

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

DISSERTAÇÃO

**Utilização dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria*
bassiana no controle do mosquito *Aedes aegypti***

Ricardo de Oliveira Barbosa

2018



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

Utilização dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle do mosquito *Aedes aegypti*

Ricardo de Oliveira Barbosa

Sob a Orientação da Professora
Isabele da Costa Angelo

E Coorientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

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

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

B238u Barbosa, Ricardo de Oliveira , 1986-
Utilização dos fungos *Metarhizium anisopliae* e
Beauveria bassiana no controle do mosquito *Aedes*
aegypti / Ricardo de Oliveira Barbosa. - 2018.
45 f.: il.

Orientadora: Isabele da Costa Angelo.
Coorientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2018.

1. *Aedes aegypti*. 2. Blastosporos. 3. Controle
biológico. I. Angelo, Isabele da Costa, 1981-, orient.
II. Pinheiro, Vânia Rita Elias , 1959-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

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

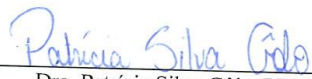
RICARDO DE OLIVEIRA BARBOSA

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

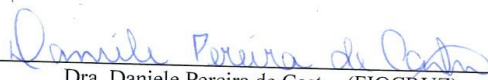
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2018



Dra. Isabele da Costa Angelo (UFRRJ)



Dra. Patricia Silva Gólo (UFRRJ)



Dra. Daniele Pereira de Castro (FIOCRUZ)

“Quando examino a mim mesmo e aos meus métodos de pensar, chego à conclusão que o dom da fantasia significa muito mais para mim que qualquer outro talento para pensar positiva e abstractamente.”

(Albert Einstein)

*Leandro Bitencourt, meu sol brilha mais ao seu lado...Este trabalho
é dedicado a você por fazer meu sol brilhar mesmo em momentos de
chuva...*

AGRADECIMENTOS

“O chão do meu mundo é sempre bem consolidado por caminhar com vocês... Pessoas que compõem minha trajetória de vida”.

Agradeço meus pais *Ione Batista de Oliveira Barbosa* e *Júlio César Barbosa* pelo amor incondicional, pelos ensinamentos da vida e contribuir para me tornar o homem que sou hoje! Se cheguei aqui foi porque vocês me deram suporte emocional e me ensinaram a buscar meus sonhos sabendo planejar e analisar as minhas possibilidades! Eu amo vocês!

Quero agradecer aquele me ama, me apoia, me orienta, me ajuda e faz de mim uma grande parte do seu mundo! *Leandro Pereira Bittencourt* meu príncipe, meu hóspede, meu marido! É por você que eu sempre procuro melhorar, é por você que eu sou melhor! E é pelo seu estímulo que eu posso ser grande sempre! Te amo!

A minha amiga Adélia a irmã que a vida me deu! Sempre me ajudando, aturando, sorrindo e chorando percorremos a vida “ruralina” juntos. A você Adélia meu muito obrigado por me escolher como amigo e irmão mais velho! Só nós realmente sabemos o significado de “Adeus”.

Dedico meus agradecimentos e este trabalho também aos meus amigos de infância *Juliana Soares, Bárbara Stibich, Miriam Emanuela, Sabrina Gomes Faria, e Mayara Guimarães* por sempre estarem do meu lado, me ajudando, levando para as farras, pelos conselhos em momentos difíceis e por me ensinarem o sentido da palavra saudade quando me mudei para o Rio de Janeiro.

À minha orientadora Prof.^a Dra. *Isabele da Costa Angelo*, por me olhar numa sala cheia de alunos e me escolher como discípulo! Você me ensinou não apenas protocolos, escritas, referências... Você me ensinou a diferença entre um orientador e um mestre, sempre me fazendo um parceiro na ciência sem me deixar pequeno, sem me desanimar e acima de tudo por me ensinar valores essencial para minha formação. Obrigado por tudo, serei eternamente grato!

Agradeço aos amigos do *Laboratório de Controle Microbiano* pela escola proporcionada! *Mariana Guedes, Andréia Terra, Maria Clemente, Caio Júnior, Jéssica Fioroti, Emily Mesquita, Allan Marciano, Adonis Rodrigues, Amanda Corval, Fernanda Sousa e todos os alunos de iniciação científica* agradeço a todos vocês pelo companheirismo, amizade, pelas ajudas em experimentos, e por me ensinarem tudo sobre controle microbiano!

Agradeço aos professores doutores *Patricia Gôlo, Emerson Pontes, e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por me acolherem de braços abertos e me ajudarem em tudo que precisei.

Ao *Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes* da UFRRJ pela parceria realizada e suporte técnico.

Ao *Laboratório de Controle Microbiano* por me ensinar a arte de pesquisar, a me fazer pensar sempre no coletivo, no bem-estar animal, nas questões humanitárias e na importância da pesquisa para a nossa sociedade.

Agradeço ao Professor doutor *Wellington da Silva Cortês* e a doutoranda *Marissa Figueiredo de Carvalho* por me ensinarem a “engatinhar” no universo científico! Obrigado mestres!

Agradeço a *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* pelo apoio financeiro e técnico. Por me ensinar valores humanos, científicos, sociais, pedagógicos.

Aos professores do PPGCV por todos os conhecimentos transmitidos.

A *CAPES* pelo apoio financeiro.

Sou grato a todos que ajudaram a elaborar esse manuscrito.

Muito obrigado por tudo.

BIOGRAFIA

Ricardo de Oliveira Barbosa filho de Júlio César Barbosa e Ione batista de Oliveira Barbosa, nasceu em 19 de outubro de 1987, no município de Ponte Nova, MG.

Estudou no Colégio Luiz Martins Soares Sobrinho no período do ensino fundamental antiga quarta série até 1999 e após esse ano se mudou para o Colégio Salesiano Dom Helvécio onde estudou até o primeiro ano do Ensino Médio. O restante do ensino médio passou a estudar na Escola Estadual Prof. Antônio Gonçalves Lanna terminando seu ciclo básico de estudos em 2006.

Em agosto de 2006 ingressou na Escola de Estudos Superiores de Viçosa no curso de Bacharelado em Direito, percorrendo o curso até o 4º período mas o amor pelas ciências biológicas falou mais alto e em 2010 ingressou pelo ENEM na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Zootecnia, onde logo no primeiro período nas aulas de anatomia o amor pela veterinária se mostrava mais forte até que no segundo semestre do mesmo ano o discente fez a transferência interna para o curso de Medicina Veterinária então concluindo o curso em agosto de 2015.

Durante sua trajetória pela Medicina Veterinária foi estagiário nos anos de 2010 a 2011 no Laboratório de Doenças Parasitárias. Mas nos anos de 2011 até 2015 o aluno foi bolsista de Iniciação Científica (FAPERJ) pelo Departamento de Ciências Fisiológicas sob a orientação do professor doutor *Wellington da Silva cortês* onde trabalhou os 4 anos da iniciação científica avaliando efeitos da planta *Mirsine coriassea* na resposta inflamatória e na cascata de coagulação. Durante o tempo da iniciação participou de diversas jornadas de iniciação científica, apresentação em congressos e simpósios da área.

A partir de 2016 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sendo orientado pela Prof^a. Dra. *Isabele da Costa Angelo*.

RESUMO

BARBOSA, Ricardo de Oliveira. **Utilização de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle do mosquito *Aedes aegypti***. 2017. p. Dissertação (Mestrado Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Aedes aegypti é o vetor de vírus que causam as doenças zika, dengue, febre amarela urbana e chikungunya. É um mosquito cosmopolita com uma plasticidade adaptativa bem pronunciada que torna difícil o seu controle. *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são fungos entomopatogênicos encontrados no meio ambiente parasitando artrópodes e por isso são amplamente usados para controles de pragas agrícolas. Pesquisas utilizando fungos buscam identificar isolados mais virulentos, seletivos, e desenvolver tecnologias que proporcionem eficácia e resistência aos efeitos do meio ambiente. O presente estudo avaliou e comparou a virulência de conídios e blastosporos de diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* suspensos em água e formulados em óleo mineral sobre larvas de *A. aegypti*. Os isolados CG 153, IBCB 481, ARSEF 2211 de *M. anisopliae*, CG 206 e CG 479 de *B. bassiana* foram cultivados em meio BDA (Batata dextrose ágar) para produção de conídios e em meio de Adamek modificado para produção de blastosporos. Larvas (L₁/L₂) foram imersas em 10 mL de suspensões de água desclorada estéril + Tween 80 0,01% ou formulação oleosa contendo $10^8/10^7$ conídios mL⁻¹ e $10^8/10^7$ blastosporos mL⁻¹ mantidos a 27°C e UR>80%. Foi analisada a taxa de sobrevivência das larvas diariamente por 7 dias. Além disso, a capacidade de produção de blastosporos entre os isolados foi avaliada em diferentes condições de tempo e agitação. O estudo estatístico utilizado foi o teste Kaplan-Meier que analisou e comparou as taxas de sobrevivência com relação ao tempo de tratamento; dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. O cálculo do tempo letal (TL₅₀) foi realizado utilizando o programa Log-rank teste. O nível de significância foi de 95% ($P \leq 0,05$). Foram observados, as maiores produções de blastosporos, nos isolados ARSEF2211, CG479 e CG206 quando mantidos a rotação de 220rpm/72h, e baixa produção nos isolados CG153 e IBCB481. Nos ensaios biológicos, blastosporos e conídios apresentaram a mesma eficácia, sendo os melhores resultados observados nos tratamentos com 10^7 conídios/blastosporos mL⁻¹ isolado CG153, IBCB481; as formulações apresentaram melhores resultados que as suspensões, com percentuais de sobrevivência das larvas que variaram entre 8,56 a 27,44%. Os melhores tempos letais (TL₅₀) foram obtidos nas formulações de blastosporos CG479 10^7 e ARSEF2211 10^8 , ambos com 1 dia. Portanto, conclui-se que blastosporos e conídios se mostraram boas opções de controle de larvas de *A. aegypti* e as formulações a base de óleo mineral se mostraram bons adjuvantes nesse controle.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos; blastosporos; mosquito.

ABSTRACT

BARBOSA, Ricardo de Oliveira. **Use of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in the control of *Aedes aegypti* mosquito. 2017. p. Dissertation (Masters degree in Veterinary Science).** Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Aedes aegypti is vector of zika, dengue, urban yellow fever and chikungunya. It is a cosmopolitan mosquito with pronounced adaptive plasticity making it difficult controlling. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* are entomopathogenic fungi found in the environment parasitizing arthropods and are therefore widely used for agricultural pest control. Researches using fungi, seek to identify more virulent and selective isolates, and develop technologies that provide an efficacy and resistance to environment effects. The aim of study was evaluating and comparing virulence conidia and blastospores using different isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana* suspended in water and mineral oil formulation on *A. aegypti* larvae. Strains CG 153, IBCB 481, ARSEF 2211 of *M. anisopliae*, CG 206, CG 479 of *B. Bassiana* were grown in PDA medium (Potato dextrose agar) to producing conidia and Adamek medium modified to producing Blastospores. Larvae (L₁/L₂) were immersed in 10 mL of sterile dechlorinated water + 0.01% Tween 80 suspensions or oily formulation containing $10^8/10^7$ mL⁻¹ conidia and $10^8/10^7$ mL⁻¹ blastospores maintained at 27°C and UR > 80%. The survival rates of larvae were evaluated daily for 7 days. In addition, blastospores production capacity among the isolates was evaluated at different time conditions and agitation. The statistical study used was Kaplan-Meier analyzing and comparing the survival rates in relation to treatment time; The parametric data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by Turkey test. The calculation of the lethal time (LT₅₀) was performed using the Log-rank test. The level of significance was 5% (p> 0.05%). The strains ARSEF2211, CG479 and CG206 obtained the highest yields of blastospores when maintained at a rotation of 220rpm/72h, whereas strains CG153 and IBCB481 obtained low production. In the biological assays, blastospores and conidia were not statistically significant, and the best results were observed in treatments with 10^7 conidia/blastospores mL⁻¹ strains CG153, IBCB481; in comparison between suspensions and formulations, they obtained better results than suspensions, with survival rates ranging by 8.56 to 27.44%. The best lethal times (TL₅₀) were obtained in the formulations of blastospores CG479 10^7 and ARSEF22118 both with 1 day. Therefore, it is concluded that blastospores and conidia showed good control options for *A. aegypti* and formulations based on mineral oil showed good adjuvant.

Keywords: entomopathogenic fungi; blastospores; mosquito.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Isolados de *Beuveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l), hospedeiro do qual foi isolado e local de isolamento.20
- Tabela 2-** Média de produção de blastosporos (\pm erro padrão) dos isolados ARSEF2211, CG153, IBCB481 (*Metarhizium anisopliae*), CG479 e CG206 (*Beuveria bassiana*) de acordo com rotação (150/220rpm) e tempo de cultivo (48/72h) sob temperatura de 27°C.....24
- Tabela 3** – Percentual de sobrevivência (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* durante sete dias de tratamento com CG206 de *Beuveria bassiana*. Grupo controle=H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%. Con= conídios e bla= blastosporos.....27
- Tabela 4** - Sobrevivência (%) \pm erro padrão das larvas de *A. aegypti* durante sete dias de tratamento com CG479 (*Beuveria bassiana*). Grupo controle=H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%. con= conídios e bla= blastosporos.28
- Tabela 5** – Percentual de sobrevivência (%) (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* durante sete dias de tratamento com isolado CG153 (*Metarhizium anisopliae*). con= conídios e bla= blastosporos.30
- Tabela 6** – Sobrevivência (%) \pm Erro padrão de larvas de *Aedes aegypti* infectadas em isolado ICBC481 (*Metarhizium anisopliae*) durante 7 dias. Con (conídios) e bla (Blastosporos) Controle== H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%.31
- Tabela 7** - Sobrevivência (%) \pm Erro padrão das larvas de *Aedes aegypti* após tratamento com isolado ARSEF2211 de *M. anisopliae* durante 7 dias. Con (conídios) e bla (Blastosporos) Controle== H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%.33
- Tabela 8** – Percentual de sobrevivência (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com isolados CG479 e CG206 (*Beuveria bassiana*), CG153, IBCB481 e ARSEF2211 (*Metarhizium anisopliae*) e tempo letal a cinquenta por cento (TL₅₀). ND= não determinado. 35
- Tabela 9** –Percentual de sobrevivência (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com em óleo mineral (1%, 0,5% e 0,1%). Tempo Letal (TL₅₀). ND=não determinado.37
- Tabela 10** – Percentual de sobrevivência (\pm Erro padrão) diário das larvas de *Aedes aegypti* infectadas com CG479 de *Beuveria bassiana*. Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos. 39
- Tabela 11** – Percentual de sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* (\pm Erro padrão) tratadas com CG206 de *Beuveria bassiana*. Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos.41
- Tabela 12 – Percentual de sobrevivência (\pm Erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com ARSEF2211 de *Metarhizium anisopliae*. Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos. 46

Tabela 13 - Percentual de sobrevivência (\pm Erro padrão) e tempo letal a cinquenta por cento (TL₅₀) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com formulação ou suspensão de conídios e blastosporos dos isolados CG479 e CG206 (*Beauveria bassiana*), CG153, IBCB481 e ARSEF2211 (*Metarhizium anisopliae*). Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos.46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**- Ciclo esquemático do processo de colonização fúngica começando pela adesão do conídio (1) desenvolvimento do tudo germinativo (2); Formação de apressório; penetração na cutícula do hospedeiro; formação de corpos hifais e melanização após contato com sistema imune do hospedeiro (esquema adaptado de WANG et al., 2016). 14
- Figura 2** – Conídios e blastosporos de *Metarhizium anisopliae* (Isolados CG153, IBCB481 e ARSEF2211) e *Beauveria bassiana* (CG206 e CG479 R). observados em microscopia óptica 400x. (A) Conídios e (B) blastosporos de isolado CG153. (C) Conídios e (D) blastosporos de isolado ARSEF2211. (E) Conídios e (F) blastosporos de isolado CG206. (G) Conídios e (H) blastosporos de isolado CG479. (I) Conídios e (J) blastosporos de isolado IBCB481. 24
- Figura 3** - Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de tratamento com conídios ou blastosporos de isolados CG479 (A), CG206 (B), CG153 (C), IBCB481 (D), ARSEF2211 (E). Grupo controle= H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%. 36
- Figura 4** - Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de tratamento com óleo mineral (1%, 0,5% e 0,1%). Controle H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%. 37
- Figura 5** - Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de tratamento com formulações ou suspensões (blastosporos/conídios) de isolados CG479 (A), CG206 (B) e ARSEF2211 (C). Grupos controle óleo mineral 0,1%; H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%. 47
- Figura 6** –Desenvolvimento de colônia fúngica em larvas de *Aedes aegypti* após ensaio biológico. *Metarhizium anisopliae* ARSEF2211 (A, A-1, A-2) *Beauveria bassiana* CG479 (B, B-1, B-2) e CG206 (C, C-1, C-2), *Metarhizium anisopliae* IBCB481(D, D-1, D-2) e CG153 (E, E-1, E-2). 48
- Figura 7** – Micro cultivo de colônias fúngica observados em microscopia óptica 400x, após re-isolamento em larvas de *Aedes aegypti*. (A) *Metarhizium anisopliae* CG153 (B) IBCB481, (C) *Beauveria bassiana* CG479 (D) e CG206 (E), *Metarhizium anisopliae* ARSEF2211. 48

SUMÁRIO

2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 História de <i>Aedes aegypti</i>	3
2.2 Morfologia, biologia e comportamento de <i>Aedes aegypti</i>	5
2.3 <i>Aedes aegypti</i> e sua Importância em Saúde Pública	7
2.4 Controle do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	8
2.4.1 Controle mecânico	8
2.4.2 Controle químico	9
2.4.3 Controle biológico	11
2.4.3.1 Fungos entomopatogênicos	13
2.4.3.2 Controle de <i>A. aegypti</i> utilizando fungos entomopatogênicos	16
2.5 Outras Formas de Controle de <i>A. aegypti</i>	17
2.6 Monitoramento Integrado	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Local de Realização de Experimento	19
3.2 Obtenção e Manutenção de Larvas de <i>A. aegypti</i>	19
3.3 Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos	20
3.4 Preparo das Suspensões/Formulações de Conídios	20
3.4.1 Produção e preparo das suspensões de blastosporos	21
3.5 Produção de Blastosporos sob Diferentes Condições de Cultivo.....	21
3.6 Teste de Patogenicidade e Virulência Contra Larvas de <i>A. aegypti</i>	22
3.7 Re-isolamento Fúngico Após Ensaio Biológicos	22
3.8 Análise Estatística	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Produção de Blastosporos sob Diferentes Condições de Cultivo	23
4.2 Resultado Ensaio Biológico	25
4.2.1 Avaliação da virulência de suspensões sobre larvas de <i>A. aegypti</i>	25
4.2.1.1 <i>Beauveria bassiana</i> - CG 206.....	25
4.2.1.2 <i>Beuveria bassiana</i> - CG479.....	27
4.2.1.3 <i>Metarhizium anisopliae</i> - CG153	29
4.2.1.4 <i>Metarhizium anisopliae</i> - IBCB481	30
4.2.1.5 <i>Metarhizium anisopliae</i> - ARSEF2211	32
4.2.2 Avaliação da Toxicidade do óleo Mineral.....	36
4.2.3 <i>Beauveria bassiana</i> CG479- formulação	37
4.2.4 <i>Beauveria bassiana</i> CG206 - formulação	39
4.2.5 <i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF2211 - formulação	41
4.2.6 Re-isolamento fúngico após ensaio biológico	47
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o mundo vem tentando desenvolver técnicas de controle cada vez mais eficientes para combater o mosquito *Aedes aegypti*, vetor dos agentes etiológicos causadores de Febre Amarela Urbana (FAU), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) e, apesar de todo investimento em combate, prevenção e diagnóstico, os casos destas doenças vêm aumentando ano a ano.

Pensando nas constantes epidemias ocasionadas é que se torna necessário cada vez mais investimento em pesquisas que visam entender melhor o vetor, sua interação com meio ambiente, a interação com arbovírus, e com isso desenvolver novas tecnologias de controle ao mosquito e seus agentes transmitidos.

O gênero *Aedes* possui diversas espécies dentre as quais, *A. aegypti* e *Aedes albopictus*, se configuram como as mais importantes. *A. albopictus* é uma espécie predominantemente silvestre, também envolvida na transmissão de arboviroses. *A. aegypti* por sua vez, é uma espécie presente predominantemente em ambientes urbanos. *A. aegypti* apresenta uma grande adaptabilidade a ambientes urbanos se desenvolvendo em locais como garrafas, caixas d'água, pneus, calhas, ou seja, qualquer recipiente que contenha água. Além da adaptação, existem outros fatores que permitem sua contínua proliferação como por exemplo, a resistência dos ovos que na ausência de ambiente favorável para eclosão das larvas podem permanecer viáveis por até um ano. Esta característica, dentre outras, é que torna o mosquito tão resistente e a transmissibilidade de doenças persistente entre nós.

Além das características de adaptabilidade e resistência inerentes ao mosquito, o seu combate se torna difícil por questões ligadas ao desenvolvimento humano como as políticas de saneamento precárias, aliadas a hábitos que propiciam a manutenção de criadouros artificiais (acúmulo em garrafas, pneus, potes, vasos de plantas, caixas d'água etc.) o crescimento urbano desorganizado criando ambientes propícios para manutenção do ciclo de vida do vetor. Atualmente, o Ministério da Saúde vem tentando combater o mosquito *A. aegypti* predominantemente por meio de controle mecânico; políticas educacionais e principalmente controle químico utilizando produtos à base de themefós, organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides, produtos estes, que se mostram cada vez menos ineficientes uma vez que o mosquito apresenta formas de escape e resistência cada vez mais eficientes.

Diante do quadro de resistência vetorial, os estudos estão cada vez mais concentrados em novas formas de controle do vetor buscando maior eficiência, eficácia, seletividade e segurança. Levando em consideração esses objetivos, o controle biológico desponta como uma importante ferramenta de combate ao mosquito *A. aegypti*. Dentre as mais variadas formas de controle biológico, a mais utilizada atualmente são os produtos à base de bactérias gram-positivas *Bacillus thuringiensis*, produtoras de cristais que destroem a parede intestinal da larva após ingestão quando colocados na água onde se desenvolvem. Atualmente já existem novos estudos de controle de *A. aegypti* utilizando nematoides, peixes, vírus e fungos.

Fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* s.l e *Beauveria bassiana* s.l, são amplamente usados na agricultura, diminuindo o uso de produtos químicos em lavouras e consequentemente cultivando produtos mais saudáveis. Estes fungos estão presentes no meio ambiente atuando naturalmente no controle de insetos. Sua ação se dá por mecanismo de adesão, penetração, produção de enzimas como a subtilisina (Pr1) e tripsina (Pr2) além de toxinas chamadas de destruxinas (*M. anisopliae*) e bovericinas (*B. bassiana*) que intensificam o processo infeccioso.

Estudos com *M. anisopliae* e *B. bassiana* envolvem utilização de conídios, blastosporos, toxinas, enzimas e metabólitos, possibilitando a introdução de novas formas de controle de vetores com melhores resultados. Pensando nisso, uma estrutura de grande importância no processo infeccioso, blastosporos (estruturas encapsuladas chamadas de corpos hifais quando produzidas *in vitro*), estão presentes na hemolinfa do hospedeiro após penetração do conídio. Estas estruturas são produtoras de toxinas que potencializam a infecção. Estudos demonstram melhores resultados na utilização de blastosporos no controle biológico, quando comparados com conídios, tais resultados variam de acordo com isolado, sua forma de cultivo e o hospedeiro alvo.

M. anisopliae e *B. bassiana* são fungos amplamente estudados não somente pela sua preferência por insetos, mas por possuírem uma vasta variabilidade genética permitindo-nos selecionar isolados mais virulentos, e seletivos garantindo assim maior eficiência, eficácia e maior segurança ambiental e animal.

Sendo assim o presente estudo objetivou avaliar e comparar a virulência de conídios e blastosporos de diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra larvas de *A. aegypti* quando imersas em suspensões aquosas ou formulações oleosas nas concentrações $10^8/10^7$

conídios e blastosporos mL⁻¹, além de verificar a capacidade de produção de blastosporos de cinco isolados fúngicos submetidos em diferentes tempos e agitação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História de *Aedes aegypti*

Historicamente a primeira descrição do mosquito *A. aegypti* se deu pelo pesquisador Linnaeus em 1762 (ZARA et al., 2016; SILVA et al., 2012) sendo mais tarde estudado por outros autores. *A. aegypti* é um mosquito de origem africana que possivelmente chegou ao continente americano de forma passiva (ovos depositados em recipientes contendo água) através de navios durante o período colonial; chegando ao continente americano, rapidamente se adaptou ao novo ambiente por conta das condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. No Brasil, os primeiros registros do mosquito foram datados em 1898, por Lutz, e posteriormente em 1899, por Ribas (BRAGA; VALLE, 2007 a). Após a introdução do mosquito no território brasileiro, ocorreu uma pressão de seleção por conta do crescimento urbano, eliminando as espécies mais silvestres e mantendo as mais urbanas do mosquito (ZARA et al., 2016). Após a eliminação das cepas silvestres, a interação, adaptação a meios urbanos e os mecanismos de escape do mosquito foram se aprimorando e tornando-se mais difícil a tarefa de eliminá-lo.

Em 1690, antes do surgimento da teoria germinal (teoria que relacionava o desenvolvimento de doenças a partir de microorganismos como bactérias) o que se praticava era a teoria miasmática que tinha como fundamento o combate as doenças por meio de purificação de ar, eliminação de roupas, colchões, administração de ervas cheirosas na tentativa de controlar algo que até então não se conhecia (SILVA et al., 2012). Após a descoberta de bactérias, e sua relação com vetores, o primeiro combate ao *A. aegypti* se deu por Wycliffe (diretor da comissão de saúde internacional da fundação Rockefeller) quando este em 1914 implantara o programa de erradicação da febre amarela durante a segunda guerra mundial e que perdurou até 1930. Na tentativa de controlar a doença, originou-se a Campanha Continental para a Erradicação do *Aedes aegypti*, um programa criado pelo médico brasileiro Heitor Prager Fróes diretor do Departamento Nacional de Saúde (DNS) e membro da Organização Sanitária Pan-Americana (OSP) (MAGALHÃES, 2016; DOMINGOS et al., 2013; SILVA et al., 2008). Nessa época a OSP era então comandada pelo médico Frederick

Lowe Soper que foi enviado aos campos da segunda guerra mundial para atuar no combate ao tifo e malária, onde nesse período testou o diclorodifeniltricloreto (DDT), composto químico que poderia, segundo ele, eliminar o mosquito vetor da febre amarela.

No Brasil, o relato de controle eficiente de um vetor e sua doença foi especificamente no Rio de Janeiro onde a febre amarela era endêmica e com elevada taxa de mortalidade. Neste contexto, Oswaldo Cruz, em 1903, começava uma campanha organizada e eficiente contra o mosquito, recrutando pessoal e usando produtos como Verde de Paris e querosene como formas de controle químico (WEMELINGER et al., 2016; BRAGA; VALLE, 2007 a) eliminando por completo a epidemia em uma cidade que na época se configurava como a maior capital do Brasil e capital Federativa. Após duas décadas de controle da doença, a cidade do Rio de Janeiro se deparava mais uma vez com uma nova epidemia de febre amarela, então, uma nova campanha (mas como as mesmas ferramentas utilizadas por Oswaldo Cruz) foi organizada pelo médico e diretor geral do Departamento Nacional de Saúde Pública Clementino Fraga eliminando então, a epidemia rapidamente entre anos de 1928 até 1929 (WEMELINGER et al., 2016). Em 1934, já começava uma movimentação mais intensa e organizada para eliminação do mosquito do país o que proporcionou a eliminação do último foco em 1955 e em 1958, sendo oficialmente declarada a erradicação do *A. aegypti* (NETO, 1997). No entanto, após 21 anos, possivelmente por conta de uma falha no monitoramento epidemiológico do mosquito, se deu sua reintrodução no país pelo município de Salvador (ZARA et al., 2016; NETO, 1997). Segundo Zara et al., (2016) e Neto, (1997) ocorreram no Brasil, dois períodos de eliminação do mosquito, 1958 e 1973 permanecendo assim até 1976 quando o mosquito mais uma vez foi reintroduzido nas nossas terras definitivamente.

Ao longo desta trajetória de epidemias, o governo federal junto aos municípios criou alguns programas de controle ao vetor, começando pelo Programa de Erradicação ao *Aedes aegypti* (PEAa) em 1996 para controle principalmente dos casos de dengue hemorrágica que ocorreram (BRAGA; VALLE, 2007 a) que consistia no uso massivo de produtos químicos para eliminação de criadouros num período de 5 anos. Basicamente o programa norteava somente uso de produtos químicos e algumas básicas medidas mecânicas como doações de tampas de caixa d'água, e não privilegiando medidas educacional e monitoramento epidemiológico. Logo, o programa não atingiu a meta prevista, permitindo assim, que o terceiro sorotipo da dengue entrasse em território nacional, forçando o governo a coordenar uma reestruturação do mesmo nomeando-o como Programa de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) que nessa etapa o controle era direcionado a infestações

vetoriais, já um amadurecimento da ideia de que o sucesso do programa dependeria também da atuação da sociedade (FEITOSA et al., 2016; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Em 2001 foi criado um novo programa chamado de Programa Nacional de Combate a Dengue (PNCD) na tentativa de ser mais eficiente que os antecessores. O controle dos focos de mosquito se baseava (e ainda se baseia) em uso de produtos químicos como temephós organofosforados, uso de UBV (ultra baixo volume) todos com a tentativa de controlar os focos dos mosquitos nos municípios brasileiros, mas o novo plano de governo já consistia em levar a discussão para a população, promovendo uma participação em massa e investimento em conscientização e educação sanitária com objetivo de se evitar a origem de novos focos. Essa ideia de responsabilidade compartilhada entre sociedade e governo agora ecoa nos nossos ouvidos descentralizando a obrigação dos governantes (ZARA et al., 2016). Ao mesmo tempo em que se investia em política de inclusão da sociedade no combate ao vetor, novos estudos começavam a despontar evidenciando uma possível seleção natural de mosquitos mais resistente a produtos químicos como temephós (ZARA et al., 2016; LIMA et al., 2016). Os estudos de resistência a compostos químicos fizeram com que o governo brasileiro começasse a usar outras formas de controle, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (LIMA et al., 2016).

2.2 Morfologia, biologia e comportamento de *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae Linnaeus, 1762) é vetor de doenças de importância para saúde pública (dengue, febre amarela, chikungunya e zika) (POWEL et al., 2013; AL-ABDELY et al., 2015). Taxonomicamente o mosquito pertence à família Culicidae subfamília Culicinae, gênero *Aedes* e subgênero *Stomorgya* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). Sua nomenclatura vem do grego sendo o prefixo “a” de negação e edes (adorado) com intuito de expressar o quão odioso seria (SILVA et al, 2012) e aegypti (Egito) vem do latim pela provável descoberta da espécie nessa região (BRAGA; VALLE, 2007 a).

O mosquito *A. aegypti* pode ser encontrado em quase todos os continentes (exceto Antártida) em locais em torno de 1.000 metros de altitude (outra exceção para os países Índia e Colômbia onde já foi relatado sua presença acima de 2.000 metros) (BRAGA; VALLE, 2007 a). Geograficamente, apesar de ser cosmopolita, predominantemente se localiza em regiões subtropicais e tropicais em latitudes que variam em 35°N e 35°S (sendo raro seu encontro em 45°N de latitude) em zonas isotermas em torno de 10 a 20°C (CONSOLI; 5

OLIVEIRA, 1998; BRAGA; VALLE, 2007 a; SILVA et al., 2012). *A. aegypti* é um mosquito que se desenvolve preferencialmente em locais contendo água limpa, rica em minerais, pouca matéria orgânica e sais (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998), embora estudo desenvolvido por Bezerra et al. (2010) mostrem que o desenvolvimento do mosquito também pode se dar em ambientes aquáticos com algum grau de material orgânico e água turva.

O ciclo biológico de *A. aegypti* é classificado como holometábolo, ou seja, um ciclo de metamorfose completa (ovo, larva, pupa e adultos). Os ovos possuem formas elípticas, apresentando uma coloração clara que se perde em contato com oxigênio pela sua oxidação ficando assim com coloração enegrecida; portanto os ovos que não atingirem a coloração preta são provavelmente os ovos inférteis (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). A oviposição é feita em locais diferenciados com intuito de evitar superlotação de larvas, competição alimentar e minimizar os riscos inerentes aos locais de oviposição (TSUNODA et al., 2010). Ao ovipor, a fêmea de *A. aegypti* coloca seus ovos (não aglomerados) em local úmido próximo a água. Segundo Zara et al., (2016) os ovos de *A. aegypti* na falta de água, conseguem resistir por um período de até 492 dias conferindo assim um grande obstáculo no controle do mosquito. O ovo, ao interagir com a água dará início a embriogênese, que completará todo processo em torno de 2 a 3 dias dando origem às larvas.

A fase larval é caracterizada por larvas que vão do primeiro ao quarto estágio, com formato vermiforme dividido em cabeça, tórax e abdômen. Possui cerca de 222 pares de cerdas ao longo do corpo com função sensorial e que auxiliam na flutuação; o aparelho bucal é do tipo mastigador-raspador com presença das escovas orais (estruturas essenciais para produção de uma corrente hídrica necessária para se trazer o alimento à boca); o sifão respiratório e os espiráculos são os responsáveis pela troca gasosa. Entre 5 a 7 dias, as larvas de quarto estágio se transformam em pupas permanecendo assim por aproximadamente 3 dias. As pupas não se alimentam e seu corpo é dividido em cefalotórax e abdômen, conferindo um formato de “vírgula”. O cefalotórax possui trombetas respiratórias e o abdômen, cerdas no seu primeiro e oitavo segmento (CONSOLI; OLIVEIRA 1998); ao se aproximar da transformação em mosquitos adultos, sua coloração vai se tornando enegrecida.

O mosquito adulto caracterizado como a fase reprodutora, é facilmente identificado pela presença de listras pratas no tórax e listras brancas no dorso e desenho em formato de lira na região dorsal do tórax (NETO, 1997). Tanto o macho quanto a fêmea apresentam anéis brancos pelas pernas e coloração preta. A diferenciação principal entre os sexos se dá principalmente pela antena sendo, plumosa em macho e pilosa em fêmeas. Apresentam

hábitos crepusculares que envolvem o acasalamento e alimentação. Ao se alimentar, ambos os sexos podem ingerir seiva de plantas sugando as gotículas de carboidrato. A alimentação sanguínea é uma característica inerente a fêmea, que necessita de proteínas necessárias para a oviposição e maturação dos seus ovos. Para fazer o repasto sanguíneo, a fêmea cuidadosamente seleciona o local da picada utilizando órgãos sensoriais, introduz seu aparelho picador-sugador com ajuda de anestésicos e anticoagulantes se alimentando por três minutos em média. Em contato com o sangue, o estômago produz uma membrana quitinosa chamada “peritrófica” que ao mesmo tempo em que protege o estômago do mosquito (contra componentes do sangue que podem ser maléficos), é também permeável a enzimas digestivas. Ao completar a hematofagia, a mesma procura um local para descansar, fazer a digestão do alimento e começar o processo de oviposição. Se não completar sua hematofagia, a fêmea pode se alimentar de outros hospedeiros até que se complete tal processo (CONSOLI; OLIVEIRA, 2009).

2.3 *Aedes aegypti* e sua Importância em Saúde Pública

A importância de *A. aegypti* se dá pela transmissão de arbovírus causadoras de doenças que geram epidemias no mundo todo (DIAS et al., 2017), dentre elas Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela Urbana.

O vírus da Dengue possui quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4) (SALJE et al., 2017) que podem se manifestar de duas formas: clássica e hemorrágica. A Virose se tornou a mais importante em território nacional em decorrência do elevado número de casos. Dados epidemiológicos nacionais apontam que no ano de 2017, até a 50ª semana epidemiológica, foram notificados 249.056 casos prováveis, 266 casos confirmados e 137 óbitos no país (BRASIL, 2017).

A febre de Chikungunya, causadora de febre e poliartrite severa, é outra doença causada por arbovírus e transmitida pela picada de *A. aegypti* em seres humanos (DONALÍSIO; FREITAS, 2015). No ano de 2017 já foram notificados cerca de 185.605 casos prováveis, 151.101 casos confirmados com 168 óbitos (BRASIL, 2017).

Outra importante doença é a Febre Amarela, uma virose de caráter não infeccioso que se apresenta de duas formas: Urbana, no qual *A. aegypti* transmite entre pessoas através da picada; e a silvestre, transmitida pela picada do mosquito do gênero *Haemagogus* em macacos e tem o homem como hospedeiro acidental; os últimos dados epidemiológicos indicaram

3.240 casos com 274 óbitos confirmados (BRASIL, 2017). Apesar do último confirmado ter ocorrido em junho de 2017, a vacinação ainda continua sendo realizada (BRASIL, 2017).

O Zika vírus, foi originalmente isolado em macacos Rhesus na floresta de Uganda no ano de 1946, mas no Brasil passou a ter destaque após a primeira epidemia no ano de 2015, posterior a Copa do mundo realizada em território nacional em 2014. Desde então, mais de 30.000 casos humanos da doença foram notificados tornando-se um importante arbovírus para saúde pública. A febre de Zika apresenta-se com uma doença de sintomas inespecíficos e que por isso pode-se passar como outra doença se não for corretamente investigada; a doença pode causar comprometimento neurológico, mas sua implicação mais grave atualmente é a microcefalia em recém-nascidos (DUARTE et al., 2017).

2.4 Controle do mosquito *Aedes aegypti*

Atualmente existem diversas formas de controle de *A. aegypti*, agrupados em 3 categorias: controle mecânico, químico e biológico que juntos se complementam no chamado “Controle Integrado de Vetores” (BRAGA; VALLE, 2007 b). Segundo Wermelinger e Carvalho, (2016), o controle de *A. aegypti* se faz necessário principalmente por ser vetor de importantes arboviroses que provocam doenças sem tratamento específico, e não somente pelos seus mecanismos de resistências adquiridos.

2.4.1 Controle mecânico

Baseia-se na adoção de medidas que visam dificultar e impedir o acesso de vetores potencialmente nocivos à saúde, controle esse que pode envolver captura dos mosquitos em qualquer uma de suas fases, retiradas de focos ou recipientes que possam servir de criadouros; limpezas de calhas, caixas d’água, entre outras (ZARA et al., 2016; BRAGA; VALLE, 2007 b). Tais medidas se concentravam em eliminação de poços artesanais ou naturais de água que poderiam servir de abrigo para a larva; aplicação de querosene nos locais onde não se poderia eliminar o reservatório; isolamento dos doentes e criação de alas de isolamento em hospitais; isolamento de casas onde ocorreram casos da febre amarela até que estas fossem desinsetizadas (WERMLINGER; CARVALHO, 2016; SILVA et al., 2012).

Tendo em vista a importância do controle mecânico, seria necessária uma vigilância epidemiológica mais atuante e forte, logo o Ministério da Saúde passou a contar com o apoio dos Agentes de Combate a Endemias (ACEs) (BRASIL, 2017) que são oficialmente o fio condutor da ligação entre órgãos de saúde e a sociedade. Suas funções incluem visitar

domicílios e locais para fazer vistorias, limpezas e usos de produtos químicos ou biológicos quando necessário; também promover educação ambiental e sanitária a população, ensinando por exemplo a guardar recipientes que possam servir de criadouros; limpar calhas, pneus, garrafas e relatar os locais de infestação (ZARA et al., 2016; FEITOSA et al., 2016). Segundo Feitosa et al., (2016), na década de noventa o governo elaborou um documento para combater o mosquito *A. aegypti* que separava um grande investimento financeiro que se converteria em medidas mecânicas de controle do mosquito como, investimento em saneamento básico; educação ambiental; campanhas de conscientização; projetos para alcançar mobilização social. Embora não faltasse esforços para se tocar o projeto, estes, não alcançaram plenamente sua meta, devido ao próprio obstáculo financeiro que o país possui.

Um dos grandes programas criados pelo governo, juntamente com o Programa Nacional de Combate à Dengue (PNCD), foi o Dia Nacional de Mobilização contra a Dengue (Dia D) com intuito de recrutar toda sociedade para praticar prevenção e combate, além de educação ambiental (FEITOSA et al., 2016).

Existem outras formas de controle mecânico do mosquito *A. aegypti*, como uso de armadilhas, mas que, apesar de eficientes para avaliação de índices de infestação, podem (algumas delas) segundo Gomes et al., (2008) demandar logística como uso de energia, local apropriado para instalação, pessoal, capacidade para uso, entre outros impedimentos que impossibilitam a popularização das armadilhas. Entre as armadilhas de captura, as “Ovitampas” são as armadilhas de maior utilização para realização de coleta de larvas de *A. aegypti* (BRASIL, 2017).

2.4.2 Controle químico

Segundo Zara et al., (2016) o controle químico se baseia na utilização de produtos que podem levar a morte da fase larval ou adultos do mosquito *A. aegypti*, seja por mecanismos que impeçam seu crescimento, produtos que podem ter efeito neurotóxico ou inibidores de produção de quitina.

Existem quatro grandes grupos moleculares que originaram importantes inseticidas: Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos e Piretróides (BRAGA; VALLE, 2007 b). No grupo dos organoclorados estão presentes os primeiros compostos químicos utilizados para controle de *A. aegypti*, o DDT e o benzenohexacloro (BHC) com ação semelhante ao primeiro; os inseticidas dessa classe atuam no canal de sódio alterando assim a transmissão dos impulsos nervosos (BRAGA; VALLE, 2007 b). O DDT foi o primeiro inseticida usado

para controle de vetores nos anos de 1940, seguido do verde de paris e querosene (MAGALHÃES, 2016).

O sucesso na utilização do DDT contra tifo na segunda guerra mundial, malária e febre amarela, estimulou seu uso de maneira indiscriminada contra pragas na agricultura, controle de ectoparasitas em animais etc. Esse uso abusivo estimulou a realização de diversos estudos para investigar seus efeitos nos alimentos, humanos e meio ambiente. A toxicidade do DDT foi comprovada em diversos estudos; seus efeitos abrangem vias endócrinas; no sistema nervoso, hiperestimulando membranas de axônio; efeito cumulativo em decorrência de armazenamento em tecido adiposo; longo período de manifestação clínica da toxicidade por conta da lenta taxa de metabolização no fígado e rim. O DDT além de não possuir seletividade para nenhum tipo de animal, possui alta capacidade de deixar resíduos no solo, lençóis freáticos e alimentos como carne, leite, frutas e vegetais. Sendo assim diversos países proibiram seu uso, incluindo o Brasil no ano de 1971 no controle de ectoparasitas de animais domésticos, no ano de 1985 na agricultura e mais tarde na saúde pública (NASCIMENTO et al., 2017; D'AMATO et al., 2002).

Segundo Consoli e Oliveira (1998), na década de 40 os Estados Unidos observaram resistência ao DDT e outros inseticidas em diversos culicídeos (entre eles os importantes vetores de doenças de importância para saúde pública). Os mesmos autores categorizaram as formas de resistência como: resistência refratária, no qual a população naturalmente apresenta genes de resistência a um determinado composto químico; resistência adquirida promovida quando uma determinada população sobrevivente de uma espécie desenvolve genes capazes de aprimorar sua imunidade ou eliminação do inseticida (resistência fisiológica), ou mesmo não adquirindo características fisiológicas que o tornem resistente, podendo alterar seu comportamento para diminuir o contato com o composto químico chamando então de resistência comportamental.

Os organofosforados são compostos que possuem em sua fórmula a molécula de fósforo; são moléculas facilmente degradadas em meio ambiente e não se acumulam no tecido de mamíferos, porém com grande toxicidade. Atualmente o principal inseticida organofosforado utilizado no Brasil é o themephós. Com mesma ação que os organofosforados, os carbamatos são grupos moleculares menos usados no controle de vetores de importância para a saúde pública. As moléculas de piretróide são compostas com mecanismo de ação semelhante ao DDT, porém sua toxicidade é conferida somente a peixes;

dentre os inseticidas dessa classe o mais usado na agricultura é a permetrina (BRAGA; VALLE, 2007 b).

No Brasil atualmente usa-se predominantemente dois compostos químicos para controle de *A. aegypti*: temephós, inseticida responsável pela inibição da enzima acetilcolinesterase; e o larvicida Difluorobenzurom que promove a inibição da síntese de quitina. Para controle de formas adultas, o Ministério da Saúde estabeleceu a utilização em larga escala de produtos piretróides (que impedem o fechamento dos canais de sódio) utilizando o sistema de pulverização que é aplicado utilizando o ultra-baixo volume (UVB) somente momentos de epidemia (FREITAS et al.,2014).

Apesar de comprovada eficiência de inseticidas, diversos estudos já comprovaram a resistência de vetores a diversos compostos químicos. Em se tratando do mosquito *A. aegypti* Diniz et al., (2014) relacionaram diversas pesquisas que detectaram resistência química em cidades de estados brasileiros como Ceará e Paraíba evidenciando a importância de se fazer esse tipo de estudo com intuito de entender melhor os mecanismos envolvidos e com isso aperfeiçoar as técnicas de controle. Os autores explicam que apesar de haver um mecanismo claro de adaptação das espécies, isso gera um custo chamado de “desvantagem adaptativa” que pode alterar outras características fisiológicas dos insetos como, por exemplo, uma perda na capacidade de reprodução e do crescimento.

No Brasil, o uso de temephós passou a ser amplamente usado com a criação do PNCD. Estes compostos são empregados durante períodos chuvosos para combate ao *A. aegypti*. Apesar da aplicação em ampla escala, estes inseticidas já começam a dar evidências de que já não apresentam a mesma ação. Estudos destes produtos mostraram que os mecanismos de detoxificação e a interação da enzima acetilcolinesterase com os temephós conferiram ao mosquito uma resistência ao composto (ARAUJO et al., 2016).

Braga e Valle. (2007) afirma que a resistência é conferida a todos os grupos de compostos químicos, mas que ainda são essenciais (mesmo com outras formas de controle sendo desenvolvidas) e que apesar disso, é necessário estudos contínuos e monitoramento dos casos de resistência para avaliação de custo-benefício.

2.4.3 Controle biológico

O controle biológico utiliza inimigos naturais (predadores ou patógenos) para controle de população de insetos (ZARA et al., 2016). Segundo Silva et al., (2015) o controle biológico tem como função reduzir uma população anteriormente elevada. O controle biológico pode 11

ser dividido em duas formas, o “controle natural” sem interferência humana e o “controle biológico artificial” que utiliza tecnologia para melhor resultado (FUNASA, 2002).

Historicamente no século III a.C. os chineses já utilizavam formigas *Oecophylla smaragdina* para controle de pragas em suas lavouras de citrus (SILVA et al., 2015; FINKLER, 2012). O parasitismo pelo fungo *Beauveria bassiana* foi observado pela primeira vez em 1834 quando pesquisador Agostini Bassi observou a presença do fungo quando estudava uma doença que afetava o bicho da seda. E posteriormente em 1878 Elie Metchnikoff descobriu *Anisoplia austriaca* que mais tarde ser tornaria *Metarhizium anisopliae* (FINKLER, 2012). Desde então diversos estudos vêm sendo realizados com entomopatógenos nas mais diversas áreas e sempre buscando um menor uso de produtos químicos e outros métodos que possam de alguma maneira ser prejudicial à saúde humana, animal e meio ambiente.

Segundo Valicente, (2009) o controle biológico pode ser realizado com utilização de nematóides (amplamente estudado nos Estados Unidos); vírus como os baculovírus (vírus com fita dupla simples de DNA) que pode por exemplo infectar *Spodoptera frugiperda* (Predadora de milho), *Anticarsia gemmatalis* (Predadora de soja); bactérias amplamente estudadas como *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), uma bactéria flagelada gram-positiva em forma de bastonete com mais de 60 mil cepas que tem capacidade de produzir cristais (quando esporuladas) citotóxicos (deltaendotoxina) que promovem a ruptura celular. Após a criação do PNCD, *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (*Bti*) passou a ser utilizado como forma de controle do vetor, quando começaram a surgir estudos sobre a resistência de *A. aegypti* ao químico themephós (LIMA et al., 2016).

Os benefícios do uso de *Bti* podem ser o baixo grau de toxicidade ao meio ambiente e mamíferos, sua ação sobre outras espécies de mosquitos e a possibilidade de uma produção em larga escala do seu produto (LIMA et al., 2016).

Outros agentes de controle biológico são os protozoários, que possuem baixa virulência e o hospedeiro morre de forma mais lenta (Valicente, 2009). Outra forma de controle biológico de larvas de *A. aegypti* foi estudada por Cavalcanti et al., (2007) que utilizaram peixes predadores como *Betta splendens*; *Thrichogaster trichopteros*; *Poecilia reticulata*.

Atualmente novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas utilizando-se *Wolbachia*, bactéria simbiótica natural de diversos insetos. Essa bactéria, introduzida no macho, causa esterilidade e ao se acasalar com as fêmeas, estas produzem ovos inviáveis; além disso, ao se

acasalarem com fêmeas que também já possuem *Wolbachia*, podem naturalmente transmitir a bactéria para a próxima geração. A nova geração de *A. aegypti* então, naturalmente infectados com a bactéria, eliminaria a necessidade de fazer reposição com mosquito infectados *in vitro* constantemente (VALLE, 2016).

O controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos é amplamente utilizado agricultura, por sua capacidade de parasitar qualquer estágio de vida do seu hospedeiro natural (FALVO et al., 2016); atualmente no Brasil, metade dos produtos biopesticidas desenvolvidos são a base de fungos, sendo a maioria, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (MASCARIN et al., 2018), que apresentam esporos que se propagam a outros quer pelo contato ou pelo ar. Comumente causam colorações variadas no seu hospedeiro e após a morte deste, podem ficar com aspecto oco ou emborrachado. Fungos entomopatogênicos mais utilizados no Brasil são *M. anisopliae* e *B. bassiana* para combater *Mahanarva posticata* (cigarrinha da cana de açúcar); *Cornitermes* (cupim) e gafanhotos como *chistocerca pallens* (VALICENTE, 2009).

2.4.3.1 Fungos entomopatogênicos

Existente mais de mil espécies de fungos que contribuem com o equilíbrio da natureza parasitando naturalmente diversos insetos (WANG et al., 2016). Dentre os mais diversos fungos com essa habilidade, os do complexo *M. anisopliae* e *B. bassiana* são os fungos amplamente usados como formas de controle biológico contra vetores de doenças animais e humanas (BUTT et al., 2013). Estudos vêm apresentando ótimos resultados no uso destes fungos contra carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Ixodes ricinus* e dípteras como *Phlebotomus papatasi*, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, lagarta *Spodoptera litura* (RAGAVENDRAN et al., 2017; ZAYED et al., 2016; WASSERMANN et al., 2016; ANGELO et al., 2014; SREE et al., 2008).

Fungos entomopatogênicos começam seu processo infeccioso pela penetração pela etapa de penetração. Após o contato com a cutícula do artrópode, o conídio (estrutura de propagação do fungo) passa a produzir adesina 1 (MAD 1) que promove a adesão do conídio à superfície do seu hospedeiro, iniciando seu processo de germinação desenvolvendo o tubo germinativo por onde migra uma série de enzimas hidrolíticas (proteases Pr1; Pr2, quitinases e lipases) além de formação de gotículas de gordura que juntos irão aumentar a concentração de glicerol com intuito de facilitar o acesso ao hospedeiro através da destruição da sua cutícula além da própria pressão mecânica com o tudo germinativo exerce (DANIEL et al.,

2017; WANG et al., 2016; GARZAR-HERNANDES et al., 2013; BUTT et al., 2013; ALVES, 1998).

Para penetrar na cutícula do hospedeiro, o fungo deve contar com sistema de desintoxicação como enzimas citocromo P450 (CYP), hidrogenases, lipases que vão inibir uma série de mecanismos antifúngicos que possam ter seu hospedeiro. Após a penetração pela cutícula o tubo germinativo se alonga e em contato com a hemocele do hospedeiro o fungo passa a secretar metabólitos secundários tóxicos como as ciclohexapeptídeo destruxinas (DTXs A, B, E) produzidas por *M. anisopliae* e bovericinas (A, B, D, E, F) secretadas por *B. bassiana* e espécies de *Paecilomyces* e *Fusarium*; melanização das células do inseto e para se multiplicar mais rapidamente, produz estruturas hifais chamadas de blastosporos até que o fungo mata seu alvo por consumir todo seu nutriente, fome, desidratação e toxemia (Figura 1). Ao terminar a infecção o fungo se exterioriza produzindo novas estruturas de propagação (DANIEL et al., 2017; WANG et al., 2016; GARZAR-HERNANDES et al., 2013; BUTT et al., 2013; ALVES, 1998).

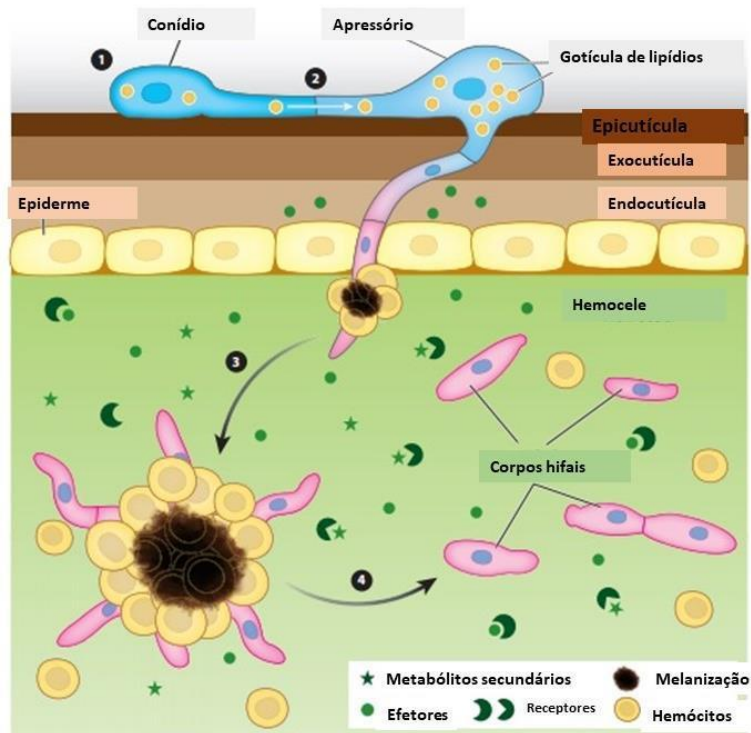


Figura 1- Ciclo esquemático do processo de colonização fúngica começando pela adesão do conídio (1) desenvolvimento do tubo germinativo (2); Formação de apressório; penetração na cutícula do hospedeiro; formação de corpos hifais e melanização após contato com sistema imune do hospedeiro (esquema adaptado de WANG et al., 2016).

Fungos entomopatogênicos apresentam duas estruturas: conídios e blastosporos que, segundo Alkhaibari et al., (2016) possuem características distintas; conídios são estruturas hidrofóbicas com formato uniforme, produzidas em meios de cultura sólido com 14 dias de tempo necessário para germinação; conídios são os mais usados na produção de tecnologia voltada para controle de pragas a campo, por ser mais resistente aos efeitos adversos do meio ambiente; blastosporos, são estruturas hidrofílicas pleomórficas produzidas na hemolinfa do hospedeiro (se produzidos *in vitro* são chamados de corpos hifais); são produzidos em meio de cultura líquido, necessitando menor tempo de preparo (2 a 3 dias) além de menor custo e espaço para produção; blastosporos são menos resistentes em ambientes terrestres devido à fina parede que o envolve que possibilita menor tempo de prateleira (nove meses quando mantidos a 4° C) porém se configura como uma boa alternativa para controle de larvas aquáticas. Os conídios apresentam um razoável tempo de prateleira (12 meses) mas que, por sua característica hidrofóbica, precisam de estabilizantes na sua fórmula para manter suas características e viabilidade (MASCARIN et al., 2016).

M. anisopliae (Metschnikoff) Sorokin é um fungo deuteromiceto encontrado naturalmente em solos parasitando preferencialmente insetos e plantas. Morfologicamente é um fungo amorfo com presença de filamentos e seus conídios apresentam formatos ligeiramente ovóides ou cilíndricos e coloração esverdeada. Ao levar a morte do seu hospedeiro, estes apresentam mesma coloração dos conídios aderidos à cutícula após exteriorização, sendo por isso a infecção por *M. anisopliae* chamada popularmente de “muscardine verde” (ORLANDELLI; PANPHILE, 2011; ZIMMERMANN, 2007 a; ROBERTS; ST LEGER, 2004). Pode ser encontrado em todos os trópicos e regiões de clima temperado (BISCHOFF et al., 2009), sendo constituído por um complexo de nove espécies que, pela sua variabilidade genética e seus diferentes hospedeiros, vem despertando o interesse em diversos estudos sobre controle de pragas e vetores no agronegócio, meio ambiente e saúde pública (BISCHOFF et al., 2009; WANG et al., 2016; RAVIDRAN et al., 2016).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill (Hypocreales: Cordycipitaceae) é um fungo que tem o solo como ambiente natural, parasitando mais de 707 espécies de insetos (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007 b). Causador da doença “muscardina branca” foi primeiramente observado pelo pesquisador Agostino Bassi em 1835 parasitando bicho da seda *Bombyx mori*. Em 1894 foi relatado a primeira epizootia em coleópteros *Melolontha melolontha*. *B. bassiana*, vem sendo usada como pesticidas biológicos no controle de pragas na agricultura

pela mesma segurança e seletividade que apresenta *M. anisopliae* (ERLER; ATES, 2015; ALVES, 1998).

Fungos entomopatogênicos são normalmente usados tendo como principal diluente a água. Pela sua constituição lipídica, conídios possuem características hidrofóbicas, o que dificulta sua diluição em ambiente puramente aquosa interferindo na homogeneização do produto, no espalhamento e na adesão sobre a cutícula do hospedeiro (SILVA et al., 2006).

Outro fator limitador do controle biológico utilizando fungos no campo são os efeitos adversos como radiação-UV, umidade, temperatura e o microclima do local onde fica o fungo. As condições naturais, quando não favoráveis ao fungo, causam efeitos deletérios sobre os conídios como diminuição da germinação e da virulência. Por isso torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de técnicas que visam proteger o propágulo das condições adversas do meio ambiente e também potencializar suas características que contribuem para sua ação no hospedeiro (CAMARGO et al., 2012; SILVA et al., 2006).

Para contornar essas limitações estudos a base de formulações utilizando óleo vegetal ou mineral vem sendo realizados, uma vez que os óleos podem melhorar ação do fungo por criar uma barreira aumenta sua proteção às condições ambientes desfavoráveis. Formulação é uma definição dada para qualquer componente que visa contribuir com a virulência; estabilidade, resistência, viabilidade (ALVES; FARIA, 2010). Emulsões fúngicas a base de óleo favorece a adesão dos conídios na cutícula dos insetos, que também é constituída de lipídio, podendo exercer então uma função sinérgica ou adjuvante (CAMARGO, 2012; SILVA et al., 2006; ALVES; FARIA, 2002).

2.4.3.2 Controle de *A. aegypti* utilizando fungos entomopatogênicos

A observação de infecção em *A. aegypti* por fungo foi relatada pela primeira vez na década de 60 quando formas adultas do mosquito foram naturalmente infectadas por *B. bassiana* (GARZAR-HERNANDES et al., 2013).

Atualmente já existem diversos estudos sobre o efeito da utilização de fungos entomopatogênicos como biocontroladores de *A. aegypti* (RAGAVENDRAN et al., 2017; DANIEL et al., 2017; ALKHAIBARI et al., 2016; GOMES et al., 2015; DONG et al., 2012). Apesar de evidente crescimento no número de pesquisas que tentam elucidar definitivamente os mecanismos envolvidos no processo de infecção em *A. aegypti*, tais mecanismos ainda não são claramente explicados (GRIENFIELD et al., 2014; BUTT et al., 2013). Butt et al., (2013) mostraram que o isolado fúngico de *M. anisopliae* ARSEF 4665, não foi capaz de matar as

larvas por processo de penetração ou produção de toxinas, mas sugeriu que as proteases (como Pr1 e Pr2) estariam envolvidas com a mortalidade.

Entre os diversos estudos, podemos citar os estudos de Ragavendran et al., (2017) que observaram atividade larvicida de *B. bassiana* no controle de *A. aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*. Alkhaibari et al., (2017) mostraram os diferentes percentuais de sobrevivência em larvas de *A. aegypti* quando em contato com conídios na forma de pó, em suspensão aquosa ou blastosporos. Daniel et al., (2017) utilizaram a bovericina para relacionar à mortalidade de *A. aegypti*. Gomes et al., (2015) promoveram a associação de *M. anisopliae* (ESALQ818) com óleo de niin para verificar sua atividade larvicida e possível sinergismo.

Estudos mais avançados abordando a taxa de replicação e transmissão de arboviroses em fêmeas de *A. aegypti* infectadas por *M. anisopliae* quando comparado com fêmeas não expostas ao fungo. Garzar-hernandes et al., (2013) mostraram que *A. aegypti* após infecção com *M. anisopliae* diminui a sua capacidade de alimentação bem como as taxas de infecção com o vírus tipo 2 da dengue, após alimentação com sangue humano infectado. Dong et al., (2012) mostraram que as vias celulares do tipo Toll e JACK-STAT (cascatas de sinalização de resposta imune) são ativadas em contato com fungos entomopatogênicos e que quando ativadas, podem inibir a replicação de vírus da dengue em fêmeas ao se alimentarem de sangue infectado.

A pesquisa de fungos com potencial para serem utilizados como controladores biológicos de diversas fases do mosquito *A. aegypti* pode englobar a utilização de blastosporos, conídios, toxinas destruxinas e bovericinas, proteases além das mais diferentes formulações como associação com extratos naturais, óleos; formulações em pó, em pano impregnado, em imersão, aspersão, alimentação. Todas estas formas de controle acima citadas necessitam de estudos que elucidem melhor as características do fungo, do mosquito e os processos de infecção etapa por etapa com intuito de se elaborar melhores formas de introduzir efetivamente, fungos entomopatogênicos como biocontroladores.

2.5 Outras Formas de Controle de *A. aegypti*

A utilização dos chamados mosquitos transgênicos também se configura como uma estratégia de controle, podendo ser dividida, segundo Zara et al., (2016), em duas etapas: a primeira consiste na redução ou eliminação do mosquito pela introdução de genes letais capazes de ser transmitidos no acasalamento; e a segunda consiste na utilização de população incapaz de transmitir vírus. Essa forma de controle foi testada em alguns municípios de São Paulo e Bahia em 2010 e foram capazes de eliminar até 90% da população de *A. aegypti* na 17

região; e após um tempo de constantes liberações de machos transgênicos, já foi possível observar larvas transgênicas no município de Juazeiro na Bahia (GARZIERA et al., 2017). A primeira produção do mosquito transgênico no Brasil ocorreu em 2014 após liberação do governo.

Outras formas de controle de *A. aegypti* seriam a utilização de radiação para tornar estéreis os mosquitos machos; associação da *Wolbachia* e radiação como forma de esterilizar os machos, diminuindo assim a taxa de oviposição das fêmeas; mosquitos dispersores de inseticidas (fêmea é atraída a uma “estação de disseminação”, se expõe ao inseticida que se aderi a cutícula é levado ao criadouro contaminando os ovos e larvas) (ZARA et al., 2016).

O Brasil atualmente segue o protocolo de Cartagena sobre biossegurança e diversidade biológica, que relaciona os principais passos para avaliação e monitoramento na utilização de tecnologia transgênica, sendo basicamente: Formulação dos problemas que podem ser relacionados; caracterização dos riscos envolvidos; classificação de risco; e uma avaliação geral de segurança. Apesar de possuir apenas quatro passos, essa avaliação de risco não é simples, necessitando de constante reavaliação (ANDRADE et al., 2016). A utilização de mosquitos com genes modificados seria uma ótima alternativa de controle, mas o manejo das técnicas não é simples, necessitando de sexagem dos insetos, que é um procedimento caro e demorado; constantes solturas destes insetos no ambiente; necessidade de monitoramento constante e de amplo estudo sobre fecundidade, fertilidade e sobrevivência (ZARA et al., 2016; GARZIERA et al., 2017).

2.6 Monitoramento Integrado

Com todo conhecimento se acumulando acerca do tema resistência de vetores, cada vez mais se busca novas formas de controle não para substituir as formas já existentes, mas para se somar as atuais medidas e diminuir o uso de formas mais novas a fauna e flora como o que ocorre com os produtos químicos. Valle, (2016) ressaltou que o uso de compostos químicos ainda é de suma importância para controle de insetos, mesmo quando se sabe dos perigos envolvidos com a toxicidade e mesmo com a resistência. Pensando nisso, a agregação (e não a substituição) de novas técnicas vem sendo elaboradas a fim de aplicar a cada território, medidas condizentes com a realidade local. E foi por isso que o termo Manejo integrado de pragas (MIP) surgiu no final dos anos 50. Este conceito nada mais é que a aplicação de técnicas sendo elas mecânicas, químicas, biológicas e/ou uso de plantas com intuito de prevenir e controlar epidemias (VALICENTE et al., 2009).

Todas essas ferramentas de controle do mosquito *A. aegypti* não possuem por si só a capacidade de eliminá-lo, justamente pela sua complexidade de interação com ambientes urbanos, crescimento desenfreado e desestruturado de cidades, além das já ditas condições climáticas ideais para sua sobrevivência, seus mecanismos de resistência e proliferação envolvidos.

Quando se elabora qualquer forma de controle deve-se principalmente conhecer o local que receberá as medidas, sendo de suma importância estudos e vigilância ativa a fim de se conhecer o perfil do local e aplicar as melhores medidas a cada realidade. Dessa forma, o governo criou, durante o desenvolvimento do PNCD, vários indicadores que foram se aprimorando com o tempo, são eles; Índice de Breteau (IB), que tem como função caracterizar o perfil dos criadouros existentes e o Índice de Infestação Predial que faz levantamento do número da infestação por larvas. No entanto, a forma de monitoramento mais atual, o Levantamento de Índice Rápido para *A. aegypti* (LIRAA) onde um município é dividido em número de imóveis que são chamados de extratos separando dentro de cada extrato 450 imóveis para análise, e a partir daí se faz um levantamento de larvas neste extrato durante um período (FEITOSA et al., 2016; COELHO, 2008).

Então o objetivo do controle integrado é promover a associação entre medidas mecânicas, químicas e biológicas, aliados a políticas de monitoramento e mapeamento de áreas de risco, juntamente com fortes propagandas, educação sanitária e ambiental visando a melhor forma de controle de um vetor seja ele *A. aegypti* ou outros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Realização de Experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano (LCM), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Daniel Neitz (EPPWON) no Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

3.2 Obtenção e Manutenção de Larvas de *A. aegypti*

As larvas foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Biologia Molecular de Artrópodes (LBBMA)/Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Exatas

da UFRRJ cuja manutenção foi aprovada pelo CEUA/ICBS número 23083007342/2016-59.

3.3 Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos

Os isolados de *M. anisopliae* sensu lato (s.l) IBCB481, ARSEF 2211 e CG153, bem como os isolados de *B. bassiana* CG479 e CG206, foram mantidos no LCM. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidos a 27°C e umidade relativa $\geq 80\%$ por 15 dias. Posteriormente, foram mantidos a 8°C até a realização dos ensaios biológicos. A identificação de cada isolado fúngico quanto ao hospedeiro originalmente isolado e o local do isolamento podem ser observados na Tabela 1.

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

Isolado	Hospedeiro do isolamento	Origem Geográfica
CG 206	Hymenoptera: Vespidae	Costa do Arapapa, AM
CG 479	Hymenoptera: Vespidae	Santana do Ipanema, AL
CG 153	Deois incompleta (Homoptera: Cercopidae)	Altamira - PA
IBCB 481	Solo	Campinas - SP
ARSEF 2211	Solo	São Paulo- SP

3.4 Preparo das Suspensões/Formulações de Conídios

Conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* foram raspados da superfície do meio de cultivo e suspensos em água estéril destilada + Tween 80 0,01%. As suspensões aquosas contendo conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para as concentrações de 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} segundo Alves (1998).

Para realização do teste de toxicidade, as concentrações usadas de óleo mineral foram respectivamente 1%, 0,5%; 0,1%. As concentrações de 10^8 ou 10^7 (blastosporos ou conídios) que apresentaram percentuais de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em suspensão superiores a 40%, foram escolhidos para adição de 10 μL de óleo mineral para compor a formulação.

3.4.1 Produção e preparo das suspensões de blastosporos

Para produção de blastosporos, foi utilizado o meio de cultura líquido Adamek modificado com milhocina (31,58 ml – 5g de amido de milho dissolvidos em 250 mL de água), extrato de levedura (42,1 g), glicose (42,1 g - glicose D (+) glucose anidra (dextrose) P. A. ACS, Vetec Química Fina Ltda), Tween 80 (Synth®) a 0,1% (21,06 ml) em 1000 ml de água deionizada. Os frascos foram fechados com papel alumínio e plástico filme, esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C (DUARTE et al., 2014).

Após a preparação do meio de cultura líquido, foram feitas suspensões de conídios com os isolados IBCB481, ARSEF 2211 e CG153 (*M. anisopliae*), CG479 e CG206 (*B. bassiana*), os quais foram quantificados e ajustados na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹, 3mL dessa suspensão foi inoculada em um erlemeyer contendo 42 mL meio de cultura, isolado fúngico.

Os frascos foram fechados com papel alumínio e plástico filme e mantidos em agitador a 150 rpm e 27 °C por 72 horas. Em seguida, o meio foi filtrado em tubos falcon utilizando funis e gazes estéreis para cada tubo. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento resuspenso em 10 mL de água desclorada estéril + Tween 80 0,01% seguida de homogeneização por 1 minuto em vórtex, nova centrifugação e re-suspensão em 5mL de água desclorada estéril + Tween 80 0,01% configurando a solução final. Para quantificação de blastosporos foram colocados 10 µL da solução final de cada tubo falcon em câmara de Neubauer. A quantificação foi feita segundo Alves (1998).

Para análise da viabilidade dos blastosporos, 10 µL da suspensão na menor concentração foram transferidos para placas de Petri contendo BDA enriquecido com cloranfenicol 0,5% mantido em temperatura e umidade controlada (25±1°C e UR≥80%) durante 24 horas. O cálculo do percentual de germinação dos blastosporos foi realizado segundo ALVES (1998).

Realizado o processo de produção e extração de blastosporos dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, as suspensões aquosas foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 10^8 blastosporos mL⁻¹; 10^7 blastosporos mL⁻¹.

3.5 Produção de Blastosporos sob Diferentes Condições de Cultivo

Com o intuito de avaliar a produção de blastosporos pelos isolados CG 206, CG 479 (*B. bassiana*), CG 153, IBCB 481 e ARSEF 2211 (*M. anisopliae*), a suspensão conidial de 21

cada isolado, cultivado em meio líquido de Adamek modificado, foi submetida a duas velocidades de rotação (150 e 220 rpm) e mantidas sob agitação por dois períodos (48 e 72h) mantidos à 27°C.

3.6 Teste de Patogenicidade e Virulência Contra Larvas de *A. aegypti*

O experimento foi realizado em condições ideais de temperatura, umidade e fotoperíodo (25°C; UR \geq 75%; 8 horas de luz) de acordo com a metodologia realizada por Gomes et al., (2015). Foram utilizados três tubos tipo falcon contendo 10 mL da suspensão de conídios de blastosporos ou formulação de conídio ou de blastosporos (em cada tubo nas concentrações 1×10^8 e 1×10^7 blastosporos/conídios mL⁻¹ com 10 larvas (L1/L2) por tubo, totalizando 30 larvas por tratamento. O percentual de redução da sobrevivência de larvas foi observado diariamente por sete dias. O número de sobreviventes foi anotado e as larvas mortas foram retiradas dos tubos, diariamente. O grupo controle foi exposto a água+Tween 80 0,01% e ao óleo mineral 0,1%. O ensaio biológico foi repetido três vezes.

3.7 Re-isolamento Fúngico Após Ensaio Biológicos

As larvas mortas foram retiradas dos tubos diariamente e colocadas em álcool 70% por dois minutos, seguida pela lavagem em água destilada estéril por um minuto. Posteriormente foram colocadas em meio de cultura BDA contendo cloranfenicol e incubadas em B.O.D com a temperatura e umidade controladas (25°C; UR \geq 80%) para facilitar o desenvolvimento do fungo.

As características macro e micromorfológicas foram analisadas pela técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (TULLOCH, 1976). Após 14 dias, a coloração das colônias foi avaliada; também foram confeccionadas lâminas temporárias coradas em Lactofenol e azul de algodão (HAWKSWORTH, 1977), observadas em microscópio óptico no aumento de 400x para identificação dos fungos.

3.8 Análise Estatística

As taxas de sobrevivência das larvas foram comparadas entre os grupos através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias. A curva de sobrevivência foi realizada utilizando Kaplan-Meier. E o cálculo do tempo letal (TL50) foi realizado utilizando o programa Log-rank teste. O nível de significância foi de 95% (p \leq 0,05).

4 RESULTADOS

4.1 Produção de Blastosporos sob Diferentes Condições de Cultivo

A Tabela 2 mostra a quantidade de blastosporos mL^{-1} produzidos pelos isolados submetidos em diferentes rotações e tempo, sendo as maiores produções observadas nos seguintes isolados: ARSEF 2211: $100,6 \pm 37,63$ (150rpm/48h), $166,8 \pm 80,13$ (150rpm/72h), $206,8 \pm 32,83$ (220rpm/48h), $360,3 \pm 82,14$ (220rpm/72h); CG206: $269,6 \pm 78,7$ (150rpm/48h), $226,2 \pm 49,99$ (150rpm/72h), $311,1 \pm 57,16$ (220rpm/48h), $1057 \pm 256,4$ (220rpm/72h) e CG479 $53,89 \pm 8,81$ (150rpm/48h), $75,11 \pm 17,2$ (150rpm/72h), $86,56 \pm 16,04$ (220rpm/48h), $228 \pm 55,51$ (220rpm/72h); os isolados que menos produziram blastosporos foram, CG153 $8,33 \pm 2,57$ (150rpm/48h), $3 \pm 1,45$ (150rpm/72h), $16,67 \pm 4,44$ (220rpm/48h), $15 \pm 11,05$ (220rpm/72h) e IBCB481 $27,33 \pm 12,58$ (150rpm/48h), $6,33 \pm 2,71$ (150rpm/72h), $17,44 \pm 7,78$ (220rpm/48h), $13,11 \pm 5,68$ (220rpm/72h).

A produção de blastosporos pelo isolado ARSEF2211 foi 72% maior ($P=0,0296$) na rotação de 220rpm por 72h, quando comparado a rotação 150rpm por 48 horas. Não ocorreram diferenças estatísticas significativa ($P>0,9999$) entre os isolados CG153 e IBCB481 de *M. anisopliae* tanto nas rotações 150 e 220rpm mantidos a 48 ou 72 horas. A produção de blastosporos do isolado CG479 de *B. bassiana* foi maior quando mantido a 220rpm/72h em comparação ao mesmo isolado mantido a 150rpm/48h (76,36%; $P=0,0017$), 150rpm/72h (67,05%; $P=0,0064$), e 220rpm/48h (62,04%; $P=0,0126$). O isolado CG206 de *B. bassiana* apresentou maior produção de blastosporos e diferença estatística quando mantidos a rotação de 220rpm por 72h em comparação aos grupos mantidos a 150rpm/48h (74,50% $P=0,0019$), 150rpm/72h (78,60%; $P=0,0010$) e 220rpm/ 48h (68,70%; $P=0,0034$).

Tabela 2- Média de produção de blastosporos (\pm erro padrão) dos isolados ARSEF2211, CG153, IBCB481 (*Metarhizium anisopliae*), CG479 e CG206 (*Beauveria bassiana*) de acordo com rotação (150/220rpm) e tempo de cultivo (48/72h) sob temperatura de 27°C.

Isolado	Rotação/tempo	Produção \pm Erro Padrão	Isolado	Rotação/tempo	Produção \pm Erro Padrão
	150 rpm 48h	100,6 \pm 37,63 b		150 rpm 48h	27,33 \pm 12,58 a
ARSEF 2211	150 rpm 72h	166,8 \pm 80,13 a b	IBCB481	150 rpm 72h	6,33 \pm 2,71 a
	220 rpm 48h	260,8 \pm 32,83 a b		220 rpm 48h	17,44 \pm 7,78 a
	220 rpm 72h	360,3 \pm 82,14 a		220 rpm 72h	13,11 \pm 5,68 a
	150 rpm 48h	8,33 \pm 2,57 a		150 rpm 48h	53,89 \pm 8,81 b
CG153	150 rpm 72h	3 \pm 1,45 a	CG479	150 rpm 72h	75,11 \pm 17,21b
	220 rpm 48h	16,67 \pm 4,44 a		220 rpm 48h	86,56 \pm 16,04 b
	220 rpm 72h	15 \pm 11,05 a		220 rpm 72h	228 \pm 55,51 a
	150 rpm 48h	269,6 \pm 78,7 b			
CG206	150 rpm 72h	226,2 \pm 49,99 b			
	220 rpm 48h	311,1 \pm 57,16 b			
	220 rpm 72h	1057 \pm 256,4 a			

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

A figura 2 mostra conídios e blastosporos visualizados em microscopia óptica 400x, dos isolados CG153, IBCB481 e ARSEF2211Y Z de *M. anisopliae* e os isolados CG206 e CG479 de *B. bassiana*.

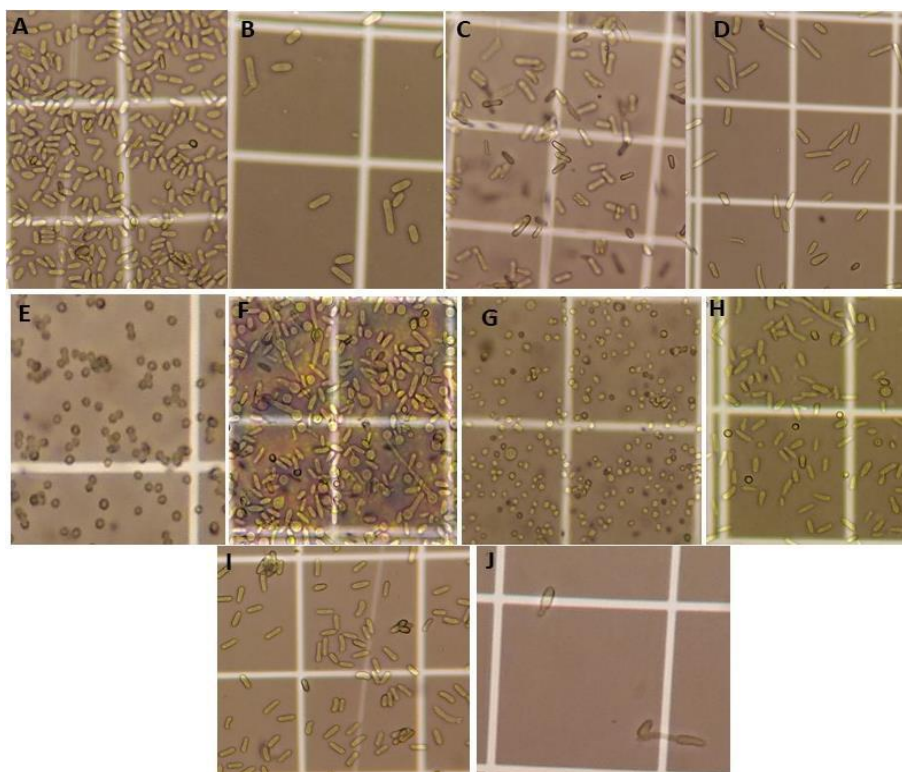


Figura 2 – Conídios e blastosporos de *Metarhizium anisopliae* (Isolados CG153, IBCB481 e ARSEF2211) e *Beauveria bassiana* (CG206 e CG479 R). observados em microscopia óptica 400x. (A) Conídios e (B) blastosporos de isolado CG153. (C) Conídios e (D) blastosporos de isolado ARSEF2211. (E) Conídios e (F) blastosporos de isolado CG206. (G) Conídios e (H) blastosporos de isolado CG479. (I) Conídios e (J) blastosporos de isolado IBCB481.

4.2 Resultado Ensaio Biológico

4.2.1 Avaliação da virulência de suspensões sobre larvas de *A. aegypti*

4.2.1.1 *Beauveria bassiana* - CG 206

Os percentuais de sobrevivência foram analisados diariamente (Figura 3A): no primeiro dia os resultados foram: 10^8 (62,22%) e 10^7 conídios mL^{-1} (80%), 10^8 (65,56%) e 10^7 blastosporos mL^{-1} (91,11%), controle (100%) (Tabela 3), onde apenas o grupo 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação ao controle ($P=0,0378$).

No segundo dia as taxas de sobrevivência foram nas concentrações 10^8 (20%) e 10^7 conídios mL^{-1} (74,44%), 10^8 (37,78%) e 10^7 blastosporos mL^{-1} (68,89%), controle (98,89%) (Tabela 3); a concentração 10^8 conídios mL^{-1} neste dia, causou acentuada redução na sobrevivência das larvas de *A. aegypti*, sendo então, estatisticamente significativo em comparação ao controle ($P<0,0001$), 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0030$) e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0092$). O tratamento com 10^8 blastosporos mL^{-1} apresentou diferença estatística ($P=0,0007$) em comparação ao controle.

No terceiro dia os percentuais de sobrevivência diminuíram nas concentrações 10^8 conídios mL^{-1} (6,67%), 10^7 conídios mL^{-1} (58,89%), 10^8 blastosporos mL^{-1} (28,89%), 10^7 blastosporos mL^{-1} (65,56%), controle (98,89%) (Tabela 3). O percentual de sobrevivência no tratamento com 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativa em comparação aos tratamentos com 10^7 conídios ($P=0,0049$), 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0012$) e controle ($P<0,0001$); o percentual de sobrevivência de 58,89% (10^7 conídios mL^{-1}) e 28,89% no tratamento com 10^8 blastosporos mL^{-1} (Tabela 3) foram estatisticamente significativos com comparação ao controle ($P=0,0490$), ($P=0,0001$).

No quarto dia, somente os tratamentos com 10^8 conídios mL^{-1} e 10^8 blastosporos mL^{-1} apresentaram seus percentuais de sobrevivência de 1,11% e 27,78% respectivamente (Tabela 3). O tratamento com 10^8 blastosporos mL^{-1} foi estatisticamente significativo quando comparado ao controle ($P<0,0001$). O tratamento com 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação os grupos tratados com 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0014$) e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,003$).

No quinto dia, os percentuais de sobrevivência foram observadas nos tratamentos com 10^8 (0%) e 10^7 conídios (55,56%), 10^8 (27,78%) e 10^7 blastosporos (65,56%) (Tabela 3); o tratamento com 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação aos

grupos, 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0021$) e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,002$); e o grupo grupo 10^7 conídios mL^{-1} foi significativo em comparação ao controle ($P=0,0244$).

No sexto dia a alteração no percentual de sobrevivência foi observada no tratamento com 10^7 conídios mL^{-1} (50,56%) e passando a 46,67% no sétimo dia (Tabela 3). No sétimo dia a concentração 10^7 blastosporos mL^{-1} apresentou percentual da sobrevivência de 60%. A concentração 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente diferente ($P=0,0098$) e ($P=0,0081$) no sexto e sétimo dia respectivamente, em comparação ao controle, já a concentração 10^8 conídios mL^{-1} apresentou resultados significativo ($P=0,0018$) em comparação ao tratamento com 10^7 blastosporos mL^{-1} .

Após a análise diária dos percentuais de sobrevivência, as médias foram calculadas após os sete dias de tratatamento: Na comparação entre as concentrações de blastosporos, a taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* tratadas com a suspensão 10^8 foi de 34,67% (Tabela 8;) sendo estatisticamente significativa, representando uma queda na taxa sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação ao controle (64,97%; $P<0,0001$) e em comparação a suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} (49,59%; $P=0,03$). A sobrevida das larvas de 68,78% no tratamento com 10^7 blastosporos mL^{-1} (Tabela 8;) não foi estatisticamente significativa em relação ao controle ($P=0,059$).

Entre os tratamentos com conídios, a sobrevivência de 12,78% na concentração 10^8 (Tabela 8;) foi estatisticamente significativa representando uma redução na sobrevivência das larvas em comparação ao grupo controle (87,09%; $P<0,0001$) e 10^7 conídios mL^{-1} (78,94%; $P=0,0002$). A taxa de 60,67% de sobrevida de larvas de *A. aegypti* no tratamento com 10^7 conídios mL^{-1} (Tabela 8;), foi estatisticamente significativa ($P=0,0026$) representando uma queda de 38,71% na sobrevivência em comparação ao controle.

Na comparação entre conídios e blastosporos, a concentração 10^8 conídios/blastosporos mL^{-1} não foram estatisticamente significativas entre si ($P=0,4116$); nem na comparação entre a concentração 10^7 conídios/blastosporos mL^{-1} ($P=0,9654$); Não foi observada diferença estatística na comparação entre 10^8 blastosporos mL^{-1} com 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,2451$); somente 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo com melhores percentuais de redução na sobrevida das larvas em comparação ao 10^7 blastosporos mL^{-1} (81,42%; $P=0,0005$).

O tempo letal (TL_{50}) dos grupos 10^8 conídios/blastosporos mL^{-1} , foram melhores (dois dias) que as concentrações 10^7 conídios mL^{-1} (seis dias) e 10^7 blastosporos mL^{-1} (ND) (Tabela 8).

Tabela 3 – Percentual de sobrevivência (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* durante sete dias de tratamento com CG206 de *Beauveria bassiana*. Grupo controle=H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%. Con= conídios e bla= blastosporos.

Tratamento	Sobrevivência (%) \pm Erro padrão						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
10 ⁸ con mL ⁻¹	62,22 \pm 13,1a	20,00 \pm 8,49b	6,67 \pm 3,73c	1,11 \pm 1,11b	0,00 \pm 0,00c	0,00 \pm 0,00c	0,00 \pm 0,00c
10 ⁷ con mL ⁻¹	80,00 \pm 8,33a	74,44 \pm 10,02ab	58,89 \pm 13,48b	58,89 \pm 13,48c	55,56 \pm 13,34b	50,00 \pm 13,94b	46,67 \pm 14,34b
10 ⁸ blas mL ⁻¹	65,56 \pm 12,26b	37,78 \pm 14,32b	28,89 \pm 13,06bc	27,78 \pm 13,21bc	27,78 \pm 13,21bc	27,78 \pm 13,21bc	27,78 \pm 13,21bc
10 ⁷ blas mL ⁻¹	91,11 \pm 3,51a	68,89 \pm 10,2a	65,56 \pm 10,94ab	65,56 \pm 10,94ac	65,56 \pm 10,94ab	65,56 \pm 10,94ab	60,00 \pm 12,47ab
Controle	100,00 \pm 0,00a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a

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

4.2.1.2 *Beauveria bassiana* - CG479

As análises diárias de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* (figura 3B) foram calculadas: no primeiro dia, foram de 100% (10⁸ conídios mL⁻¹), 83,33% (10⁷ conídios mL⁻¹) 91,11% (10⁸ blastosporos mL⁻¹), 93,33% (10⁷ blastosporos mL⁻¹) e 100% (controle) (Tabela 4), neste dia não foram observadas reduções na sobrevivência estatisticamente significativas diferença estatística entre os grupos.

No segundo dia, as taxas de sobrevivências foram de 43,33% (10⁸ conídios mL⁻¹), 64,44% (10⁷ conídios mL⁻¹) 12,22% (10⁸ blastosporos mL⁻¹), 83,33% (10⁷ blastosporos mL⁻¹) e 98,89% (controle) (Tabela 4). Neste dia, o tratamento com 10⁸ blastosporos mL⁻¹ foi estatisticamente significativo ($P < 0,0001$) em comparação ao grupo controle (87,64%), suspensão 10⁷ blastosporos (85,34%) e 10⁷ conídios mL⁻¹ (81,04%; $P = 0,0042$); o tratamento com 10⁸ conídios mL⁻¹ também foi estatisticamente significativo em comparação ao controle ($P = 0,0021$) e a suspensão 10⁷ blastosporos mL⁻¹ ($P = 0,0442$).

No terceiro dia, as taxas de sobrevivência foram de 31,11% (10⁸ conídios mL⁻¹), 51,11% (10⁷ conídios mL⁻¹), 8,89% (10⁸ blastosporos mL⁻¹), 75,56% (10⁷ blastosporos mL⁻¹) e 98,89% (controle) (Tabela 4). Neste dia, foi estatisticamente significativo o tratamento com 10⁸ conídios mL⁻¹ em comparação ao controle ($P = 0,0001$) e 10⁷ blastosporos mL⁻¹ ($P = 0,0200$); e no tratamento com 10⁷ conídios mL⁻¹ em comparação ao controle ($P = 0,0105$).

No quarto dia, as taxas de sobrevivência foram de 22,22% (10⁸ conídios mL⁻¹), 47,78% (10⁷ conídios mL⁻¹) 4,44% (10⁸ blastosporos mL⁻¹), 74,44% (10⁷ blastosporos mL⁻¹) e 98,89% (controle) (Tabela 4). As diferenças estatísticas significativas foram observadas nos tratamentos: 10⁸ conídios mL⁻¹ comparado a 10⁷ blastosporos mL⁻¹ (70,15%; $P = 0,0038$) e 10⁷ conídios mL⁻¹ comparado ao controle (51,68%; $P = 0,0048$).

Do quinto ao sétimo dia, os percentuais de sobrevivência diminuíram somente nos tratamentos com 10^8 conídios mL^{-1} (20%, 16,67% e 13,33%) sendo significativa ($P < 0,0001$) em comparação a controle; e no tratamento com 10^7 conídios mL^{-1} (45,56%; 41,11%; 38,89%) sendo estatisticamente significativo em comparação com o controle $P = 0,0029$, $P = 0,0014$ e $P = 0,0005$ respectivamente (Tabela 4).

Após calcular os percentuais diários de sobrevivência, as médias também foram calculadas e comparadas entre si: após tratamento com a concentração 10^8 blastosporos mL^{-1} sobreviveram 18,33% das larvas de *A. aegypti* (Tabela 8), representando uma redução da sobrevivência significativa ($P < 0,0001$) de 81,48% em comparação ao controle e de 76,67% em comparação a 10^7 blastosporos mL^{-1} ; a taxa de 78,56% de sobrevivência do grupo tratado com 10^7 blastosporos mL^{-1} (Tabela 8) representou uma redução de sobrevivência das larvas estatisticamente significativa em comparação ao controle (20,65%; e $P = 0,0826$).

A sobrevivência de 35,22% no grupo tratado com 10^8 conídios mL^{-1} e de 53,11% na concentração de 10^7 (Tabela 8; figura 3), foram significativas (64,42%; $P < 0,0001$ e 46,35%; $P = 0,0034$, respectivamente) em comparação ao controle. Não foi observada diferença estatística entre as suspensões de conídios 10^8 e 10^7 ($P = 0,3422$).

Não foram significativas entre si a comparação entre as mesmas concentrações: 10^8 conídios/blastosporos mL^{-1} ($P = 0,6236$) e 10^7 conídios/blastosporos mL^{-1} ($P = 0,2287$). A diferença estatística foi significativa na comparação entre as maiores concentrações e as menores: 10^8 blastosporos mL^{-1} comparado a 10^7 conídios mL^{-1} (65,49%; $P = 0,0442$); 10^8 conídios mL^{-1} com 10^7 blastosporos mL^{-1} (55,17%; $P = 0,0069$).

O tempo letal (TL_{50}) dos grupos 10^8 conídios/blastosporos mL^{-1} (dois dias) foram menores que as concentrações de 10^7 conídios mL^{-1} (quatro dias) e 10^7 blastosporos mL^{-1} (não determinado) (Tabela 8).

Tabela 4 - Sobrevivência (%) \pm erro padrão das larvas de *A. aegypti* durante sete dias de tratamento com CG479 (*Beauveria bassiana*). Grupo controle=H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%. Con= conídios e bla= blastosporos.

Tratamento	Sobrevivência (%) \pm Erro padrão						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
10^8 con mL^{-1}	100,00 \pm 0,00a	43,33 \pm 10,8bc	31,11 \pm 10,6cd	22,22 \pm 9,69cd	20,00 \pm 10,00cd	16,67 \pm 10,14c	13,33 \pm 8,82c
10^7 con mL^{-1}	83,33 \pm 10,14a	64,44 \pm 16,17ab	51,11 \pm 14,28bc	47,78 \pm 14,02bc	45,56 \pm 13,65bc	41,11 \pm 14,19bc	38,89 \pm 13,69bc
10^8 blas mL^{-1}	91,11 \pm 4,55a	12,22 \pm 4,65c	8,89 \pm 3,51d	4,44 \pm 3,38d	4,44 \pm 3,38d	4,44 \pm 3,38c	4,44 \pm 3,38c
10^7 blas mL^{-1}	93,33 \pm 3,73 a	83,33 \pm 8,50a	75,56 \pm 12,03ab	74,44 \pm 12,71ab	74,44 \pm 12,71ab	74,44 \pm 12,71ab	74,44 \pm 12,71ab
Controle	100,00 \pm 0,00a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a

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

4.2.1.3 *Metarhizium anisopliae* - CG153

Não foi possível a obtenção da suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} através da metodologia utilizada. Logo, foi utilizada somente a concentração 10^7 blastosporos mL^{-1} .

A sobrevivência das larvas foi avaliada diariamente (figura 3C) e no primeiro dia, os percentuais de sobrevivência foram de 82,22% (10^8 conídios mL^{-1}), 62,22% (10^7 conídios mL^{-1}), 72,22% (10^7 blastosporos mL^{-1}) e 100% (controle) (Tabela 5). A concentração 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação ao controle ($P=0,0202$), porém, neste dia não foram estatisticamente significativos os tratamentos com 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,4750$) e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,1253$) em comparação ao controle. Comparando 10^7 blastosporos mL^{-1} com os tratamentos 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} não ocorreram diferenças estatísticas significantes ($P=0,8450$ para ambos). Não foi observado diferença estatística significativa ($P=0,1253$) na comparação entre 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} .

No segundo dia os percentuais de sobrevivência foram de 36,67% (10^8 conídios mL^{-1}), 32,22% (10^7 conídios mL^{-1}), 52,22% (10^7 blastosporos mL^{-1}), 98,89% no grupo controle (que se manteve até o sétimo dia) (Tabela 5). Neste dia, foram estatisticamente significativos ($P<0,0001$) o tratamento com 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0014$) em comparação ao controle.

No terceiro dia as taxas de sobrevivência foram de 21,11% (10^8 conídios mL^{-1}), 17,78% (10^7 conídios mL^{-1}), 30% (10^7 blastosporos mL^{-1}) (Tabela 5). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos ($P<0,0001$) em comparação ao controle.

No quarto dias taxas de sobrevivências das larvas de *A. aegypti* foram de 6,67% (10^8 conídios mL^{-1}), 17,78% (10^7 conídios mL^{-1}), 13,33% (10^7 blastosporos mL^{-1}) (Tabela 5).

No quinto dia os percentuais foram de 4,44% (10^8 conídios mL^{-1}), 12,22% (10^7 conídios mL^{-1}), 10% (10^7 blastosporos mL^{-1}); no sexto dia foram de 4,44% (10^8 conídios mL^{-1}), 3,33% (10^7 conídios mL^{-1}), 6,67% (10^7 blastosporos mL^{-1}). (Tabela 5).

No último dia pós tratamento os percentuais de sobrevivência eram de 1,11% (10^7 conídios mL^{-1}); 2,22% (10^8 conídios mL^{-1}); e 3,33% (10^7 blastosporos mL^{-1}). Durante todo o experimento não foi observado diferença estatística entre todas as concentrações do isolado CG153 de *M. anisopliae*.

Ao final do ensaio biológico, as médias de sobrevivência de cada tratamento foram calculadas e comparadas. Os percentuais de sobrevivência obtidos foram de 22,44% (10^8 conídios mL^{-1}), 20,89% (10^7 conídios mL^{-1}), 26,78% (10^7 blastosporos mL^{-1}) e 99% (controle) (Tabela 8).

A diferença estatística significativa ($P < 0,0001$) e as reduções na sobrevivência das larvas de *A. aegypti* foram observadas nas concentrações 10^7 blastosporos mL^{-1} (72,95%); 10^8 (77,33%) e 10^7 conídios mL^{-1} (78,90%) em comparação ao controle.

Não houve diferença estatística quando comparamos a concentração 10^7 blastosporos mL^{-1} com 10^8 ($P=0,8667$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,7226$). Também não ocorreu diferença estatística entre as concentrações 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,9924$).

Os tempos letais (TL_{50}) obtidos foram de dois dias para as concentrações 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} e três dias para 10^7 blastosporos mL^{-1} (Tabela 8).

Tabela 5 – Percentual de sobrevivência (%) (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* durante sete dias de tratamento com isolado CG153 (*Metarhizium anisopliae*). Con= conídios e bla= blastosporos.

Tratamento	Sobrevivência (%) \pm Erro padrão						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
CG153							
10^8 con mL^{-1}	82,22 \pm 6,19a	36,67 \pm 9,28b	21,11 \pm 9,04b	6,67 \pm 2,89b	4,44 \pm 2,42b	4,44 \pm 2,42b	2,22 \pm 1,47b
10^7 con mL^{-1}	62,22 \pm 11,15b	32,22 \pm 7,41b	17,78 \pm 7,41b	17,78 \pm 7,41b	12,22 \pm 5,96b	3,33 \pm 2,36b	1,11 \pm 11,11b
10^7 blas mL^{-1}	72,22 \pm 11,64a	52,22 \pm 10,77b	30,00 \pm 7,82b	13,33 \pm 4,41b	10,00 \pm 4,41b	6,67 \pm 3,33b	3,33 \pm 2,36b
Controle	100,00 \pm 0,00a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a

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

4.2.1.4 *Metarhizium anisopliae* - IBCB481

Não foi possível a obtenção da suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} através da metodologia utilizada. Logo, foi utilizada somente a concentração 10^7 blastosporos mL^{-1}

Os percentuais de sobrevivência diário foram analisados (figura 3D) e no primeiro dia, os percentuais de sobrevivência foram de 81,89% (10^8 conídios mL^{-1}) 60% (10^7 conídios mL^{-1}), 35,56% (10^7 blastosporos mL^{-1}) e 100% (controle) (Tabela 6); diferenças estatísticas significativas foram observadas nos grupos 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P < 0,0001$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0007$) em comparação ao controle e no grupo 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0001$) em comparação a 10^8 conídios mL^{-1} .

No segundo dia, as sobrevivências foram de 6,67% (10^8 conídios mL^{-1}), 37,78% (10^7 conídios mL^{-1}), 7,78% (10^7 blastosporos mL^{-1}), 98,89% no controle (que se manteve até o sétimo dia) (Tabela 6); a concentração 10^8 conídios mL^{-1} reduziu significativamente a sobrevivência das larvas em comparação ao controle ($P < 0,0001$) e ao tratamento com 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0032$). A imersão em 10^7 blastosporos mL^{-1} causou redução significativa na sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação ao controle ($P=0,0040$) e 10^7

conídios mL⁻¹ ($P=0,0040$). O grupo 10⁷ conídios mL⁻¹ foi significativo ($P<0,0001$). em comparação ao controle

No terceiro dia os percentuais de sobrevivência foram de 0% (10⁸ conídios mL⁻¹), 22,22% (10⁷ conídios mL⁻¹), 1,11% (10⁷ blastosporos mL⁻¹) (Tabela 6). O tratamento com 10⁷ conídios mL⁻¹ foi significativo ($P<0,0001$) a sobrevivência das larvas em comparação ao controle aquoso

No quarto dia, os percentuais de sobrevivência foram de 16,67% (10⁷ conídios mL⁻¹) e 0% (10⁷ blastosporos mL⁻¹) (Tabela 6). A taxa de sobrevivência das larvas tratadas com 10⁷ conídios mL⁻¹ foi significativa ($P<0,0001$) em comparação ao controle.

No quinto, sexto e sétimo dia, os percentuais de sobrevivência das larvas tratadas com 10⁷ conídios mL⁻¹ foram de 10%, 4,44% e 2,22% (Tabela 6).

Os percentuais médios de sobrevivência das larvas após o ensaio biológico foram de: 12,67% (10⁷ conídios mL⁻¹), 21,89% (10⁷ conídios mL⁻¹), 4,78% (10⁷ blastosporos mL⁻¹) e 99% (controle) (Tabela 8).Apresentaram redução significativa ($P<0,0001$) na sobrevivência a comparação do grupo controle com os seguintes tratamentos: 10⁷ blastosporos mL⁻¹ (95,17%), 10⁸ (87,20%) e 10⁷ conídios mL⁻¹ (77,89%); não foi significativo ($P=0,0821$) a comparação entre 10⁷ blastosporos mL⁻¹ e 10⁸ conídios mL⁻¹. Houve redução significativa na sobrevivência os grupos, 10⁷ blastosporos mL⁻¹ (78,16%; $P<0,0001$) e 10⁸ conídios mL⁻¹ (42,20%; $P=0,0321$) em comparação ao grupo 10⁷ conídios mL⁻¹.

Os tempos letais (TL₅₀) obtidos foram: um dia (10⁷ blastosporos mL⁻¹), dois dias (10⁸ e 10⁷ conídios mL⁻¹) (tabela 8).

Tabela 6 – Sobrevivência (%) ± Erro padrão de larvas de *Aedes aegypti* infectadas em isolado ICBC481 (*Metarhizium anisopliae*) durante 7 dias. Con (conídios) e bla (Blastosporos) Controle= H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%.

Tratamento	Sobrevivência (%) ± Erro padrão						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
10 ⁸ con mL ⁻¹	81,89 ± 3,24ab	6,67 ± 2,89b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b
10 ⁷ con mL ⁻¹	60,00 ± 6,24bc	37,78 ± 9,69c	22,22 ± 4,94c	16,67 ± 5,53c	10 ± 2,89c	4,44 ± 1,76c	2,22 ± 1,47b
10 ⁷ blas mL ⁻¹	35,56 ± 10,94c	7,78 ± 5,47b	1,11 ± 1,11b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b
Controle	100,00 ± 0,00a	98,89 ± 1,11a	98,89 ± 1,11a	98,89 ± 1,11a	98,89 ± 1,11a	98,89 ± 1,11a	98,89 ± 1,11a

*Resultados seguidos de mesma letra em linhas diferentes, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$)

4.2.1.5 *Metarhizium anisopliae* - ARSEF2211

Os percentuais de sobrevivência obtidos a cada dia (figura 3E) foram calculados e no primeiro dia, foi de 94,44% (10^8 conídios mL^{-1}), 73,33% (10^7 conídios mL^{-1}) 84,44% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 76,67% (10^7 blastosporos mL^{-1}) e 100% (controle) (Tabela 7). Não ocorreu diferença estatística significativa em nenhum grupo quando comparados ao controle ou entre si.

No segundo dia os percentuais de sobrevivência foram de 82,22% (10^8 conídios mL^{-1}), 60% (10^7 conídios mL^{-1}) 47,78% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 60% (10^7 blastosporos mL^{-1}) e 98,89% no grupo controle (o grupo controle permaneceu com esse percentual até o sétimo dia) (Tabela 7). Somente a concentração 10^8 blastosporos mL^{-1} foi significativo ($P=0,0090$) em comparação ao controle; não apresentaram diferença estatística os grupos 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0744$), 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,7790$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0744$) em comparação ao controle.

No terceiro dia os percentuais de sobrevivência foram de 56,67% (10^8 conídios mL^{-1}), 58,89% (10^7 conídios mL^{-1}) 43,33% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 52,22% (10^7 blastosporos mL^{-1}) (Tabela 7). Ocorreu redução significativa da sobrevivência das larvas de *A. aegypti* nos tratamentos com 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0371$) e 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0085$) em comparação ao controle.

No quarto dia foram de, 53,33% (10^8 conídios mL^{-1}), 58,89% (10^7 conídios mL^{-1}) 38,89% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 51,11% (10^7 blastosporos mL^{-1}). Apresentaram diferença significativa, em comparação ao controle, os grupos 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,0477$) e 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0043$).

No quinto dia, os percentuais de sobrevivência foram de 46,67% (10^8 conídios mL^{-1}), 57,78% (10^7 conídios mL^{-1}) 32,22% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 50% (10^7 blastosporos mL^{-1}) (Tabela 7).

No sexto dia os percentuais de sobrevivência foram de 42,22% (10^8 conídios mL^{-1}), 51,11% (10^7 conídios mL^{-1}) 28,89% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 48,89% (10^7 blastosporos mL^{-1}) (Tabela 7), neste dia as foram estatisticamente significativo concentrações 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0161$), 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0002$), 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0106$) e 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,0029$) em comparação ao controle.

No sétimo dia as taxas de sobrevivência foram de foram de 35,56% (10^8 conídios mL^{-1}), 42,22% (10^7 conídios mL^{-1}) 23,33% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 48,89% (10^7 blastosporos mL^{-1}) (Tabela 7). Ocorreu redução significativa ($P<0,0001$) em comparação ao controle, as

concentrações 10^8 blastosporos mL^{-1} , 10^7 blastosporos mL^{-1} , 10^8 conídios mL^{-1} e 10^7 conídios mL^{-1} .

Ao final dos 7 dias, as médias dos percentuais de sobrevivência foram de 58,67% (10^8 conídios mL^{-1}), 57,44% (10^7 conídios mL^{-1}), 41,56% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 68,78% (10^7 blastosporos mL^{-1}) e 99% (controle) (Tabela 8). Foram estatisticamente significativos os percentuais de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* tratadas com as concentrações 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0007$) e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0112$), 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,0028$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0021$) em comparação ao controle.

Não houve diferença estatística quando comparado os tratamentos entre si: 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,9929$); 10^8 e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,5188$); 10^8 blastosporos mL^{-1} e 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,7028$); 10^8 blastosporos mL^{-1} e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,7561$); 10^8 conídios mL^{-1} e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,9998$); 10^7 blastosporos mL^{-1} e 10^7 conídios mL^{-1} ($P>0,9999$); 10^8 conídios mL^{-1} e 10^7 conídios mL^{-1} ($P>0,9998$).

os tempos letais (TL₅₀) obtidos foram: dois dias (10^8 blastosporos mL^{-1}), quatro dias e meio (10^7 blastosporos mL^{-1}), 5 dias (10^8 conídios mL^{-1}) e sete dias (10^7 conídios mL^{-1}) (Tabela 8).

Tabela 7 - Sobrevivência (%) \pm Erro padrão das larvas de *Aedes aegypti* após tratamento com isolado ARSEF2211 de *M. anisopliae* durante 7 dias. Con (conídios) e bla (Blastosporos) Controle= H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%.

Tratamento	Sobrevivência (%) \pm Erro padrão						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
10^8 con mL^{-1}	94,44 \pm 2,42a	82,22 \pm 5,47a	56,67 \pm 9,72a	53,33 \pm 10d	46,67 \pm 8,98d	42,22 \pm 8,30d	35,56 \pm 9,73d
10^7 con mL^{-1}	73,33 \pm 10,14a	60,00 \pm 12,69a	58,89 \pm 12,30a	58,89 \pm 12,30a	57,78 \pm 12,34a	51,11 \pm 11,84d	42,22 \pm 11,76d
10^8 blas mL^{-1}	84,44 \pm 11,07a	47,78 \pm 12,56b	43,33 \pm 12,80b	38,89 \pm 12,63b	32,22 \pm 10,51b	28,89 \pm 9,49b	23,33 \pm 9,57b
10^7 blas mL^{-1}	76,67 \pm 10,93a	60,00 \pm 13,23a	52,22 \pm 14,22a	51,11 \pm 14,67d	50,00 \pm 14,72d	48,89 \pm 14,86d	48,89 \pm 14,86d
Controle	100 \pm 0,00a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11 a	98,89 \pm 1,11a

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

Foram comparados os tratamentos com conídios de todos os isolados testados: o tratamento com CG479 10^8 conídios mL^{-1} não foi estatisticamente significativo em comparação aos grupos CG206 10^8 ($P=0,5569$) e 10^7 ($P=0,3669$); CG153 10^8 ($P=0,9791$); e 10^7 ($P=0,9540$); ARSEF2211 10^8 ($P=0,4911$) e 10^7 ($P=0,5516$); IBCB481 10^8 ($P=0,5495$) e 10^7 ($P=0,9718$). o isolado CG479 na concentração 10^7 conídios mL^{-1} não foi estatisticamente significativo em comparação aos isolados CG206 10^7 ($P=0,9997$), CG153 10^8 ($P=0,1350$), CG153 10^7 ($P=0,0944$), ARSEF2211 10^8 e 10^7 ($P>0,9999$), IBCB481 10^7 ($P=0,1192$). Os

isolados CG206 e IBCB481 na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} foram estatisticamente significativos ($P=0,0102$ e $P=0,0098$ respectivamente) com redução na sobrevivência das larvas de 75,94% e 76,14% em comparação ao CG479 10^7 conídios mL^{-1} .

O tratamento com CG206 10^8 conídios mL^{-1} não foi estatisticamente significativo em comparação aos grupos CG153 10^8 ($P=0,9976$) e 10^7 ($P=0,9995$), IBCB481 10^8 ($P>0,9999$); o tratamento com CG206 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,9985$) reduziu significativamente a taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação a ARSEF2211 10^8 (78,22%; $P=0,0017$) e 10^7 conídios mL^{-1} (77,75%; $P=0,0025$). O tratamento com CG206 10^7 não apresentou diferença estatística em comparação aos grupos ARSEF2211 10^8 e 10^7 ($P>0,9999$); mas reduziu significativamente a taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação aos grupos, CG153 10^8 (61,01%; $P=0,0191$) e 10^7 (65,57%; $P=0,0120$); IBCB481 10^8 (79,12%; $P=0,0008$) e 10^7 (63,92%; $P=0,0162$).

O isolado CG153 10^8 não foi estatisticamente diferente em comparação aos grupos IBCB481 10^8 ($P=0,9974$) e 10^7 ($P>0,9999$), porém, reduziu significativamente a taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação aos grupos ARSEF2211 10^8 (61,75%; $P=0,0337$) e 10^7 (60,93%; $P=0,0469$). O tratamento com CG153 10^7 não foi estatisticamente significante em comparação ao grupo IBCB481 10^8 ($P=0,9994$) e 10^7 ($P>0,9999$) porém, reduziu significativamente a taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação ao grupo ARSEF2211 10^8 (64,45%; $P=0,0218$) e 10^7 (63,63%; $P=0,0308$).

O tratamento com IBCB481 10^8 foi estatisticamente significativo em comparação aos grupos ARSEF2211 10^8 conídios mL^{-1} (78,40%; $P=0,0016$) e 10^7 (77,94%; $P=0,0405$). IBCB481 10^7 não foi estatisticamente significativo ARSEF2211 10^7 ($P=0,0289$) porém, reduziu significativamente ($P=0,0024$) em 61,89% comparação aos grupos ARSEF2211 10^8 .

Na comparação entre as suspensões de blastosporos dos isolados, o tratamento com CG479 10^8 não apresentou diferença estatística em comparação com os grupos, CG206 10^8 ($P=0,9129$), CG153 10^7 ($P=0,9987$), ARSEF2211 10^8 ($P=0,6049$) e 10^7 ($P=0,0575$), IBCB481 10^7 ($P=0,9856$); CG479 10^8 foi estatisticamente significativo em comparação ao grupo CG206 10^7 (82,07%; $P=0,0026$). O grupo CG479 10^7 blastosporos mL^{-1} não foi estatisticamente significativo comparado aos grupos CG206 10^7 ($p=0,9963$), 2211 10^8 ($P=0,0727$) e 10^7 ($P=0,6658$) mas obteve diferença estatística significativa comparado aos grupos CG206 10^8 (55,87%; $P=0,0150$), CG153 10^7 (65,91% $P=0,0018$) e IBCB481 10^7 (91,94% $P<0,0001$).

O grupo CG206 10^8 não apresentou diferença estatística em comparação aos grupos $153 \cdot 10^7$ ($P=,9992$), ARSEF2211 10^8 ($P=0,9997$), 10^7 (0,6837) e IBCB481 10^7 ($P=0,3339$). Os grupos IBCB481 10^7 (90,80%; $P<0,0001$) e CG153 10^7 (61,06%; $P=,00237$) foram estatisticamente significativos comparados ao grupo CG206 10^7 . Não foram diferentes estatisticamente os grupos ARSEF2211 10^8 ($P=0,3879$) e 10^7 ($P=0,9829$) em relação a concentração de 10^7 (CG206).

O grupo CG153 10^7 não foi diferente estatisticamente em comparação aos grupos ARSEF2211 10^8 ($P=0,9495$), 10^7 ($P=0,2748$) e IBCB481 10^7 ($P=0,7521$).

Tabela 8 – Percentual de sobrevivência (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com isolados CG479 e CG206 (*Beauveria bassiana*), CG153, IBCB481 e ARSEF2211 (*Metarhizium anisopliae*) e tempo letal a cinquenta por cento (TL₅₀). ND= não determinado.

Tratamento	Sobrevivência		Tratamento	Sobrevivência	
	(%) \pm Erro padrão	TL ₅₀		(%) \pm Erro padrão	TL ₅₀
CG479 10^8 conídios mL ⁻¹	35,22 \pm 8,19 bc	2	CG479 10^8 blastosporos mL ⁻¹	18,33 \pm 3,05 be	2
CG479 10^7 conídios mL ⁻¹	53,11 \pm 12,92 b	4	CG479 10^7 blastosporos mL ⁻¹	78,56 \pm 10,64 ac	ND
CG 206 10^8 conídios mL ⁻¹	12,78 \pm 3,22 c	2	CG 206 10^8 blastosporos mL ⁻¹	34,67 \pm 12,06 bde	2
CG 206 10^7 conídios mL ⁻¹	60,67 \pm 11,97 b	6	CG 206 10^7 blastosporos mL ⁻¹	68,78 \pm 9,35ad	ND
CG 153 10^8 conídios mL ⁻¹	22,44 \pm 3,36 bc	2	CG 153 10^7 blastosporos mL ⁻¹	26,78 \pm 5,55be	3
CG 153 10^7 conídios mL ⁻¹	20,89 \pm 4,47 bc	2	ARSEF2211 10^8 blastosporos mL ⁻¹	41,56 \pm 9,99 bcde	2
ARSEF2211 10^8 conídios mL ⁻¹	58,67 \pm 7,08 b	5	ARSEF2211 10^7 blastosporos mL ⁻¹	56,44 \pm 13,04 bcd	4,5
ARSEF2211 10^7 conídios mL ⁻¹	57,44 \pm 11,11 b	7	IBCB481 10^7 blastosporos mL ⁻¹	6,33 \pm 1,85 e	1
IBCB481 10^8 conídios mL ⁻¹	12,67 \pm 0,83 c	2			
IBCB481 10^7 conídios mL ⁻¹	21,89 \pm 3,78 bc	2			
Controle Tween 80 0,01%	99 \pm 1 a	ND			

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

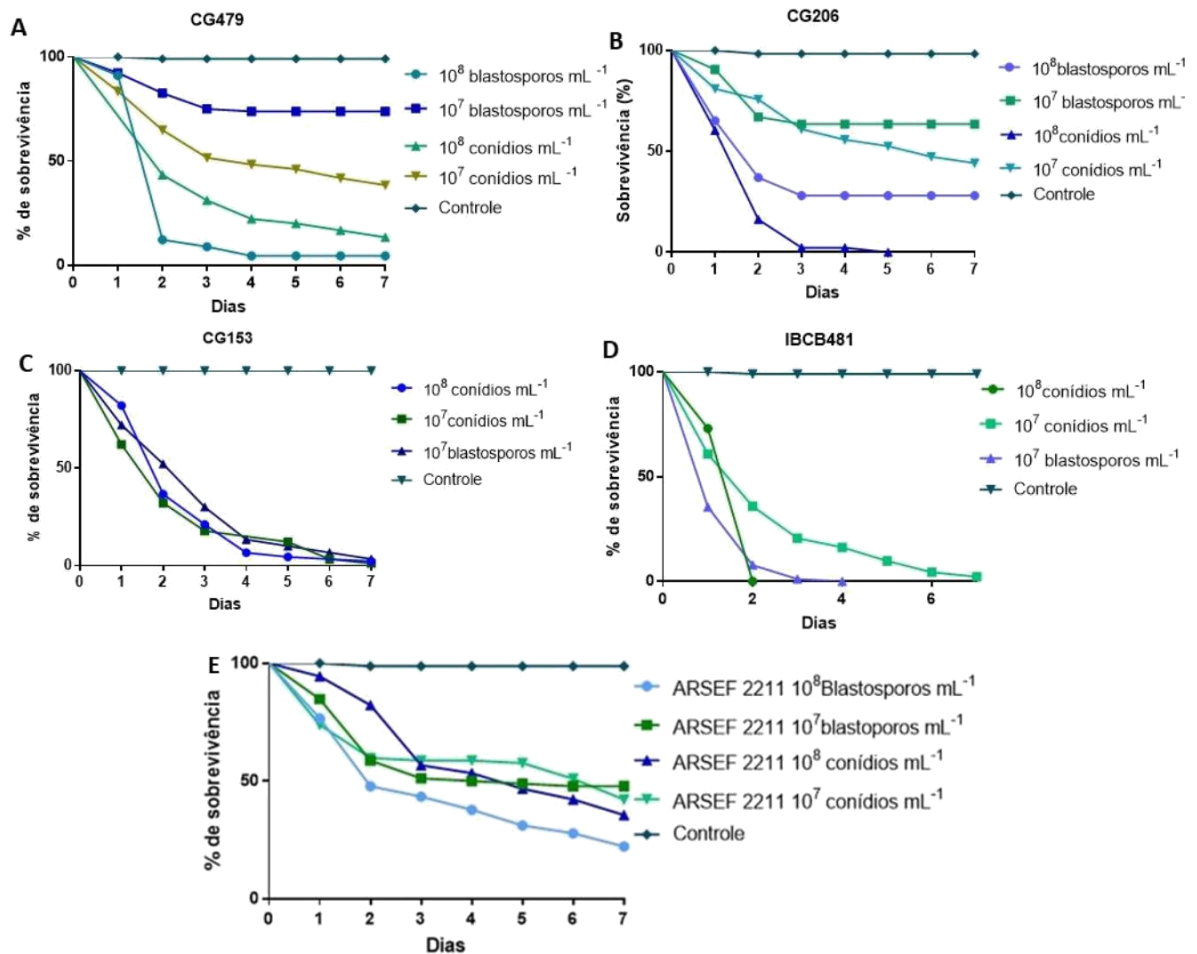


Figura 3 - Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de tratamento com conídios ou blastosporos de isolados CG479 (A), CG206 (B), CG153 (C), IBCB481 (D), ARSEF2211 (E). Grupo controle= H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%.

4.2.2 Avaliação da Toxicidade do óleo Mineral

Os percentuais de sobrevivência das larvas tratadas com óleo mineral em diferentes concentrações foram de 63,67% (óleo mineral 1%), 70,33% (óleo mineral 0,5%) e 95,5% (óleo mineral 0,1%) (Tabela 14; figura 9). O óleo mineral na concentração de 0,1% não apresentou diferença estatística ($P=0,5619$) em relação ao controle. As concentrações de 1% e 0,5%, apresentaram diferença estatística significativa ($P<0,0001$) e em comparação ao grupo controle. Os LT₅₀ obtidos foram: cinco dias (óleo 1%), seis dias (óleo 0,5%) e não determinado (óleo 0,1%) (Tabela 9).

Tabela 9 – Percentual de sobrevivência (\pm erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com em óleo mineral (1%, 0,5% e 0,1%). Tempo Letal (TL₅₀). ND=não determinado.

Grupo	Sobrevivência (%) \pm Erro padrão	TL ₅₀
Óleo 1%	63,67 \pm 2,57 b	5
Óleo 0,5%	70,33 \pm 3,16 b	6
Óleo 0,1%	95,5 \pm 2,60 a	ND
Controle Tween 80 0,01%	100 \pm 0 a	ND

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

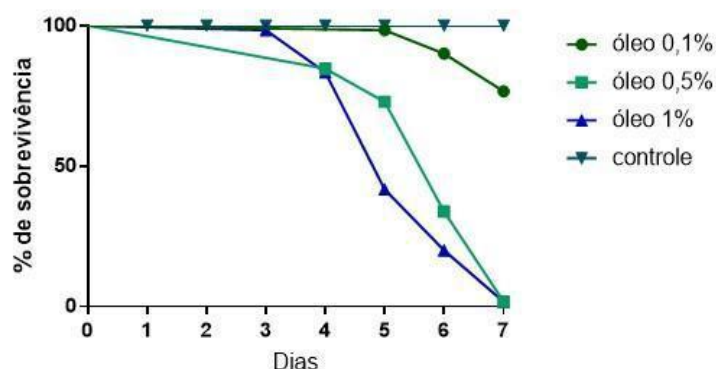


Figura 4 - Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de tratamento com óleo mineral (1%, 0,5% e 0,1%). Controle H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%.

4.2.3 *Beauveria bassiana* CG479- formulação

As análises de sobrevivência diárias foram realizadas (Figura 5A) e no primeiro dia, os percentuais de sobrevivência foram de 75,56% (suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1}), 42,78% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 75,56% (suspensão 10^7 conídios mL^{-1}), 74,44% (formulação 10^7 conídios mL^{-1}) (Tabela 10), neste dia, a formulação de blastosporos foi estatisticamente significativo ($P=0,0005$) em comparação aos controles aquoso e oleoso.

No segundo dia, os percentuais de sobrevivência foram de 13,33% nas larvas tratadas com a formulação de 10^7 blastosporos mL^{-1} , 64,44% no tratamento com suspensão 10^7 blastosporos, 38,89% na formulação 10^7 conídios mL^{-1} , 50% na suspensão 10^7 conídios mL^{-1} , 98,89% no controle oleoso e 100% no controle aquoso (Tabela 10), neste dia então, a formulação de blastosporos foi estatisticamente significativo em comparação a suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0054$), controle aquoso ($P<0,0001$) e oleoso ($P<0,0001$), porém não foi estatisticamente significativo em comparação a suspensão ($P=0,0908$) e formulação 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,4193$). A suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} não foi estatisticamente significativa em comparação aos controles aquoso ($P=0,1090$), oleoso ($P=0,1301$), suspensão ($P=0,8910$) e formulação 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,4193$). A suspensão 10^7 conídios mL^{-1} foi significativa em comparação ao controle aquoso ($P=0,0069$) e oleoso 37

($P=0,0087$). A formulação e suspensão 10^7 conídios mL^{-1} não foram estatisticamente significativas entre si ($P=0,9619$); A formulação de conídios foi estatisticamente significativa em comparação aos controles aquoso ($P=0,0005$) e oleoso ($P=0,0007$).

No terceiro dia, as taxas de sobrevivência foram de 2,22% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 53,33% na concentração de 10^7 blastosporos mL^{-1} (o percentual de sobrevivência de 53,33% da concentração 10^7 permaneceu até o sétimo dia), 36,67% (10^7 conídios mL^{-1}), 1,11% (formulação 10^7 conídios mL^{-1}) (Tabela 10) a formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} foi estatisticamente significativa em comparação aos grupos: suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0025$), controle aquoso e oleoso ($P<0,0001$), porém não foi estatisticamente significativo em comparação a suspensão ($P=0,0,889$) e formulação 10^7 conídios mL^{-1} ($P>0,9999$). A suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação aos controles oleoso ($P=0,0092$) e aquoso ($P=0,0071$), mas não apresentou diferença estatística significativa quando comparado a suspensão 10^7 conídios mL^{-1}

($P=0,7737$). A formulação 10^7 conídios mL^{-1} foi significativa em comparação aos grupos: suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0019$), controle aquoso e oleoso ($P<0,0001$). A suspensão 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativa em comparação aos grupos: aos controles, oleoso e aquoso ($P=0,0001$). A formulação e a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} não apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si ($P=0,0727$).

No quarto dia, os percentuais de sobrevivência foram de 1,11% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 35,56% (10^7 conídios mL^{-1}), 0% (formulação 10^7 conídios mL^{-1}) (Tabela 10). Neste dia não foi verificado larvas vivas como o tratamento com formulação 10^7 conídios mL^{-1} sendo então estatisticamente significativo em comparação aos grupos tratados com suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0015$), controle aquoso e oleoso ($P<0,0001$).

No quinto foram as taxas foram de 33,33% (10^7 conídios mL^{-1}) e 92,22% (controle oleoso). Neste dia não foi verificado larvas vivas no tratamento com formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}

No quinto, sexto e sétimo dia apenas o controle oleoso reduziu o percentual de sobrevivência das larvas sem diferença estatística significativa ($P=0,9915$) ($P=0,9629$) e ($P=0,9444$), respectivamente em comparação ao controle aquoso (Tabela 10).

Ao final do ensaio biológico, as médias de sobrevivência foram calculadas (Tabela 13). O percentual de sobrevivência de 8,56% das larvas tratadas com formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} (Tabela 13) foi estatisticamente significativo, representando uma redução na sobrevivência das lavas em comparação ao grupos: controles oleoso (90,99%; $P<0,0001$),

aquoso (91,44%; $P < 0,0001$) e suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} (85,54%; $P = 0,0002$); o percentual de sobrevivência de 58% da suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} (Tabela 13; figura 5A) sendo estatisticamente significativo em comparação aos controles, oleoso ($P = 0,0050$) e aquoso ($P = 0,0014$).

As larvas tratadas com formulação 10^7 conídios mL^{-1} apresentaram 16,22% de sobrevivência (Tabela 13;) sendo estatisticamente significativa, ($P < 0,0001$) em comparação aos controles, oleoso e aquoso. A suspensão 10^7 conídios mL^{-1} causou 42,56% de sobrevivência das larvas (Tabela 13), proporcionando redução significativa em comparação aos controles oleoso (55,25%; $P = 0,0001$) e aquoso (57,44%; $P < 0,0001$). Não foi observada diferença estatística significativa quando comparados a suspensão e formulação 10^7 conídios mL^{-1} ($P = 0,0823$).

Quando comparados às formulações (blastosporos e conídios) entre si, não foram estatisticamente significativos ($P = 0,9869$), o mesmo aconteceu para as suspensões ($P = 0,7848$). A formulação 10^7 conídios mL^{-1} foi reduziu significativamente a sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação à suspensão de blastosporos (72,03% $P = 0,0119$).

Os tempos letais (TL_{50}) obtidos foram: um dia para formulação com blastosporos 10^7 e dois dias para suspensão e formulação com conídios 10^7 (Tabela 13).

Tabela 10 – Percentual de sobrevivência (\pm Erro padrão) diário das larvas de *Aedes aegypti* infectadas com CG479 de *Beauveria bassiana*. Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos.

Tratamento	Sobrevivência (%) \pm Erro padrão						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
CG479							
10^7 blas	75,56 \pm 11,92a	64,44 \pm 13,65b	53,33 \pm 14,81b	53,33 \pm 14,81b	53,33 \pm 14,81b	53,33 \pm 14,81b	53,33 \pm 14,81b
Formulação 10^7 blas mL^{-1}	42,78 \pm 12,5b	13,33 \pm 5,00c	2,22 \pm 2,22c	1,11 \pm 1,11c	0,00 \pm 0,00c	0,00 \pm 0,00c	0,00 \pm 0,00c
10^7 con mL^{-1}	75,56 \pm 8,18a	50,00 \pm 13,02 b	36,67 \pm 15,9bc	35,56 \pm 16,17bc	33,33 \pm 16,67bc	33,33 \pm 16,67bc	33,33 \pm 16,67bc
formulação 10^7 con mL^{-1}	74,44 \pm 10,42a	38,89 \pm 12,85b	1,11 \pm 1,11c	0,00 \pm 0,00c	0,00 \pm 0,00c	0,00 \pm 0,00c	0,00 \pm 0,00c
Controle oleoso	100,00 \pm 0,00a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	92,22 \pm 5,47ab	88,89 \pm 7,54 ab	87,78 \pm 7,41ab
Controle aquoso	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a

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

4.2.4 *Beauveria bassiana* CG206 - formulação

Na análise diária da sobrevivência (Figura 5B), o primeiro dia apresentou percentuais de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* de 97,78% (suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1}), 78,89% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 84,44% (suspensão 10^7 conídios mL^{-1}), 63,33%

(formulação 10^7 conídios mL^{-1}) e 100% nos controles aquoso e oleoso (Tabela 11). Somente o percentual de sobrevivência da formulação 10^7 conídios mL^{-1} (Tabela 11) foi estatisticamente significativa em comparação a suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0172$), controles aquoso e oleoso ($P=0,0094$ para ambos os controles).

No segundo dia, foi observado 25,56% de sobrevivência das larvas no tratamento com a formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} apresentando redução significativa ($P<0,0001$) em comparação as taxas de sobrevivência dos tratamentos com suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} (84,44%), suspensão 10^7 conídios (70%), controle oleoso (98,89%) e aquoso (100%) (Tabela 11), porém não foi estatisticamente significativa em comparação a formulação 10^7 conídios mL^{-1} ($P>0,9995$). O percentual de sobrevivência de 23,33% no tratamento com formulação 10^7 conídios mL^{-1} (Tabela 11) foi significativa ($P<0,0001$) em comparação a suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} , 10^7 conídios mL^{-1} , controle oleoso e aquoso respectivamente. A suspensão 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativa em comparação ao controle aquoso ($P=0,0011$) e ao controle oleoso ($P=0,0019$), porém não foi estatisticamente significativa ($P=0,3208$) quando comparado a suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} .

No terceiro dia, os percentuais de sobrevivência foram reduzidos nos tratamentos com formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} (6,67%), suspensão 10^7 conídios mL^{-1} (43,33%), formulação 10^7 conídios mL^{-1} (1,11%) (Tabela 11). Neste dia, a formulação 10^7 conídios e blastosporos mL^{-1} reduziram significativamente ($P<0,0001$) a sobrevivência das larvas em comparação aos grupos, controle oleoso, aquoso, suspensão 10^7 conídios mL^{-1} e 10^7 blastosporos mL^{-1} . A suspensão 10^7 conídios mL^{-1} reduziu significativamente ($P<0,0001$) a sobrevivência das larvas em comparação aos grupos tratados com suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} , controle oleoso e aquoso.

No quarto dia, os percentuais de sobrevivência diminuíram nos tratamentos com formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} (3,33%), suspensão 10^7 conídios mL^{-1} (28,89%) e formulação 10^7 conídios mL^{-1} (0%) (Tabela 11).

No quinto dia, os percentuais de sobrevivência das larvas tratadas no *A. aegypti* foram reduzidas nos tratamentos com formulações 10^7 blastosporos mL^{-1} , no qual não foi observado larvas vivas neste dia, a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} apresentou 25,56% de sobrevivência das larvas e de 92,22% no controle oleoso (Tabela 11).

No sexto dia, os grupos 10^7 conídios mL^{-1} e controle oleoso apresentaram percentuais de sobrevivência de 20% e 88,89% respectivamente (Tabela 11), e no sétimo dia o percentual de sobrevivência do controle oleoso foi de 87,78%; na comparação entre os grupos durante no

sexto e sétimo dia, a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) em comparação ao controle aquoso e controle oleoso.

Na formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} a sobrevivência das larvas foi de 16,44%, com redução significativa ($P < 0,0001$) em relação aos controles oleoso em 95,11%, aquoso (100%) e suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} (86,33%) (Tabela 13). A suspensão de blastosporos não foi estatisticamente significativo ($P = 0,1934$) em comparação ao controle oleoso, porém, foi significativo em comparação ao controle aquoso ($P = 0,0162$).

A sobrevivência de 12,33% das lavas tratadas com formulação 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativa ($P < 0,0001$), em comparação ao controle oleoso, aquoso e suspensão 10^7 conídios mL^{-1} (Tabela 13); o grupo tratado com a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} apresentou 41,78% de sobrevivência (Tabela 13) sendo estatisticamente significativo ($P < 0,0001$) em comparação aos controles, oleoso e aquoso.

As formulações a base de óleo mineral (conídios ou blastosporos) foram estatisticamente significativas ($P < 0,0001$) em comparação as suspensões tanto de conídios quanto de blastosporos. A comparação entre as formulações não foi estatisticamente significativa ($P = 0,9584$).

As formulações (blastosporos/conídios) apresentaram dois dias de tempo letal (TL_{50}) para matar cinquenta por cento das larvas de *A. aegypti* e três dias para suspensão aquosa de conídios, e não foi possível determinar o tempo letal na suspensão de blastosporos pelo alto percentual de sobrevivência (Tabela 13).

Tabela 11 – Percentual de sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* (\pm Erro padrão) tratadas com CG206 de *Beauveria bassiana*. Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos.

Tratamento	Sobrevivência (%) \pm Erro padrão						
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
10^7 blas mL^{-1}	97,78 \pm 2,22a	84,44 \pm 5,8ab	84,44 \pm 5,8a	84,44 \pm 5,8a	84,44 \pm 5,8a	84,44 \pm 5,8a	84,44 \pm 5,8a
Formulação 10^7 blas mL^{-1}	78,89 \pm 8,41ab	25,56 \pm 4,44c	6,67 \pm 3,33d	3,33 \pm 2,36d	0,00 \pm 0,00d	0,00 \pm 0,00b	0,00 \pm 0,00b
10^7 con mL^{-1}	84,44 \pm 4,75ab	70,00 \pm 5,77b	43,33 \pm 4,08b	28,89 \pm 6,76b	25,56 \pm 7,47b	20,00 \pm 8,33b	20,00 \pm 8,33b
Formulação 10^7 con mL^{-1}	63,33 \pm 14,62b	23,33 \pm 7,64c	1,11 \pm 1,11d	0,00 \pm 0,00d	0,00 \pm 0,00d	0,00 \pm 0,00b	0,00 \pm 0,00b
CTR óleo mineral 0,1%	100,00 \pm 0,00a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11a	92,22 \pm 5,47a	88,89 \pm 7,54a	87,78 \pm 7,41a
Controle	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a

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

4.2.5 *Metarhizium anisopliae* ARSEF2211 - formulação

Os percentuais diários de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* tratadas com formulações e suspensão do isolado ARSEF2211 foram analisados (Figura 5C). No primeiro

dia foram de 92,22% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 96,67% (10^7 blastosporos mL^{-1}), 42,22% (formulação 10^8 blastosporos mL^{-1}), 63,33% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 55,56% (10^8 conídios mL^{-1}), 88,89% (10^7 conídios mL^{-1}), 53,33% (formulação 10^8 conídios mL^{-1}), 74,44% (formulação 10^7 conídios mL^{-1}) e 100% para os controles aquoso e oleoso (Tabela 12). Neste dia, a formulação 10^8 blastosporos mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação aos grupos imersos em suspensão de 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0015$); 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0004$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0041$) controles aquoso e oleoso ($P=0,0001$). A formulação 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação ao tratamento em suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0339$), 10^7 blastosporos mL^{-1} ($p=0,0105$), controles aquoso e oleoso ($P=0,0041$). A suspensão 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação aos grupos 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0192$), controles aquoso e oleoso ($P=0,0077$).

No segundo dia, os percentuais de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* foram de 86,67% (10^8 blastosporos mL^{-1}), 92,22% (10^7 blastosporos mL^{-1}), 16,67% (formulação 10^8 blastosporos mL^{-1}), 33,33% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 31,11% (suspensão 10^8 conídios mL^{-1}), 85,56% (suspensão 10^7 conídios mL^{-1}), 33,33% (formulação 10^8 conídios mL^{-1}), 32,22% (formulação 10^7 conídios mL^{-1}) e 98,89% (controle oleoso) (Tabela 12). Na comparação entre os tratamentos, o percentual de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* tratadas com a formulação 10^8 blastosporos mL^{-1} foi significativa ($p<0,0001$) em comparação as suspensões 10^8 10^7 blastosporos mL^{-1} 10^7 conídios mL^{-1} controle aquoso e oleoso. A formulação 10^8 conídios mL^{-1} reduziu significativamente ($P<0,0001$) a sobrevivência das larvas em comparação a concentração de 10^7 blastosporos mL^{-1} , controle oleoso e aquoso, suspensões 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P=0,0006$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0009$). O tratamento com suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo ($P<0,0001$) comparado as suspensões 10^7 blastosporos mL^{-1} , 10^7 conídios mL^{-1} , controle aquoso e oleoso, suspensão 10^8 blastosporos ($P=0,0003$). O tratamento com a formulação 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo ($P<0,0001$) em comparação aos grupos tratados com as suspensões 10^7 blastosporos mL^{-1} e 10^7 conídios mL^{-1} , controle oleoso e aquoso e suspensão 10^8 blastosporos ($P=0,0004$).

No terceiro dia, os percentuais de sobrevivência foram de 91,11% (10^7 blastosporos mL^{-1}), 10% (formulação 10^8 blastosporos mL^{-1}), 18,89% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 25,56% (10^8 conídios mL^{-1}), 66,67% (10^7 conídios mL^{-1}), 25,56% (formulação 10^8 conídios mL^{-1}), 8,89% (formulação 10^7 conídios mL^{-1}) (Tabela 12). As larvas infectadas com

formulação 10^8 blastosporos mL^{-1} foi significativo ($P < 0,0001$), em comparação a suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} (10^7 blastosporos mL^{-1} , suspensão 10^7 conídios mL^{-1} , controle oleoso e aquoso, mas não foi estatisticamente significativo em comparação a formulações 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P = 0,9968$), suspensão 10^8 conídios mL^{-1} ($P = 0,8759$) e 10^7 ($P > 0,9999$), e suspensão 10^8 conídios mL^{-1} ($P = 0,8759$). A formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} foi estatisticamente significativo ($P < 0,0001$) em comparação as suspensões de blastosporos 10^8 e 10^7 , controle oleoso, aquoso e suspensão 10^7 conídios mL^{-1} ($P = 0,0004$), porém sem diferença estatística em comparação aos grupos 10^8 conídios mL^{-1} ($P = 0,9997$), formulações de conídios 10^8 ($P = 0,9997$) e 10^7 ($P = 0,9924$).

Neste terceiro dias tratamentos com formulações 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} e a suspensão 10^8 conídios mL^{-1} foram estatisticamente significativas ($P < 0,0001$) em comparação as suspensões de blastosporos 10^8 e 10^7 , controle oleoso e aquoso; e o tratamento com as formulações 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} e a suspensão 10^8 conídios mL^{-1} foram estatisticamente significativas ($P = 0,0045$), ($P = 0,0004$) e ($P = 0,0045$), respectivamente em comparação a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} , porém, formulações de conídios 10^8 e 10^7 não foram estatisticamente significativas entre si ($P = 0,8246$); a suspensão 10^8 conídios mL^{-1} não foi estatisticamente significativo em comparação a formulação de conídios 10^8 ($P > 0,9999$) e 10^7 ($P = 0,8246$).

A suspensão 10^7 conídios mL^{-1} neste terceiro dia, não foi estatisticamente significativo em comparação a suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P = 0,3372$), controle oleoso ($P = 0,0627$) e aquoso ($P = 0,0468$). A suspensão de 10^8 blastosporos não apresentou diferença estatística em comparação a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} ($P = 0,6237\%$), controle oleoso ($P = 0,9699$) e aquoso ($P = 0,9481$). A suspensão de blastosporos 10^7 não obteve diferença estatística em comparação aos controles oleoso ($P = 0,9989$) e aquoso ($P = 0,9968$).

No quarto dia, os percentuais de sobrevivência das larvas foram de 90% (suspensões 10^7 blastosporos mL^{-1}), 6,67% (formulação 10^8 blastosporos mL^{-1}), 7,78% (formulação 10^7 blastosporos mL^{-1}), 23,33% suspensão 10^8 conídios mL^{-1} , 52,22% (suspensão 10^7 conídios mL^{-1}), 2,22% (formulação 10^8 conídios mL^{-1}), 4,44% formulação 10^7 conídios mL^{-1} (Tabela 12). As taxas de sobrevivência das larvas tratadas com formulação 10^8 e 10^7 blastosporos mL^{-1} , suspensão 10^8 conídios mL^{-1} , formulação 10^8 conídios mL^{-1} foram significativas ($P < 0,0001$) em comparação as suspensões 10^7 blastosporos mL^{-1} , controles aquoso e oleoso; a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} foi estatisticamente significativo em comparação a suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} ($P = 0,0074$), suspensões 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P = 0,0021$). A suspensão

10^8 conídios mL^{-1} , foi estatisticamente significativo em comparação a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0486$).

No quinto dia, os percentuais de sobrevivência foram observados nos grupos 10^7 blastosporos mL^{-1} (85,56%), formulação 10^8 blastosporos mL^{-1} (2,22%), formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} (0%), 10^7 conídios mL^{-1} (51,11%), formulação 10^8 conídios mL^{-1} (21,11%), formulação 10^7 conídios mL^{-1} (40%) (Tabela 12).

No sexto dia, as alterações nos percentuais de sobrevivência foram observadas nos grupos formulação 10^8 blastosporos mL^{-1} (0%), 10^7 conídios mL^{-1} (50%), formulação 10^8 conídios mL^{-1} (18,89%), controle oleoso (88,89%). No sétimo dia, os percentuais de sobrevivência que se alteram foram os das larvas tratadas com suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} (84,44%) controle oleoso (87,78%). (Tabela 12).

A sobrevivência das larvas tratadas com formulação 10^8 blastosporos mL^{-1} foi de 11,11% (Tabela 13) sendo estatisticamente significativa ($P<0,0001$) em comparação as taxas de sobrevivência das larvas tratadas suspensões de blastosporos 10^8 (83,89%) e 10^7 (89,33%) aos controles oleoso (95,11%) e aquoso (100%), (Tabela 13). O grupo tratado com formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} apresentou 17,67% de sobrevivência (Tabela 13) sendo estatisticamente significativa ($P<0,0001$) em comparação aos controles, aquoso, oleoso, suspensão 10^8 e 10^7 blastosporos mL^{-1} . As formulações 10^8 e 10^7 blastosporos mL^{-1} não foram estatisticamente diferentes entre si ($P=0,8849$). A suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} não foi estatisticamente significativa em relação ao controle aquoso ($P=0,1011$), controle oleoso ($P=0,4400$) e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,9943$). A suspensão aquosa de 10^7 blastosporos mL^{-1} também não foi estatisticamente significativa em comparação aos controles aquoso ($P=0,4969$) e oleoso ($P=,9292$).

Os tratamentos com formulação 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} apresentaram 27,44% e 17% de sobrevivência das larvas, respectivamente (Tabela 13), sendo significativo ($P<0,0001$) em comparação aos grupos controles, oleoso, aquoso e significativos ($P=0,0096$) e ($P=0,0004$) respectivamente com comparação a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} . Estas formulações de conídios não foram significantes e entre si ($P=0,9006$). A taxa de sobrevivência das larvas tratadas com a suspensão 10^8 conídios mL^{-1} foi de 29,22% (Tabela 13) não sendo estatisticamente significativo em comparação a formulação 10^8 conídios mL^{-1} ($P>0,9999$) e formulação 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,8243$), mas foi estatisticamente significativo em comparação aos controles, aquoso e oleoso ($P<0,0001$) e suspensão 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,0158$). O grupo tratado com suspensão 10^7 conídios mL^{-1} apresentou 63,33% de

sobrevivência das larvas de *A. aegypti* (Tabela 13), sendo estatisticamente significativo em comparação aos controles aquoso ($P=0,0077$) e oleoso ($P=0,0296$).

Comparando todos os grupos, a formulação 10^8 blastosporos mL^{-1} reduziu significativamente ($P<0,0001$) em 82,46% a sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} , porém, não significativo em comparação as formulações 10^8 ($P=0,7187$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P=0,9997$) e suspensão 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,5867$).

Houve redução significativa na sobrevivência das larvas no tratamento com formulação 10^7 blastosporos mL^{-1} em comparação a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} (82,46%; $P<0,0001$), porém não foi estatisticamente significativo em comparação a suspensão 10^8 conídios mL^{-1} ($P=0,9531$); formulação 10^8 ($P=0,9842$) e 10^7 conídios mL^{-1} ($P>0,9999$).

O grupo tratado com formulação 10^8 conídios mL^{-1} reduziu significativamente ($P<0,0001$) em 67,29% e 69,28% a sobrevivência das larvas em comparação as suspensões 10^8 e 10^7 blastosporos mL^{-1} , respectivamente. A formulação 10^7 conídios mL^{-1} reduziu significativamente ($P<0,001$) em 79,74% e 80,97% a sobrevivência das larvas em comparação as suspensões 10^8 e 10^7 blastosporos mL^{-1} .

Foi estatisticamente significativa a suspensão 10^8 conídios mL^{-1} com redução na sobrevivência das larvas de *A. aegypti* em comparação a suspensão 10^8 blastosporos mL^{-1} (65,17%; $P<0,0001$), suspensão 10^7 blastosporos mL^{-1} (67,29%; $P<0,0001$). Não foi observado diferença estatística quando comparado a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} com as suspensões 10^8 ($P=0,4040$) e 10^7 blastosporos mL^{-1} ($P=0,1221$).

Os tempos letais (TL_{50}) obtidas foram: formulação de 10^8 blastosporos mL^{-1} (um dia), dois dias para as formulações 10^7 blastosporos mL^{-1} , 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} (dois dias), a suspensão 10^7 conídios mL^{-1} (quatro dias), suspensão 10^8 conídios mL^{-1} (dois dias), as suspensões 10^8 e 10^7 blastosporos mL^{-1} não foi possível determinar o tempo letal pela baixa mortalidade ao logo do experimento. (Tabela 13).

Tabela 12 – Percentual de sobrevivência (\pm Erro padrão) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com ARSEF2211 de *Metarhizium anisopliae*. Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos.

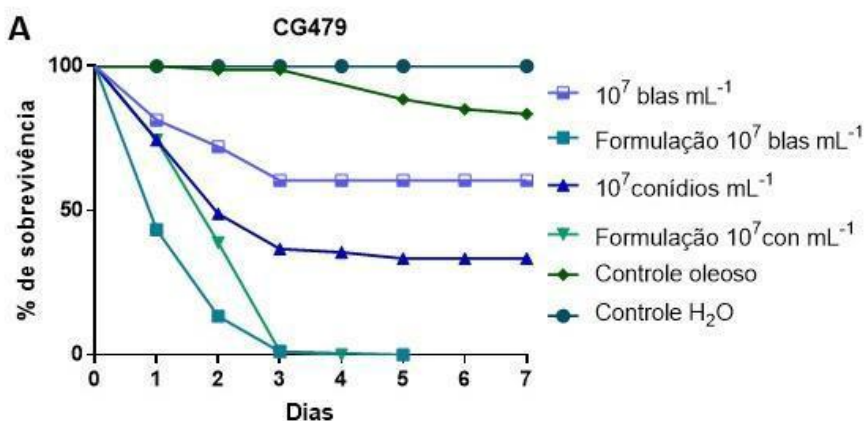
Tratamento	Sobrevivência (%) \pm Erro Padrão						
ARSEF2211	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
10^8 blas mL ⁻¹	92,22 \pm 5,72a	86,67 \pm 7,45a	86,67 \pm 7,45a	86,67 \pm 7,45a	86,67 \pm 7,45a	86,67 \pm 7,45a	65,56 \pm 11,56de
10^7 blas mL ⁻¹	96,67 \pm 2,36a	92,22 \pm 3,64a	91,11 \pm 4,55a	90 \pm 4,41a	85,56 \pm 8,52a	85,56 \pm 8,52a	84,44 \pm 8,52a
10^8 blas mL ⁻¹ óleo	42,22 \pm 6,83b	16,67 \pm 5b	10 \pm 3,33b	6,67 \pm 2,36b	2,22 \pm 1,47b	0 \pm 0b	0 \pm 0b
10^7 blas mL ⁻¹ óleo	63,33 \pm 11,3ab	33,33 \pm 7,82b	18,89 \pm 4,55b	7,78 \pm 3,24b	0 \pm 0b	0 \pm 0b	0 \pm 0b
10^8 con mL ⁻¹	55,56 \pm 9,88b	31,11 \pm 12,41b	25,56 \pm 12,81b	23,33 \pm 11,79b	23,33 \pm 11,8b	23,33 \pm 11,8b	21,11 \pm 10,6b
10^7 con mL ⁻¹	88,89 \pm 3,89a	85,56 \pm 4,75a	66,67 \pm 7,1cd	52,22 \pm 4,94c	51,11 \pm 4,84c	50 \pm 5c	50 \pm 5e
10^8 coní mL ⁻¹ óleo	53,33 \pm 14,81b	33,33 \pm 15,9b	25,56 \pm 12,81b	22,22 \pm 11,15b	21,11 \pm 10,73b	18,89 \pm 9,64b	17,78 \pm 8,94b
10^7 con mL ⁻¹ óleo	74,44 \pm 10,56b	32,22 \pm 9,1b	8,89 \pm 3,9b	4,44 \pm 3,4b	0 \pm 0b	0 \pm 0b	0 \pm 0b
CTR óleo 0,1%	100 \pm 0 a	98,89 \pm 1,11a	98,89 \pm 1,11ac	98,89 \pm 1,11a	92,22 \pm 5,47a	88,89\pm7,54a	87,78 \pm 7,41ad
Controle	100 \pm 0 a	100 \pm 0a	100 \pm 0ad	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a

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

Tabela 13 - Percentual de sobrevivência (\pm Erro padrão) e tempo letal a cinquenta por cento (LT₅₀) das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com formulação ou suspensão de conídios e blastosporos dos isolados CG479 e CG206 (*Beauveria bassiana*), CG153, IBCB481 e ARSEF2211 (*Metarhizium anisopliae*). Controle aquoso (água desclorada estéril + Tween 80 0,01%) e controle oleoso (óleo mineral 0,1%). Con= conídios e blas=blastosporos.

Isolados	Sobrevivência (%) \pm			Isolados	Sobrevivência (%) \pm		
	Erro padrão	LT ₅₀			Erro padrão	LT ₅₀	
ARSEF 2211 10^8 blas mL ⁻¹	83,89 \pm 7,33 a c	ND		CG 206 10^7 blas mL ⁻¹	86,33 \pm 4,98 a	ND	
ARSEF 2211 10^7 blas mL ⁻¹	89,33 \pm 5,42 a c	ND		CG 206 formulação 10^7 blas mL ⁻¹	16,44 \pm 1,85 b	2	
ARSEF 2211 formulação 10^8 blas mL ⁻¹	11,11 \pm 2,41 b	1		CG 206 10^7 coní mL ⁻¹	41,78 \pm 4,99 c	3	
ARSEF 2211 formulação 10^7 blas mL ⁻¹	17,67 \pm 3,46 b	2		CG 206 formulação 10^7 coní mL ⁻¹	12,33 \pm 3,17 b	2	
ARSEF 2211 10^8 con mL ⁻¹	29,22 \pm 11,48 b	2		CG479 10^7 blas mL ⁻¹	58,00 \pm 13,86 b	ND	
ARSEF 2211 10^7 con mL ⁻¹	63,33 \pm 4,10 c	4		CG479 formulação 10^7 blas mL ⁻¹	8,56 \pm 2,73 c	1	
ARSEF 2211 formulação 10^8 con mL ⁻¹	27,44 \pm 11,58 b	2		CG479 10^7 coní mL ⁻¹	42,56 \pm 14,39 c b	2	
ARSEF 2211 formulação 10^7 con mL ⁻¹	17,00 \pm 3,02 b	2		CG479 formulação 10^7 coní mL ⁻¹	16,22 \pm 3,08 c	2	
CTR óleo mineral 0,1%	95,11 \pm 2,94 a	ND		Controle	100,00 \pm 0,00 a	ND	

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



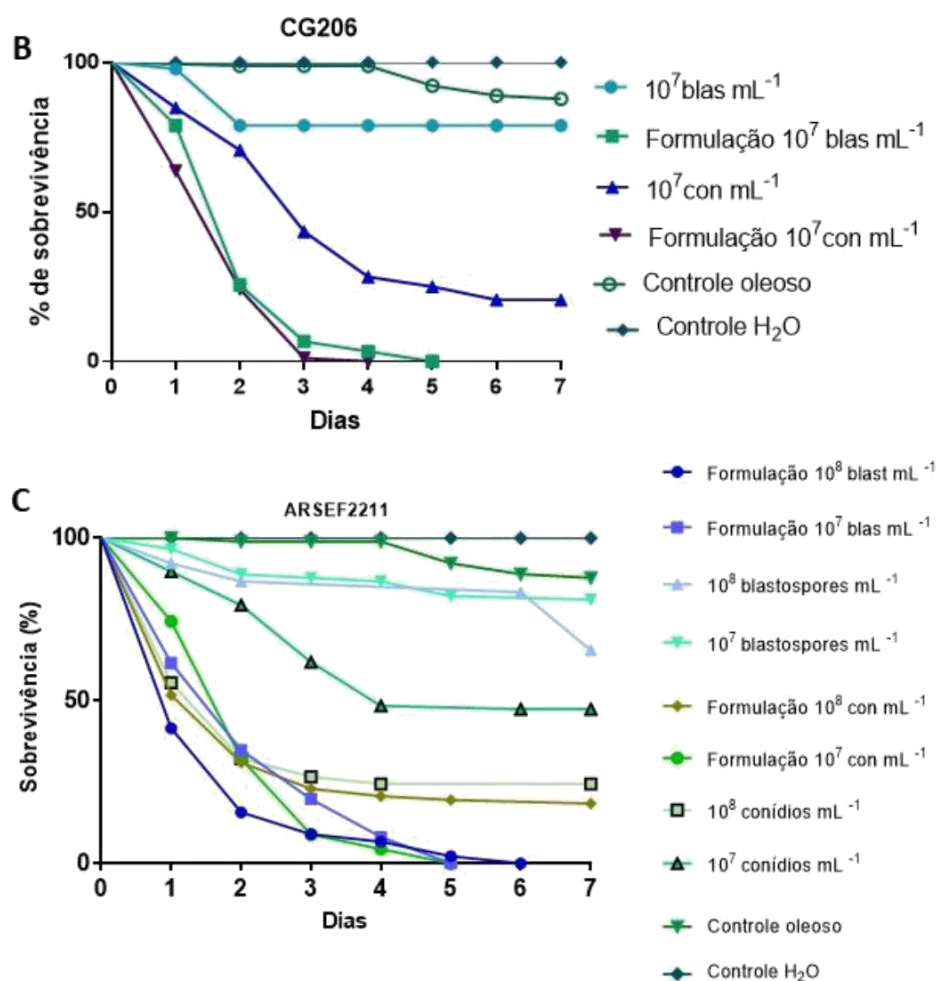


Figura 5 - Sobrevivência (%) das larvas de *Aedes aegypti* após sete dias de tratamento com formulações ou suspensões (blastosporos/conídios) de isolados CG479 (A), CG206 (B) e ARSEF2211 (C). Grupos controle óleo mineral 0,1%; H₂O desclorada estéril + Tween 80 0,01%.

4.2.6 Re-isolamento fúngico após ensaio biológico

Após morte de larvas e subsequente assepsia com álcool 70%, foram colocados em uma placa de Petri contendo BDA suplementado com cloranfenicol 0,05% para observação de crescimento fúngico. As larvas de *A. aegypti* expostas aos isolados de *M. anisopliae* ARSEF2211 (Figura 6 A); CG153 (Figura 6 E) e IBCB481 (Figura 6 D) e de *B. bassiana* CG206 (Figura 6 C) e CG479 (Figura 6 B) A característica macro morfológica observada foi a cor da colônia branca de algodão de *B. bassiana* (figura 6 B-2 e C-2) e verde para *M. anisopliae* (figura 6 A-2, D-2, E-2). Os fungos foram observados sob microscopia óptica em $\times 400$ de ampliação e identificados de acordo com Samson (1974); CG153, IBCB481, ARSEF2211 (*Metarhizium anisopliae*): conídios em forma de banana (Figura 7A, B e E); CG206, e CG479 (*B. bassiana*): conídio oval (Figura 7 C e D) Após a identificação das

características macro e micromorfológicas, os isolados foram identificados como os mesmos utilizados na infecção. Após micro cultivo e visualização em microscopia óptica a 400x, tais colônias foram identificadas como sendo os mesmos isolados utilizados nos ensaios biológicos (Figura 7).

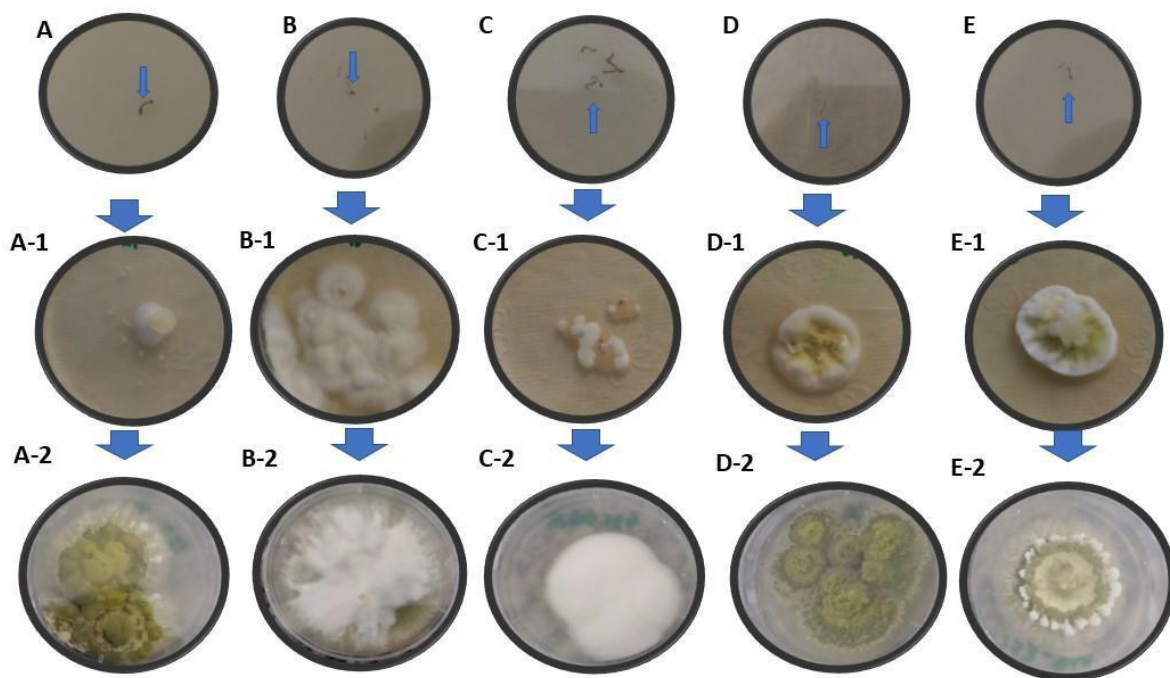


Figura 6 –Desenvolvimento de colônia fúngica em larvas de *Aedes aegypti* após ensaio biológico. *Metarhizium anisopliae* ARSEF2211 (A, A-1, A-2) *Beauveria bassiana* CG479 (B, B-1, B-2) e CG206 (C, C-1, C-2), *Metarhizium anisopliae* IBCB481(D, D-1, D-2) e CG153 (E, E-1, E-2).

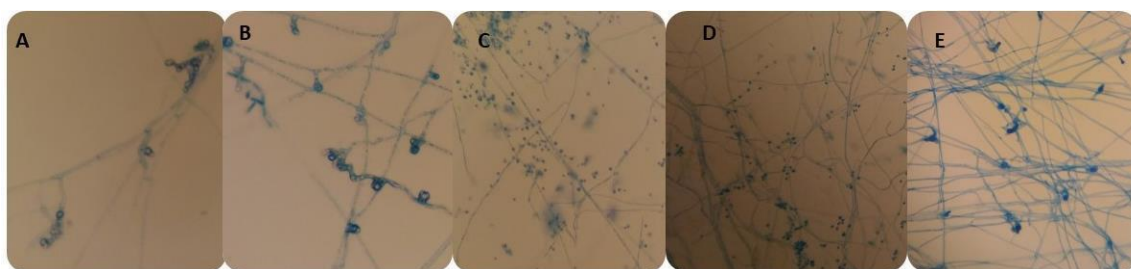


Figura 7 – Micro cultivo de colônias fúngica observados em microscopia óptica 400x, após re-isolamento em larvas de *Aedes aegypti*. (A) *Metarhizium anisopliae* CG153 (B) IBCB481, (C) *Beauveria bassiana* CG479 (D) e CG206 (E), *Metarhizium anisopliae* ARSEF2211.

5 DISCUSSÃO

Fungos entomopatogênicos são amplamente usados no agronegócio para controle biológico de diversas espécies de artrópodes, porém o tempo para produção de fungos

entomopatogênicos é um dos principais obstáculos para formulação de produtos em grande escala (MASCARIN et al., 2015; 2018). A maioria dos produtos que utilizam fungos entomopatogênicos utilizam conídios para preparação, porém cada vez mais procurasse o desenvolvimento de novos produtos mais eficientes e que demandam menor tempo para produção, sendo assim estruturas como blastosporos despertam cada vez mais o interesse para utilização em larga escala, por que demandam pouco tempo, menos espaço para sua produção e pode ser produzidos em maiores quantidades (MASCARIN et al., 2015; KLEESPIES; ZIMMERMAN 1991; ALVES,1998). Apesar das vantagens, a produção comercial requer métodos que produzam blastosporos estáveis eficientes e resistentes aos efeitos adversos do meio ambiente (MASCARIN et al., 2015). Pensando na possibilidade de produção de estruturas fúngicas em menos tempo e em maior quantidade, nosso trabalho corroborou os estudos de Mascarin et al., (2015) e Kleespies; ZIMMERMAN (1991) mostrando que foi obtido uma grande produção de blastosporos dos isolados ARSEF2211, CG206 e CG 479 a 48h e 72h. A produção de blastosporos está intimamente ligada a quantidade de glicose e a presença de extrato de levedura para fermentação (KLEESPIES; ZIMMERMAN (1991), ADAMEK, 1963 e OTTATI-LIMA et al, 2014); quantidades superiores a 50g L^{-1} possibilitam uma maior produção de blastosporos; rotações superiores a 350rpm que possibilitam maior aeração e resistência a dissecação (MASCARIN et al., 2015; JACKSON et al., 1997), neste trabalho, rotação máxima de 220rpm e $42,1\text{ g L}^{-1}$ adicionados ao meio de cultura, os isolados ARSEF2211, CG206 e CG 479 tiveram altas produções de propágulos 360,3 (220rpm/72h), 1057 (220rpm/72h) e 228 (220rpm/72h) respectivamente; os isolados CG153 e IMCB481 produziram uma quantidade pequena de blastosporos.

Apesar da grande produção de blastosporos, nos isolados ARSEF2211, CG206 e CG 479, a submissão a diferentes rotações e tempos se mostrou estatisticamente nos isolado ARSEF2211, CG479 e CG206 (220rpm/72h, em comparação a 150rpm/48h); CG479 e CG206 (220rpm/72h em comparação a 150rp/72h) e (220rpm/72h contra 220rpm/48h) corroborando o estudo de Mascarin et al., (2015) mostrando a importância no aumento da rotação para obter maiores quantidades de blastosporos.

O meio de cultura utilizado neste trabalho, não obteve de forma homogênea a produção de blastosporos de um mesmo isolado, o que pode ser justificado pelas características do isolado utilizado no momento como repiques sucessivos, tempos de armazenamento, temperatura de armazenamento, diferentes necessidades nutricionais. Além disso, fungos entomopatogênicos respondem de forma diferente quando submetidos a mesmo

meio de cultura por possuir uma ampla variabilidade genética que devem ser levados em consideração no momento da preparação do meio líquido com intuito de melhorar a produção de blastosporos do isolado (MASCARIN et al., 2013).

A produção de blastosporos pode alterar quando imerso em meios de cultura com diferentes concentrações de tween 80 ou de polietileno glicol 200 (PEG 200) (KLEESPIES; ZIMMERMAN, 1991; ADAMEK, 1963) neste trabalho avaliamos apenas a diferentes rotações e tempo de imersão, entretanto possivelmente a produção de blastosporos de *M. anisopliae* pode ter sido diferente da produção de *b. bassiana* também por conta da concentração de tween 80. O pH do meio de cultura foi avaliado por Jackson et al., (2004) que não observaram diferença estatística na produção de blastosporos quando submetidos a pH de 3 à 6,5 apesar disso nosso experimento não avaliou a produção de blastosporos quando em diferentes pH.

O tempo de imersão em meio de cultura líquido interfere na produção de blastosporos do isolado (ADAMEK 1963) corroborando os resultados dos nossos isolados ARSEF221, CG206 e IBCB481 quando comparamos 48 horas e 72 horas.

A utilização de fungos entomopatogênicos como forma de controle de mosquitos de importância para saúde pública vêm ganhando espaço (RAGAVENDRAN et al., 2017; HOLDER; KEYHANI, 2005). Diversos estudos vêm mostrando maior virulência de blastosporos quando comparado a conídios (ALKHAIBARI et al., 2016, 2017; DONG et al., 2016; MIRANPURI; KHACHATOURIANS, 1990) porém os mecanismos envolvidos na infecção não são completamente elucidados (GREENFIELD et al., 2014; BUT et al., 2013).

O presente estudo mostrou que conídios e blastosporos dos isolados utilizados foram igualmente eficientes para o controle das larvas de *A. aegypti* o que não corrobora os resultados obtidos por Alkhaibari et al., (2016), no qual mostram que blastosporos são significativamente mais eficientes que conídios, atribuindo tal feito provavelmente por fatores como produção de proteases Pr1 e Pr2, capacidade de adesão do blastosporos e sua grande produção de mucilagem (o que ajudaria na capacidade de adesão a superfície da larva).

Entomopatógenos como *B. bassiana* e *M. anisopliae* são fungos naturais de ambientes terrestres, produzindo conídios que possuem com propriedades lipofílicas e hidrofóbicas que dificultam sua ação em ambientes aquáticos; além de conídios, estes fungos, produzem estruturas hifais chamadas de blastosporos (com características hidrofílicas, que possibilitam interação em ambientes aquáticos) produzidas dentro da hemolinfa do hospedeiro após penetração do conídio (WANG et al., 2016).

Segundo Alkhaibari et al., (2016) blastosporos por possuírem característica hidrofílica e capacidade de grande produção de mucilagem, teriam capacidade de se aderir a superfície do hospedeiro aquático com isso promover o parasitismo, diferente dos conídios, justificando a maior eficiência do blastosporos em mortalidade das larvas de *A. aegypti*.

Apesar da capacidade de interagir em água, este trabalho não obteve diferença estatística na redução da sobrevivência das larvas de *A. aegypti* quando comparados blastosporos e conídios, nossos resultados portanto não corroboram os experimentos realizados por Alkhaibari et al., (2016), porém é válido ressaltar que os fatores que levaram a estes resultados são inúmeros, variando de acordo com cada isolado fúngico onde estes, possuem suas características próprias que os permitem serem mais ou menos virulentos e ou resistentes a condições adversas; pela forma de interação do isolado fúngico com o meio aquoso; pela linhagem de mosquito usada em nosso experimento; interação do fungo com a superfície cuticular que pode conter ou não antifúngicos ou lipídios cuticulares; pela condições imunológica que se encontra os mosquitos que podem ser mais resistente a infecções fúngicas; fatores como humidade e temperatura e pH ótimos também interferem nessa interação fungo/hospedeiro (ZIMMERMAN 2007). Zimmerman (2007), já relatava diversos trabalhos que mostravam o insucesso no parasitismo de *B. bassiana* em ambientes aquáticos em outros modelos experimentais.

Embora blastosporos e conídios, neste trabalho, apresentarem parecida virulência, os isolados IBCB481 e CG153 de *M. anisopliae* que mesmo não se mostrando bons produtores de blastosporos, foram altamente virulentos, reduzindo drasticamente o percentual de sobrevivência das larvas em baixas concentrações (reduções de sobrevivência que variaram de 77,88% a 93,60% no tratamento com isolado IBCB481 e 78,90% a 72,94% para CG153 ambos na concentração 10^7 blastosporos/conídios mL^{-1}) que quando comparados aos outros isolados nas mesmas concentrações, mostram que a quantidade de propágulo não está ligada à sua efetiva virulência. Foram necessários uma concentração de 10^8 conídios/ blastosporos mL^{-1}

¹ dos isolados de *B. bassiana* CG 206, CG479, para se ter uma maior eficácia na redução da sobrevivência das larvas de *A. aegypti* e no tempo de redução (2 dias para blastosporos e conídios), mostrando também que (embora em maior concentração), tanto conídios, quanto blastosporos destes isolados de *B. bassiana* preparados em suspensões aquosas se mostraram também eficazes no controle do mosquito. Porém, entre todos os isolados testados, foi o isolado ARSEF2211 que apresentou os piores resultados quando comparados com os outros tratamentos. As concentrações de 10^8 blastosporos ou conídios mL^{-1} reduziram os percentuais

de sobrevivência das larvas que variaram entre 40,73% a 58,02% (tempos letais variando entre 2 a 7 dias) o que justificou a associação ao óleo mineral com a concentração de 10^8 apenas nestes isolado.

O que se buscou neste trabalho então, foi a avaliação e comparação de virulência *in vitro* de isolados fúngicos contra larvas de *A. aegypti*, bem como o tempo letal necessário para matar cinquenta por cento das larvas. Nos nossos experimentos, as suspensões aquosas fúngicas em concentrações que apresentaram taxas sobrevivência de larvas de *A. aegypti* superiores a 40% foram associados ao óleo mineral na concentração de 0,1% e estas formulações passaram a apresentar altas quedas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* mesmo em baixas concentrações (10^7 propágulos mL⁻¹).

A utilização de óleos vegetais ou minerais podem envolver estruturas fúngicas em micelas protegendo-os de fatores adversos do ambiente como temperatura, radiação UV, além de proteger o fungo em ambientes aquáticos, ao mesmo tempo facilitando a adesão destas estruturas fúngica ao tegumento do hospedeiro (GOMES et al., 2015; CAMARGO et al., 2012; ANGELO et al., 2010). A escolha do óleo mineral então como adjuvante fúngico se deu pelo fato de ser a primeira vez que seria associado a fungos entomopatogênicos para controle de larvas de *A. aegypti*. No entanto um efeito altamente tóxico para as larvas não era interessante. Porém no teste de toxicidade do óleo mineral, este, na concentração de 0,1%. reduziu 4,5% a sobrevivência das larvas mostrando-se pouco tóxico. Devemos considerar, no entanto que mesmo em baixa concentração o óleo mineral promove a formação de uma fina camada acima da linha aquática, apesar de não elucidado este processo de ação do óleo mineral, Helmy et al. (2011) ainda citam que o óleo poderia impregnar no sifão respiratório da larva dificultando a troca de oxigênio, o que poderia justificar neste trabalho, o pequeno número de larvas mortas quando expostas somente a emulsão de óleo mineral.

Apesar do possível efeito adjuvante e protetor que óleos minerais ou vegetais podem exercer pós associação com fungos entomopatogênicos, os possíveis efeitos nocivos ao meio ambiente devem ser estudados. Bukhari et al., (2011) realizaram estudos utilizando formulações a base óleo sintético Shellsol T e além de comprovar a sinergia com fungos entomopatogênicos, este óleo em concentrações superiores a 1g / litro tem baixa toxicidade para peixes, invertebrados aquáticos e microrganismos. Helmy et al., (2012) revisaram sobre óleo mineral e os efeitos no meio ambiente, seres vivos incluindo humanos, e citam que, o óleo mineral é seguro para estes, além disso o óleo mineral não teria um possível efeito residual pela sua capacidade de se dissipar por evaporação. Neste estudo, o óleo mineral a

0,1% foi de baixa toxicidade para larvas de *A. aegypti*, por isso é possível que nesta concentração, o óleo possa ser seguro para outros microrganismos aquáticos quanto utilizado nesta concentração. No entanto, para comprovar essa segurança os possíveis efeitos tóxicos sobre o meio ambiente precisam ser esclarecidos.

Ao serem realizados os experimentos com as formulações oleosas, o isolado de *B. bassiana* CG479 em formulação oleosa de blastosporos foi capaz de reduzir 91,44% a sobrevivência das larvas e quando em formulação de conídios, reduziu 83,78%; no isolado CG206 as formulações de blastosporos e conídios reduziram 83,56% e 87,67% a sobrevivência das larvas e no isolado ARSEF2211 as formulações de blastosporos apresentaram reduções de variam entre 82,33% a 88,89% e as formulações de conídios as os percentuais de redução da sobrevivência variaram entre 72,56% (10^8) e 83% (10^7) corroborando os resultados de pesquisas recentes (GOMES et al., 2015; CAMARGO et al., 2012; ANGELO et al., 2010) se mostrando então que óleo mineral pode ser uma boa adjuvante para preparação de formulações fúngicas.

É interessante o observar que o tratamento com suspensões de blastosporos ou conídios obtivemos bons resultados no cálculo do tempo letal que variou entre 2 dias à 7 dias, porém as formulações a base de óleo mineral apresentaram, além de menores percentuais de sobrevivência em menores concentrações (variando entre 8,56% a 27,44% nas formulações 10^7 blastosporos ou conídios mL^{-1} de todos os isolados testados), o tempo letal também foi menor, variando entre 1 ou 2 dias, o que corrobora os resultados obtidos por Gomes et al., (2015) ao ver menores percentuais de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* ao fazer associação de óleo vegetal com fungo *M. anisopliae*.

Estudos realizados por But et al., (2013) mostraram que conídios de *M. anisopliae* neste ambiente aquático em contanto com larvas de *A. aegypti* expressam enzimas necessárias para o sucesso da infecção com a Pr1 e adesinas (Mad1 e Mad2) (detectadas nas fezes) mas não conseguem se aderir firmemente a superfície do mosquito. Essa expressão de enzimas apresentada mostra que os conídios tentam dar continuidade ao processo de parasitismo, mas pela interação ineficaz com a larva esse processo não prosseguiu. O Processo de infecção do fungo não continua nem mesmo por produção de mucilagem que se dilui em ambiente aquático dificultando assim a interação parasita hospedeiro; já o conídio uma vez presente no aparelho digestório do inseto, não germina, dessa forma não parasita a larva de *A. aegypti* nem mesmo conseguiu causar uma ativação da cascata inflamatória de maneira adequada e sendo totalmente eliminado pelas fezes do inseto.

Fungos entomopatogênicos podem produzir toxinas destruxinas quando produzidos por *M. anisopliae* ou beuvericina por *B. bassiana* que são dicitlopeptídeos e que muitas vezes é alvo de estudos sobre sua participação na virulência de diversos hospedeiros. Em *A. aegypti* a toxina beuvericina foi estudada por Daniel et al., (2017), relacionando a presença destas toxinas com a mortalidade em larvas de terceiro instar de *A. aegypti*. Porém But et al., (2013), citaram que apesar de relatos sobre morte de larvas de *A. aegypti* pela produção da toxina fúngica destruxina (produzida por alguns isolados de *M. anisopliae*) em seus estudos não foi encontrado destruxina nas larvas mortas, descartando assim a morte por ação de toxinas. No nosso estudo, porém as toxinas produzidas por *M. anisopliae* e *B. bassiana* não foram verificados neste ensaio biológico, mas que serão objetos de estudos posteriores.

O que foi apresentado por But et al., (2013) é que o mosquito morreria acidentalmente por múltiplos fatores como uma apoptose induzida por estresse por conta dos mecanismos de proteção ativadas pelo conídio em ambiente inóspito; por ativação da enzima “caspase” envolvida no processo de morte celular do mosquito; por interações mecânica com o hospedeiro que levariam a obstrução do sifão respiratório resultando em asfixia; produção de enzimas proteolíticas (Pr1 e Pr2) principalmente Pr1, produzida no trato digestório da larva no qual o autor verificou sua relação com a morte das larvas ao se usar inibidores de Pr1 e conseqüentemente menor mortalidade das larvas. Apesar de neste trabalho não serem verificados a real relação da morte das larvas o que as afirmativas feitas por But et al. (2013) possam estar relacionadas com este trabalho.

6 CONCLUSÕES

Após todas as avaliações realizadas neste trabalho foi possível concluir que:

- A velocidade de rotação e o tempo de agitação influenciam na produção de blastosporos dos isolados ARSEF2211, CG479 e CGG206.
- Blastosporos e conídios foram igualmente eficazes para controle de larvas de *A. aegypti*.
- As formulações a base de óleo mineral, tanto de blastosporos quanto de conídios, se mostraram mais eficazes que as suspensões aquosas. Confirmando a hipótese de que o óleo como adjuvante potencializa a performance dos fungos testados.

- O óleo mineral em concentração superior a 0,1% se mostrou tóxico para larvas de *A. aegypti*.
- Os isolados ARSEF2211, CG479 e CGG206, IBCB481 e CG 153 podem ser usados no controle *in vitro* de larvas de *A. aegypti*.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÁMEK, L.; Submerge Cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). **Folia Microbiologia**, v.10, p.255-257, 1963.

AL-ABDELY, H.M.; Zika an emerging teratogenic virus. **Saudi Medical Journal**, v.37, p.831-833, 2016.

ALKHAIBARI, A. M.; CAROLINO, A. T.; BULL, J. C.; SAMUELS, R. I.; BUTT, T. M.; Differential Pathogenicity of *Metarhizium* Blastospores and Conidia against Larvae of Three Mosquito Species. **Journal of Medical Entomology**, v.54, p.696–704, 2017.

ALKHAIBARI, A. M.; CAROLINO, A. T.; YAVASOGLU, S. I.; MAFFEIS, T. *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. **Plos Pathogens**, v.12, p.1-19, 2016.

ALVES, S.B.; Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. FEALQ: Piracicaba, p.289–382, 1998.

ANDRADE, P.P.; ARAGÃO, F.J.L.; DELLAGOSTIN, W.C.O.; FINARDI-FILHO, F.; HIRATA, M.H.; LIRA-NETO, A.C.; MELO, M.A.; NEPOMUCENO, A.L., NÓBREGA, F.G.; SOUSA, G.D.; VALICENTE, F.H.; ZANETTINI, M.H.B.; Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. **Bolletín of the World Health Organization**. v.94, p.766-771, 2016

ANGELO, I.C.; ALVES, V.T.M. TUNHOLI, V.M.; PERINOTTO, W.M.S; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; BEZERRA, S.Q.; PINHEIRO, J.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; Physiological changes in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) experimentally infected with entomopathogenic fungi. **Parasitology Research**, v.114, p.219-225, 2014. *anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007 a.

ARAÚJO, A.P.; DINIZ, D.F.A.; BARROS, E.H.R.A.; OLIVEIRA, C.M.F.; AYRES, C.F.J.; MELO-SANTOS, M.A.V.; REGIS, L.N.; SILVA-FILHA, M.H.N.; The susceptibility of *Aedes*

aegypti populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. **Parasites and Vectors**. v.6, p.1-9, 2013.

BARLETTA, F.; SILVA-NASCIMENTO, M.C.L.; TALYULI, O.A.C.; OLIVEIRA, J.H.M.; PEREIRA, L.O.R.; OLIVEIRA, P.L.; SORGINE, M.H.F.; Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. **Parasites and vectors**, v.10, p.126-132, 2017.

BEZERRA, E.B; FERNANDES, C.R.M; SOUZA, J.T; FREITAS, E.M; SANTOS, K; Efeito da Qualidade da Água no Ciclo de Vida e na Atração para Oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.3, p.1016-1023, 2010.

Bischoff, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A.; A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v.101, p.512–530, 2009.

BRAGA, I.A.; VALLE, D.; *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Revista Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v.16, p 113 - 118, 2007 a.

BRAGA, I.A.; VALLE, D.; *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Revista Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v.16, p.279-293, 2007 b.

BRASIL. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil v48 n°43 – 2017 disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>.

BUTT, T. M.; GREENFIELD, B. P. J.; GREIG, C.; MAFFEIS, T. G. G.; TAYLOR, J. W. D.; PIASECKA, J.; EASTWOOD, D. C.; *Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death, **Plos One**, v.8, p.1-11, 2013.

CAMARGO, M.G.; GOLO P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO S.; BITTENCOURT V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology** v.188, p.140–147, 2012.

CAVALCANTI, L.P.G.; PONTES, R.J.S.; REGAZZI, A.C.F.; JÚNIOR, F.J.P.; FRUTUOSO, R.L.; SOUSA, E.P.; FILHO, F.F.D.; LIMA, J.W.O.; Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, v.41, p.638-44, 2007.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L.; Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz, Reimpressão CAP. 3, 1998.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O.; DDT (dicloro difenil tricloetano): Toxicidade e contaminação ambiental – Uma revisão. **Química Nova**, v.25, p.995 – 1002, 2002.

DANIEL, J.F.S.; SILVA, A.A.; NAKAGAWA, D.H.; MEDEIROS, L.S.; CARVALHO, M.G.; TAVARES, L.J.; ABREU, L.M.; RODRIGUES-FILHO, E.; Larvicidal Activity of *Beauveria bassiana* Extracts against *Aedes aegypti* and Identification of Beauvericins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, p.1003-1013, 2017.

DIAS, L. S.; MACORIS, M. L.G.; ANDRIGHETTIS, M. T. M.; OTRERAS, V. C. G.; DIAS, A. S.; BAUZER, L. G. S.R.; RODOVALHO, C. M.; MARTINS, A. J.; Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **Plos One**, v.12, p.1-16p, 2017.

DINIZ, M.M.C.S.L; HENRIQUE, A.D.S.; LEANDRO, R.S.; AGUIAR, D.L.; BESERRA, E.B.; Resistência de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. **Revista de Saúde Pública**, v.48, p.775-782, 2014.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R.; Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.18, p.283-285, 2015.

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

DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; SUM-MOON, YONG.; CHURCHILL, A.C.L.; GIBSON, D.M.; Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. **Current Genetics**, v.58, p.105–116, 2012.

DUARTE, G. F. **Viabilidade de massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* em filme de água e susceptibilidade a *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana***. 2014. 61p. Dissertação (Medicina Tropical e Saúde Pública). Universidade Federal de Goiás. Goiás.2014.

DUARTE, G.; MORON, A.F.; TIMERMAN, A.; FERNANDES, C.E.; NETO, C.M.; FILHO, G.L.A.; JUNIOR, H.W.; SANTO, H.F.B.E.; STEIBEL, J.A.F.; FILHO, J.B.; ANDRADE, J.B.B.; BURLÁ, M.; SÁ, M.F.S.; BUSSO, N.E.; GIRALDO, P.C.; SÁ, R.A.M.; JUNIOR, R.P.; MATTAR, R.; FRANCISCO, R.P.V. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.39, p.235–248, 2017.

ERLER, F.; ATEs, A.O.; Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agents against the June beetle. **Journal of Insect Science**. v.15 p.1-7, 2015.

FALVO, M. L.; PEREIRA-JUNIOR, R. A.; RODRIGUES, J.; LOPEZ LASTRA, C. C.; GARÇÍA, J. J.; FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C.; UV-B radiation reduces in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* s.l. but does not affect virulence in fungus treated

Aedes aegypti adults and development on dead mosquitos. **Journal of Applied Microbiology**, v.121 p.1710-1717, 2016.

FEITOSA, F.R.S.; SOBRAL, I.S.; SILVA, M.S.F.; JESUS, E.N.; Estratégias de prevenção e controle da dengue em Aracaju: Potencialidades e fragilidades. **Revista Caminhos de Geografia**, v.17 p.149-168, 2016.

FINKLER, C.L.L.; Controle de insetos: Uma breve revisão. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v.8 e 9, p.169-189, 2011/2012.

FREITAS, R.M.; AVENDANHO, R.C.; SANTOS, R.; SYLVESTRE, G.; ARAU, S.C.; LIMA, P.B.; MARTINS, A.J.; COELHO, G.E.; VALLE, D.; Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. **Plos one**. v.9, p.1-10, 2014.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília, 2002.

GARZA-HERNANDEZ, J.A.; RODRIGUEZ-PEREZ, M.A, SALAZAR, M.I.; RUSSELL, T.L.; ADELEKE, M.A.; LUNA-SANTILLANA, E.J.; REYES-VILLANUEVA, F.; Vectorial Capacity of *Aedes aegypti* for Dengue Virus Type 2 Is Reduced with Co-infection of *Metarhizium anisopliae*, **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.7, p.1-5, 2013.

GARZIERA, L.; PEDROSA, M.C.; SOUZA, F.A.; GOMEZ, M.; MOREIRA, M.B.; VIRGINIO, J.F.; CAPURRO, M.L.; CARVALHO, D.O.; Effect of interruption of overflooding releases of transgenic mosquitoes over wild population of *Aedes aegypti*: two case studies in Brazil. **The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 164, p.327–339, 2017.

GOLO, P.S.; GARDNER, D.R.; GRILLEY, M.M.; TOKEMOTO, J.Y.; BRASKNOF, S.B.; PIRES, M.S.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.P.; ROBERTS, D.W.; Production of Destruxins from *Metarhizium* spp. Fungi in Artificial Medium and in Endophytically Colonized Cowpea Plants. **Plos One**, v.9. p. 1-9, 2014.

GOMES, A.C.; SILVA, N.N.; BERNAL, R.T.I.; LEANDRO, A.S Estimação da infestação predial por *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) por meio da armadilha Adultrap®. **Revista Epidemiologia e Serviço de Saúde**. V.17 p.293-300, 2008.

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

GREENFIELD, BP. J.; LORD, A.M.; DUDLEY, E.; BUTT, T.M.; Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. **The Royal Society open Science**, v,1 p.1-9, 2014.

GUZMAN, M.G.; HARRIS, E.; Dengue. **Journal the Lancet** v. 385, 453–465p 2015.

HAWKSWORTH, D.L. **Micologist's handbook**. 2^aed. England, Kew Surrey: CAB Press, 1977. 231p

HELMY, E.I.; KWAIZ, F. A.; EL-SAHN, O.M.N.; The usage of mineral oils to control insects. **Egypt. Acad. J. Biol. Sci.**, v. 5, p.167 -174, 2012.

HOLDER, D. J.; KEYHANI, N.O. Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to Substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 5260–5266, 2005.

KLEESPIES, R. G.; ZIMMERMANN, G.; Production of Blastospores by Three Strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in Submerged Culture. **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p.127-135, 1991.

LIMA, E.P.; FILHO, A.M.O.; LIMA, J.W.O.; JÚNIOR, A.N.R.; CAVALCANTI, L.P.G.; PONTES, R.J.S.; Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.3, 259-263p., 2006.

LIMA, J.B.P.; ROSA-FREITAS, M.G.; RODOVALHO, C.M.; BRAGA, I.A.; Field and semi-field evaluation of *Bacillus Thuringiensis* var.israelensis versus Temephos® in *Aedes aegypti* control. **Journal of Health and Biology Science** v.4 p.65-74, 2017.

MARCONDES, D. M.; C. B., XIMENES, M.F.F. M.; Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, p.4–10, 2016.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA JR.C. Í., FERNANDES, É. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M.; Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology** in impression MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; JÚNIOR, Í. D.; Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.127, p.11-20, 2015.**Environmental Monitoring and Assessment** v.189, p.1-9. 2015.

MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G.; Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology**, v.37, p.155-162, 1990.

NETO, F.C.; Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** V.30 p.279-285, 1997.

OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. C. S. Microcephaly and Zika vírus. **Jornal de Pediatria**, v.92, p.103-105, 2016.

ORLANDELLI, R.C.; PANPHILE, J.A.; Fungo entomopatogênico *metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. **Revista Saúde e biologia**. v.6, p.79-82, 2011.

OTTATI-DE-LIMA, E. L.; FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. E. M.; GASSEN, M. H.; WENZEL, I. M. ALMEIDA, A. M.B.; ZAPPELLINI, L. O.; Liquid production of entomopathogenic fungi and ultravioleta radiation and temperature effects on produced propagules. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.81, p. 342-350, 2014.

POWELL, J.R; TABACHINICK, W.J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.108 p11-17, 2013.

RAGAVENDRAN, C.; DUBEY, N.K.; NATARAJAN, D.; *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potente fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **The Royal Society of Chemistry**. v.7, p.3838–3851, 2017.

ROBERTS, D.W.; ST LEGER, R.J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

SALJE, H.; LESSLEER, J.; BERRY, I.M.; MELENDREZ, M.C.; ENDY, T.; KALAYANAROOJ, S.; A-NUEGOONPIPAT, A.; CHANAMA, S.; SANGKIJPORN, S.; KLUNGTHONG, C.; THAISOMBOONSUK, B.; NISALAK, A.; GIBBONS, R.V.; IAMSIRITHAWORN, S.; MACAREO, L.R.; YOON, I.; SANGARSANG, A.; JARMAN, R.J.; CUMMINGS, D.A.T.; Dengue diversity across spatial and temporal scales: Local structure and the effect of host population size. **Science** v.355, p.1302–1306, 2017.

SCHOLTE, E.J.; KNOLS, B.G.J.; TAKKEN, W.; Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v 91, p.43–49, 2012.

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

- SILVA, C.M.; COUTINHO, G.S.L.; OLEA, R.S.G.; A luta humana contro o *A. aegypti*. **Caderno de Pesquisa de São Luís**, v.19, p.105-113, 2012
- SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H.; CAVAGUCHI, S.A.; Efeito de Agroquímicos à Base de Óleo Mineral e Vegetal sobre a Viabilidade dos Fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **Bioassay**, v.1 p.1-5, 2006.
- SREE, K. S.; PADMAJA, V. Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. **Toxicon**, v.51, p.1140-1150, 2008.
- TSUNODA, T.; FUKUCHI, A.; NANBARA, S.; TAKAGI, M. Effect of body size and sugar meals on oviposition of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) **Journal of Vector Ecology**. v.35, p.56-60, 2010.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society** v. 66, p. 407-411, 1976.
- VALICENTE, F.H. Controle biológico de pragas com entomopatogênos. **Informe Agropécuário**.v30 p.48-55, 2009.
- VALLE, D.; No magic bullet: citizenship and social participation in the control of *Aedes aegypti*. **Epidemiologia e serviço de saúde**.v.25, p.1-4, 2016.
- WANG, C.; WANG. S.; Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements, **The Annual Review of Entomology**, v.62, p.73–90, 2017.
- WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J. L. M.; Ute MACKENSTEDT, U. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases** v.7, p.768–771, 2016.
- WEMELINGERS, D.E.; CARVALHO, R.W.; Métodos e procedimentos usados no controle do *Aedes aegypti* na bem-sucedida campanha de proflaxia da febre amarela de 1928 e 1929 no Rio de Janeiro, **Revista Epidemiologia e Serviço da Saúde** v.25 p.837-844, 2016.
- ZARA, A.L.S.A.; SANTOS, S.M.; OLIVEIRA, E.S.F.; CARVALHO, E.S.F.; COELHO, G.E.; *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Revista Epidemiologica e Serviço de Saude**, v.25, p.391-404,2016.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553-596, 2007 b.

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