa viva no solo das florestas (Moore & Frazer, 2002; Mueller & Bills, 2004).

Os fungos são organismos heterotróficos que, por muito tempo, foram considerados plantas primitivas, sem clorofila. Porém, evidências moleculares recentes demonstraram que os fungos são mais relacionados com os animais do que com as plantas. Na verdade, eles têm forma de vida bastante distinta dos outros seres vivos, o que os faz pertencer a um reino próprio, designado Reino Fungi (Raven, 2001). Existem fungos que são parasitas, obtendo alimento através do ataque a outros seres vivos, como plantas, animais domésticos, insetos e humanos (Quadros *et al*., 2005).

Os fungos constituem o grupo mais diverso de eucariontes em ambiente terrestre depois dos insetos, devido a sua ampla distribuição e associação com substratos inorgânicos e orgânicos (Gewin, 2002; Holf *et al*., 2004). A partir de 1990, a estimativa mais aceitável, não somente por micólogos, mas em quaisquer trabalhos de biodiversidade global, é de 1 a 1,5 milhão de espécies. Outras estimativas variam de 1,5 a 13,5 milhões, nas quais estão incluídas espécies não descritas que infectam insetos (Lodge e*t al*., 1995; Lodge & Cantrell, 1995; Lodge, 2001).

Os Basidiomicetos constituem aproximadamente 25% das espécies descritas do Reino Fungi. São caracterizados pela formação de esporos nos tipos diferenciados de hifas (basídio) (Griffin, 1994; Carlile & Watkinson, 1997). Atualmente, Basidiomycetes, são propostos como Classe, baseando-se essa indicação na presença ou ausência de basidioma macroscópico, forma e ciclo de

vida, incluindo especialização a hospedeiro (Willerding *et al*., 2005; Loguercio-Leite *et al*., 2006).

A utilização de fungos para o controle de insetos-pragas se fundamenta em sua capacidade de infectá-los, causando doença e morte num processo dependente de fatores bióticos e abióticos (Onofre *et al.,* 2002). As diferenças na patogenicidade dos fungos são indicativas de variações genéticas ocorrendo naturalmente, sendo a natureza e a extensão dessas variações desconhecidas. Entretanto, a variação tem sido identificada em caracteres associados com a patogenicidade, incluindo atividades enzimáticas (St. Leger *et al*., 1986; 1987), e sistemática molecular em fungos (Valadares *et al*., 1998; Vilarinhos *et al.,* 1992). Esses estudos mostram que espécies de fungos, embora morfologicamente similares, podem ser geneticamente distintas quanto à produção de enzimas, patogenicidade e outros fatores.

A maioria das espécies de basidiomicetos, conhecidas popularmente como orelhas-de-pau e cogumelos, são capazes de degradar a madeira (lignina e/ou celulose e hemicelulose). Todas essas espécies são denominadas lignolíticas ou lignocelulolíticas (Newell *et al*., 1996; Anagnost, 1998). Os fungos lignolíticos estão divididos em três grupos, dois grupos principais compreendendo os causadores de podridão branca (*white-rot*) e os causadores de podridão castanha (*brown-rot*) (Ejechi *et al*., 1996; Nakasone, 1996; Worrall *et al*., 1997; Highley & Dashek, 1998).

Os fungos apresentam atividade degradativa de amplo espectro, podendo secretar grande diversidade de enzimas extracelulares, o que os tornam capazes de metabolizar moléculas recalcitrantes. Os basidiomicetos, fungos causadores da podridão branca da madeira, têm sido estudados como tipicamente ligninolíticos, por terem a capacidade de degradar substâncias complexas como a lignina, devido à ação de suas enzimas extracelulares, produzidas durante o metabolismo secundário, como conseqüência da limitação de nutrientes (Fratila-Apachitel *et al*., 1999).

No grupo dos basidiomicetos lignocelulolíticos encontramos organismos que atuam como importantes decompositores, sendo os principais responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Degradam os componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina a partir dos quais obtém energia para seu crescimento e reprodução. Esses microrganismos são os únicos conhecidos com a

capacidade de metabolizar completamente a molécula de lignina a gás carbônico e água, sendo os maiores responsáveis pela degradação dos tecidos vegetais (Rezende *et al.*, 2001).

Os dados da literatura apontam que o fungo da espécie *Pycnoporus sanguineus*, que será um dos fungos utilizados nos bioensaios, apresentam um grande potencial para produção de enzimas, para utilização nas indústrias e atividade antibacteriana (Castro e Silva, *et al*. 1993; Ferreira, 2005). O *P. sanguineus* é da Classe Basidiomycete da família *Polyporaceae*, com propriedades detorioradoras de madeira e encontrados em florestas subtropicais e tropicais dos hemisférios norte e sul (Nobles & Frew, 1962; Bücker *et al*., 2006ab).

Neste contexto citamos a análise das atividades antibacterianas das substâncias produzidas por este fungo*,* na inibição de crescimento de várias espécies de bactérias (Smânia Jr., *et al.* 1995, 2003; Smânia, *et al*., 1997), também a utilização comercial, pelo alto rendimento na produção de lacases contitutivas, pelo fungo *Botryosphaeria sp.* (Giese, *et al.* 2004) e o trabalho realizado por Rosa, *et al.* (2003) pelo *Screening* de basidiomicetos no Brasil com atividade antimicrobiana, teve como parte do programa desenvolver novos metabólitos bioativos a partir desta diversidade de basidiomicetos encontrados no Brasil. Relataram um total de 103 isolados de basidiomicetos representando 84 espécies coletados de diferentes localizações (Anke, 1989; Maziero *et al*., 1999; Suay *et al.,* 2000).

Vários diferentes tipos de organismos deterioram a madeira, mas o maior dano resulta dos fungos. Podridão é a forma mais séria de deterioração microbiológica porque pode causar o colapso da estrutura muito rapidamente. Estudos recentes têm avançado nosso conhecimento sobre como os componentes são degradados por microrganismos e suas enzimas, permitindo rápido avanço na biotecnologia. Dentre os organismos fúngicos que degradam a madeira, aqueles que causam a podridão branca são os que apresentam um maior potencial de aplicação biotecnológica. A presença de ligninase, Mn-peroxidase e glucosidase, por exemplo, na cepa amazônica de *Pycnoporus sanguineus* indica-o como potencial para uso industrial, especialmente em tratamento de efluentes de indústria papeleira. Vários outros fungos deterioradores da madeira apresentam potencial biotecnológico, como por exemplo, *Antrodia*, *Tyromeces*, para a

bioremediação do solo, produção de enzimas de interesse para a agricultura, indústria de alimentação, fabricação de detergentes, fungicida e inseticida. (Castro e Silva *et al.* 2002).

3.4.2 Fungos Endofíticos

Microrganismos endófitos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas. Definidos como assintomáticos, não produzindo, portanto, efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, permaneceram praticamente esquecidos até o final dos anos 70, quando, por uma série de motivos, começaram a chamar atenção. Nessa época verificou-se que, longe de serem meros habitantes do interior de vegetais, possuíam propriedades de interesse, como por exemplo conferir proteção contra insetos-pragas, outros microrganismos patogênicos e inclusive contra herbívoros. Atualmente, sabe-se que endófitos podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de potencial interesse biotecnológico, além de exercerem outras funções de importância para a sobrevivência do hospedeiro (Azevedo*,* 2001a; Ferrara, 2006).

Provavelmente todas as plantas possuem microrganismos endofíticos. Uma mesma planta pode albergar vários deles, incluindo fungos e bactérias, habitando, de modo geral, suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. Portanto, eles se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças (Azevedo*,* 2001a).

Verificou-se alta similaridade entre linhagens selvagens e mutantes do fungo *Namurea rileyi* considerando características relacionadas à produção de enzimas extracelulares e virulência, constatando-se que a elevada produção de lipases e proteases estavam associadas com o aumento da virulência (Barros, 1995). Em outros estudos, utilizando linhagens do fungo *Beauveria bassiana* provenientes de diferentes regiões geográficas, verificou-se que, independentemente da origem

geográfica, as linhagens com elevada produção de lipases foram mais virulentas do que as com baixa produção (Paris & Segretáin, 1975).

Estudos da variabilidade genética de fungos relacionados à virulência são extremamente importantes para a seleção de linhagens mais efetivas, as quais poderão ser utilizadas como bioinseticidas em programas de controle integrado de pragas. A virulência de fungos pode estar associada à viabilidade de seus conídios, à produção de enzimas extracelulares e produção de metabólitos secundários dentre outros fatores (Onofre *et al.,* 2002).

Modelos epidemiológicos mostram que ambos os componentes de fecundidade e repasto sangüíneo são juntos os mais importantes fatores que afetam a capacidade adaptativa dos mosquitos e a transmissão da malária, sugerindo que os fungos tem potencial para ser encarado como um agente de biocontrole para o controle de doenças que utilizam mosquitos como vetores (Scholte *et al.*, 2006).

3.5 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos especiais com estruturas geralmente diferentes das de metabólitos primários como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, dos quais são derivados. Entre estes compostos encontram-se antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, agentes anti-tumorais, feromônios e promotores de crescimento de animais e plantas (Azevedo, *et al.,* 2002). O metabolismo secundário não é essencial para o crescimento dos microrganismos que os produzem, mas é uma via alternativa que colabora para a sua sobrevivência na natureza. A produção de metabólitos secundários por microrganismos encontra ampla aplicação na área de fármacos e de agroquímicos (Etchegaray, 2002; Nogueira *et al.*, 2006).

Um crescente interesse nos estudos com microrganismos endofiticos tem surgido recentemente, em parte causada pela possibilidade de que tais espécies possam ser utilizadas como agentes de biocontrole contra insetos (Azevedo, *et al.,* 2002; Okumu *et al.*, 2007; Bücker *et al.*, 2007b).

Além disso, os fungos endofiticos constituem uma valiosa fonte de metabólitos secundários com potencial ação como antimicrobianos, na biotecnologia e na agricultura (Alves, 1998; Etchegaray, 2002; Castro e Silva *et al.* 2002; Nogueira & Tiosso, 2003).

A busca de substâncias de uso prático para o homem na natureza é uma das mais antigas atividades da nossa civilização. No Brasil, as plantas têm sido os organismos vivos mais investigados como fonte de produtos naturais (Bras-Filho, 1994; Verpoorte *et al.*, 1999). No entanto, os microrganismos, organismos marinhos, pequenos insetos e animais também têm se mostrado uma fonte rica de substâncias para a humanidade (Natori *et al.*, 1981). Como o Brasil ocupa destaque na biodiversidade de plantas e animais, é de se esperar que ocorra uma alta diversidade de bactérias e fungos e, como conseqüência, uma fonte versátil de substâncias pode ser encontrada.

A grande maioria dessas substâncias é classificada como metabólitos secundários para diferencia-las daquelas de função primária básica para os organismos vivos. Os metabólitos primários são em geral macromoleculares, possuem as mesmas funções e são amplamente produzidos pelos seres vivos independentemente da sua classificação taxonômica (Harborne & Tomas-Barberan, 1991). Ao contrário, os metabólitos secundários geralmente são micromoleculares, não apresentam funções básicas aparentes, e sua produção depende do tipo de organismo e de sua espécie (Nosov, 1994).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e manejo dos mosquitos

∞ ***Aedes aegypti* Linnaeus, 1762**

Os ovos de *Aedes aegypti* foram obtidos a partir de colônias do Laboratório de Malária e Dengue do INPA, onde foram mantidas em gaiolas no insetário. Nessas gaiolas são colocados pequenos copos de sorvete, revestidos com tiras de papel filtro, e com uma lâmina de água no fundo para manter a tira úmida, onde os mosquitos depositam seus ovos.

As tiras de papel filtro contendo ovos desidratados de *A. aegypti* serviram para a eclosão das larvas, onde foram mantidas em cubas esmaltadas com água de poço artesiano, até atingirem o terceiro estádio do desenvolvimento larval, objeto das observações quanto às doses de efeito e susceptibilidade. Na manutenção das larvas para posterior utilização e manutenção da colônia, as larvas foram alimentadas com 5mL de alimento líquido, compostos de uma mistura de farinha de peixe e pó de fígado, adicionados cada dois dias, até atingirem o estágio de pupa (Cristophers, 1960).

Para a obtenção dos mosquitos adultos, as pupas são transferidas para uma bandeja plástica e colocadas em uma gaiola, onde após 48 horas ocorre a emergência dos mosquitos adultos. Na manutenção dos mosquitos na gaiola, os machos são alimentados com uma solução preparada com água e açúcar, misturados em um erlenmeyer, contendo na borda um algodão umedecido pela solução.

Para a oviposição, as fêmeas são alimentadas com sangue de *hamster* (*Mesocricetus auratus*), imobilizado em uma caçapa (gaiolas confeccionadas com telas
de nylon), onde permaneciam durante uma hora cada dois dias (Figura 1a). Depois da manutenção, as fêmeas colocam os ovos sobre a tira de papel, em maior concentração no limite com a água (Figura 1b). Os ovos permanecem cerca de dois dias para o embrionamento e, em seguida, são armazenados de forma desidratada para continuidade da colônia ou obtenção de novas larvas para trabalhos futuros (Figura 1c).

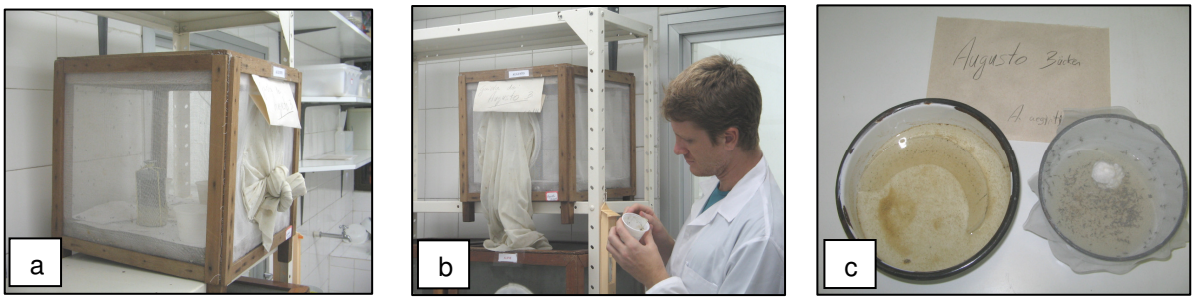

Figura 1. (a) Repasto sangüíneo das fêmeas de *A. aegypti* com sangue de *hamster* (*M. auratus*); (b) Verificação da oviposição das fêmeas de *A. aegypti* após o repasto sangüíneo; (c) Embrionamento para obtenção das larvas para os testes biológicos e continuidade da colônia. Fotos fonte: Bücker, A.

∞ ***Anopheles nuneztovari*** **Gabaldón, 1940**

Devido a espécie *Anopheles nuneztovari* Gabaldón, 1940 apresentar comportamento zoofílico, as capturas foram realizadas em currais bovinos, selecionando-se apenas fêmeas alimentadas, levando-se em consideração o comportamento zoófilo destas espécies. As coletas das espécies do gênero *Anopheles* foram realizadas na Zona leste de Manaus, no Ramal do Chico Mendes e na Fazenda Natan. Os adultos das espécies foram coletados no horário das 18 às 21 horas com auxílio de capturador manual entomológico (Figura 2a). As fêmeas coletas no campo eram colocadas em copos de papel parafinado de 500 mL, armazenados em isopor, previamente umedecidos (Figura 2b), e transportados para o insetário do Laboratório de Malária e Dengue no INPA.

Figura 2. (a) Coleta de anofelinos em currais bovinos; (b) Acomodação dos mosquitos anofelinos; (c) Caixa de isopor contendo papel umidecidos e copos parafinados telados com os mosquitos anofelinos coletados. Fotos fonte: Bücker, A.

A manutenção dos anofelinos no insetário seguiu procedimento descrito por Santos *et al.* (1981) e Scarpassa & Tadei (1990). Sendo a oviposição individual das fêmeas realizadas em copos de 100 mL contendo no fundo papel filtro umedecido e o copo fechado com tela de filó e liga elástica (Figura 3a). Esses copos eram dispostos em camadas em uma caixa de isopor, onde permaneciam até o término do tempo de oviposição (72 horas). Após o tempo de oviposição, as fêmeas e os ovos foram identificados utilizando-se as chaves de Faran (1980) e Consoli & Oliveira (1994) (Figura 3b). Após esta identificação, foram encontradas também outras espécies do subgênero *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902 em menores proporções, como: *Anopheles albitarsis* Lynch Arribálzaga, 1878; *Anopheles triannulatus* Neiva & Pinto, 1922 e *Anopheles darlingi* Root, 1926.

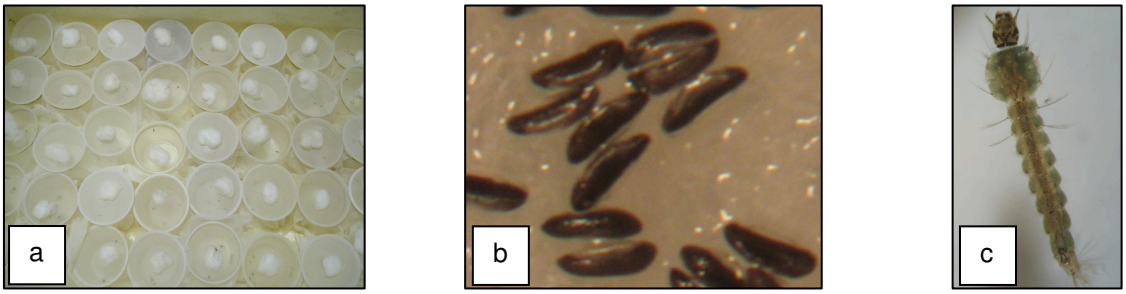

Figura 3. (a) Copos plásticos individuais para a oviposição das fêmeas de *Anopheles* sp.; (b) Ovos de *Anopheles* depositados em papel filtro; (c) Larva de *A. nuneztovari* em 3 º estádio. Fotos fonte: Costa, F.M.

Os ovos identificados como sendo de *A. nuneztovari* foram colocados para eclosão em copos de plásticos de 100 mL contendo água e papel filtro nas bordas. As larvas ao atingirem o primeiro/segundo estádios foram transferidas para cubas esmaltadas contendo água de poço artesiano e adicionado alimento líquido composto por 1g e pó de fígado para 8g de farinha de peixe diluídos em 500 mL de água, de acordo com Santos et *al.* (1981) e Scarpassa & Tadei (1990). Em cada cuba foram adicionados 2 mL deste alimento líquido e a água trocada a cada dois dias. As larvas foram mantidas neste sistema até atingirem o terceiro estádio, quando foram utilizadas nos bioensaios (Figura 3c). A água de poço era previamente armazenada em frascos plásticos no insetário para equilíbrio da temperatura. A temperatura média do insetário e da sala de experimentos dos bioensaios foram mantidas a 27±1ºC e umidade entre 70 – 80% e fotoperíodo de 12 horas.

4.2 Preparação dos Extratos

Foram utilizados diferentes tipos de espécies de fungos para a extração dos componentes ativos destes fungos.

Extratos de *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.

O fungo *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr da Classe Basidiomycete, família Polyporaceae, tem propriedades decompositoras de madeira. Exemplares deste fungo foram coletados na Reserva Adolpho Ducke do INPA (59º 58´W e 2º 57´S), e posteriormente cultivados em meios de cultura na Universidade Estadual do Amazonas (UEA) junto da Coleção Micológica do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior de Tecnologia (EST) sob Coordenação do Prof. Dr. Ademir Castro e Silva.

Para a obtenção dos extratos brutos, os carpóforos de *P. sanguineus* foram triturados em moinho de facas e passados em peneiras. Os extratos então obtidos a partir do material triturado em extrator Soxhlet, sofreram processo de extração em gradientes de polaridade na média de 8 horas.

Extratos dos Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos foram obtidos com a equipe do Dr. José Odair Pereira e da Dra. Antonia Q.L. Souza, em colaboração com o Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Os fungos endofíticos são provenientes da Fazenda da Agronomia – UFAM, BR Manaus – Rio Branco. Foram utilizados 4 gêneros de fungos endofíticos de diferentes extratos: *Pestalotiopsis* (7 extratos); *Penicillium* (7 extratos); *Trichoderma* (3 extratos) e *Xylaria* (1 extrato). Em seguida, temos uma coleção destes fungos para dar início o processo da realização dos bioensaios seletivos, com o propósito de realizar um *screenig* dos extratos para avaliar a atividade larvicida e determinar a espécie de maior potencial letal.

Os fungos do gênero *Pestalotiopsis*, são endófitos do fruto da planta *Gustavia cf. elíptica* da família Lecythidaceae; e os demais são do córtex da planta *Murraya paniculata* (Rutaceae).

	Espécies	Identificação dos extratos
1	*Trichoderma* sp.	Fração Líquida Acetato de Etila
2	*Trichoderma ovaslisporum*	Fração Líquida Acetato de Etila
3	FED-15	Micélio Etanol
4	*Xylaria* sp.	Micélio Etanol
5	*Pestalotiopsis virgulata*	Micélio Acetato de Etila
6	*Pestalotiopsis virgulata*	Micélio Butanol
7	*Pestalotiopsis virgulata*	Fração Líquida Acetato de Etila
8	*Pestalotiopsis aeruginea*	Fração Líquida Acetato de Etila
9	*Pestalotiopsis aeruginea*	Micélio Acetato de Etila
10	*Pestalotiopsis aeruginea*	Fração Líquida Butanol
11	*Pestalotiopsis aeruginea*	Micélio Butanol
12	*Penicillium veridicatum*	Micélio Etanol
13	*Penicillium citrinum*	Micélio Etanol
14	*Penicillium veridicatum*	Fração Líquida CH_2Cl_2
15	*Penicillium citrinum*	Fração Líquida Acetato de Etila
16	*Penicillium citrinum*	Fração Líquida CH_2Cl_2
17	*Penicillium veridicatum*	Fração Líquida Acetato de Etila

4.3 Bioensaios Seletivos

Para a avaliação de susceptibilidade da ação inibidora dos extratos fúngicos, a montagem dos bioensaios seguiu critérios estabelecidos por Dulmage *et al.* (1990), com algumas modificações. Foram utilizados 17 extratos diferentes nos bioensaios seletivos, sendo realizados apenas com larvas de *A. aegypti*, servindo como modelo biológico para posterior aplicação em bioensaios de dose com ambas as larvas de *A. aegypti* e *A. nuneztovari*.

Em laboratório, as condições de temperatura foram de 27±1ºC e umidade relativa superior a 80%. Nos bioensaios foram utilizadas placas de cultura celular de poliestireno com diâmetro de 34,5mm para a realização dos bioensaios (Figura 6), contendo 10 mL de água potável em cada poço da placa de cultura, 10 larvas de terceiro estádio, 50µL de alimento líquido, mais a aplicação dos extratos fúngicos, estabelecendo duas concentrações: 250 e 500 ppm; mais o controle negativo que recebeu apenas DMSO (Dimetilsulfóxido) nas mesmas concentrações, cuja mortalidade não ultrapassou 10%.

Após a aplicação do extrato, as leituras foram feitas nos intervalos de 24h, 48h e 72 horas, anotando-se o número de larvas vivas e mortas em cada concentração, sendo o experimento repetido em três momentos diferentes. Os extratos selecionados nesta fase seletiva deveriam apresentar mortalidade das larvas superior a 50%.

Crescimento e extração dos fungos selecionados

Foram selecionados dois extratos de maior potencial letal, a partir dos bioensaios seletivos. Um extrato endofítico (*Pestalotiopsis virgulata*) e um extrato basidiomiceto (*Pycnoporus sanguineus*), para serem realizados os testes nos bioensaios de dose.

O extrato miceliar de *Pestalotiopsis virgulata*, código *GaFr3 2.3 Micélio Acetato Etanol*, foi escolhido a partir do Bioensaio Seletivo para ser feito cultura celular em Meio Líquido e posteriormente realizados os Bioensaios de Dose.

Foram utilizados 17 extratos de diferentes espécies de fungos para a avaliação da atividade larvicida. Os extratos para o inicio dos trabalhos (escala analítica) foram cedidos pelo laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana da Universiadade Federal do Amazonas – UFAM. Destes extratos, a linhagem de *Pestalotiopsis virgulata* foi selecionada e cultivada em maior escala, para obtenção de quantidades sufucientes para a realização de todos os bioensaios com larvas de *A. aegypti* e *A. nuneztovari,* e necessários para uma possível purificação das moléculas bioativas.

O fungo endofítico *P. virgulata* foi cultivado em 48 erlenmeyers com 300 mL de meio de cultura MID líquido com 5 fragmentos de ágar por erlenmeyer contendo micélio e esporos da cultura, em placa de Petri com BDA, cultivada previamente por

15 dias. Na ocasião também foram inoculados nas mesmas condições quatro erlenmeyers com o basidiomiceto *P. sanguineus*) para serem realizados os mesmos bioensaios da prévia.

Ápos 28 dias de cultivo em meio de cultura MID líquido, as linhagens foram filtradas em papel de filtro número 12, a vácuo, em câmera de fluxo laminar vertical, a fim de se separar o micélio do meio metabólico, e destes foram realizadas as extrações dos metabólitos secundários.

Para a extração dos metabólitos secundários, foram utilizados dois solventes de diferentes polaridades: Acetato de Etila ($CH_3CO_2CH_2CH_3$) e água (extrato aquoso). Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida, observando-se o ponto de ebulição de cada solvente (acetato de etila= 68,7ºC, H_2O= 100ºC), e pesados para obtenção dos rendimentos. Também foi realizado liofilização dos extratos aquosos dos meios de cultura. Mesmo procedimento foi adotado para os extratos de *P. sanguineus.*

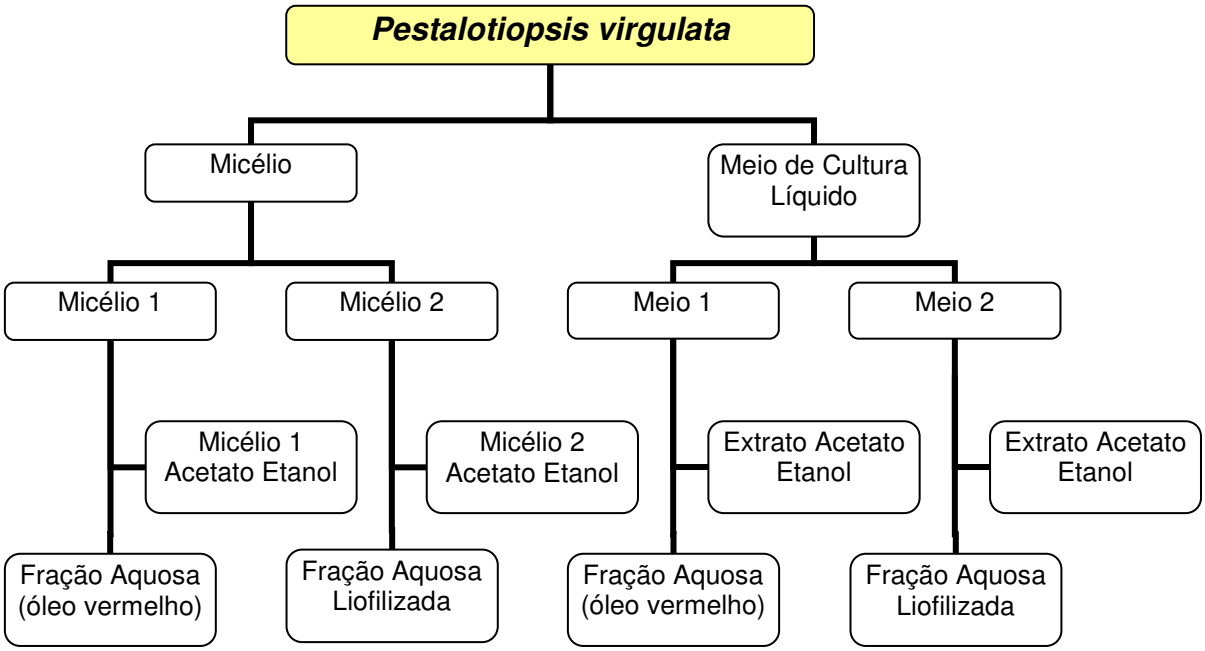

Figura 4. Esquema das etapas realizadas na procura de substâncias bioativas de *Pestalotiopsis virgulata.*

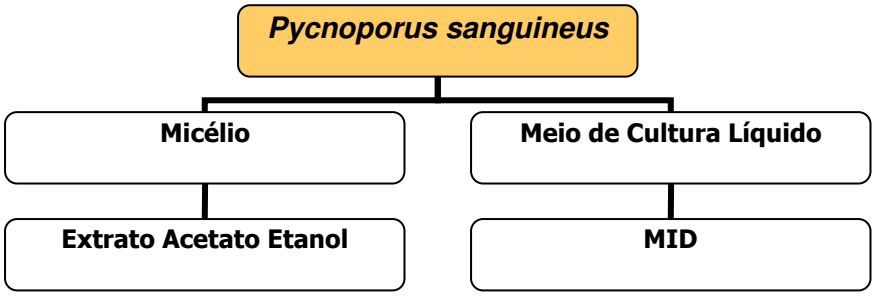

Figura 5. Esquema das etapas realizadas na procura de substâncias bioativas de *Pycnoporus sanguineus.*

4.4 Bioensaios de Dose para obtenção das Concentrações Letais (CL_{50} - CL_{90})

Para cada diluição testada, foram feitas 3 réplicas de cinco poços das placas de cultura celular contendo 10 mL de água potável, 100 µl de alimento líquido, 10 larvas de terceiro estádio e a dose do extrato, conforme a figura 6. Em cada bioensaio foi feita uma réplica controle adicionando DMSO. As leituras foram realizadas nos intervalos de 24h, 48h e 72 horas, e verificado o número de larvas vivas e mortas nos poços.

Foram ralizados bioensaios testando diferentes extrativos contra larvas de 3° estádio de *Aedes aegypti* (09 extratos) e *Anopheles nuneztovari* (07 extratos) para obtenção das Concentrações Letais - CL_{50} e CL_{90}, cada extrato com 5 concentrações: 100, 200, 300, 400 e 500 ppm.

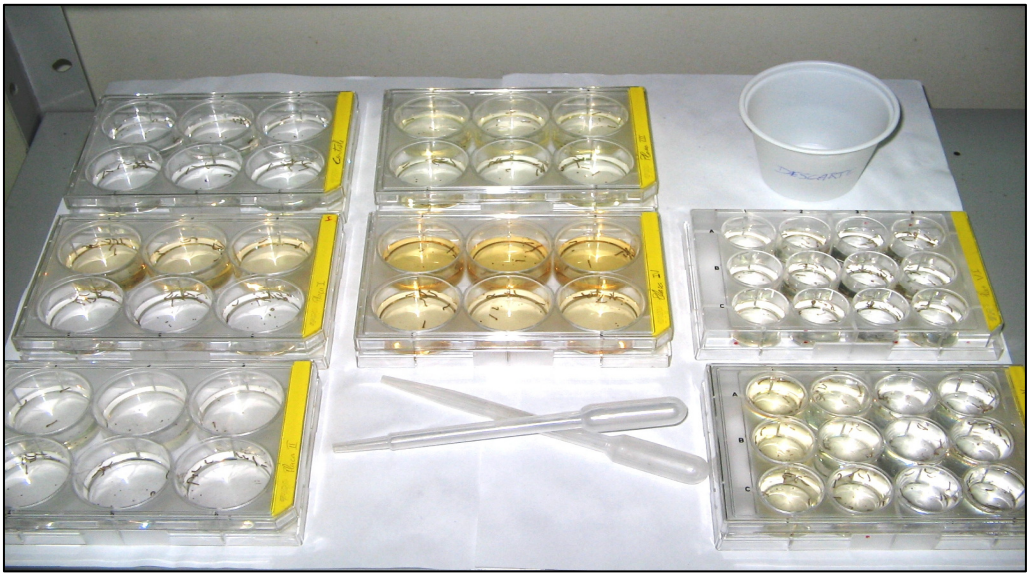

Figura 6. Placas de cultura celular para a realização dos bioensaios.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para retirar a influência da mortalidade natural das larvas foi feito um cálculo de correção utilizando a fórmula de Abbott (Finney, 1981) à eficiência dos extratos foram avaliadas estatisticamente por meio de retas de regressão linear dos extratos para cada intervalo de leitura sendo também calculada a concentração letal mediana a CL_{50} e CL_{90} usando ambos o programa de Polo-PC.

4.5.1 Avaliação dos bioensaios seletivos

Os valores de mortalidade foram normalizados pela transformação do arcsen.j; onde *x* é a proporção entre os indivíduos pelo total de indivíduos ao início do experimento. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA - de um fator (concentração dos extratos fúngicos) com medidas repetidas no tempo (intervalos de 24 horas).

4.5.2 Avaliação dos bioensaios de dose

A avaliação dos bioensaios seguiu critérios de acordo com Dulmage *et al.* (1990), onde foram considerados os seguintes critérios: a mortalidade no grupo controle não deverá ultrapassar 10%, o limite de confiança considerado foi de 95% e os bioensaios foram repetidos em três dias alternados.

Foi utilizado o cálculo da mortalidade corrigida com a fórmula de Abbot (1925), expressa abaixo, para retirar a influencia da mortalidade natural nos bioensaios quando o grupo controle foi $\geq 5\%$ e $\leq 20\%$.

$$\mathbf{P} = \left(1 - \frac{\mathbf{T}}{\mathbf{C}}\right) \mathbf{x\ 100}$$

onde:

P = mortalidade corrigida %;

T = número de indivíduos vivos no tratamento após bioensaio;

C = número de indivíduos vivos no controle após bioensaio;

4.5.3 Concentração Letal Mediana - CL_{50} e CL_{90}

O cálculo da concentração letal para matar 50% da população das larvas, nos três intervalos de observação, foi realizado com auxílio do programa Polo PC, a partir dos dados de mortalidade das larvas obtidas nos bioensaios.

O cálculo das concentrações letais para matar 50% (CL_{50}) e 90 % (CL_{90}) das larvas foi realizado por meio da análise de *probit* com o auxílio do programa Polo PC (LeOra Software, 1987; Haddad, 1998), a partir dos dados de mortalidade obtidos nos bioensaios, considerando a estimativa da potência: g :5 0,5. Os dados foram plotados no programa seguindo as recomendações do guia do usuário no qual preconiza uma classificação de doses, portanto não sendo utilizadas todas as concentrações testadas para a análise.

A partir dos dados obtidos pelo programa foi montado um gráfico comparativo entre a mortalidade esperada e obtida das concentrações e os *probits* gerados pela equação de regressão:

$$\mathbf{y = (\alpha + 5) + \beta \,.\, log\ x}$$

Onde: **y** = *Probit*;

α = coeficiente linear (*parameter* dose ppm);

β = coeficiente angular (*slope*);

x = concentração.

Este tipo de análise permite determinar a relação positiva ou negativa existente entre as variáveis dependente (y) e indepedente (x) (Motta e Wagner, 2003).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação dos bioensaios seletivos

Os valores percentuais da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações dos diferentes extratos de fungos endofíticos e do fungo basidiomiceto em relação aos intervalos observados estão representados na Tabela 1. O extrato miceliar aceto-etanólico de *Pycnoporus sanguineus* foi bastante efetivo contra as larvas de 3° estádio de *A. aegypti*, promovendo mortalidade de 98% em 500µg/mL e de até 67% para a metade da concentração, 250µg/mL. Outro extrato miceliar selecionado foi do endófito *Pestalotiopsis virgulata*, apresentando mais eficácia que do fungo basidiomiceto, com 100% de mortalidade em 500µg/mL e de até 81% para a metade da concentração, 250µg/mL.

Tabela 1. Percentuais da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* de 3º estádio nas concentrações dos diferentes extratos de fungos endofíticos e do fungo basidiomiceto.

	Espécies	**Identificação dos extratos**	**% Mortos** 250µg/mL	**% Mortos** 500µg/mL
1	*Pycnoporus sanguineus**	**Pyc** Micélio AcOEt.	67%	98%
2	*Trichoderma* sp.	**T16** Fr.Lq AcOEt	30%	90%
3	*Trichoderma ovaslisporum*	**MpG16** 1.3b Fr.Liq. AcOEt.	0%	0%
4	*FED-15*	**MpC11** 3.2 Fr. Micélio Et.	6.6%	73.3%
5	*Xylaria* sp.	**mpCe11** 3.2 Micélio	6.6%	100%
6	*Pestalotiopsis virgulata**	**GaFr3** 2.3 Micélio AcOEt.	81%	100%
7	*Pestalotiopsis virgulata*	**GaFr3** 2.3 Micélio But	33.3%	95%
8	*Pestalotiopsis virgulata*	**P3IA - GaFr3** 3.2 Fr.Liq. AcOEt.	6.6%	56.6%
9	*Pestalotiopsis aeruginea*	**P1IA - GaFr1** 1.2b Fr.Liq. AcOEt.	0%	20%
10	*Pestalotiopsis aeruginea*	**GaFr1** 1.2b Micélio AcOEt	56.6%	96.6%
11	*Pestalotiopsis aeruginea*	**GaFr1** 1.2b Fr.Liq. But.	33.3%	93.3%
12	*Pestalotiopsis aeruginea*	**GaFr1** 1.2b Micélio But.	0%	0%
13	*Penicillium veridicatum*	**MpR2** 3.2a Micélio	10%	96.6%
14	*Penicillium citrinum*	**MpR1** 3.2a Micélio	6.6%	96.6%
15	*Penicillium veridicatum*	**MpRp2** 3.2 Fr.Lq. CH_2Cl_2	33.3%	76.6%
16	*Penicillium citrinum*	**MpR1** 3.2a Fr.Lq. AcOEt	3.3%	66.6%
17	*Penicillium citrinum*	**MpR1** 3.2a Fr.Lq. CH_2Cl_2	0%	0%
			500µg/mL	1000µg/mL
18	*Penicillium veridicatum*	**MpR3** 2.3b Fr. Liq. Acet.	13.3%	95%

* escolhidos para bioensaios de dose

5.2 Bioensaios de dose para obtenção das Concentrações Letais (CL_{50} - CL_{90})

- ***Aedes aegypti***

Pode-se visualizar na Tabela 2 os resultados obtidos para os nove extratos utilizados na avaliação das concentrações letais contra larvas de *Aedes aegypti*, verificando os tempos de exposição, os valores das concentrações letais CL_{50} e CL_{90}. valores de g (0.95), qui-quadrado (χ^2), Intervalos de Confiança para 5% de probabilidade (IC 95%) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.*

Quatro (04) dos nove (09) extratos de fungos estudados mostraram toxicidade contra larvas de *A. aegypti* para CL_{50} < 500 µg/ml.

Tabela 2. Resultados dos bioensaios com larvas de *Aedes aegypti* (3º estádio) nas leituras de 48 e 72 horas nos diferentes extratos testados.

Extratos	*Aedes aegypti*					
	Leitura (horas)	CL_{50} (ppm) (IC 95%)	CL_{90} (ppm) (IC 95%)	g	χ^2	Equação de Regressão y = (α + 5) + β log x
Pest. Meio 1	**48h**	1160.4 (799.1 – 2745.3)	4956.7 (2265.5 – 32461.)	0.17	0.91	y = (-6.22 + 5) + 2.03 log x
	72h	805.4 (553.7 – 2766.5)	3052.2 (1336.0 – 62941.)	0.33	3.67	y = (-6.43 + 5) + 2.21 log x
Pest. Meio 1 F. Aquosa	**48h**	n.s.	n.s.	0.99	1.16	y = (-10.1 + 5) + 3.28 log x
	72h	n.s.	n.s.	0.68	0.74	y = (-6.58 + 5) + 2.01 log x
Pest. Meio 2	**48h**	n.s.	n.s.	5.76	6.03	y = (-18.2 + 5) + 6.44 log x
	72h	n.s.	n.s.	2.21	8.11	y = (-4.38 + 5) + 1.30 log x
Pest. Meio 2 F. Aquosa	**48h**	n.s.	n.s.	1.07	0.13	y = (-5.21 + 5) + 1.39 log x
	72h	n.s.	n.s.	0.54	1.04	y = (-7.10 + 5) + 2.24 log x
Pest. Micélio 1	**48h**	246.74 (141.17 – 348.81)	645.5 (427.7 – 3000.8)	0.41	12.3	y = (-7.34 + 5) + 3.06 log x
	72h	126.6 (43.3 – 184.1)	449.5 (304.8 – 1453.1)	0.36	8.16	y = (-4.89 + 5) + 2.32 log x
Pest. Micélio 2	**48h**	196.1 (147.2 – 240.2)	478.4 (372.05 – 766.3)	0.14	6.77	y = (-7.58 + 5) + 3.30 log x
	72h	101.8 (54.7 – 138.2)	379 (290.3 – 619.7)	0.17	4.12	y = (-4.50 + 5) + 2.24 log x
Pest. Micélio 2 F. Aquosa	**48h**	n.s.	n.s.	5.30	0.67	y = (-27.5 + 5) + 9.55 log x
	72h	n.s.	n.s.	5.30	0.67	y = (-27.5 + 5) + 9.55 log x
Pyc Micélio	**48h**	227.4 (160.2 – 298.7)	6011.1 (2178.3 – 91302.)	0.21	1.89	y = (-2.12 + 5) + 0.90 log x
	72h	153.6 (52.6 – 223.8)	1635.0 (749.7 – 45623.)	0.40	4.02	y = (-2.72 + 5) + 1.24 log x
Pyc MID	**48h**	395.1 (349.3 – 460.6)	1499.7 (1088.5 – 2480.7)	0.05	0.85	y = (-5.74 + 5) + 2.21 log x
	72h	335.1 (272.1 – 441.2)	4175.1 (1958.5 – 20914.)	0.13	0.79	y = (-2.95 + 5) + 1.16 log x

n.s. = não significativo em g < 0.5

Os dados da tabela 2 referem-se aos resultados apresentados pelo programa Polo-PC, com significativo intervalo de confiança para g < 0.5 e valores de qui-quadrado (χ^2) < 7.98 não sendo significativos, indicando assim que os dados se ajustam ao modelo de *Probit*. Com excessão do extrato Pest. Micélio 1, que apresentou χ^2 elevado e o programa Polo-PC teve de ajustar os dados utilizando a heterogeneidade como fator de correção. A seguir serão discutidos os resultados apresentados na tabela 2 com mais detalhes.

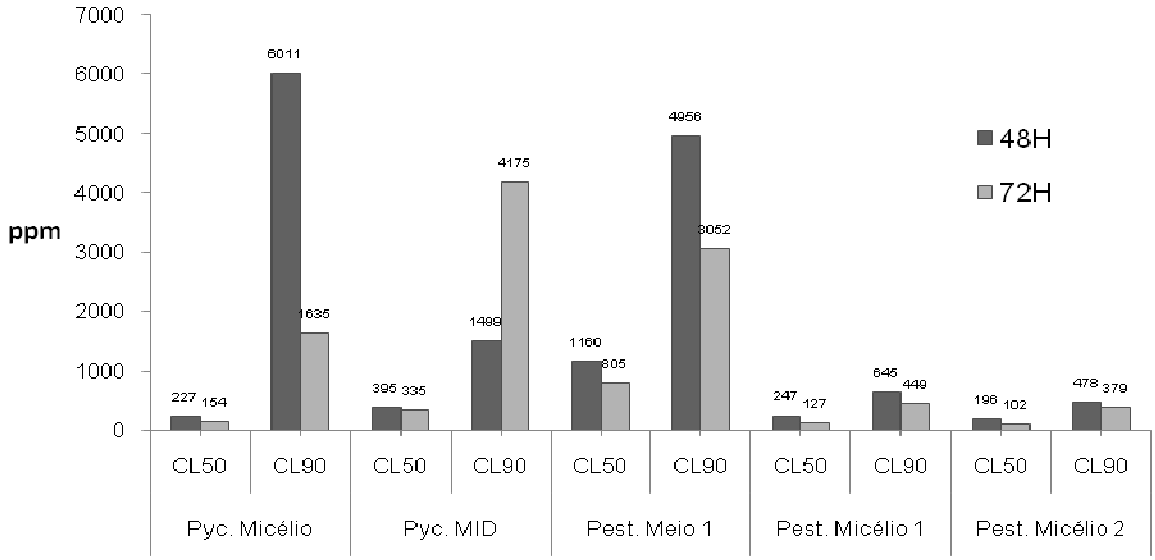

Figura 7. Representação gráfica das Concentrações Letais (CL_{50} e CL_{90} – ppm) dos extratos Pyc Micélio, Pyc MID, Pest. Meio 1, Pest. Micélio 1 e Pest. Micélio 2; contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* nos intervalos de leitura de 48 e 72 horas.

Tabela 3. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* nas leituras de 48 e 72 horas, mostando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit*.

Extratos	Leitura (horas)	CL_{50} (IC 95%)	n	χ^2	g.l	R^2	Eq. regressão y = (α + 5) + β.logx
Pest. Meio 1	**48h**	1160.4 (799.1 – 2745.3)	120	0.91	3	0.938	y = 2.03x - 1.22
	72h	805.4 (553.7 - 12766.5)	120	3.67	3	0.928	y = 2.21x - 1.43
Pest. Micélio 1	**48h**	246.74 (141.2 – 348.8)	100	12.3	3	0.978	y = 1.36x + 0.48
	72h	126.6 (43.3 - 184.1)	100	8.16	3	0.999	y = 2.32x + 0.11
Pest. Micélio 2	**48h**	196.1 (147.2 – 240.2)	120	6.77	3	0.896	y = 3.38x - 2.58
	72h	101.8 (54.7 – 138.2)	120	4.12	3	0.991	y = 2.24x + 0.50

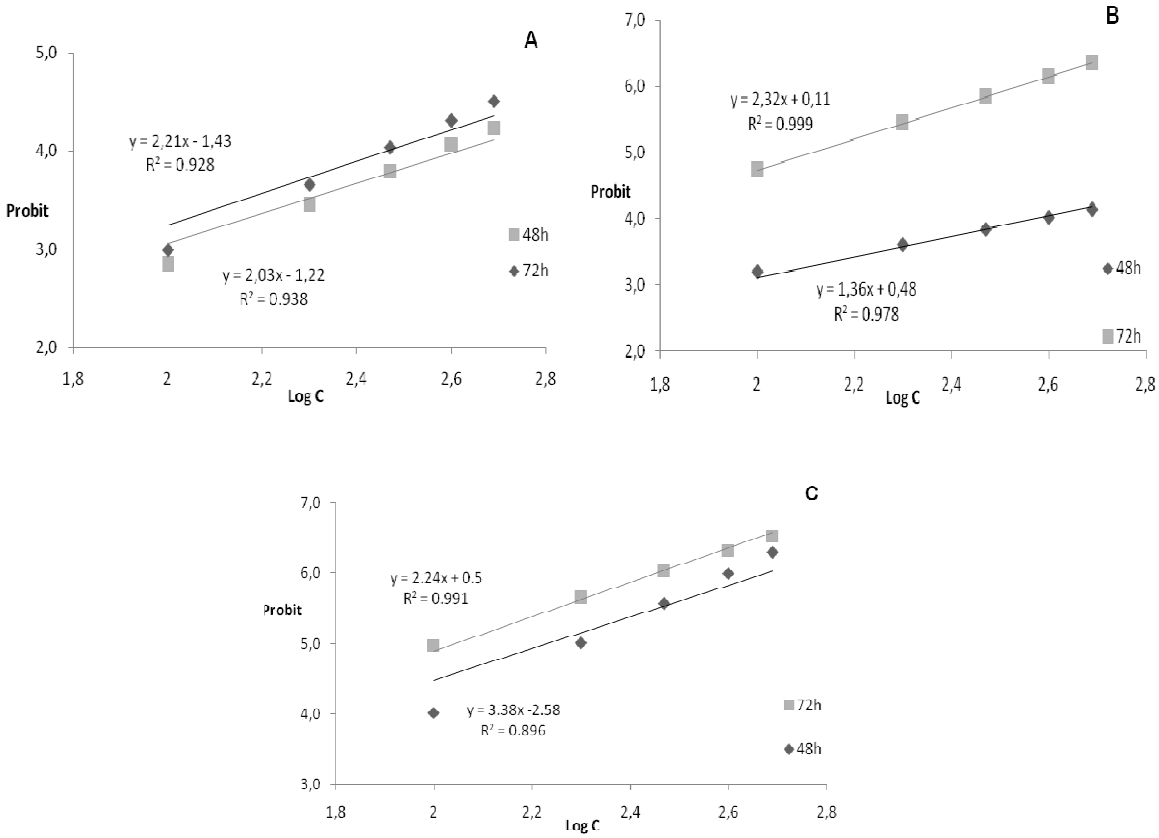

Figura 8. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 (A), Micélio 1 (B) e Micélio 2 (C) de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* nas leituras de 48 e 72 horas.

Tabela 4. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P).

Extratos	χ^2	g.l.	P	Hipótese de Igualdade	χ^2	g.l.	P	Hipótese de Paralelismo
Meio 1 x Mic.2	540,8	2	P < 0,0001	rejeitada	0,0048	1	P > 0,945	aceita
Mic 1 x Mic 2	4,55	2	P > 0,103	aceita	0,0536	1	P > 0,817	aceita

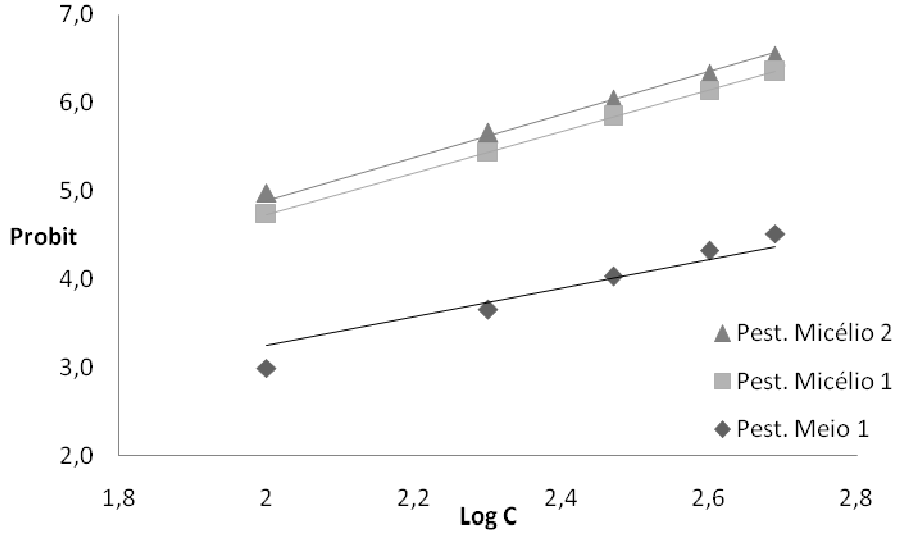

Figura 9. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Pest. Meio 1, Pest. Micélio 1 e Pest. Micélio 2 de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* na leitura de 72 horas.

O extrato Pest. Micélio 1 apresentou χ^2 significativo, indicando que χ^2 calculado foi maior que o χ^2 tabelado (χ^2 calc. > χ^2 tab.), este resultado indica que há um baixo ajuste dos dados ao modelo de *Probit* (Finney, 1971), portanto o programa Polo-PC efetuou os cálculos porém, usando a heterogeneidade como fator de correção para as variâncias das estimativas dos parâmetros (Tabela 2).

Comparando os resultados entre Pest. Micélio 1 versus Pest. Micélio 2, tanto a hipótese de igualdade quanto paralelismo foram aceitas pelo programa Polo-PC, indicando, portanto, que as doses efetivas são qualitativamente e quantitativamente não-diferentes (Tabela 4). Resultado também observado nas análises por CCD (Cromatografia em Camada Delgada), com auxílio de lâmpadas de UV a 245 nm e 366 nm, onde também não foi constatada nenhuma diferença significativa visualmente entre os dois extratos miceliares, além de terem sido reinoculados em meio de cultura e não apresentarem contaminantes após seu crescimento.

Comparando os resultados entre Pest. Meio 1 versus Pest. Micélio 2, a hipótese de igualdade foi rejeitada, enquanto que a hipótese de paralelismo foi aceita, indicando que as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes (Tabela 4).

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios. Sendo que para matar 50% da

população é necessário uma concentração 7,87 vezes menor do extrato Pest. Micélio 2 que se necessita do extrato Pest Meio 1 (Figura 10).

```
Relative potencies
                potency   limits        0.90         0.95         0.99
Micelio2        7.87308   lower      5.80311      5.44216      4.72580
                          upper     11.94650     13.60546     19.88609
```

Figura 10. Potência Relativa do extrato Pest. Micélio 2 de 7.87308 vezes maior que em relação ao extrato Pest Meio 1, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

Tabela 5. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* nas leituras de 48 e 72 horas, observando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.*

Extratos	Leitura (horas)	CL_{50} (IC 95%)	n	χ^2	g.l.	R^2	Equação de regressão $y = (\alpha + 5) + \beta . \log x$
Pyc Micélio	**48h**	227.4 (160.2 – 298.7)	120	1.89	3	-0.74	y = 0.9x + 2.88
	72h	153.6 (52.6 – 223.8)	120	4.02	3	0.424	y = 1.24x + 2.28
Pyc MID	**48h**	395.1 (349.3 – 460.6)	120	0.85	3	0.98	y = 2.21x - 0.74
	72h	335.1 (272.1 – 441.2)	120	0.79	3	0.468	y = 1.16x - 2.05

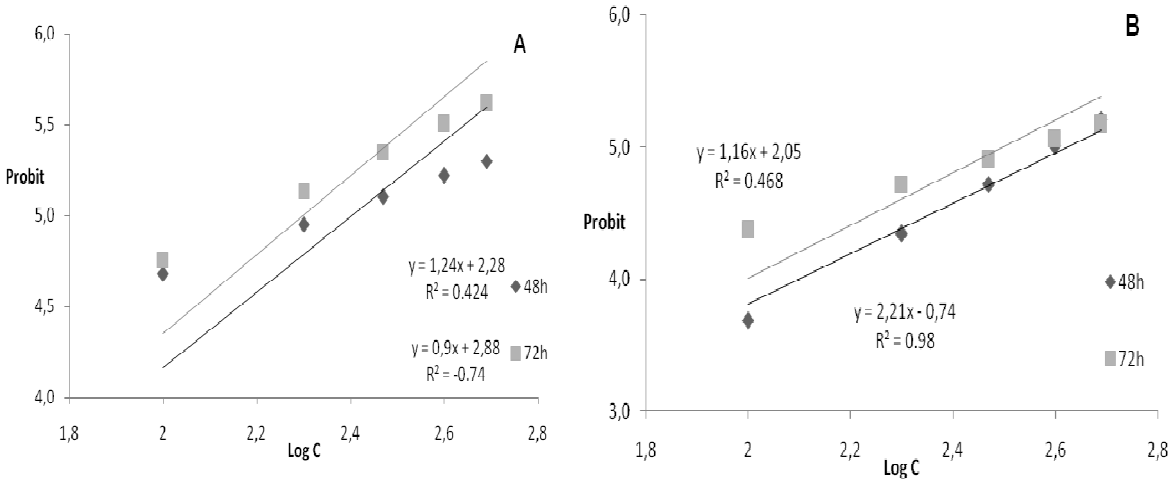

Figura 11. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Micélio (A) e do Meio de Cultura - MID (B) de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* nas leituras de 48 e 72 horas.

Tabela 6. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P).

Extratos	χ^2	g.l.	P	Hip. de Igualdade	χ^2	g.l	P	Hip. de Paralelismo
Pyc Mic x Pyc MID	30,879	2	P < 0,0001	rejeitada	0,0643	1	P > 0,80	aceita

Na Figura 12 foram comparados os dados do extrato miceliar de *P. sanguineus* versus o extrato do Meio de Cultura (MID) e evidenciado no gráfico que o maior o potencial larvicida foi observado para o extrato miceliar de *P. sanguineus*. Considerando a mortalidade nas leituras de 72h para ambos os extratos (Micélio e MID), observa-se que os valores de χ^2 foram significativos para cada leitura, rejeitando a hipótese de igualdade entre os extrativos (Tabela 6).

Levando-se em conta o teste de paralelismo, ou seja, testar a hipótese de que os coeficientes angulares das regressões não são singificativamente diferentes, a hipótese de paralelismo foi aceita, pois os valores de χ^2 não foram significativos nas comparações (Tabela 6).

Os testes relativos às retas de regressão na tabela 6 mostram que a hipótese de igualdade foi rejeitada e que há paralelismo entre elas, ou seja, os coeficientes angulares das regressões não são significativamente diferentes. Portanto, as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes. Na figura 13 constam as retas de regressão considerando os dois extratos nas leituras de 72h. Os valores de *Probit* foram calculados a partir das estimativas dos parâmetros coenfiente linear e angular (obtidos no programa Polo-PC), seguindo-se a tabela de Finney (1971).

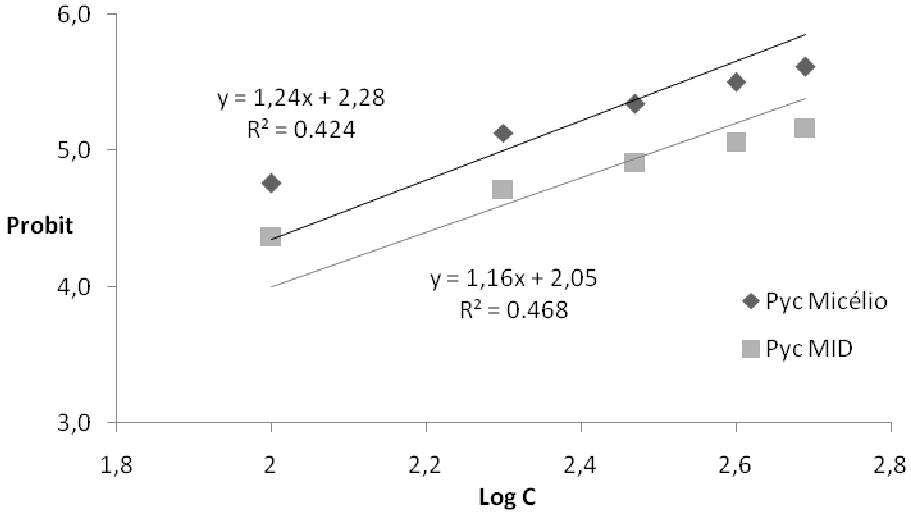

Figura 12. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Micélio e do Meio de Cultura - MID de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* na leitura de 72 horas.

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios. Sendo que para matar 50% da população é necessário uma concentração 2,20 vezes menor do extrato Pyc Micélio que se necessita do extrato Pyc MID (Figura 13).

Relative potencies					
	potency	limits	0.90	0.95	0.99
Pyc	2.20023	lower	1.70552	1.63111	1.49836
		upper	3.03509	3.27013	3.85239

Figura 13. Potência Relativa do extrato Pyc Micélio de 2.20023 vezes maior que em relação ao extrato Pyc MID, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

Os extratos miceliares de *P. virgulata* e *P. sanguineus* apresentaram melhores resultados de mortalidade contra larvas de 3º estádio de *A. aegypti*, nas leituras de 72h (figura 14). Comparando os dados dos extratos miceliares destes fungos evidenciou-se pelo gráfico que o maior potencial larvicida foi obtido para *P. virgulata.*

Tabela 7. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com os extratos miceliares dos gêneros *Pestalotiopsis* versus *Pycnoporus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P).

Extratos	χ^2	g.l.	P	Hipótese de Igualdade	χ^2	g.l	P	Hipótese de Paralelismo
Pestalotiopsis* x *Pycnoporus	62,047	2	P < 0,0001	rejeitada	9,287	1	P > 0,002	rejeitada

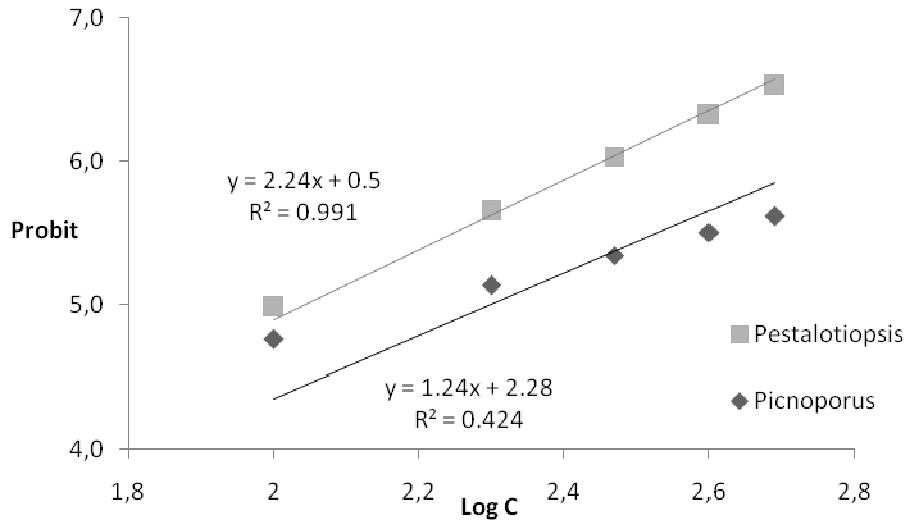

Figura 14. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico de *Pestalotiopsis virgulata* e *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Aedes aegypti,* na leitura de 72 horas.

Considerando a mortalidade nas leituras de 72h para ambos os extratos miceliares (Pyc e Pest.), observa-se que os valores de χ^2 foram significativos para cada leitura, rejeitando a hipótese de igualdade da mortalidade. Na figura 14 constam as retas de regressão considerando os dois extratos nas leituras de 72h. Os valores de *Probit* foram calculados a partir das estimativas dos parâmetros coenfiente linear e angular (obtidos no programa Polo-PC), seguindo-se a tabela de Finney (1971). Levando-se em conta o teste de paralelismo, ou seja, testar a hipótese de que os coeficientes angulares das regressões não são singificativamente diferentes, a hipótese de paralelismo foi rejeitada, pois os valores de χ^2 foram significativos nas comparações (Tabela 7).

Os testes relativos às retas de regressão (figura 14) mostram que a hipótese de igualdade foi rejeitada e que não há paralelismo entre elas, ou seja, os

coeficientes angulares das regressões são significativamente diferentes. Neste caso, em que a hipótese de paralelismo não foi confirmada, o maior potencial larvicida é atribuído ao maior coeficiente angular (*slope*), obtido pelo gênero *Pestalotiopsis* (coef. angular Pyc = 1,2477; coef. angular Pest = 2,2450).

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios. Sendo que para matar 50% da população é necessário uma concentração 2,22 vezes menor do extrato Pest. Micélio 2 que se necessita do extrato Pyc micélio (Figura 15).

Relative potencies

	potency	limits	0.90	0.95	0.99
Pest	2.22227	lower	1.58324	1.46553	1.21711
		upper	3.50626	4.08053	6.71339

Figura 15. Potência Relativa do extrato Pest. Micélio 2 de 2.22227 vezes maior que em relação ao extrato Pyc micélio, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

- ***Anopheles nuneztovari***

Pode-se visualizar na Tabela 8 os resultados obtidos para os sete extratos utilizados na avaliação das concentrações letais contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari*, verificando os tempos de exposição, os valores das concentrações letais medianas CL_{50} e CL_{90}.

Três (03) dos sete (07) extratos de fungos estudados mostraram toxicidade contra larvas de *A. nuneztovari* para $CL_{50} < 500$ µg/ml.

Tabela 8. Resultados dos bioensaios com larvas de *Anopheles nuneztovari* (3º estádio) nas leituras de 48 e 72 horas nos diferentes extratos testados.

Extratos	***Anopheles nuneztovari***					
	Leitura (horas)	**CL_{50} (ppm)**	**CL_{90} (ppm)**	**g < 0.5**	**χ^2**	**Eq. regressão y = (α + 5) + β.logx**
Pest. Meio 1	**48h**	n.s.	n.s.	1.29	4.46	y=(-4.52+5) +1.36logx
	72h	918.8 (649.6-1867.4)	7418.9 (3051.9-51820.)	0.14	0.83	y=(-4.18+5) +1.41logx
Pest. Meio 1 F. Aquosa	**48h**	n.s.	n.s.	1.45	0.42	y=(-5.03+5) +1.31logx
	72h	2993.9 (1111.3-.43+06)	135615.3 (11127.6 – ****)	0.46	0.50	y=(-2.69+5) +0.77logx
Pest. Meio 2	**48h**	n.s.	n.s.	1.14	3.69	y=(-3.87+5) +1.13logx
	72h	585.7 (466.1 – 862.7)	3777.5 (1976.3-13756.)	0.11	1.46	y=(-4.38+5) +1.58logx
Pest. Meio 2 F. Aquosa	**48h**	3835.0 (1359.8-.48+06)	97081.0 (9803.4-.60+10)	0.43	0.02	y=(-3.27+5) +0.91logx
	72h	689.1 (471.7–1737.2)	16268.0 (4251.7-.72+06)	0.23	1.09	y=(-2.64+5) +0.93logx
Pest. Micélio 2	**48h**	11.8 (0.28 – 33.2)	80.8 (24.3 – 121.2)	0.33	1.57	y=(-1.65+5) +1.53logx
	72h	11.9 (0.27 – 33.4)	78.7 (22.7 – 118.7)	0.33	2.28	y=(-1.68+5) +1.56logx
Pest. Micélio 2 F. Aquosa	**48h**	638.2 (469.6–1184.8)	8246.2 (3073.3-82642.)	0.16	2.65	y=(-3.23+5) +1.15logx
	72h	397.9 (265.0–1202.6)	4622.5 (1390.3-.36+07)	0.49	4.12	y=(-3.12+5) +1.20logx
Pyc Micélio	**48h**	116.7 (32.4 – 174.6)	568.1 (363.2-2680.1)	0.38	7.38	y=(-3.85+5) +1.86logx
	72h	87.2 (16.5 – 137.9)	343.7 (237.0 – 947.1)	0.40	8.16	y=(-4.17+5) +2.15logx

n.s. = não significativo em g < 0.5

Os dados da tabela 8 referem-se aos resultados apresentados pelo programa Polo-PC, com significativo intervalo de confiança para g < 0.5 e valores de qui-quadrado (χ^2) < 7.98 não sendo significativos, indicando assim que os dados se

ajustam ao modelo de *Probit*, ou seja, o *Probit* é uma função linear de dose ou log (dose). Com excessão do extrato Pyc Micélio, que apresentou χ^2 elevado e o programa Polo-PC teve de ajustar os dados utilizando a heterogeneidade como fator de correção. A seguir serão discutidos os resultados apresentados na tabela 8 com mais detalhes.

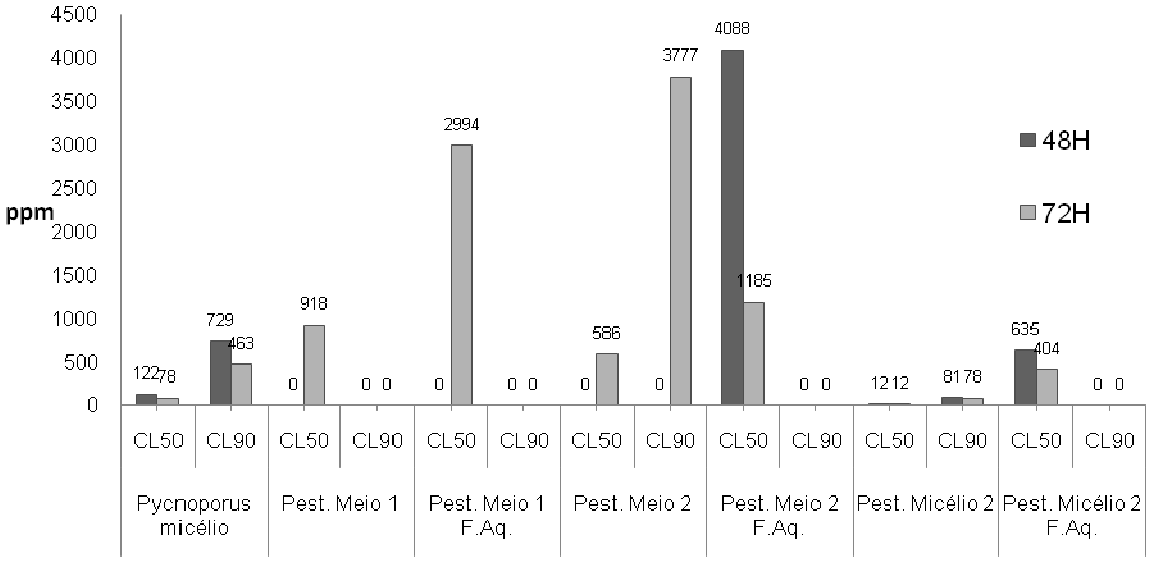

Figura 16. Mostra o gráfico com os 7 extratos com atividade larvicida que apresentaram 5% de probabilidade, e suas respectivas Concentrações Letais (CL_{50} e CL_{90} – ppm) nas leituras de 48 e 72 horas.

Tabela 9. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas (3º estádio) de *Anopheles nuneztovari* nas leituras de 48 e 72 horas, mostando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.*

Extratos	Leitura (horas)	CL_{50} (IC 95%)	n	χ^2	g.l	R^2	Equação de regressão $y = (\alpha + 5) + \beta.\log x$
Pest. Meio 1	**72h**	918.8 (649.6-1867.4)	120	0.83	3	0.943	y = 1.412x + 0.814
Pest. Meio 1 F. Aquosa	**72h**	2993.9 (1111.3-.43+06)	120	0.50	3	-0.51	y = 0.773x + 2.31
Pest. Meio 2	**72h**	585.7 (466.1-862.7)	120	1.46	3	0.974	y = 1,583x + 0,619
Pest. Meio 2 F. Aquosa	**48h**	3835.0 (1359.8-.48+06)	120	0.02	3	0.39	y = 0.913x + 1.728
	72h	689.1 (471.7-1737.2)	120	1.09	3	-0.08	y = 0.933x + 2.351

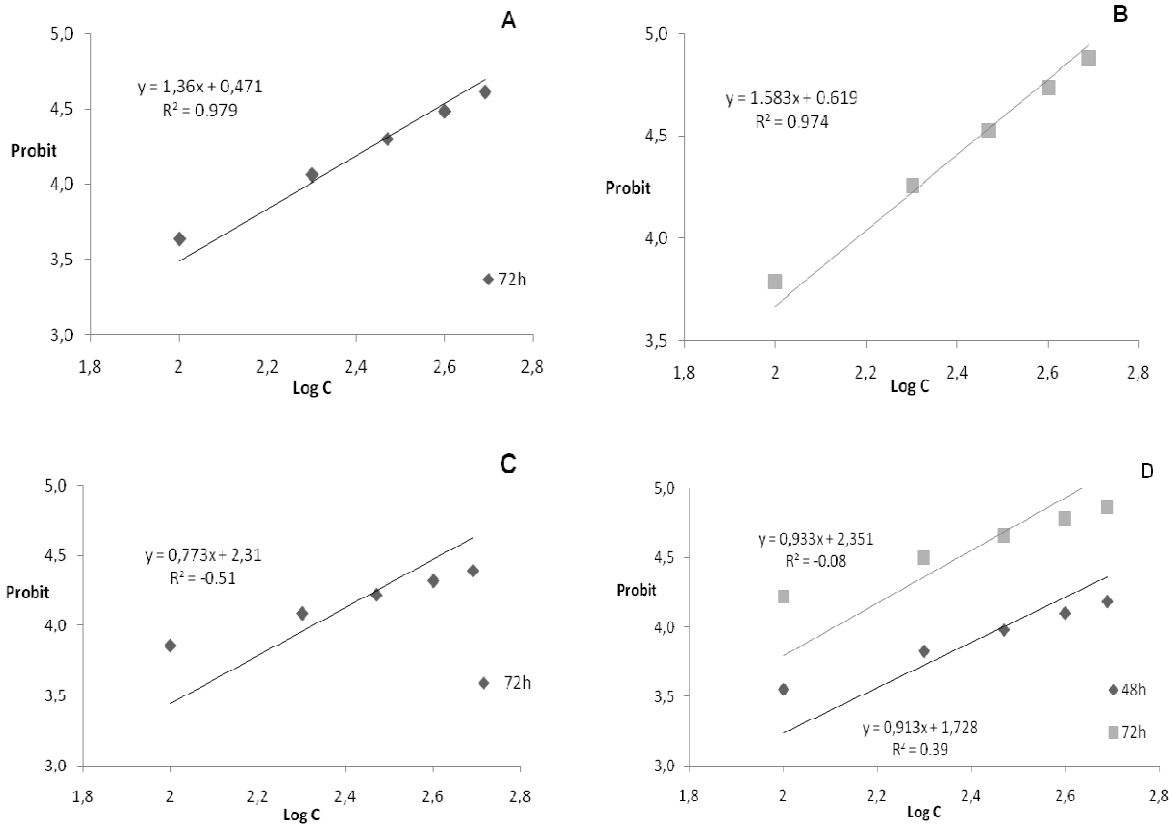

Figura 17. Representações gráficas dos valores de *Probit* dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 (A), Meio 1 F. Aquosa (B), Meio 2 (C) e Meio 2 F. Aquosa (D) de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* nas leituras de 48 e 72 horas.

Tabela 10. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *A. nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P).

Extratos	χ^2	g.l	P	Hipótese de Igualdade	χ^2	g.l	P	Hipótese de Paralelismo
Meio 1 x Meio1 FA	3,70	2	P > 0,157	aceita	2,872	1	P > 0,090	aceita
Meio 2 x Meio 2 FA	6,58	2	P < 0,1	rejeitada	3,522	1	P > 0,060	aceita

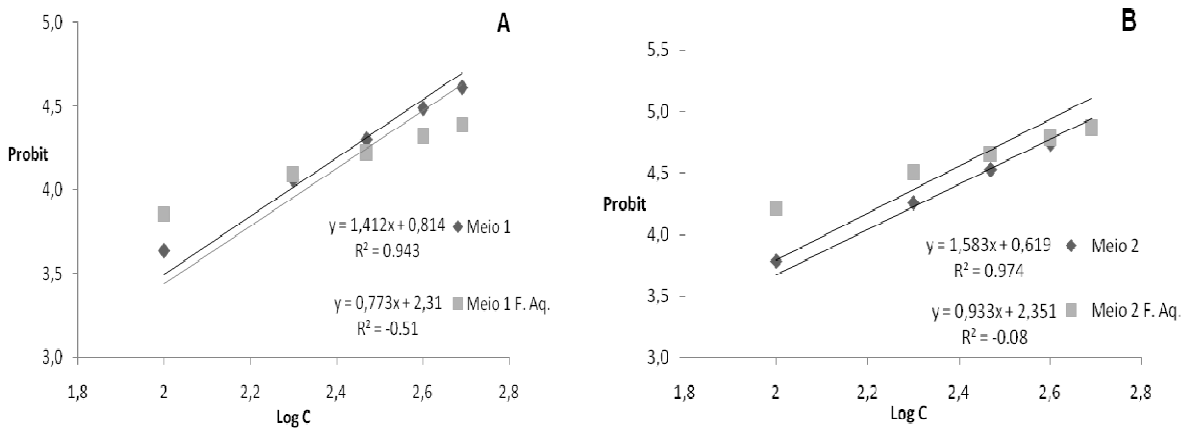

Figura 18. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 versus Meio 1 F. Aquosa (A) e Meio 2 versus Meio 2 F. Aquosa (B), de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* na leitura de 72 horas.

Comparando os resultados entre Pest. Meio 1 versus Pest. Meio 1 F. Aquosa, tanto a hipótese de igualdade quanto paralelismo foram aceitas pelo programa Polo-PC, indicando, portanto, que as doses efetivas são qualitativamente e quantitativamente não-diferentes (Tabela 10).

Comparando os resultados entre Pest. Meio 2 versus Pest. Meio 2 F. Aquosa, a hipótese de igualdade foi rejeitada, enquanto que a hipótese de paralelismo foi aceita, indicando que as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes (Tabela 10).

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios. Sendo que para matar 50% da população é necessário uma concentração 0,77 vezes menor do extrato Pest. Meio 2 que se necessita do extrato Pest. Meio 2 F. Aquosa (Figura 19).

Relative potencies

	potency	limits	0.90	0.95	0.99
Meio 2	.77066	lower	.58778	.55404	.48812
		upper	.98463	1.03240	1.13562

Figura 19. Potência Relativa do extrato Pest. Meio 2 de 0.77066 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Meio 2 F. Aquosa, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

Tabela 11. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P).

Extratos	χ^2	g.l	P	Hipótese de Igualdade	χ^2	g.l.	P	Hipótese de Paralelismo
Meio 1 x Meio 2	7,659	2	P < 0,05	rejeitada	0,206	1	P > 0,65	aceita
Meio 1 FA x Meio 2 FA	28,17	2	P < 0,0001	rejeitada	0,206	1	P > 0,65	aceita

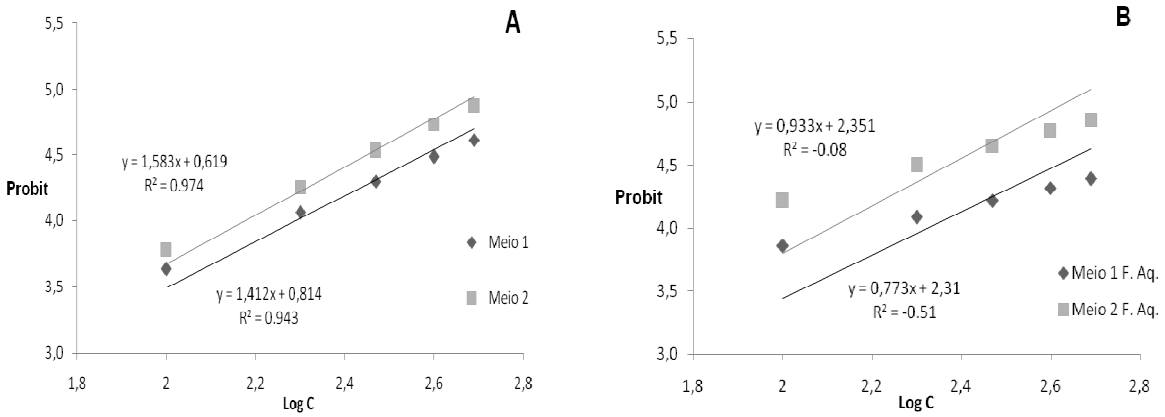

Figura 20. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Meio 1 versus Meio 2 (A) e Meio 1 F. Aquosa versus Meio 2 F. Aquosa (B), de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* na leitura de 72 horas.

Comparando os resultados entre Pest. Meio 1 versus Pest. Meio 2, a hipótese de igualdade foi rejeitada, enquanto que a hipótese de paralelismo foi aceita, indicando que as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes (Tabela 11).

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios. Sendo que para matar 50% da população é necessário uma concentração 1,41 vezes menor do extrato Pest. Meio 2 que se necessita do extrato Pest Meio 1 (Figura 21).

```
Relative potencies
                potency   limits       0.90        0.95        0.99
Meio 2          1.41417   lower     1.14609     1.10187     1.01975
                          upper     1.79609     1.89242     2.11531
```

Figura 21. Potência Relativa do extrato Pest. Meio 2 de 1.41417 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Meio 1, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

Comparando os resultados entre Pest. Meio 1 F. Aquosa versus Pest. Meio 2 F. Aquosa, a hipótese de igualdade foi rejeitada, enquanto que a hipótese de paralelismo foi aceita, indicando que as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes (Tabela 11).

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios. Sendo que para matar 50% da população é necessário uma concentração 3,14 vezes menor do extrato Pest. Meio 2 F. Aquosa que se necessita do extrato Pest. Meio 1 F. Aquosa (Figura 22).

```
Relative potencies
                potency   limits       0.90         0.95         0.99
Meio 2 F        3.14696   lower     2.06147      1.92670      1.69971
                          upper     6.27885      7.67326     12.94246
```

Figura 22. Potência Relativa do extrato Pest. Meio 2 F. Aquosa de 3.14696 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Meio 1 F. Aquosa, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

Tabela 12. Resultados dos bioensaios com extratos de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* nas leituras de 48 e 72 horas, mostando os valores das concentrações letais medianas CL_{50}, número de larvas utilizadas (n), qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.), linha de tendência (R^2) e a equação de regressão gerando os valores de *Probit.*

Extratos	Leitura (horas)	CL_{50} (IC 95%)	n	χ^2	g.l.	R^2	Equação de regressão $y = (\alpha + 5) + \beta . \log x$
Pest. Micélio 2	**48h**	11.8 (0.28 – 33.2)	120	1.57	3	0.195	y = 1.539x + 3.346
	72h	11.9 (0.27 – 33.4)	120	2.28	3	0.236	y = 1.565x + 3.315
Pest. Micélio 2 F. Aquosa	**48h**	638.2 (469.6–1184.8)	120	2.65	3	0.60	y = 1.153x + 1.766
	72h	397.9 (265.0–1202.6)	120	4.12	3	0.588	y = 1.203x + 1.872

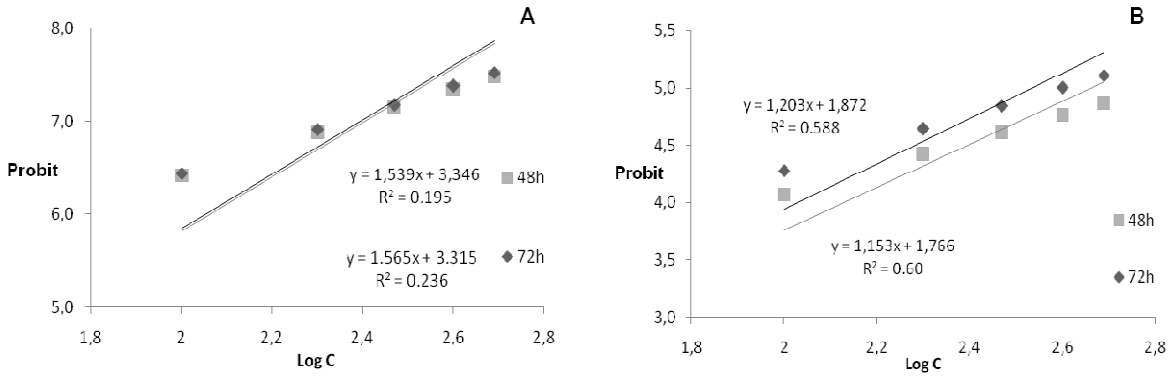

Figura 23. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Micélio 2 (A) e sua Fração Aquosa (B), de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* nas leituras de 48 e 72 horas.

Tabela 13. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com extrato miceliar e Fração Aquosa de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P).

Extratos	χ^2	g.l	P	Hipótese de Igualdade	χ^2	g.l	P	Hipótese de Paralelismo
Mic. 2 x Mic. 2 FA	510,79	2	P < 0,0001	rejeitada	0,502	1	P > 0,479	aceita

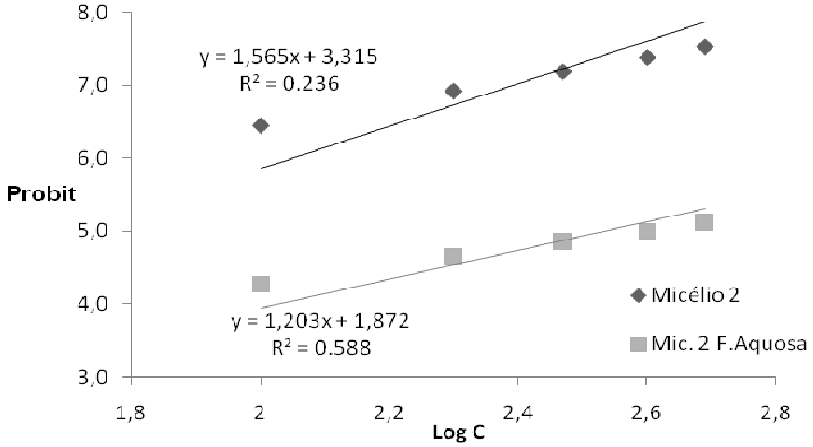

Figura 24. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos aceto-etanólico do Micélio 2 versus a Fração Aquosa do Micélio 2 de *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari,* na leitura de 72 horas.

Comparando os resultados entre Pest. Micélio 2 versus Pest. Micélio 2 F. Aquosa, a hipótese de igualdade foi rejeitada, enquanto que a hipótese de paralelismo foi aceita, indicando que as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes (Tabela 13).

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios. Sendo que para matar 50% da população é necessário uma concentração 60.74 vezes menor do extrato Pest. Micélio 2 que se necessita do extrato Pest. Micélio 2 F. Aquosa (Figura 25).

```
Relative potencies
                potency   limits       0.90         0.95         0.99
Mic2          60.74410   lower    26.13685     23.02961     18.40106
                         upper   243.39131    355.78350    893.13835
```

Figura 25. Potência Relativa do extrato Pest. Micélio 2 de 60.7441 vezes maior que em relação ao extrato Pest. Micélio 2 F. Aquosa, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

Tabela 14. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os dois tempos das leituras dos bioensaios realizados com extrato miceliar de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari.* Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e nível de probabilidade (P).

Leitura (horas)	χ^2	g.l.	P	Hipótese de Igualdade	χ^2	g.l	P	Hipótese de Paralelismo
48h x 72h	17,565	2	P < 0,0001	rejeitada	0,682	1	P > 0,409	aceita

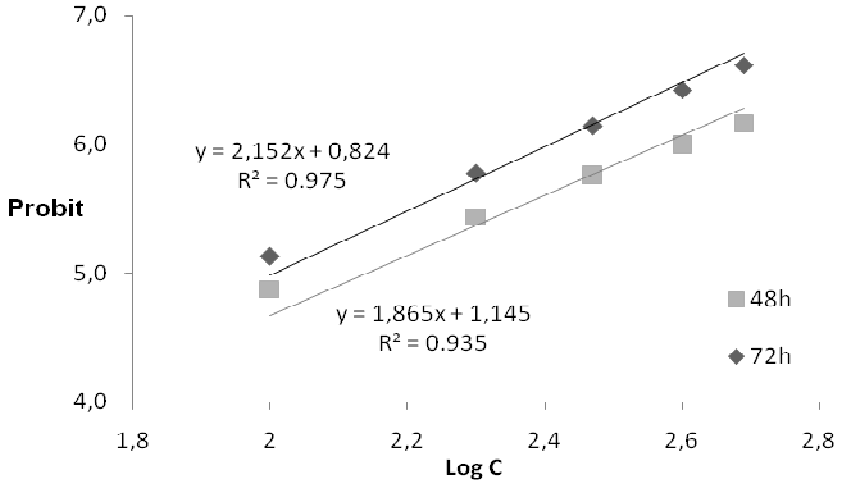

Figura 26. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos tempos de leitura (48 e 72 horas) do extrato aceto-etanólico do Micélio de *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari*.

O extrato Pyc Micélio apresentou χ^2 significativo, indicando que χ^2 calculado foi maior que o χ^2 tabelado (χ^2 calc. > χ^2 tab.), este resultado indica que há um baixo ajuste dos dados ao modelo de *Probit* (Finney, 1971), portanto o programa Polo-PC efetuou os cálculos porém, usando a heterogeneidade como fator de correção para as variâncias das estimativas dos parâmetros (Tabela 2).

Para este resultado com larvas de *A. nuneztovari* em exposição ao extrato miceliar de Pyc, obtemos as retas de regressão linear para os dois tempos amostrados, e os resultados de *Probit* indicam retas paralelas significando que as concentrações efetivas são qualitativamente idênticas, porém quantitativamente diferentes. Portanto, segundo Haddad (1998), para bioensaios visando o controle de insetos, a formulação ou extrato que apresentar menor concentração efetiva é a que apresenta maior virulência, após confirmado o paralelismo.

Comparando os resultados da parte miceliar do gênero *Pycnoporus* na figura 26, entre as leituras de 48h versus 72h, a hipótese de igualdade foi rejeitada,

enquanto que a hipótese de paralelismo foi aceita, indicando que as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes (Tabela 14).

Tabela 15. Resultados dos testes de hipótese de igualdade e paralelismo comparando os bioensaios realizados com os extratos miceliares dos gêneros de *Pestalotiopsis* versus *Pycnoporus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari* na leitura de 72 horas. Mostrando os valores de qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l.) e probabilidade (P).

Extratos	χ^2	g.l.	P	Hipótese de Igualdade	χ^2	g.l	P	Hipótese de Paralelismo
Pestalotiopsis* x *Pycnoporus	92,598	2	P < 0,0001	rejeitada	1,182	1	P > 0,277	aceita

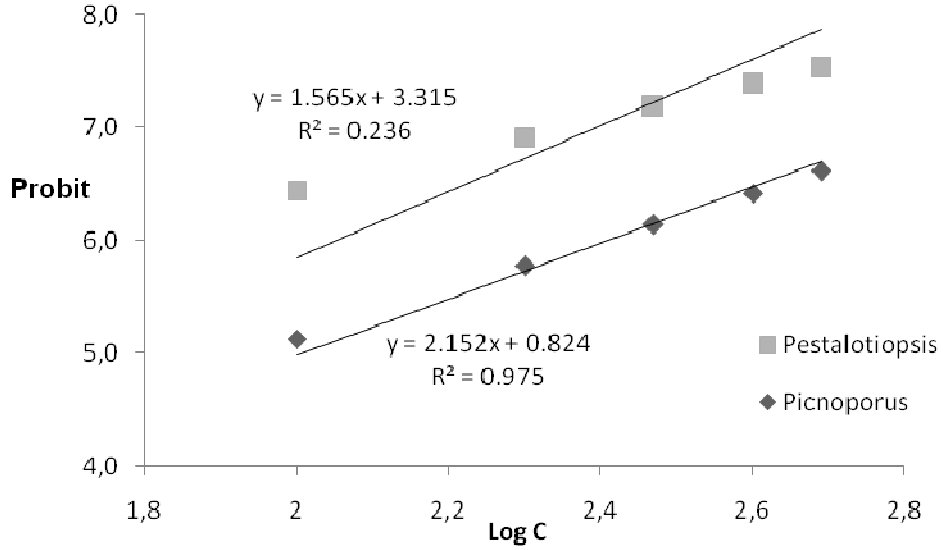

Figura 27. Representações gráficas dos valores de *Probit* da comparação dos extratos miceliares de aceto-etanólico de *Pestalotiopsis virgulata* versus *Pycnoporus sanguineus* contra larvas de 3º estádio de *Anopheles nuneztovari*, nas leituras de 72 horas.

Os melhores resultados obtidos contra larvas de *A. nuneztovari* estão apresentados na Figura 28, confrontando os dados dos extratos miceliares do fungo *P. virgulata* versus *P. sanguineus*, e evidenciando pelo gráfico que foi maior o potencial larvicida do gênero *Pestalotiopsis*. Considerando a mortalidade nas leituras de 72h para ambos os extratos miceliares (Pyc e Pest.), observa-se que os valores de χ^2 foram significativos para cada leitura, rejeitando a hipótese de igualdade da mortalidade.

Os valores de Probit foram calculados a partir das estimativas dos parâmetros coenfiente linear e angular (obtidos no programa Polo-PC), seguindo-se a tabela de Finney (1971). Os testes relativos às retas de regressão da figura 27 mostra que a hipótese de igualdade foi rejeitada e que há paralelismo entre elas, ou seja, os

coeficientes angulares das regressões não são significativamente diferentes. Portanto, as doses efetivas são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes (Tabela 15).

Os valores da Potência Relativa (PR) foram calculados pelo programa Polo-PC com base nos dados obtidos dos bioensaios na relação entre os extratos miceliares de *P. virgulata* e *P. sanguineus*, sendo que para matar 50% da população é necessário uma concentração do extrato Pest. Micélio 2 de 3,78 vezes menor que para o extrato a partir de Pyc micélio (Figura 28).

Relative potencies

	potency	limits	0.90	0.95	0.99
Pest	3.78548	lower	2.46245	2.24250	1.80490
		upper	7.03040	8.71186	18.06134

Figura 28. Pest. Micélio 2 de uma concentração 3.78548 vezes maior que em relação ao extrato Pyc, nos três intervalos de confiança (0.90; 0.95 e 0.99).

6. DISCUSSÃO

A biodiversidade das florestas tropicais como a Amazônia constitui-se em um enorme potencial para descoberta de novos produtos biologicamente ativos. Somente o Brasil possui aproximadamente 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20% de toda a flora mundial conhecida, e não menos de 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas. A floresta Amazônica brasileira, com mais de 30 mil espécies vegetais, compreende cerca de 26% das florestas tropicais remanescentes no planeta, isto sem citar toda a microbiota ainda desconhecida (Brasil, 1998; Silva & Mello, 2001).

Considerando o controle da dengue e da malária na Amazônia, um aspecto relevante trata-se do estudo de substâncias biologicamente ativas, com propriedades inseticidas. Estas mostram grande potencial para o controle, especialmente aquelas com atividade larvicida e adulticida, pelo fato de substituir o uso de inseticidas químicos que, freqüentemente, mostram efeitos colaterais, quando utilizados rotineiramente como pesticidas na agricultura. Dentre os efeitos colaterais indesejáveis, citam-se os distúrbios sensoriais cutâneos, hipersensibilidade, neurite periférica, irritante de mucosas, entre outros (Lichtenstein *et al*., 1974). Em decorrência da crescente resistência dos mosquitos aos produtos químicos sintéticos (Brown, 1986), verificou-se a necessidade de alternativas mais eficazes, que minimizem os inconvenientes causados à saúde humana e os danos ao meio ambiente (Rabello, 1974; Mittal *et al*., 1991).

No contexto para se tentar descobrir um novo produto de origem fúngica, com efeito larvicida, fez-se um *screening* de cinco espécies de fungos endofíticos mais uma espécie de fungo basidiomiceto*,* avaliando a efetividade larvicida de dois diferentes extratos, acetato-etanólico e aquoso, contra larvas de *Aedes aegpti* servindo primeiramente, como modelo biológico para então posterior bioensaios contra larvas de *Anopheles nuneztovari.*

Atualmente tem-se dado muita ênfase aos inseticidas com baixa toxicidade, alto efeito residual e elevada especificidade. Um produto com essas características assegura o controle efetivo de populações de insetos pragas, principalmente aqueles de importância médica como os culicídeos, além de oferecer proteção ambiental (Resende & Gama, 2006; Costa, 2007).

O descobrimento de novos métodos para o controle do mosquito *Aedes aegypti* é um parâmetro importante pois este é o principal vetor responsável por arboviroses como a dengue e a febre amarela, ambas com endemicidade nas Américas Central e do Sul, Ásia e África. Corriqueiramente, a situação com respeito a dengue é crítica em todos os países da América e particularmente no Brasil (FUNASA, 2003; Luna *et al.*, 2005).

Considerando a atual epidemia de malária em Manaus-AM e dengue no Rio de Janeiro-RJ, os estudos objetivando a implementação do controle tornam-se relevantes, considerando a intensa proliferação de *Anopheles darlingi* (vetor da malária) e de *Aedes aegypti* (vetor da dengue) nas áreas periféricas da cidade. Neste contexto, a redução dos criadouros de imaturos é a alternativa ideal para o controle de mosquitos, pois estes estão em áreas definidas e são eliminados antes de atingirem o estágio adulto, responsável pela transmissão da doença (CDC, 2006; Tadei *et al.*, 2007).

A parte miceliar tanto do fungo endofítico quanto do fungo basidiomiceto, apresentaram resultados satisfatórios para a atividade larvicida em ambos os mosquitos testados. Os extratos dos meios de cultura líquido, em sua maioria, não apresentaram resultados significativos e nem puderam ser calculados os valores das concentrações letais para o intervalo de confiança até 95%. A continuidade desses estudos possibilitará a descoberta e isolamento de novos compostos biotivos capazes de suprimir populações de mosquitos vetores de malária.

Outra observação importante é de que os extratos miceliares de acetato-etanol mais apolares, foram os mais ativos, apresentando resultados de maior potencial letal que os extratos aquosos. Indicando que os princípios ativos larvicidas devam ser constituintes de baixa polaridade, assemelhando-se aos resultados de Scott *et al.* (2002).

O extrato aquoso demanda altas concentrações do extrativo para provocar mortalidade nas larvas. Embora esta não constitua a técnica mais recomendada para se obter um conjunto de substâncias bioativas de uma determinada estrutura fúngica, possui relevante importância em uma triagem inicial (Pérez-Pacheco, 2004). Neste trabalho, objetivou-se comparar os extratos miceliar e aquoso, com intenção de fazer com que a produção dos metabólitos secundários dos fungos *Pestalotiopsis virgulata* e *Pycnoporus sanguineus* fossem excretados ao meio de

cultura líquido ao qual foram inoculados. De acordo com Pérez-Pacheco (2004), a avaliação da atividade inseticida de extrativos aquosos permite explorar rápido e facilmente uma grande quantidade de espécies ou compostos que tenham efetividade para o controle de larvas de mosquitos. Os dados deste trabalho permitiram verificar que somente o extrato aquoso de *P. sanguineus* (Pyc MID), mostrou toxicidade contra larvas de *A. aegypti* para CL_{50} < 500 µg/ml em ambos os períodos amostrados de 48 e 72h. Em larvas de *A. nuneztovari*, a atividade verificada de extratos aquosos com CL_{50} < 500 µg/ml somente foi percebida para *P. virgulata* (Pest. mic 2 F.Aq.) na leitura de 72 horas.

O estudo dos fatores motivadores da biossíntese é também uma maneira que pode ser utilizada para maximizar o rendimento de produtos naturais (Yeoman & Yeoman, 1996). A indução de rotas biossintéticas específicas tem sido possível em alguns casos utilizando esses fatores que podem ser de origem biótica ou abiótica. Muitos metabólitos secundários acumulados pelas plantas são induzidos por microrganismos fitopatogênicos e são denominados de fitoalexinas (Bailey & Mansfield, 1982; Paxton, 1981; Desjardins *et al.*, 1989).

Mais recentemente, o estudo das interações entre plantas e microrganismos tem revelado novos caminhos para a obtenção de produtos naturais. Entre essas interações, as associações entre plantas e microrganismos endofíticos parecem ocorrer em um nível de intimidade bioquímica surpreendente. Possivelmente durante o desenvolvimento das mesmas, os organismos associados adquirem potencial genético para biossintetizar classes de substâncias (Santos, 2004).

Lu *et al.* (2000) publicaram resultados sobre metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos de *Artemisia annua* L. (Asteraceae), uma tradicional erva medicinal chinesa, reconhecida por sintetizar artemisinina, uma potente droga antimalárica. Seus resultados sugeriram a possibilidade dos metabólitos produzidos pelo fungo endofítico *Colletotrichum* sp. poderiam proteger a planta *A. annua*, sendo talvez tóxica ou eventualmente letal para outros fitopatógenos. Presumindo ainda, o envolvimento na adaptação e competitividade na planta adulta de *A. annua.*

Vários casos de controle biológico natural de insetos por meio de microrganismos endofíticos têm sido relatados. Por exemplo, *Rhabdocine parkery,* um fungo endofítico isolado de pinheiros, infecta também as galhas formadas na

planta pelo inseto-praga da mesma, pertencente ao gênero *Contarina.* Isso ocasiona mortalidade das larvas que habitam o interior das galhas, provavelmente devido à produção de uma toxina pelo fungo (Becker, 1997).

Em trabalho desenvolvido por Souza *et al.* (2004), foram isolados 571 fungos endofíticos e 74 bactérias endofíticas das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* (Rubiaceae) e *Strychnos cogens* (Loganiaceae). *P. longiflora* e outras espécies desse gênero estão relacionadas a 90% das mortes de gado na região. *S. cogens* e outras espécies de *Strychnos* são utilizadas pelos indígenas na confecção de "curares". Uma amostra de 79 isolados fúngicos teve seus metabólitos extracelulares bioensaiados contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos: 19 isolados inibiram um ou mais microrganismos-teste. Dos oito isolados com melhores resultados de inibição, as móleculas bioativas eram menores que 12.000 daltons, fato verificado pela diálise dos metabólitos.

Em trabalho realizado por Corrêa (2007), a atividade larvicida de espécies da família Piperaceae sobre as espécies de *Anopheles* sp. e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) foram estudadas. Os resultados mostraram que os extratos menos apolares apresentaram melhores resultados frente às larvas estudadas. Dentre as diferentes partes da planta (fruto, galho e folha), o extrato mais ativo de *Piper tuberculatum* contra larvas de *A. nuneztovari* e de *A. albitarsis* foi o de fruto. Extratos mais polares mostraram-se menos ativos contra as duas espécies de mosquitos. Comparando os diferentes extratos de frutos (hexânico, clorofórmico, metanólico e aquoso), o extrato hexânico exibiu maior atividade larvicida para as duas espécies de mosquitos.

Considerando a atividade simbiótica já conhecida de certos fungos endofíticos (Bidochka & Khachatourians, 1988; Caroll, 1988; Pereira, 1993; Pereira *et al.,* 1993; 1999; Lu *et al*., 2000), onde o fungo produz metabólitos secundários que auxiliam na proteção da planta contra insetos e microrganismos invasores, o estudo aponta que a atividade larvicida apresentada pelo extrato do endófito *P. virgulata*, possa ter papel relevante na defesa do vegetal contra organismos nocivos à planta, uma vez que o endófito vive em comum harmonia com a planta, sugerindo com isso, uma atividade simbiótica do endófito *P. virgulata* e sua planta hospedeira *Gustavia cf. elíptica* (Lecythidaceae).

Em estudo semelhante, a atividade larvicida foi observada por Silva *et al.* (2004) em taninos isolados de *Magonia pubescens* (Sapindaceae), sobre *Aedes aegypti*. Como existe atualmente uma exigência de que produtos de origem natural sejam quimicamente estudados (Cascón & Gilbert, 2000), foi feito o estudo fitoquímico das frações larvicidas bioativas para evidenciar sua eficácia e segurança de seu uso, na busca de alternativas para o controle de mosquitos e obtenção de estruturas químicas passíveis de aprimoramento da atividade pela via sintética de outros derivados.

Em trabalho realizado por Choochote *et al.* (2006), investigaram a potencialidade de três espécies de *Piper spp.* contra *Aedes aegypti* adultos. Foi constatado que todos os extratos de *Piper* mostraram atividade adulticida expressiva, quando testados contra fêmeas do mosquito através de aplicação tópica. Estes dados reforçam o potencial adulticida, possibilitando pesquisas futuras a fim de desenvolver substâncias naturais para o combate a mosquitos adultos.

Apresenta-se, pela primeira vez, o estudo fitoquímico das frações larvicidas, isoladas da *Magonia pubescens*, monitorado pelo estudo de eficácia sobre larvas de 3° estádio de *Aedes aegypti*, na busca de alternativas para o controle desse mosquito e obtenção de estruturas químicas passíveis de aprimoramento da atividade pela via sintética de outros derivados (Silva *et al*. 2004). Estudos que já evidenciaram potencialidade de uso de extratos botânicos para o controle de *A. aegypti*, apontam CL_{50} variando de 3 a 67ppm de *Magonia pubescens* (Park *et al*. 2002; Siddiqui *et al*., 2000; Simas *et al*., 2004; Slimestad *et al*., 1995; Souza *et al.* 2004), a partir da substância de tanino catéquico, identificado na fração larvicida MP-9 (Arruda *et al.* 2003a,b). Sugerindo com isso, que os resultados obtidos nos bioensaios com extratos miceliares de *Pycnoporus sanguineus* e *Pestalotiopsis* sp. contra larvas de *A. aegypti* e *A. nuneztovari* apresentaram resultados coerentes com a literatura.

Nos estudos de Bittencourt *et al.* (1997), puderam observar a patogenicidade de fungos constatando uma diminuição do percentual de eclosão das larvas em ovos tratados de carrapatos. Assim como Onofre *et al.* (2000) testaram à ação de quatro linhagens de fungos e verificaram, pelo cálculo da dose letal mediana (DL_{50}), que todas as linhagens controlam este parasita com eficiência.

Vários programas de pesquisa relacionados a aspectos básicos e aplicados estão sendo desenvolvidos com fungos e sua capacidade micoinseticida, até mesmo utilizado em grande escala na África e nos EUA (Moreira *et al*., 1996; Ávidos & Ferreira, 1997).

Vilas-Bôas *et al.* (1998) trabalharam com conjugação de *Bacillus thuringiensis* e condições ambientais, apresentando resultados com maiores freqüências de conjugação obtidas em larvas de insetos. Fornecendo esporos e cristais de linhagens doadoras e receptoras de *B. thuringienis* a larvas de diferentes insetos e, após a morte dos mesmos, puderam recuperar transconjugantes em freqüências iguais ou superiores àquelas obtidas em meio de cultura. Esses resultados demonstram que, após a morte da larva, os esporos de *B. thuringienis* podem germinar com muita eficiência, gerando células vegetativas hábeis a promover a transferência de material genético. No entanto, esses resultados ainda não são suficientes para uma conclusão (Becker, 1997).

Segundo Tadei & Rodrigues (2002), outra bactéria bastante utilizada também no controle de insetos vetores de doenças é o *Bacillus sphaericus*, apesar de possuir um espectro de ação restrito (*Culex* e *Anopheles*), tem melhor desempenho que *Bacillus thuringiensis*. Formulados destas duas espécies foram utilizados em criadouros na periferia de Manaus e adjacências, com objetivo de se conhecer o desempenho desses dois bioinseticidas bacterianos e se avaliar o controle biológico como forma de atuação rotineira contra as formas imaturas de anofelinos, nas companhas de combate à malária na Amazônia, obtendo-se resultados efetivos no uso da dosagem mínima (50ml / 10 litros) para *B. sphaericus* (Wirth *et al.*, 2000; Tadei & Rodrigues, 2002).

Instituições de pesquisa brasileiras vêm desenvolvendo trabalhos utilizando fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana,* para o controle da broca da bananeira, dos percevejos-da-soja e broca grande da cana-de-açúcar. Alves (1998) em seu trabalho com fungos entomopatogênicos, cita os principais fungos utilizados para o controle microbiano de pragas, como o *Metarhizium anisopliae*, acreditando-se que este patógeno ocorra naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens. Alves (1998) ainda cita a classe Chytridiomycetes com o gênero *Coelomomyces*, onde este fungo possui a capacidade de produzir epizootias em populações de larvas de algumas espécies de dípteros, como *Aedes,*

Anopheles e *Culex.* A utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de pernilongos, baratas, ácaros, percevejos hematófagos e de percevejos-da-soja, também tem sido pesquisada (Serafini *et al.,* 2002).

Outros exemplos, na literatura, demonstram que muitas propriedades medicinais de certas plantas ou fungos, podem estar relacionados com metabólitos que são produzidos por microrganismos. Devido a grande diversidade biológica em território brasileiro, seria importante o isolamento e a caracterização desses microrganismos ainda não-explorados, como são aquelas espécies utilizadas medicinalmente por culturas indígenas das regiões da Amazônia e da mata Atlântica, dentre outras (Azevedo *et al.,* 2002). Neste contexto é lembrado que algumas tribos indígenas brasileiras usavam *P. sanguineus* ("orelha-de-paú vermelha") para medicina popular na cicatrização de feridas. (Alibert, 1944; Fidalgo, 1965; Fidalgo & Hirata, 1979; Pérez-Silva *et al*., 1988). Sendo este um dos fatores de interesse por ter escolhido este basidiomiceto para realizar os bioextratos, além de ser conhecido o seu potencial citotóxico e antiviral do pigmento cinnabarina (Smânia Jr. *et al*., 2003) encontrada com certa abundância em seu basidioma.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias de fermentação e purificação, os basidiomicetos têm recebido atenção pelo potencial como fonte para novas classes de antibióticos (Anke, 1989). A variedade de metabólitos secundários, produzidos por um único microrganismo endofítico, ainda não foi estimada, mas a expectativa é de que seja alta dada à conhecida versatilidade adaptativa de fungos e bactérias (Pereira *et al.,* 1993).

Os resultados observados apontam que os extratos a partir do micélio dos fungos estudados apresentaram melhor rendimento larvicida, e por sua vez, os extratos aquosos a partir do meio líquido cultivado não apresentaram resultados satisfatórios. Tendo em vista que os fungos produzem seus metabólitos secundários para o meio externo para realizarem diversas atividades, como alimentação e defesa contra outros microrganismos (Santos, 2004), podemos sugerir que estes fungos estudados não apresentaram potencialmente metabólitos com atividade larvicida no meio de cultura líquido, ou ainda, que os metabólitos produzidos realmente não apresentam atividade larvicida. Outra sugestão é baseada em que estes metabólitos não foram produzidos pelos fungos em decorrência de outros fatores, e estes outros fatores podem estar incluídos, por

exemplo, a falta de necessidade em produzir tais compostos pela falta de competitividade no meio de cultura líquido ou falta de algum outro composto que induzisse a resposta do fungo cultivado frente ao composto estranho.

O estudo dos microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia é uma dinâmica linha de pesquisa na área de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Esses estudos, relativamente recentes, são o resultado de trabalhos de iniciação científica, dissertações de mestrado acadêmico e teses de doutorado sob orientação de Pereira, que iniciou trabalhos nessa área, em 1993 e vem ampliando estudos com endófitos de plantas tropicais na Amazônia. A maioria dos resultados, ainda não-publicados, está sendo obtida a partir de plantas de importância econômica na região (Azevedo *et al.* 2002).

Levando-se em consideração a carência de bibliografia pertinente do controle biológico de mosquitos, utilizando extratos de fungos, temos uma lacuna a ser preenchida e um ótimo potencial a ser explorado, pelas particularidades destes fungos basidiomycetes e fungos endofíticos. A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e social. Entre estes sistemas, os fungos são o maior potencial na produção de metabólitos secundários que são importantes na procura de novos antibióticos. A descoberta e desenvolvimento de antibióticos foi um dos mais importantes avanços da medicina no século XX (Smith, 1999).

Desta forma, são imprescindíveis os estudos de prospecção de novas substâncias uma vez que com os resultados alcançados estarão disponíveis mais alternativas de controle para a malária.

Com os resultados obtidos a partir desta iniciativa conjunta de formar parcerias entre as Instituições de Pesquisa da Amazônia (INPA, UEA e UFAM), apesar de serem relativamente recentes, já apontam para um forte potencial a ser explorado e com um amplo espectro de atuação. Isso demonstra que, podemos obter bons resultados a partir da exploração dos Recursos Naturais Amazônicos de uma forma consciente e responsável. Engajando este trabalho numa das principais linhas de pesquisa do Curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas.

7. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos nos tópicos deste trabalho, sobre à ação larvicida dos extratos dos fungos de *Pycnoporus sanguineus* (Basidiomycete: Poliparaceae) e *Pestalotiopsis virgulata* contra larvas de *A. aegypti* e *A. nuneztovari,* possibilitaram as seguintes conclusões:

- Quatro (04) dos nove (09) extratos de fungos estudados contra larvas de *A. aegypti* mostraram toxicidade para $CL_{50} < 500$ µg/ml.

- Três (03) dos sete (07) extratos de fungos estudados contra larvas de *A. nuneztovari* mostraram toxicidade para $CL_{50} < 500$ µg/ml.

- Os extratos miceliares apresentaram resultados mais satisfatórios no combate as larvas de *A. aegypti* e *A. nuneztovari* que os extratos aquosos de ambos os fungos.

- O extrato mais polar (aquoso) mostrou-se menos ativo contra as duas espécies de mosquitos que em relação ao extrato menos polar (acetato-etalólico).

- Nas espécies de mosquitos testadas, o extrato miceliar do endófito *Pestalotiopsis virgulata* foi bastante ativo, indicando a sua potencialidade na produção de um inseticida natural a partir de uma fonte renovável.

8. BIBLIOGRAFIA

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of na insecticide. Journal of Economic Entomology. 18: 265-267.

Alibert, H. 1944. Note sar les champignons poussant dans le bas Dahomey et sur deux agaricin6es estimées des indigénes de cette même région. *Notes Africaines* 22, 11-12.

Alves, S.B. 1986. Controle Microbiano de Insetos. Editora Manole Ltda., São Paulo. p. 407.

Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos. *In:* Alves, S.B. Controle Microbiano de Insetos. 2.ed. Piracicaba: Fealq. 289-381.

Anagnost, S. E. 1998. Light Microscopic Diagnosis of Wood Decay. Iawa Journal, v. 19, n. 2, p. 141-167.

Anke, T. 1989. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. *Prog Ind Microbiol 27*:51-66.

Arantes, O.M.N.; Vilas-Bôas, L.A.; Vilas-Bôas, G.T. 2002. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. *In:* Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria / Org. Serafini, L.A.; Barros, N.M. e Azevedo, J.L. Caxias do Sul: EDUCS. 433p.

Arruda, W., Oliveira, G.M.C.; Silva, I.G. 2003a. Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens*. Entomologia y Vectores 10: 47-60.

Arruda, W., Oliveira, G.M.C.; Silva, I.G. 2003b. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36:17-25.

Ávidos, M.F.; Ferreira, L.T. 1997. Gafanhotos: a maldição milenar. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. V. 1, 2:8-11.

Azevedo, J.L. 2001a. Microrganismos endofíticos. *In*: Ecologia Microbiana. / Org. Azevedo, J.L. *et al.* Cap. 4, 117-137p.

Azevedo, J.L. 2001b. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. *In*: Ecologia Microbiana. / Org. Azevedo, J.L. *et al.* Cap. 18, 445-461p.

Azevedo, J.L.; Júnior, W.M.; Araújo, W.L.; Pereira, J.O. 2002. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. *In:* Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria / Org. Serafini, L.A.; Barros, N.M. e Azevedo, J.L. Caxias do Sul: EDUCS. 433p.

Bailey, J.A.; Mansfield, J.W. 1982. Phytoalexins. Eds, New York, John Wiley & Sons.

Bary, A. Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Leipzig: Engelamn. 1866, 316p.

Barros, N.M. 1995. Variabilidade de linhagens de *Nomuraea rileyi* quanto a produção de enzimas extracelulares e virulência a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis.* Porto Alegre: UFGRS. 153p. Tese de Doutorado.

Barata, R.C. 1995. Malária no Brasil: Panorama epidemiológico na última década. *Cad. Saúde Públ.,* 11(1): 128-136.

Becker, N. 1997. Microbial control of mosquitoes: management of the upper Rhine mosquito population as a model programme. Parasitology Today. 13(12): 485-487.

Bidochka, M.J.; Khachatourians, G.G. 1988. Regulation of extracellular protease in the entopathogenic fugus *Beauveria bassiana.* Experimental Mycology. 12:161-168.

Bing, L.A.; Lewis, L.C. 1993. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsanto) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Agriculture Ecosystems and Environment, v.45, p.147-156.

Bittencourt, V.R.E.P.; Souza, E.J.; Peralva, S.L.F.S. 1997. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus.* Revista da Universidade Fereral Rural Série. Ciência & Vida. 16:49-55.

Bras-Filho, R. 1994. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. Química Nova. 17(5): 405-445.

Brasil. 1998. Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre a Diversidade biológica: Brasil, MMA, Brasília.

Breen, J.P. 1993. Enhanced resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. Journal of Economic Entomology, v.86, p.621-629.

Breen, J.P. 1994. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. Annual Review of Entomology, v.39, p.401-423.

Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 2: 123-140.

Bücker, A.; Fonseca, M.D.P.; Romano, I.; Santos, J; Scubeller, V.; Cavallazzi, J.R.P.; Castro e Silva, A.; Tadei, W.P. 2006a. Levantamento da riqueza e da diversidade biológica de fungos lignolíticos da reserva de desenvolvimento sustentável do Tupé, Manaus-AM. 57 Congresso Nacional de Botânica, Porto Alegre-RS.

Bücker, A.; Falcão, N.C.S.; Castro e Silva, A.; Filho, T.R.A.; Tadei, W.P. 2006b. Estudo sobre isolamento de fungos Basidiomicetos coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-AM, Brasil. I Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia.

Bücker, A.; Falcão, N.C.S.; Souza, A.Q.L; Souza, A.D.L.; Pereira, J.O.; Silva, A.C.; Tadei, W.P. 2007a. Controle biológico de larvas de *Aedes aegypti* por substâncias de *Trichoderma koningii*, um fungo endofítico da Amazônia. X Simpósio de Controle Biológico – SICONBIOL. Brasília-DF.

Bücker, A.; Falcão, N.C.S.; Souza, A.Q.L; Souza, A.D.L.; Pereira, J.O.; Silva, A.C.; Tadei, W.P. 2007b. Controle biológico de larvas de *Aedes aegypti* por substâncias de *Trichoderma koningii*, um fungo endofítico da Amazônia. X Simpósio de Controle Biológico – SICONBIOL. Brasília-DF.

Carlile, M.J.; Watkinson, S.C. 1997. The Fungi. 4 ed. Academic Press. San Diego – CA / USA. 482p.

Carroll, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont, Ecology 69: 2–9.

Cascón V, Gilbert B. 2000. Caracterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. Phytochemistry 55: 773-778.

Castro e Silva, A.; Esposito, E.; Ferraz, A.; Durán, N. 1993. Decay of *Parkia oppositifolia* in Amazonian wood by *Pycnoporus sanguineus* and potential use for effluent decoloriozation.. *Holzforschung, Alemanha*, 47: 361-368.

Castro e Silva, A. 1996. Micromorfologia da degradação de madeira da espécie de Hura crepitans L. por fungos lignolíticos pertencentes a classe hymenomycetes. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

Castro e Silva, A.; Silva, M.B.C.; Cavalcanti, M.A. 2002. FUNGOS: O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica. Disponível em: <http//www.geocities.com.br/biodiversidade2002/fungos> Acesso em 11/02/2005.

Cavalcante, E.T.S. 1993. Avaliação da deltametrina para o controle da malária em áreas de garimpo. Dissertação de mestrado, INPA/FUA. Manaus – AM. 154p.

CDC – Centers of Disease Control and Prevention. Malaria.2006. Disponível em: http://www.cdc.gov/malaria/control_prevention/vector_control.htm

Choochote, W.; Chaithong, U.; Kamsuk, K.; Rattanachanpichai, E.; Jitpakdi, A.; Tippawangkosol, P.; Chaiyasit, D.; Champakaew, D.; Tuetun, B.; Pitasawat, B. 2006. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three *Piper spp.*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 48(1): 33-37.

Christophers, R.S. 1960. *Aedes aegypti* the Yellow Fever Mosquito. Cambridge University Press, London. 739p.

Clay,K.; Marks, S.; Cheplick, G.P. 1993. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. Ecology, *v.74,* p.1767-1777.

Consoli, R. A.G.B.; Oliveira, R.L. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz. 228 p.

Corrêa, R.G. 2007. Ação Larvicida de Espécies da Família Piperaceae em *Anopheles* sp. e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Dissertação de Mestrado. 134p.

Costa, F.M. 2007. Avaliação da atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos diflubenzuron contra *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae), em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado. 61p.

Deane, LM. 1986. Malaria vectors in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81 (Suppl II): 5-14.

Deane, LM. 1988. Malaria studies and control in Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 38: 223-30.

Deane, LM. 1989. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 84: 149-56.

Desjardins, A.E.; Spencer, G.F.; Plattner, R.D.; Beremand, M.N. 1989. Furanocoumarin Phytoalexins, Trichothecene Toxins and Infection of *Pastinaca sativa* by *Fusarium sporotrichioides*. Phytopathology, 79: 170-175.

Dulmage, H.T.; Yousten, A.A.; Singer, S.; Lacey, L.A. 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP / World Bank / WHO, Steering Comittee to Biologicl Control of Vetores, Geneva. p. 59.

Ejechi, B.O.; Obuekwe, C.O.; Ogbimi, A.O. 1996. Microchemical Studies of Wood Degradation by Brown Rot and White Rot Fungi in Two Tropical Timbers. International Biodeterioration & Biodegradation, v. p. 119-122.

Esposito, E.; Azevedo, J.L. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul-RS. EDUCS, 510p.

Etchegaray, A. 2002. Biossíntese de antibióticos peptídicos em microrganismos. USP-SP. Piracicaba, SP.

Faran, M.E. 1980. Mosquito Studies (Diptera: Culicidae). XXXIV. A revision of the *albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contr. Am. Ent. Inst.*, 15: 1-215.

Ferrara, M.A. 2006. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. Revista Fitos. Vol.2, n.01.

Ferreira, F.S. 2005. Aspectos de crescimento e produção enzimática dos fungos deterioradores de madeira *Pycnoporus sanguineus* (L:Fr) Murr. e *Trametes* sp. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Amazonas-UEA.

Ferreira, E. 1964. Distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual da erradicação da malária. *Rev. Bras. Malariol*. D. Trop., 16: 329-348.

Fidalgo*, O 1965. Conhecimento micológico dos índios brasileiros. Rickia 2, 1-10.*

Fidalgo, O.; Hirata, J.M. 1979. Etnomicologia caiabi, txicão e txucarrarmãe. *Rickia* 8, 1-5.

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge (UK): Cambridge University Press.

Finney. D.J. 1981. *Probit analysis*. 3 ed. S. Chand & Company Ltd, Ram Nagar, New Delhi. p. 333.

Fontes, E.M.G. 1992. controle biológico: um desafio para o país. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* 27: 1-4.

Forattini, O.P. 1962. Família Culicidae. *In:* Entomologia Médica. Forattini O.P., editor. EDUSP, São Paulo, p.123-301.

Fowler, G.G.; Di Romagnano, L.F.T. 1992. Ecological bases for biological control. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* 27: 5-13.

Fratila-Apachitel, L.E.; Hirst, J.A.; Siebel, M.A.; Giyzen, M.J.; 1999. Diuron degradation by Phanerochaete crysosporium BKMF-F. 1767. Synthetic and Natural Media Biotechnology Letters, v.21, p.147-154.

FUNASA, 2003. Plano de Intensificação da ações do controle da malária na Amazônia legal triênio 2000-2002. Brasília, Julho. Disponível em: www.funasa.gov.br

Gabaldón, A. 1981. *Anopheles nuneztovari* importantes vector y agente de malaria refractaria em venezuela. *Biol. Dir Mlariol Saneam Amb,* 21:p. 28-38.

Gallup, J.L.; Sachs, J.D. 1998. The economic Burden of Malaria. Working Paper Series. Center for International Development, Harvard University.

Germani, J.C. 1993. Estudos de produção de *Bacillus sphaericus* S2 com matérias-primas regionais e de avaliação da atividade larvicida. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 182.

Gewin, V. 2002. All living things, online. Nature, v. 418, p. 362-364.

Ghosh, S.K.; Tiwari, S.N.; Sathyanarayan, T.S.; Sampath, T.R.R.; Sharma, V.P.; Nanda, N.; Joshi, J.; Adak T.; Subbarao, S.K. 2005. Larvivorous fish in wells target the malaria vector sibling species of the Anopheles culicifacies complex in villages in Karnataka, India, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 99: 101–105.

Ghosh, S.K., Tiwari, S.N., Sathyanarayan, T.S., Dash, A.P., Magurran, A.E., 2006. Experience of larvivorous fish in malaria control over a decade in India and need for study on biodiversity implications, in: 11th International Congress on Parasitology; 6–11 August 2006; Glasgow, UK. Abstract No. 528.

Ghosh, S.K. & Dash, A.P. 2007. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 101: 1063—1064.

Giese, E.C.; Covizzi, L.G.; Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M.. 2004. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria sp*. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v.26 nº4, p. 463-470.

Greenwood BM; Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. Revista: J Clin Invest The Journal of clinical investigation. Vol. 118(4): 1266-1276.

Griffin, D.H. 1994. Fungal Physiology. 2 ed. Wiley-Liss. New York - USA. 458p.

Guerra, C.A.; Gikandi, P.W.; Tatem, A.J.; Noor, A.M.; Smith, D.L.; Hay, S.I.; Snow, R.W. 2008. The Limits and Intensity of *Plasmodium falciparum* Transmission: Implications for Malaria Control and Elimination Worldwide. Plos Medicine. Vol. 5(2): 300-311.

Habib, M.E.M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dipteras de importância médica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84 (3): p. 31-34.

Haddad, M.L. 1998. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. *In* Alves, S.B. 1998 Controle Microbiano de Insetos. 2º ed. Capítulo 34. Editora FEALQ, Piracicaba – São Paulo. 1163 p.

Harborne, J.B.; Tomas-Barberan, F.A. 1991. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. 1 ed. Oxford, Claredon Press.

Highley T.L.; Dashek, W.V. 1998. Biotechnology in the Study of Brown- and White-rot Decay. Great Britain, Forest products Biotechnology, p. 15-35.

Holf, J.A.; Klopfenstein, N.B.; Tonn, J.R.; Mcdonald, G.I.; Zambino, P.J.; Rogers, J.D.; Peever, T.L.; Carris, L.M. 2004. Roles of Woody Root-Associated Fungi in Forest Ecosystem Processes: Recent Advances in Fungal Identification. USDA Forest Service RMRS-RP-47, Rocky Mountain Research Station.

Hofrichter, M.; Ziegenhagen, D.; Sorge, S.; Ullrich, R.; Bublitz, F.; Fritshe, W. 1999. Degradation of lignite (low-rank coal) by ligninolytic Basidiomycetes and their manganese peroxidase system. Applied Microbiology Biotechnology, v. 52, p. 78-84.

Ivanissevich, A.; Nussenzveig, M. 1991. Malária: como vai? *Rev. Cien. Hoje*, v.13, n.76: 7-14.

Kües, U.; Liu, Y. 2000. Fruiting body production in basidomycetes. Applied Microbiology Biotechnology, v. 54, p. 141-152.

Lane, J. 1953. Neotropical Culicidae. São Paulo. Universidade de São Paulo-USP.

LeOra Software. 1987. POLO-PC a user´s guide to Probit or Log analysis. 1119 Shattuck Ave, Berkeley, CA, 94707, 22pp.

Lereclus, D.; Delecluse, A.; Lecadet, M.M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and *genes. In:* Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. (Coord.) *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and pratice. J. Wiley & Sons, 37-70.

Lichtenstein, E.P.; Liang T.T.; Schulz R.K.; Schnoes K.H.; Carter T.G. 1974. Insecticidal and Synergistic Components Isolated from Dill Plants**.** *J. of Agr. and F. Chem.*, 22: 658-664.

Lodge, D.J.; Cantrell, S. 1995. Fungal communities in wet tropical forest: variation in time and space. Canadian Journal Botany, v. 73, n. 1, p. 1391-1398.

Lodge, D.J.; Chapela, I.; Samuels, G.; Uecker, F.A.; Desjardin, D.; Horak, E.; Miller, O.K.; Hennebert, G.L.; Decock, A.A.; Ammirati, J.; Burdsall, H.H.J.; Kirk, P.M.; Minter, D.W.; Hailing, R.; Laessoe, T.; Mueller, G.; Huhndorf, S.; Oberwienkler, F.; Pegler, D.N.; Spooner, B.; Petersen, R.H.; Rogers, J.D.; Ryvarden, L.; Watling, R.; Turnabull, E.; Whalley, A.J.S. 1995. A Survey of Patterns of Diversity in Non-Lichenized Fungi. Mitt. Eidgenöss. Forsh.anst. Wald Schnee Landsch, v. 70, n. 1, p. 157-173.

Lodge, D.J. 2001. Diversidad Mundial y regional de hongos In: HERNÁNDEZ, H. M.; ALDRETE, H. A. F.; ÁLVAREZ, F. & ULLOA, M. Enfoques contemporâneos para el estúdio de la biodiversidad. México, Instituto de Biología, UNAM. p. 291-304.

Loguercio-Leite, C.; Michels, J.; Campos-Santana, M.; Trierveiler-Pereira, L.; Marcon-Baltazar, J.; Bekai, L. 2006. Basidiomycetes: circunscrição. *In*: Os avanços da botânica no início do século XXI, Morfologia, Fisiologia, Taxonomia, Ecologia e Genética: Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica / organização de Mariath, J.E.A. e Santos, R.P. Porto Alegre-RS. Sociedade Botânica do Brasil, 2006. 752p.

Lourenço-de-Oliveira, R; Oliveira-Ferreira, J.; Guimarães, A.E.G.; Castro, M.G.; Motta, M.A. 1987. Studies in progresso on malaria transmission in Rondonia State, Brazil. Mem. do Instituto Oswaldo Cruz. 82(supl.I): 29.

Lourenço-de-Oliveira, R; Guimarães, A.E.G.; Arlé, M.; Silva, T.F.; Castro, M.G.; Motta, M.A.; Deane, L.M. 1989. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in

endemic areas of Rondonia State, Amazon regions of Brazil. Mem. do Instituto Oswaldo Cruz. 84(4): 501-514.

Lu, H.; Zou, W.X.; Meng, J.C.; Hu, J.; Tan, R.X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science, 151: 67-73.

Luna, J.S.; Santos, A.F.; Lima, M.R.F.; Omena, M.C.; Mendonça, F.A.C.; Bieber, L.W.; Sant´Ana, A.E.G. 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. Journal of Ethnopharmacology 97:199-206.

Maziero, R.; Cavazzoni, V.; Bononi, V.L.R. 1999. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Rev Microbiol 30*:77-84.

Melo, I.S. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. *In*: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (eds). Controle Biológico. Jaguariúna-SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 1: 17-67.

Mittall, P. K.; Adak, T. e Shahama, V. P. 1991. Acute toxicity of certain organochlorine, organophosphate, synthetic pyrethroid and microbiol inseticide to the mosquito eating fish, Gambusia affinis. *Indian J. Malariol.* 28: 167-170.

Motta, V.T.; Wagner, M.B. 2003. Bioestatística. Caxias do Sul: Educs, São Paulo: Robe Editorial, 2003, 201 p.

Moore, D.; Frazer, L.A.N. 2002. Essential Fungal Genetics**.** New York: Springer.

Moreira, M.A.B.; Magalhães, B.P.; Valadares, M.C.C.; Chagas, M.C.M. 1996. Occurence of *Metarhizium flavoviridae* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera:Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brazil, Anais de Sociedade Entomológica do Brasil. V. 25, 2:359-361.

Mueller, G.M.; Bills, G.F. 2004. Introduction. *In:* Mueller, G.M.; Bills, G.F.; Foster, M.S. Biodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods. Amsterdan:Elsevier Academic Press. 159-163.

Nakasone, K.K. 1996. Diversity of lignicolous Basidiomycetes. *In:* MCMIINN, J. W.; CROSSLEY, D. A. Biodiversity and Coarse Windy Debris in Southern Forests, proceedings of the Workshop on coarse woody debris in Southerns forests: effects on Biodiversity. Athens, GA. Gen. Tech. Rep. SE-94. Asheville, NC:US. Departament of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station, 146p.

Natori, S.; Ikekawan, N.; Zuzuki, M. 1981. Advances in natural products chemistry. 1ed. New York, John Wiley & Sons.

Neves, D.P. 2002. Parasitologia humana. Editora Atheneu, 10ª ed. São Paulo-SP.

Newell, S. Y.; Porter, D.; Lingle, W. L. 1996. Lignocellulolysis by Ascomycetes (fungi) of a Saltmarsh Grass (smooth cordgrass). Georgia, Microscopy Research and Technique, v. 33, p. 32-46.

Nicolas, L. 1986. Potentialités de Bacillus sphaericus dans la lutte antivectorielle en Afrique tropicale. Cah. ºR.S.T.ºM., sér. *Ent. Méd. et Parasitol.,* 24(4): 265-273.

Nobles, M.K.; Frew, B.P. 1962. Studies in wood-inhabiting Hymenomycetes. V: The genus Pycnoporus Karst. Canadian Journal of Botany. 40, 987- 1016.

Nogueira, M.A.; Diaz, G.; Andrioli, W.; Falconi, F.A.; Stangarlin, J.R. 2006. Secondary metabolites from *Diplodia maydis and Sclerotium rolfsii* with antibiotic activity. Brazilian Journal of Microbiology. 37: 14-16.

Nogueira, M.A.; Tiosso T.B. 2003. *Screening for Antibacterial Activity of Secondary Metabolites Obtained from Phytopathogenic and Ambiental Fungi*. Cascavel, 50p. (Undergraduate Pharmacy´s Monography, Departamento de Farmácia. Unioeste).

Nosov, A.M. 1994. Functions of plant secondary metabolites in vivo and in vitro. Russian Journal of Plant Phisiolog. 41(6): 767-771.

Okoye, P.N.; Brooke, B.D.; Koekemoer, L.L.; Hunt, R.H.; Coetzee, M. 2008. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. doi: <10.1016/j.trstmh.2008.02.022>

Okumu, F.O.; Knols, B.G.J.; Fillinger, U. 2007. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. Malaria Journal, 6:63.

Olembo, R. 1995. Biodiversity and its importance to the biotechnology industry. Biotechnology and Applied Biochemistry, *v.21,* p.I-6.

Oliveira-Ferreira, J.; Lourenço-De-Oliveira, R.; Teva, A.; Deane, L.M.; Daniel-Ribeiro, C.T. 1990. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 43(1): 6-10.

Onofre, S.B.; Miniul, C.M.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. 2000. Pathogenicity of *Metarhizium flavoviride* var. *flvoviride* (Gams & Rozsypal) and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin over bovine tick *Boophilus microplus* (Can., 1887). American Journal of Veterinary Research. (In Press). 62:1478-1480.

Onofre, S.B.; Vargas, L.R.B.; Rossato, M.; Barros, N.M.; Boldo, J.T.; Nunes, A.R.F.; Azevedo, J.L. 2002. Controle biológico de pragas na agropecuária, por meio de fungos entomopatogênicos. *In:* Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria / Org. Serafini, L.A.; Barros, N.M. e Azevedo, J.L. Caxias do Sul: EDUCS. 433p.

OPAS - Organizacion Panamericana de la Salud. 2001. Informe de la situación de los programas de malaria en las Américas (Baseado en datos de 2000). OPS/HCP/HCT/M/189/01. Washington DC.

Paris, S.; Segretain, G. 1975. Caractéres physiologiques de *Beauveria tenella* en rapport avec la virulence de souches de le chpampignon pour la larve des Hanneton commun *Melolontha melolontha*. Entomophaga. 20:135-138.

Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ. 2002. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:1866-1870.

Paxton, J.D. 1981. Phytoalexins – A Working Redefinition. Phytopath. Z. 101: 106-109.

PHAO / WHO. 1991. Status of malaria programs in the Ameritas. XXXIX Report. Pan American Health Organization / World Health Organization, CD35/INF/2. 130p.

Pereira, J.O. 1993. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish.* Piracicaba: ESALQ/USP. 105p. Tese de Doutorado.

Pereira, J.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. 1993. Endophytic fungi of Stylosanthes: a first report. Mycologia. 85: 362-364p.

Pereira, J.O.; Carneiro-Vieira, M.L.; Azevedo, J.L. 1999. Edophytic fungi from Musa acuminata and their reintroduction in axenic plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 15: 43-46p.

Pérez-Pacheco, R.; Hernández, C.R.; Lara-Reyna, J.; Belmont, R.M.; Valverde, G.R. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales em larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Acta Zoológica Mexicana. 20 (1): 144-152.

Pérez-Silva, E.; Aguirre-Acosta, E.; Pérez-Amador, C. 1988. Aspectos sobre el uso y distribucion de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en Mexico. *Revista Mexicana de Micologia* 4, 137-144.

Póvoa, M.M.; Silva, A.N.M.; Santos, C.C.B.; Segura, M.N.O.; Machado; R.L.D. 2000. Malaria transmission. Ciência e Cultura 52: 208-12.

Quadros, R.M.; Agostini, E.; Lopes, C.; Marcelino, F.; Werner, F.; Benedet, R.C. 2005. Programa de Levantamento e Análise dos Recursos Bióticos nas Unidades de Manejo Florestal (UMF) da MADEPAR - Ind. e Com. de Madeiras. Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC.

Rabello, M. N. 1974. *Estudo citogenético de indivíduos profissionalmente expostos ao DDT*. Tese de Doutorado, Inst. de Biociências da Universidade de São Paulo. 114pp.

Raven, P. *e cols*. 2001. Biologia Vegetal. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 6ª ed.

Resende, M.C.; Gama, R.A. 2006. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxifen em condições de laboratório para Aedes aegypti. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 39(1): 72-75.

Rezende, M.I.; Scarmínio, I.S.; Monteiro, R.T.R.; Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M. 2001. Efeito do herbicida Scepter (Imazaquin) na produção de lacases pelo Pleurotus ostreatus através de metodologia de superfície de resposta. In: De Melo, I.S.; Silva, C.M.M.S.De; Scramin, S.; Spessoto, A. Biodegradação. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, v.1, p.341-347.

Rodrigues, I.B. 1996. Controle de malária: Atividade larvicida de onze estirpes de *Bacillus spahaericus* contra *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles braziliensis*. Dissertação de mestrado. INPA/FUA, Manaus - AM. p. 95.

Ronchi, B.I. 1985. Estudos de patologia em lagartas de *Ascia monuste monuste* (L., 1764) (Lepidoptera: Pieridae), infectada por *Bacillus thuringiensis* kurstaki (H 3a: 3b). dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus-AM. 111p.

Rosa, L.H.; Machado, K.M.G.; Jacob, C.C.; Capelari, M.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2003. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 7, p. 967-974.

Rozendaal, 1997 J.A. Rozendaal, Vector Control: methods for use by individuals and communities, World Health Organization, Geneva (1997).

Russel, P.F.; West, L.S.; Manwell, R.D. 1946. Practical Malariology. W. B. Saunders Company, Philadelphia e London.

Santos, R.M.G. 2004. Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp. e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae). Tese de Doutorado. UFSCar, São Carlos-SP.

Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Kerr, W.E. 1981. Biologia de Anofelinos Amazônicos. I. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Díptera: Culicidae) da Rodovia Manaus – Boa Vista. *Acta Amazon.* 11(4) : p.789-797.

Scarpassa, V.M.; Tadei, W.P. 1990. Biologia de anofelinos amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *A. nuneztovari. Acta amaz.*, 20: 95-118.

Scholte, E.J; Knols, B.G.J.; Takken, W. 2006. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. Journal of Invertebrate Pathology. 91:43-49.

Scott, I.M. *et al.* 2002. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agricultural and Forest Entomology* v.4, 137-144.

Serafini, L.A.; Barros, N.M. e Azevedo, J.L. 2002. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Editora da Universidade de Caxias do Sul - RS: EDUCS. 433p.

Shon, Y.H.; Nam, K.S. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. Journal of Enthnopharmacology; v. 77, p. 103-109.

Siddiqui BS, Asfhan F, Ghiasuddin FS, Navqi SN, Tariq RM. 2000. Two inseticidal tetranortriterpenoids from Azadirachta indica. Phytochemistry 53:371-376.

Silva, H.H.G.; Silva, I.G.; Santos, R.M.G.; Filho, E.R.; Elias, C.N. 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37 (5):396-399.

Silva, C.G.; Mello, L.C.P. 2001. Ciência, tecnologia e inovação: desafio para a sociedade brasileira-Livro Verde. MCT/MCT, Brasília.

Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira F° AM. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão de dengue – atividadede Myroxylon balsamum (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Química Nova 27:46-49.

Slimestad R, Marston A, Mavi A, Hostettmann K. 1995. Larvicidal constituents of Melantheria albinervia. Planta Medica 61:562-563.

Smânia, E.F.A.; Smânia Jr., A.; Loguercio-Leite, C.; Gil, M.L. 1997. Optimal parameters for Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus.* J. Chem. Tech. Biotechnol. (70) p. 57-59.

Smânia Jr., A.; Delle Monache F.; Smânia, E.F.A.; Gil, M.L.; Benchetrit, L.C.; Cruz, F.S. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. Journal of Ethnopharmacology 45, 177-181p.

Smânia Jr., A.; Marques, C.J.S.; Smânia, E.F.A.; Zanetti, C.R.; Carobrez, S.G.; Tramonte, R.; Loguercio-Leite, C. 2003. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. Phytotherapy Research (17) p. 1069-1072.

Smith, R.J.; Grula, E.A. 1983. Chitinase is an icducible enzymes in *Beauveria bassiana.* Journal of Invertebrate Pathology. 42:319-326.

Smith, T.L.; Jarvis, W.R. 1999. Antibacterial resistence in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.*, 1: 795-805.

Sosa-Gómez, D.R.; Alves, S.B.; Milani, M.T. 1994. Characterization and phonetic analysis of geipgraphical isolates of *Beauveria spp.* Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 29, 3:401-409.

Souza, A.Q.L.; Souza, A.D.L.; Astolfi-Filho, S.; Belém-Pinheiro, M.L.; Sarquis, M.I.M.; Pereira, J.O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* benthan. Acta Amazônica. Vol 34(2): 185-195.

Stamets P. 2002. Novel antimicrobials from mushrooms. HerbalGram; v. 54, p. 29-33.

St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle dagradation in vitro by enzymes from entomopathogens. Joumal Invertebrate Pathology. 47:167-177.

St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae.* Archives of Biochemistry and Biophysics. 253:221-232.

Straatsma, G.; Ayer, F.; EGLI, S. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruti bodies over 21 years in a Swiss forest plot. Mycological Reseach, v. 105, n. 5, p. 515-523.

Suay, I.; Arenal, F.; Asensio, F.J.; Basilio, A.; Cabello, M.A.; Díez, M.T.; García, J.B.; Val, A.G.; Gorrochategui, J.; Hernández, P.; Peláez, F.; Vicente, M.F. 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie Van Leeuwenhoek 78*: 129-139.

Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Costa, W.L.S.; Scarpassa, V.M. 1988. Biologia de anofelinos amazônicos. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica de transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Ver. Inst. Trop.,*30(3): p. 221-251.

Tadei, W.P. 1993. Biologia de anofelinos amazônicos. XVIII. Considerações sobre as espécies de *Anopheles* (Culicidae), transmissão e controle da malária na Amazônia. *Rev. U.A. série: ciência da saúde*, 2 (1,2): 1-34.

Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B. 1993. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira. *In*: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M. & Oliveira, L.A. (Eds) (1993) *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. v.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. p. 167 – 196.

Tadei, W.P. 1996. Malária em Manaus – fatores entomológicos evolvidos na dinâmica de transmissão. 1. Densidade populacional, caracterização dos criadouros e sazonalidade. Relatório, INPA. 65pp.

Tadei, W.P.; Dutary-Thatcher, B.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 59(2): p. 325 – 335.

Tadei, W.P. & Dutary-ThatcheR, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: of the subgenus Nyssorhynchus (1). *Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo*, 42: 87-94.

Tadei, W.P. 2001. Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia. 7º Reunião especial da SBPC. Anais/resumos (CD-ROM). Manaus: *Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência:* p. 1- 6.

Tadei, W.P. & Rodrigues, I.B. 2002. O controle Biológico para anofelinos na Amazônia. *Anais do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia.* [CD-ROM]. 1-6.

Tadei, W.P. & Pinheiro, V.C.S. 2002. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 44(5): 245-250.

Tadei, W.P.; Pinto, R.C.; Oliveira, A.E.M.; Terrazas, W.C.M.; Santos, J.M.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S.; Lima, C.A.P.; Lopes, N.R.; Ribeiro, J.M.T. 2004. Controle da Malária em Manaus: Tanques de piscicultura e sua importância na proliferação de *Anopheles darlingi.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37. p.261 - 261.

Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B.; Lima, C.A.P.; Pinto, R.C.; Oliveira, A.E.M.; Santos, J.M.M.; Rafael, M.S.; Terrazas, W.C.M.; Lopes, N.R. 2005. Malária no rio Negro/AM: importância do igapó na proliferação de *Anopheles darlingi* e sua relação com a transmissão. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical., 38. p. 505 - 505.

Tadei, W.P.; Guaycurus, T.V.; Rodrigues, I.B.; Pinto, R.C.; Santos, J.M.M.; Rafael, M.S.; Lima, C.A.P.; Oliveira, A.E.M.; Becker, N. 2006. Biological control as an alternative on the fight against malaria in Amazon: Epidemics in the city of Manaus *In*: 15º European Sove Meeting - Society for Vector Ecology, Serres, Greece. Program & Abstract Book Sove. , p.27 - 27. 2006.

Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B.; Santos, J.M.M.; Rafael, M.S.; Passos, R.A.; Costa, F.M.; Pinto, R.C.; Oliveira, A.E.M.; 2007. Entomologia e controle de vetores: o Papel da entomologia no controle da Malária. Revista Brasileira de Medicina Tropical. Vol.40 supl. II. X Reunião Nacional de Pesquisa em Malária.

Tauil, P.L. 1992. Intervention possibilities on the biologic cycle of malaria towards endemism control. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,* 34 (suppl 9): 21-23.

Tauil, P.L. 2005. Avaliação de uma nova estratégia de controle da malária na Amazônia brasileira. Brasília-DF. UnB. 95p. Tese de Doutorado.

Tosta, C.E. 2007. Coadaptation and malaria control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 102(3):385-404.

Valadares-Inglis, M.C.; Shiler, W.; De-Souza, M.T. 1998. Controle Biológico. Engenharia genética de Microrganismos agentes de controle biológico. v.1. Jaguariúna, SP:EMBRAPA. p. 201 – 230.

Van Rie, J.; McGaughey, W.H.; Johnson, D.E.; Barnett, B.D.; Van Mellaert, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis.* Science, 247:72-74.

Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; tem Hoopen, H.J.G.; Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathway for production of fine chemicals. Biotechnology Letters. 21(6): 467-479.

Vilarinhos, P.T.R.; Dias, J.M.C.S.; Nogueira, R.G.; Lopes, J.B. 1992. Avaliação da potência larvicida de novos isolados de *Bacillus sphaericus* contra *Culex quinquefasciatus*. III Simpósio de Controle Biológico (Resumos). CNPDA/EMBRAPA. p. 286.

Yeoman, M.M.; Yeoman, C.L. 1996. Tansley review on 90: Manipulating secondary metabolism in culture plant cells. New Phytologist. 134(4): 553-569.

Wang´ombe, L.K.; Mwabu, M. 1993. Agricultural land use patterns and malaria conditions in Kenya. Soc. Sci. Med., 37(9): 1121-1130.

WHO, World Health Organization. 1970. Insecticidal resistance and vector control. Genebra. 270 p.

WHO, World Health Organization. 1980. Fourth Meeting of the Scientific Work Group on Biological Control of Insects Vectors of diseases. Genebra. (TDR/BCV/80.03).

WHO, World Health Organization. 2000. Roll back malaria – What are the prospects? Bulletin of the World Health Organization, 78, (12): 1377.

WHO, World Health Organization. World Malaria Report 2005. WHO Library Cataloguing-in-Publication. Data, Geneva, Switzerland. 294 pp. 2005.

WHO, World Health Organization. 2008. Acesso ao site em 14 de março de 2008. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html.

Wirth, M.C.; Federici, B.A.; Walton, W.E. 2000. *Cyt*1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*). Applied Environmental Microbiology. 66:1093-1097.

Worrall, J.J., Anagnost E.E.; Zabel R.A. 1997. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungis. Mycologia, v.89, n.2, p.199-219.

Willerding, A.L.; Barbosa, M.F.; Burlamaqui, T.C. 2005. Diversidade de macromicetos lignolíticos. *In:* BioTupé: meio físico, diversidade biológica e sociocultural. Org. Santos-Silva, E.N.; Aprile, F.M.; Scudeller, V.V.; Melo, S. 2005. Editora do INPA. Manaus-AM, 246p.