

COMBINAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM O  
INSETICIDA DIFLUBENZURON E O ENCAPSULAMENTO DE  
*Metarhizium anisopliae* VISANDO O CONTROLE DE LARVAS DE  
*Aedes aegypti*

**CÁTIA OLIVEIRA DE PAULA MORAIS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MAIO – 2015

COMBINAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM O  
INSETICIDA DIFLUBENZURON E O ENCAPSULAMENTO DE  
*Metarhizium anisopliae* VISANDO O CONTROLE DE LARVAS DE  
*Aedes aegypti*

**CÁTIA OLIVEIRA DE PAULA MORAIS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MAIO – 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 186/2015

Morais, Cátia Oliveira de Paula

Combinação de fungos entomopatogênicos com o inseticida diflubenzuron e o encapsulamento de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de larvas de *Aedes aegypti* / Cátia Oliveira de Paula  
Morais. – 2015.

95 f. : il.

Orientador: Richard Ian Samuels

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 78 – 95.

1. *Aedes aegypti* 2. Diflubenzuron 3. *Metarhizium anisopliae* 4. *Beauveria bassiana* 5. Encapsulamento I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD–  
M827c

COMBINAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM O  
INSETICIDA DIFLUBENZURON E O ENCAPSULAMENTO DE  
*Metarhizium anisopliae* VISANDO O CONTROLE DE LARVAS DE  
*Aedes aegypti*

**CÁTIA OLIVEIRA DE PAULA MORAIS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutorado em Produção Vegetal.

Aprovada em 27 de maio de 2015

Comissão Examinadora

---

Prof. Dr. Francisco José Alves Lemos (D.Sc., Ciências Biológicas) – UENF

---

Prof. Dr. Cláudio Luiz Melo de Souza (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

---

Prof. Dr. Milton Erthal Junior (D.Sc., Produção Vegetal) – IFFGuarus

---

Dr. Adriano Rodrigues de Paula (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF  
(Coorientador)

---

Prof. Dr. Richard Ian Samuels (Ph.D. Patologia de Insetos) – UENF  
(Orientador)

*“Porque o Senhor dá sabedoria,  
e da sua boca vem o conhecimento  
e o entendimento.” Pv 2:6.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos benefícios concedidos, amor, fidelidade, enfim por permitir essa vitória. Meu Deus tudo que tenho, tudo que sou, eu devo a Ti!!!

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia pela oportunidade de realização deste curso;

Agradeço ao meu pai Ailton que torceu muito por mim, dedicou sua vida para realização dos meus sonhos, mas não pôde estar comigo nesse momento tão especial, mas sei que está com Deus. Muito Obrigada meu querido pai!!!

Agradeço à minha mãe Jacira, pelo amor incondicional, aos meus irmãos, Geraldo, Gerson e Isac, cunhadas e sobrinhos pelas orações, pelo incentivo e pelo amor;

Agradeço ao meu esposo Eduardo, pelo amor, pela ajuda, pela sabedoria, pela paciência. Você faz parte desta conquista!

Agradeço ao Professor Richard, pela orientação, oportunidade e sabedoria;

Agradeço ao Adriano, pela coorientação, ajuda e incentivo;

Agradeço aos amigos do laboratório, Denise, Arli, Verônica, Talles, Aline, Simone, Mariana, Leila, Lala, Josi, pelas conversas, pela amizade, pela ajuda, pelo companheirismo, essa turma é maravilhosa!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	04
2.1 Bioecologia de <i>Aedes aegypti</i> .....	04
2.2 Controle de <i>Aedes aegypti</i> .....	07
2.2.1 Controle físico.....	08
2.2.2 Controle químico.....	08
2.2.3 Controle biológico.....	11
2.3 Controle microbiano com fungos entomopatogênicos.....	13
2.3.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> no controle de insetos vetores.....	14
2.3.2 <i>Beauveria bassiana</i> no controle de insetos vetores.....	16
2.4 Interação dos fungos entomopatogênicos com inseticidas.....	17
2.5 Encapsulamento de fungo em matriz de alginato de sódio.....	20
3. OBJETIVO GERAL.....	25
3.1 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
4.1 Criação de <i>Aedes aegypti</i> .....	27
4.2 Produção de fungos entomopatogênicos .....	28
4.3 Separação e preparo da suspensão dos conídios do fungo .....	28
4.4 Ajuste da curva padrão de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	29

4.5 Encapsulamento de <i>Metarhizium anisopliae</i> em alginato de sódio.....	29
4.6 Liberação do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado em alginato de sódio.....	30
4.7 Teste de sobrevivência larval.....	30
4.8 Experimento 1: Determinação da curva de sobrevivência das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após exposição ao diflubenzuron .....	30
4.9 Experimento 2: Efeitos dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> em associação com diflubenzuron sobre as larvas de <i>Aedes aegypti</i>	31
4.10 Experimento 3: Efeitos do polietilenoglicol e dos processos de secagem no encapsulamento de <i>Metarhizium anisopliae</i> em alginato de sódio sobre as larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	32
4.11 Experimento 4: Avaliação da virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado quando produzido a partir de conídios em arroz sem utilizar a máquina separadora de esporos.....	33
4.12 Experimento 5: Curva de sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado em alginato de sódio .....	33
4.13 Experimento 6: Efeito do tipo de embalagem, condições e tempo de armazenamento na virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	33
4.14 Experimento 7: Efeito da exposição ambiental de <i>Metarhizium anisopliae</i> com ou sem encapsulamento sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	34
4.15 Experimento 8: Avaliação da persistência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado em alginato de sódio e utilizado para infecção de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Experimento 1: curva de sobrevivência das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após exposição ao diflubenzuron .....	37
5.2 Experimento 2: Efeitos dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> em associação com diflubenzuron sobre as larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	39
5.3 Curva padrão das concentrações do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	42
5.4 Características de <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado em alginato de	43



sódio.....	
5.5 Liberação dos conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado em matriz de alginato de sódio.....	44
5.6 Experimento 3: Efeitos do polietilenoglicol e dos processos de secagem no encapsulamento de <i>Metarhizium anisopliae</i> em alginato de sódio sobre as larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	45
5.7 Experimento 4: Avaliação da virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado quando produzido a partir de conídios em arroz sem uso da máquina separadora.....	47
5.8 Experimento 5: Curva de sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao <i>Metarhizium anisopliae</i> encapsulado em alginato de sódio .....	47
5.9 Experimento 6: Efeito do tipo de embalagem, condições e tempo de armazenamento na virulência de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	50
5.10 Experimento 7: Efeito da exposição ambiental de <i>Metarhizium anisopliae</i> com ou sem encapsulamento sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	58
5.11 Experimento 8: Avaliação da persistência do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre as larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	60
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÕES .....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## RESUMO

O controle convencional de *Aedes aegypti* é baseado no uso de produtos químicos, porém o uso indiscriminado tem proporcionado o aumento de resistência desse vetor. Uma das alternativas para manejar a resistência é usar inseticidas alternativos, como por exemplo, o diflubenzuron, um regulador de crescimento. Além disso, a interação de concentrações baixas de inseticidas quando aplicados junto com fungos entomopatogênicos é outra opção de controle a ser investigada. Porém, os fungos são altamente vulneráveis às condições ambientais, dessa forma, o encapsulamento do fungo em matriz de alginato pode proteger o micro-organismo. O presente trabalho visou avaliar a interação entre o diflubenzuron e os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, como também encapsular o fungo *M. anisopliae* visando o controle de larvas de *A. aegypti*. As curvas de sobrevivência nos testes de interação dos fungos com inseticida foram estatisticamente diferentes ( $P < 0.0001$ ). A combinação de *M. anisopliae* com diflubenzuron apresentou interação sinérgica, proporcionando 28,9% de larvas sobreviventes e tempo médio de sobrevivência de 4 dias. A combinação de *B. bassiana* com o diflubenzuron não apresentou interação, com 46,7% de larvas sobreviventes e  $S_{50}$  de 6,5 dias. As esferas de alginato de sódio produzidas com o fungo *M. anisopliae* apresentaram formato arredondado quando úmidas e após a secagem, as esferas apresentaram formato irregular. O processo de secagem, liofilização ou BOD, não interferiu no formato e nem no peso seco das esferas produzidas ( $F_{(1,5)} = 0,501$ ;  $P > 0,05$ ). A maior liberação de *M. anisopliae*

encapsulado foi no segundo dia de imersão na água, com  $6,5 \times 10^3$  conídios mL<sup>-1</sup>. As larvas expostas ao *M. anisopliae* encapsulado, revestido com PEG com textura fina e desidratado no liofilizador (P1L) apresentaram sobrevivência de 38,9%, menor que os demais tratamentos ( $F_{(4,14)} = 34,945$ ;  $P < 0,05$ ). O tratamento com *M. anisopliae* encapsulado sem prévia separação do arroz permitiu a sobrevivência de 100% de larvas. As concentrações de *M. anisopliae* encapsulado com 0,25 e 0,5 g de conídios/ 50 mL promoveram o menor percentual de sobrevivência larval entre os tratamentos, com 24,3 e 28,9% de larvas sobreviventes, respectivamente ( $F_{(8, 26)} = 18,382$ ;  $P < 0,05$ ) e tempo médio de sobrevivência de 7 dias. *M. anisopliae* não encapsulado, armazenado na geladeira e embalado com papel manteve sua virulência após trinta dias de armazenamento com 73,3% de larvas sobreviventes. *M. anisopliae* encapsulado, armazenado na geladeira e embalado com papel teve a menor redução na virulência, proporcionando 78,9% de larvas sobreviventes com 60 dias de armazenamento. O *M. anisopliae* encapsulado expostos às condições ambientais manteve a virulência sobre as larvas de *A. aegypti*. Os tratamentos com o fungo encapsulado e o não encapsulado, após 10 dias de persistência na água, permitiram que 100% das larvas sobrevivessem. O uso de fungos junto com baixas concentrações de inseticidas é interessante para aumentar a eficiência do controle de mosquitos e a encapsulação em matriz de alginato é útil para proteger o fungo das flutuações ambientais.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*, diflubenzuron, fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, controle biológico e encapsulamento.

## ABSTRACT

In order to control *Aedes aegypti*, chemical insecticides have been widely used, but their indiscriminate use has led to increased development of resistance. One of the alternatives for managing resistance is to use insecticides such as diflubenzuron, an insect growth regulator. Furthermore, the interaction of low concentrations of insecticides together with entomopathogenic fungi could be an alternative control option. However, fungi are highly vulnerable to environmental conditions, therefore, encapsulation of the fungus in an alginate matrix could protect the micro-organism from adverse environmental conditions. This study aimed to evaluate the interaction between diflubenzuron, *Metarhizium anisopliae* and *Bassiana bassiana*, and also encapsulate *M. anisopliae* for the control of larvae of *A. aegypti*. The survival curves for the interaction of the fungi and insecticide were statistically different ( $P < 0.0001$ ). The combination of *M. anisopliae* with diflubenzuron had a synergistic interaction, resulting in 28.9% larval survival and a  $S_{50}$  of 4 days. The combination of *B. bassiana* with diflubenzuron showed no interaction, 46.7% surviving larvae  $S_{50}$  and 6.5 days. Sodium alginate beads produced with the fungus *M. anisopliae* had rounded shape when wet and after drying, the balls had irregular shape. The process of drying, using a freeze dryer or BOD did not influence the shape or weight of the dry beads ( $F_{(1,5)} = 0.501$ ,  $P > 0.05$ ). The highest levels of *M. anisopliae* conidial release following encapsulation were on the second day of immersion ( $6.5 \times 10^3$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ). Larvae exposed to *M. anisopliae* encapsulated and coated with

PEG with fine texture and dried using a freeze dryer (P1L) resulted in 38.9% survival, lower than the other treatments ( $F_{(4,14)} = 34.945$ ;  $P < 0.05$ ). The treatment with *M. anisopliae* encapsulated without prior separation from the rice, resulted in 100% larval survival. The concentrations of 0.25 and 0.5 g/ 50 mL of *M. anisopliae* encapsulated conidia promoted the lowest percentage of larval survival between treatments, with 24.3 and 28.9% of surviving larvae, respectively ( $F_{(8, 26)} = 18.382$ ;  $P < 0.05$ ) and a median survival time of 7 days. Unencapsulated *M. anisopliae* stored in the refrigerator and packed with paper maintained its virulence after thirty days of storage with 73.3% larval survival. Encapsulated *M. anisopliae*, stored in the refrigerator and wrapped in paper had the lowest reduction in virulence, with 78.9% of surviving larvae following 60 days of storage. Encapsulated *M. anisopliae* exposed to environmental conditions maintained virulence against *A. aegypti* larvae. The treatment with the encapsulated and unencapsulated fungus, after 10 days persistence water, resulted in 100% of the larvae survived. The use of fungi with low concentrations of insecticides is interesting to increase the efficiency of mosquito control and encapsulation in alginate matrix is useful for protecting the fungus from the environmental fluctuations.

**Keywords:** diflubenzuron, *Aedes aegypti*, entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, biological control and encapsulation.

## 1. INTRODUÇÃO

O principal vetor da dengue, febre amarela e chikungunya no Brasil e no mundo é o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762; WHO, 2015). *A. aegypti* é uma espécie predominantemente doméstica, antropofílica e hematófaga, que faz de depósitos artificiais de água limpa os locais preferenciais para a postura de seus ovos. Este inseto desenvolve-se por metamorfose completa, com o ciclo de vida compreendido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Christophers, 1960). O ciclo de vida desse inseto está intimamente ligado às condições ambientais, que são fatores propícios ao desenvolvimento do mosquito e ao aumento de criadouros (Costa *et al.*, 2008).

No Brasil, *A. aegypti* é encontrada em todos os estados da federação, com grande incidência nos principais centros urbanos, ambiente no qual encontra alimento em abundância, locais de repouso e reprodução. Essa espécie desloca dentro das cidades e entre as cidades através do fluxo de pessoas que podem carregar o vírus e o fluxo de matérias e bens que podem levar os ovos do mosquito, (Catão, 2012).

Em 2015, no Brasil foram registrados 745.957 casos de dengue, sendo confirmados 229 óbitos até a semana epidemiológica 15 (04/01/15 a 18/04/15). A região Sudeste teve o maior número de casos notificados (489.636 casos; 66,2%) em relação ao total do país. No estado do Rio de Janeiro foram registrados 22.484 casos (Ministério da Saúde, 2015). Nos quatro primeiros meses do corrente

ano, foram registrados cerca de 300 casos de dengue na cidade de Campos dos Goytacazes (Secretaria Municipal de Saúde de Campos dos Goytacazes, 2015).

Além dos vírus da febre amarela e dengue, o mosquito *A. aegypti* pode transmitir o vírus Chikungunya (CHIKV), que causa uma doença infecciosa e febril. Até a semana epidemiológica 15 do corrente ano foram notificados 3.135 casos autóctones de febre de chikungunya no país (Ministério da Saúde, 2015).

Nesse cenário epidemiológico, os programas nacionais de controle do mosquito utilizam estratégias de ação fundamentadas na eliminação do vetor (FUNASA, 2001), visto que não existe tratamento específico, nem vacina disponível para prevenir a infecção pelo vírus da dengue (WHO, 2009) e nem da febre chikungunya (WHO, 2015). O controle químico é o principal método utilizado pelo poder público para diminuir as epidemias. Entretanto, o uso contínuo de inseticida tem proporcionado o aparecimento de populações de mosquitos resistentes (Braga *et al.*, 2004; Beserra *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2006, 2011).

Uma das alternativas para manejar a resistência de insetos a inseticidas é utilizar inseticidas com modo de ação distinto e aplicações alternadas, visando a reduzir a taxa de resistência ou postergar a seleção de indivíduos resistentes. Nesse intuito, diferentes classes de inseticidas têm sido inseridas nos programas de controle da dengue, como os reguladores de crescimento de insetos que formam um grupo de inseticidas da 3ª geração (WHO, 2005), sendo notório ressaltar o diflubenzuron, indicado pelo Ministério da Saúde para controle de larvas de *A. aegypti*. Esse larvicida atua como inibidor da síntese de quitina durante o processo de muda (Ministério da Saúde, 2009).

Além de novas classes de inseticidas, o controle de vetores e pragas associando inseticidas e entomopatógenos pode ser uma alternativa viável, visto que tem benefícios econômicos e ecológicos, como diminuição dos riscos de contaminação ambiental e de reduzir o aparecimento de insetos resistentes aos inseticidas (Alves *et al.*, 1998a). Trabalhos têm mostrado aumento na eficiência dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* quando combinados com inseticidas (Furlong e Groden, 2001; Hiromori e Nishigaki, 2001; Paula *et al.*, 2011).

Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são amplamente utilizados nos programas de controle biológico (Faria e Wraight, 2007). Trabalhos já mostraram a virulência desses fungos sobre vetores de

doenças, como *A. aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles arabiensis* (Paula *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Howard *et al.*, 2010; Kikankie *et al.*, 2011). Todavia, apesar da comprovada eficiência desses agentes de controle, seu uso em campo tem sido dificultado, pois são altamente vulneráveis às condições ambientais, como temperatura, umidade relativa e radiação solar (Sanyang *et al.*, 2000).

Nesse sentido, a formulação dos propágulos adquire grande importância para o controle microbiano, visto que pode proteger os patógenos da radiação solar, fornecer nutrientes para seu crescimento e favorecer o armazenamento. Além disso, pode aumentar a virulência, proporciona melhor praticidade na aplicação e maior preservação no ambiente; tornando, dessa forma, o patógeno apto a ser utilizado em condições de campo (Alves *et al.*, 1987).

As formulações para encapsular micro-organismos têm sido utilizadas em diversas áreas de pesquisa, com destaque para fitossanidade. Nessa técnica o encapsulado é acondicionado por matrizes poliméricas, as quais permitem sua liberação de forma controlada e sob condições específicas (Suave *et al.*, 2006).

O alginato de sódio pode formar matrizes que servem para encapsular diferentes produtos. Esse polímero vem sendo usado no encapsulamento de entomopatógenos, promovendo maior capacidade de sobrevivência dos fungos em condições de campo, além de ser solúvel em água e não tóxico ao fungo nem ao homem (Carballo, 1998). Liu e Liu (2009a) reportaram que o encapsulamento do fungo *M. anisopliae* em matriz de alginato de sódio permitiu a manutenção da sua viabilidade por seis meses.

O desenvolvimento de sistemas que permitem a liberação progressiva e controlada do fungo em meio aquoso pode manter ou ampliar a ação do entomopatógeno no controle de larvas de mosquitos, visto que, proporciona concentração constante, aumentando assim a sua eficácia. Portanto, torna-se necessária a investigação de formulações apropriadas para encapsular fungo *M. anisopliae* visando seu uso no controle de larvas de *A. aegypti*.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bioecologia de *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* pertencente ao filo Arthropoda, à classe Insecta, à ordem Diptera, à família Culicidae e ao gênero *Aedes* (Christophers, 1960) tem ampla distribuição geográfica, predominando nas áreas tropicais e subtropicais situadas entre os paralelos de latitudes 35° Norte e 35° Sul e nas zonas isotermas de 10°C em latitudes norte e sul (WHO, 2009), porém projeções de elevação de 2° C da temperatura no final do século XXI indicam um provável aumento na distribuição deste vetor no planeta (Githeko *et al.*, 2000).

Esse culicídeo é originário da África e chegou ao continente americano após desenvolver, em seu ambiente primário, grau significativo de sinantropia (Christophers, 1960). A capacidade de transmitir os vírus da dengue, febre amarela urbana e chikungunya torna o *A. aegypti* um problema de saúde pública. A dengue tem se destacado entre as enfermidades reemergentes e é considerada a mais importante das doenças virais transmitidas por artrópodes. Ocorre em mais de 100 países e expõe mais de 2,5 bilhões de pessoas ao risco de contraí-la nas áreas urbanas, suburbanas e rurais dos trópicos e subtropicais (WHO, 2009). Outra arbovirose com crescente incidência é a chikungunya, identificada em mais de 60 países na Ásia, África, Europa e Américas, com registros de 1.135.000 casos suspeitos nas ilhas do Caribe, países da América Latina e EUA, causando 176 mortes nos primeiros meses de 2015 (WHO, 2015).

A ocorrência das doenças anteriormente mencionadas está diretamente relacionada com a ecologia e distribuição do vetor, ecologia dos hospedeiros, variáveis ambientais e ocupação do espaço pelo homem (Forattini, 2002). Os fatores estruturais e conjunturais como concentração da população humana e aumento da mobilidade de pessoas também podem potencializar a propagação das doenças, favorecendo a expansão e a manutenção da circulação do vírus e seus vetores (Glasser e Gomes, 2002).

A dispersão do mosquito ocorre, principalmente, de forma passiva, por via terrestre, marítima e aérea, através de ovos depositados em pneus usados e adultos que se abrigam dentro de veículos (Eiras, 2005).

A dispersão ativa de *A. aegypti* é variável, sendo guiada pela busca de sítios apropriados de oviposição, geralmente o alcance não excede os 100 metros, porém, já foi demonstrado até 3 km, quando não havia recipientes para oviposição nas proximidades. Fora do período de alimentação, reprodução e dispersão, os mosquitos procuram abrigos com pouca luz, ausência de vento, umidade relativa do ar elevada e com pouco movimento para repousar (FUNASA, 2001).

O desenvolvimento pós-embrionário do mosquito *A. aegypti* é por holometabolia. Seu ciclo de vida compreende duas fases ecológicas distintas e interdependentes, sendo uma aquática, compreendendo as fases de ovo, larva e pupa, e uma terrestre correspondente ao mosquito adulto (Figura 1). O estágio larval possui quatro fases de desenvolvimento (FUNASA, 2001).

A postura dos ovos é realizada individualmente próxima à lâmina d'água, no instante da postura os ovos são brancos, mas adquirem coloração negra rapidamente. Os ovos são revestidos externamente por uma camada denominada de exocório, medem, aproximadamente 1 mm de comprimento e têm o contorno alongado e fusiforme. São resistentes à dessecação, podendo permanecer viáveis no campo, por mais de um ano, sendo observada eclosão com até 450 dias de quiescência. A fecundação ocorre durante a postura e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura (FUNASA, 2001).

A eclosão das larvas ocorre após o desenvolvimento embrionário em condições ambientais favoráveis. O principal estímulo para a eclosão é o contato do ovo com a água do criadouro. As larvas passam por quatro fases de desenvolvimento denominadas L1, L2, L3 e L4. Seu corpo é composto de cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é dividido em oito segmentos, a parte posterior e anal possui quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água. O período larval varia de quatro a sete dias (Forattini, 2002).

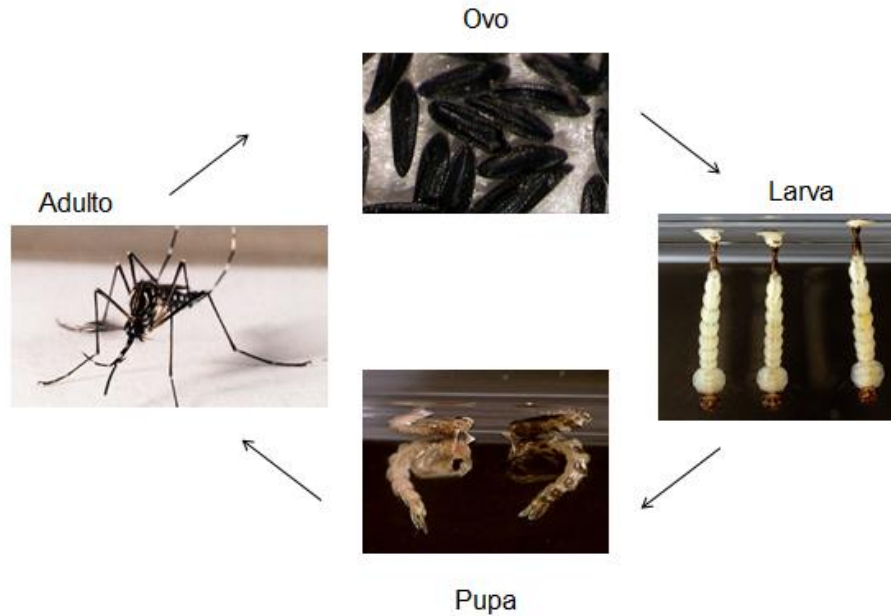
Na fase subsequente, têm-se as pupas, que possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen, com um par de tubos respiratórios ou trompetas. Neste

período, geralmente de dois a três dias, não ocorre alimentação e há metamorfose para estágio adulto (FUNASA, 2001).

Os adultos apresentam tórax enegrecido, ornamentado com desenho em forma de lira no mesonoto e faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais. O macho se distingue da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Permanecem vivos em condições de laboratório, geralmente, por dois a três meses, mas, na natureza, vivem em média trinta dias (Consoli e Oliveira, 1998).

Os machos e as fêmeas do mosquito alimentam-se de seiva de plantas, entretanto, as fêmeas necessitam das proteínas presentes no sangue do hospedeiro para a maturação dos ovos. Essa espécie é hematófaga, predominantemente doméstica e antropofílica. O número de ovos por postura depende da quantidade de sangue ingerido durante o repasto sanguíneo, mas geralmente uma fêmea produz em média 120 ovos (Forattini, 2002). Muitos vertebrados são fontes de repasto, inclusive o homem, que é picado, preferencialmente, nos pés e nas partes inferiores das pernas (Eiras, 2005).

As fêmeas de *A. aegypti* ovipositam em horários com pouca luminosidade, com um pico matutino e outro vespertino. Em condições de laboratório, a maior taxa de oviposição foi observada ao entardecer e 72 horas após a realização do repasto sanguíneo. Em campo, a periodicidade de oviposição foi entre a 9<sup>a</sup> e a 10<sup>a</sup> hora da fotofase e entre a 1<sup>a</sup> e a 2<sup>a</sup> hora do período da escotofase (Gomes *et al.*, 2006).



**Figura1-** Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.

## 2.2 Controle de *Aedes aegypti*

O controle de vetores em Saúde Pública visa prevenir a infecção mediante o bloqueio ou a redução da transmissão, sendo seus principais objetivos, o manejo dos problemas existentes, como surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade; a prevenção de epidemias ou a reintrodução de doenças; e a redução dos fatores de risco ambiental da transmissão. Para isso é necessário buscar o conhecimento sobre o hospedeiro humano, a doença, o vetor e o ambiente; e dispor dos recursos necessários para aplicação oportuna de medidas de controle (Braga *et al.*, 1999).

O controle efetivo dos vetores não pode depender de um só método e sim, de várias alternativas, adequadas à realidade local, que permitam sua execução de forma integrada e seletiva. O controle integrado trata do planejamento do controle, de acordo com as condições ambientais e a dinâmica populacional do vetor. São selecionados os métodos de controle apropriados e as populações do vetor devem ser mantidas em níveis baixos de infestação (OPS, 2005).

Nas últimas décadas, vem sendo reiterada a recomendação do controle integrado de *A. aegypti* com implementação descentralizada, envolvendo o poder público e a sociedade. As medidas mais utilizadas pelos programas de controle envolvem o controle físico, químico e biológico, sendo os dois primeiros grupos mais intensamente utilizados (San Martín e Brathwaite-Dick, 2007).

### **2.2.1 Controle físico**

No controle físico as medidas preventivas são direcionadas principalmente aos criadouros, constituindo-se de ações simples e eficazes, especialmente os cuidados a serem adotados pela população.

O princípio primordial é fundamentado no saneamento básico que visa à modificação do meio para reduzir as populações de *A. aegypti*, diminuindo o número de criadouros artificiais no ambiente por meio de medidas como a adequação dos serviços de água potável, com cobertura de depósitos que acumulam água, sistema de drenagem; obras de engenharia em habitações, destruição ou a destinação adequada de possíveis criadouros, coleta de resíduos sólidos e seletivos de materiais recicláveis, dificultando assim a oviposição das fêmeas em tais potenciais criadouros. Outra estratégia visa reduzir o contato humano com o vetor através de instalação de telas em janelas, mosquiteiros e uso de repelentes (Ministério da Saúde, 2009).

Silva e Gomes (2008) demonstraram que medidas mecânicas, como aplicações de resíduos de madeira e de casca de árvores entre as folhas de bromélias ornamentais, foram eficazes para evitar que larvas do mosquito *A. aegypti* desenvolvessem nos exemplares estudados, visto que, as plantas da família *Bromeliaceae* constituem criadouros naturais de várias espécies de culicídeos.

### **2.2.2 Controle químico**

O controle químico é baseado no uso de produtos químicos para eliminar ou controlar vetores e oferece como principais vantagens, a rapidez e a facilidade de atuação. Esse tipo de método é realizado para o controle do mosquito *A. aegypti* desde o início do século passado, com a primeira campanha contra a

febre amarela realizada em Cuba e no Panamá quando as residências foram tratadas com petróleo e piretrina. Na década de 40, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) se destacou como o principal agente químico utilizado nos programas de erradicação do mosquito realizados no continente americano, porém devido ao aumento de populações do mosquito resistentes, em 1960, esse inseticida foi substituído pelos organofosforados (OPAS, 2005).

O controle químico de *A. aegypti* realizado pelos órgãos públicos é direcionado para o tratamento focal, perifocal dos criadouros do vetor e aplicação espacial com equipamento de pulverização em ultrabaixo volume (UBV) no período de epidemia (Ministério da Saúde, 2009).

No tratamento focal, as ações são direcionadas para o controle das larvas, com aplicação periódica de larvicidas em recipientes que possam atuar como criadouros, quando a sua eliminação mecânica não é viável. Os inseticidas mais empregados para essa modalidade são os organofosforados e os reguladores de crescimento (Ministério da Saúde, 2009).

O organofosforado temefós é o inseticida mais utilizado nos municípios brasileiros para controle de larvas de *A. aegypti*. Esse inseticida atua inibindo irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase, que é importante na regulação dos níveis de acetilcolina, um neurotransmissor. Em condições normais, acetilcolinesterase catalisa a hidrólise da acetilcolina em ácido acético e colina, interrompendo a transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios. Porém, em insetos expostos aos organofosforados, ocorre o acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), provocando hiperatividade nervosa, distorção muscular, colapso do sistema nervoso, paralisia e morte do inseto (Braga e Valle, 2007).

A aplicação do temefós é realizada em ciclos bimestrais, em água estagnada e em reservatórios de água para uso doméstico, na concentração final de 1 ppm e formulação granulada (Ministério da Saúde, 2009).

Os reguladores de crescimento indicados pelo Ministério da Saúde para controle de larvas de *A. aegypti* estão divididos em dois grupos, inibidores da síntese de quitina (ISQ) e análogos do hormônio juvenil (AJH) (Ministério da Saúde, 2009). Os ISQ, como o diflubenzuron, novaluron e o triflumuron, atuam sobre as larvas, ocasionando a morte durante a ecdise. A larva não consegue eliminar a cutícula velha, devido à inibição da deposição de quitina (Mulla, 1995).

O diflubenzuron na concentração de 0,1 e 1 ppm ocasionou mortalidade de 100% em larvas de *A. aegypti* de terceiro estágio em período menor que uma semana. Foram observadas alterações morfológicas das larvas tratadas, como presença de vacúolos citoplasmáticos e grande quantidade de secreção na superfície apical do mesêntero, além do espessamento da cutícula, intensa atividade celular e alterações no corpo gorduroso, inibição da reabsorção da exocutícula e inibição da formação da cutícula nova (Borges *et al.*, 2004).

Relatório emitido pelo Ministério da Saúde mostrou a eficiência e a persistência de reguladores de crescimento utilizados no controle de larvas de *A. aegypti*. Nos ensaios realizados em condições simuladas de campo, a mortalidade ocasionada pelos ISQ ocorreu principalmente em larvas e a mortalidade de pupas foi observada somente após três semanas. A atividade residual do diflubenzuron variou entre 7 e 17 semanas e a do triflumuron entre 5 e 7 semanas, a persistência por mais de 8 semanas só foi observada para triflumuron quando aplicado em baldes colocados na sombra (Ministério da Saúde, 2005).

Os AJH desequilibram o balanço hormonal ocasionando vários graus de metamorfose incompleta. Sua principal atuação é na inibição de emergência de adultos, as larvas sobrevivem e a mortalidade ocorre principalmente no estágio de pupa, se as pupas sobreviverem a mortalidade ocorrerá durante a emergência do adulto (Mulla 1995). O methoprene é um dos mais antigos AJH desenvolvidos, esse larvicida é recomendado pela OMS para uso em controle de *Aedes sp.* em água potável (WHO, 1997). O pyriproxifen é outro dos compostos miméticos de hormônio juvenil com grande eficácia e também é recomendado para controle de *Aedes sp.* (Mulla, 1991).

Para o controle químico dos mosquitos adultos são empregadas duas modalidades: 1º) aplicação de inseticida de ação residual denominada de tratamento perifocal, indicada para uso rotineiro específico em imóveis que, além de concentrarem muitos recipientes em condições que favorecem a proliferação de formas imaturas, contribuem para a dispersão passiva do vetor; e 2º) aplicação espacial de inseticida com pulverizadores de Ultrabaixo Volume, indicado para situações de surto e epidemias. Os inseticidas empregados nessa modalidade são os piretroides, cipermetrina e deltametrina e o organofosforado malathion (Ministério da Saúde, 2009).

O inseticida imidacloprid não está inserido no programa nacional de controle do mosquito da dengue, mas é um inseticida promissor no controle de *A. aegypti* (Paul *et al.*, 2006). Esse inseticida atua como antagonista da acetilcolina, ligando-se aos receptores nicotínicos, abrindo os canais de sódio; entretanto, as moléculas não são degradadas imediatamente, levando à hiperexcitação do sistema nervoso e, conseqüentemente, à morte dos insetos (Omoto, 2000).

Antonio-Arreola *et al.* (2011) reportaram o potencial do imidacloprid no controle de ovos de *A. aegypti*. Nesse estudo foi verificado que os ovos do mosquito tratados com imidacloprid na concentração de 0,15 ppm não eclodiram. Enquanto no tratamento controle 50% das larvas eclodiram. No trabalho desenvolvido por Paula *et al.* (2011), foi verificado que o imidacloprid na concentração de 100ppm proporcionou menos de 20% de sobrevivência em adultos de *A. aegypti*.

### 2.2.3 Controle biológico

O controle biológico consiste na utilização racional de inimigos (predadores, parasitas, parasitoides ou patógenos) naturais ou modificados visando à manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria na ausência do inimigo natural. Este método pode ser integrado ao controle químico, físico, mecânico e comportamental (Pedrosa-Macedo, 1993; Melo e Azevedo, 1998; Gallo *et al.*, 2002).

Quando comparado o controle químico e o controle biológico, o controle biológico apresenta vantagens e desvantagens. Entre as vantagens pode-se citar que causa menor impacto ambiental, possui alta especificidade e causa menor incidência de desenvolvimento de resistência, não afetando populações de artrópodes, como os inimigos naturais, que são ecologicamente importantes. Em compensação requer tecnologia de aplicação às vezes mais complexa, possui um efeito mais lento e são vulneráveis às condições ambientais (Alves, 1998a).

No Programa Nacional de Controle da Dengue, a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) é indicada para o controle larvário de *A. aegypti* (Polanczyk *et al.*, 2003; Ministério da Saúde, 2009). O modo geral de ação do Bti envolve inicialmente a ingestão dos cristais, em suspensão na água, pelas larvas. Uma vez ingerido, o cristal é solubilizado em pH



alcalino intestinal liberando no lúmen quatro polipeptídeos componentes do cristal, que são considerados protoxinas. Estes necessitam ser clivados pelas proteases intestinais dando origem à proteína ativada de menor tamanho (Koni e Ellar, 1994).

Após o processamento proteolítico, a toxina passa pela membrana peritrófica e é reconhecida por receptores específicos presentes no intestino. Após a ligação com o receptor, a toxina cria poros que alteram o balanço osmótico no tecido intestinal. Em poucos minutos são observadas alterações citopatológicas no epitélio intestinal das larvas, como o intumescimento celular, a alteração na estrutura das mitocôndrias, a ruptura da lâmina basal, os danos à musculatura lisa, a lise das células e o extravasamento do conteúdo intestinal para hemolinfa. Como consequência ocorre inibição da alimentação, paralisia e morte rápida por toxemia (Vilarinhos *et al.*, 1998).

O controle biológico com o uso de predadores naturais, como os peixes larvófagos, é uma alternativa que pode ser utilizada no controle de larvas de *A. aegypti*, principalmente em criadouros naturais. Contudo, no estado do Ceará, várias espécies de peixe vêm sendo utilizadas em depósitos domiciliares. Em condições de laboratório, um espécime macho do peixe *Betta splendens* é capaz de consumir até 500 larvas de *A. aegypti* em menos de 24 horas (Cavalcanti *et al.*, 2007). Os peixes da espécie *Poecilia reticulata* foram utilizados em comunidade rural de Dracena/SP para controlar larvas de *A. aegypti* em bebedouros de animais (Ferreira e Sampaio, 1996).

Os peixes, em função de seu tamanho, são inadequados para os criadouros mais comuns do mosquito, considerando-se que na maioria das vezes esses criadouros são descartáveis, mas podem ser adequados para tanques de armazenamento de água em condições precárias, em que não existam reservatórios apropriados com tampa. Entretanto, a desvantagem desse tipo de controle está relacionada com a possibilidade dos peixes larvófagos levarem micro-organismos dos seus criadouros originais e esses micro-organismos serem potencialmente patogênicos para os seres humanos (Cavalcanti *et al.*, 2007).

### 2.3 Controle microbiano com fungos entomopatogênicos

O controle microbiano é um ramo do controle biológico que trata da utilização racional dos entomopatógenos (fungos, bactérias, protozoários, vírus e nematoides). Essa modalidade de controle tem as vantagens de ter seletividade aos inimigos naturais, ter a capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente e ser de fácil aplicação. As limitações do controle microbiano estão relacionadas com o reduzido espectro de ação, efeito mais lento do que os inseticidas químicos, necessidade de condições ambientais favoráveis para realizar o controle e condições especiais de armazenamento (Alves, 1998a).

Aproximadamente, 80% das doenças em insetos têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes à cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies e a maioria dos gêneros conhecidos já foram relatados no território brasileiro. Eles não possuem pigmentos fotossintéticos, possuem grande variabilidade genética, largo espectro de hospedeiros e penetram nos insetos via tegumento, via trato alimentar e através dos espiráculos. Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano de insetos (Alves, 1998a). Esses micro-organismos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros e as espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* mostraram alta virulência contra vetores de doenças (Scholte *et al.*, 2005, 2007 ; Zhang *et al.*, 2010; Sousa, 2013; Vieira *et al.*, 2013).

Os programas de controle microbiano podem utilizar os fungos entomopatogênicos de três formas, a saber, Controle Clássico, em que ocorre a importação de agentes de controle da região de origem para outra, de modo a estabelecê-los permanentemente como novos elementos da fauna; Controle Aumentativo ou por Incrementação, em que o entomopatógeno é multiplicado massalmente em laboratórios especializados, para posteriormente, ser liberado no campo no momento apropriado; e Controle por Conservação, através da manutenção dos fungos nos agroecossistemas favorecendo ou fornecendo as condições de sobrevivência e reprodução e, conseqüentemente, estimulando sua permanência no ambiente (Shah e Pell, 2003).

A utilização de fungos entomopatogênicos possui um obstáculo considerável que é a alta vulnerabilidade às condições ambientais, como temperatura, umidade relativa e radiação solar (Sanyang *et al.*, 2000). A temperatura afeta o metabolismo dos fungos, pois, altera processos de produção

de enzimas, toxinas, germinação dos conídios, desenvolvimento do tubo germinativo, penetração, colonização e reprodução. A faixa ideal para o crescimento da maioria dos fungos entomopatogênicos varia entre 20 a 30° C (Alves e Leucona, 1998). Segundo Fernandes (1986), a temperatura atua sobre todas as fases do fungo entomopatogênico, porém sua influência é mais evidente durante a germinação e o desenvolvimento da infecção, que é a fase parasítica e após a morte do hospedeiro, na conidiogênese, a fase reprodutiva.

A umidade relativa alta entre 70 e 100 % é essencial para as fases de disseminação, germinação e penetração dos fungos entomopatogênicos. A radiação ultravioleta (UV) representa o principal agente de inibição dos entomopatógenos e estes, podem perder sua infectividade quando submetidos à luz solar direta, inviabilizando seu uso no controle de insetos (James *et al.*, 1998, Braga *et al.*, 2001a,b,c).

### **2.3.1 *Metarhizium anisopliae* no controle de insetos vetores**

O fungo *M. anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitacea) é morfologicamente filamentosos com micélio hialino e septado, dotado de conidióforos dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas (Arruda *et al.*, 2005). Encontra-se amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no solo, onde sobrevive por longos períodos, sendo patogênico a mais de 300 espécies de insetos (Franceschini *et al.*, 2001).

O processo infeccioso de *M. anisopliae* inicia com a deposição e adesão de conídios sobre a cutícula do hospedeiro através de interações hidrofóbicas e do material mucilaginoso. Em condições adequadas de umidade e temperatura, ocorre a germinação, o desenvolvimento dos conídios e o tubo germinativo diferenciam-se em apressório. Através de uma combinação de pressão e degradação enzimática (proteases e quitinases e lipases) ocorre a penetração da cutícula, subsequentemente, as hifas proliferam e colonizam as cavidades do corpo do hospedeiro, ocorrendo liberação de toxinas (destruxinas e citocalasinas). A ação das toxinas interfere nos processos fisiológicos, causando paralisação e/ou morte do inseto. Após a morte do hospedeiro, as hifas crescem invadindo os diversos órgãos internos. O micélio emerge do corpo do inseto produzindo conídios que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos. No final

da conidiogênese o cadáver apresenta coloração verde, denominada muscardine verde (Schrank e Vainstein, 2010).

Os insetos infectados procuram normalmente lugares com temperatura mais elevada, a fim de aumentar a temperatura do corpo e assim inibir o desenvolvimento do micro-organismo infectante. A ação das destruxinas reduzindo a mobilidade do hospedeiro prejudica esse mecanismo de defesa comportamental (Elliot *et al.*, 2002). O nível de virulência dos isolados do fungo *Metarhizium* é proporcional à quantidade de destruxina produzida (Sree *et al.*, 2008).

A facilidade de produção, aplicação, especificidade, ausência de toxicidade ao homem e a possibilidade de associação com as outras táticas de controle viabilizam a utilização de *M. anisopliae* no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças (Roberts e St. Leger, 2004). As diversas características de *M. anisopliae* despertam o interesse nos estudos do potencial desse fungo no controle de insetos que causam prejuízos ao homem.

Em um estudo de campo em uma aldeia rural na Tanzânia, avaliou-se a infecção e a redução da sobrevivência dos mosquitos selvagens *A. gambiae* após os mosquitos repousarem em tecidos pretos impregnados com o fungo *M. anisopliae*. Nesse estudo foi verificado que os mosquitos infectados com o fungo, após onze dias, apresentaram 100% de mortalidade, enquanto que no tratamento controle foram necessários vinte dias para que todos os mosquitos morressem. Esses resultados indicam que o fungo *M. anisopliae* é eficaz para ser usado em programas de controle da malária, visto que diminuiu a longevidade dos mosquitos *A. gambiae*, seu principal vetor (Scholte *et al.*, 2005). Em outro trabalho foi verificado que os mosquitos *A. gambiae* foram infectados em apenas 15 a 30 minutos de contato com a formulação de *M. anisopliae* ( $2 \times 10^{10}$  conídios  $m^2$ ) em óleo mineral, o que resultou 100% de mortalidade em dez dias de infecção (Mnyone *et al.*, 2009).

A virulência de *M. anisopliae* foi observada também sobre todos os estágios de desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*. Os ovos de *A. aegypti* tratados com *M. anisopliae* em ambiente com umidade em 100% não apresentaram eclosão das larvas (Luz *et al.*, 2008). Pereira *et al.* (2009) reportaram que houve 88% de mortalidade quando as larvas de *A. aegypti* foram tratadas com fungo *M. anisopliae* (ESALQ 818). O tempo de sobrevivência de

machos e fêmeas de *A. aegypti* foi de três e quatro dias, respectivamente, quando os mosquitos foram colocados durante 24h no interior de um cilindro de plástico contendo os papéis filtro impregnados com *M. anisopliae* (ICIPE30) na concentração  $1,6 \times 10^{10}$  conídios  $m^{-2}$  (Scholte *et al.*, 2007).

A temperatura interferiu na virulência do fungo *M. anisopliae* (ICIPE30) sobre o mosquito *A. aegypti*. Quando os mosquitos foram expostos ao fungo em ambiente com temperatura de 20, 26 e 32°C a mortalidade dos mosquitos infectados foi 47,4; 72,2 e 90,3%, respectivamente (Darbro *et al.*, 2011).

No estudo de Carolino *et al.* (2014) foi verificado que a formulação de *M. anisopliae* em óleo vegetal e isoparafina aumentou a persistência do fungo até 18 a 23 dias da formulação ser impregnada em tecidos pretos, sendo verificado que os conídios ressuspensos do tecido e aplicados sobre os mosquitos proporcionaram 64% de sobrevivência nos mosquitos tratados, enquanto que no controle a sobrevivência foi 87%.

### **2.3.2 *Beauveria bassiana* no controle de insetos vetores**

*B. bassiana* (Ascomycota: Clavicipitacea) é nome da fase assexuada ou anamorfo do fungo, a fase sexuada do fungo ou teleomorfo é conhecido como *Cordyceps bassiana*. Morfologicamente esse fungo possui micélio esbranquiçado, conidióforos simples em grupos irregulares ou verticilados. A característica mais marcante são os grupos de células conidiogênicas curtas e globosas que produzem uma sucessão de conídios unicelulares a partir de uma raque alongada (Kirk *et al.*, 2001). As formas dos conídios podem variar de globoso, elipsoide, cilíndrico, reniforme e vermiforme e com grande variedade de tamanhos (Rehner, 2005).

O fungo *B. bassiana* foi isolado pela primeira vez de *Bombyx mori* (bicho-da-seda), causando a doença conhecida como muscardine branca. É de ocorrência cosmopolita, coletada frequentemente de insetos e amostras de solo, onde pode subsistir por longo tempo. Em condições de laboratório pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que no campo ocorre de forma enzoótica e epizoótica em Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera e de forma enzootica sobre Diptera, Hymenoptera e Orthoptera (Alves e Leucona, 1998; Melo, 2002).

O modo de infecção desse fungo é semelhante ao fungo *M. anisopliae*, porém no final da infecção, os insetos apresentam com o corpo coberto por uma massa pulverulenta de conídios de coloração esbranquiçada (Alves, 1998a).

Estudos mostraram a virulência de *B. bassiana* sobre vetores, como também seu potencial em reduzir a capacidade de mosquitos em transmitir doenças. Howard *et al.* (2010) reportaram que a infecção pelo fungo *B. bassiana* modificou o comportamento alimentar de fêmeas de *C. quinquefasciatus*, uma vez que as fêmeas infectadas pelo fungo reduziram em 37% a alimentação sanguínea.

A utilização do fungo *B. bassiana* é uma alternativa no controle de vetores resistentes a inseticidas. Visto que, nos testes realizados com populações de *A. arabiensis* suscetíveis ou resistentes aos inseticidas recomendados pelo WHO para controle de vetores da malária não houve diferença significativa na sobrevivência dessas populações de mosquitos infectados com *B. bassiana*. Porém, diferenças quantitativas foram detectadas quando os mosquitos foram infectados em temperaturas diferentes. A probabilidade de *A. arabiensis* ser infectado por *B. bassiana* é maior quando a infecção pelo fungo ocorre em temperaturas de 25°C do que em 21°C (Kikankie *et al.*, 2010).

A transmissão horizontal de *B. bassiana* entre mosquitos *A. aegypti* foi mostrada quando os machos infectados pelo fungo acasalaram com fêmeas sadias, ocasionando mais de 70% de mortalidade nas fêmeas (García-Munguía *et al.*, 2011). A suscetibilidade de larvas de *A. aegypti* a *B. bassiana* (CG24) foi mostrada quando as larvas foram tratadas com o fungo na concentração  $5 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>, ocorrendo 82,7% de mortalidade (Pereira *et al.*, 2009).

#### **2.4 Interação dos fungos entomopatogênicos com inseticidas**

A interação de fungos com concentrações baixas de inseticidas químicos é uma alternativa para melhorar a eficácia do entomopatógeno. Nessa interação, espera-se que o inseticida atue como agente estressor na população praga e conseqüentemente, o inseto alvo fique mais suscetível ao entomopatógeno. Esse método de controle tem benefícios econômicos e ecológicos, sendo possível reduzir a quantidade de inseticida a ser utilizada, como também as concentrações dos micro-organismos (Borges e Nova, 2011).

No controle associado utilizando inseticidas com fungos entomopatogênicos devem ser investigados a compatibilidade entre os produtos através da análise de germinação, o crescimento da esporulação do fungo na presença do inseticida (Neves *et al*, 2001), uma vez que os inseticidas podem causar uma variedade de efeitos sobre fungos entomopatogênicos, tais como a inibição da germinação e do desenvolvimento do tubo germinativo, como também causar mutações que alteram a patogenicidade ou virulência dos fungos (Borges e Nova, 2011).

Os efeitos tóxicos dos produtos fitossanitários sobre os fungos podem variar em função da natureza química dos produtos, da sua concentração e das espécies e/ou isolados do agente microbiano (Batista Filho *et al.*, 2001). Além disso, a presença de emulsificantes e outros aditivos podem contribuir para a incompatibilidade de inseticidas com os entomopatógenos, representando um fator importante a ser investigado nas formulações de produtos utilizados no controle associado (Morris, 1977).

Diversos estudos investigaram os efeitos dos inseticidas combinados com fungos entomopatogênicos apresentando resultados variáveis dependendo da espécie/isolado do entomopatógeno utilizado e produto testado (Loureiro *et al*, 2002; Tanzini *et al.*, 2002; Alizadeh *et al.*, 2007).

O nim afetou crescimento vegetativo, esporulação e germinação do fungo *M. anisopliae* (Araujo Júnior *et al.*, 2009). Entretanto, nos estudos de Pires *et al.* (2010) foi observado que a incompatibilidade do nim e da abamectina com o *M. anisopliae* estava relacionada com os isolados estudados e com as concentrações do óleo de nim utilizadas nos testes. Uma vez que, o crescimento radial das colônias de *B.bassiana* e *Paecilomyces farinosus* não foi afetado pelo óleo de nim utilizando a concentração de 0,0048%, mas nas concentrações do óleo de 0,0097 em 5%, o crescimento dos fungos foi inibido. Com relação ao *M. anisopliae* obteve-se um resultado distinto do encontrado para os outros dois fungos, pois, a partir da concentração 0,039%, o óleo de nim não teve efeito sobre o crescimento, indicando que este fungo é menos sensível à ação do óleo de nim. A germinação dos conídios dos três fungos estudados não foi afetada pelas diferentes concentrações de óleo de nim (Marques *et al.*, 2004).

Os efeitos fungitóxicos *in vitro* de formulações de inseticida sobre *B. bassiana* foram investigados através da análise da germinação e produção dos

conídios e crescimento vegetativo. Nesses testes foram observados que o neocotinoide tiametoxan e o piretroide cyfluthrin mostraram-se compatíveis ao fungo, porém o piretroide alfacipermetrina foi moderadamente tóxico e os organofosforados triazofos, clorpirifos e ciclodienoclorado endosulfan inibiram 100% a germinação dos conídios (Oliveira *et al.*, 2003).

Os fungos podem ter a habilidade de degradar e/ou metabolizar as moléculas de alguns inseticidas, sendo por isso a causa de não haver inibição do seu crescimento na presença de determinados produtos químicos (Alves, 1998a). Moino Jr. e Alves (1998) sugeriram que o micro-organismo, em um mecanismo de resistência fisiológica, poderia metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, utilizando as moléculas resultantes desse processo, liberadas no meio de cultura, como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e a conidiogênese.

A germinação e o crescimento micelial do fungo *B. bassiana* não foram inibidos quando o fungo foi combinado com os inseticidas abamectin, acefato, acetamiprid, betacyflutrin, bifentrina, ciromazina, deltametrina, diafentiuron, diflubenzuron, dimetoato, fenpropratrina, fenpyroximate, fenvalerate, imidacloprid, metamidofós, propamocarb, tebufenozide ou triclorfon (Tamai *et al.*, 2002).

O regulador do crescimento de insetos, fenoxicarb, não afetou o crescimento micelial do fungo *B. bassiana* e nem a germinação dos conídios (Vásquez *et al.* 2006). A combinação do fungo *M. anisopliae* com inseticidas fenitrothion ou teflubenzuron reduziu significativamente a atividade da enzima fenoloxidase em larvas de *Anomala cuprea*, sendo observado também que a combinação do fungo com fenitrothion diminuiu o número de hemócitos totais e a combinação do fungo teflubenzuron reduziu as células granulares das larvas (Hiromori e Nishigaki, 2001).

A combinação do fungo *M. anisopliae* com piretroide o cyfluthrin (nas concentrações de 0,05; 0,5; 5; 20, 30, 40 ppm) ou com o organofosforado propetamphos (nas concentrações de 0,5; 5; 50; 100 e 200 ppm) resultou em efeito aditivo na mortalidade de *Blattella germânica*, porém quando o fungo foi combinado com 300 ppm de propetamphos o efeito dessa combinação foi sinérgico (Pachamuthu e Kamble, 2000).

A elevada taxa de mortalidade e taxa reduzida de alimentação das larvas *Agriotes lineatus* e *A. obscurus* tratadas com spinosad combinado com *M.*



*anisopliae* indicam que esses agentes de controle interagem sinergicamente, com potencial de controle dessas pragas no campo (Ericsson *et al.*, 2007).

Neves e Alves (1999) reportaram que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando aplicados em associação com concentrações subletais de imidacloprid promoveram uma ação sinérgica eliminando colônias de cupins *Cornitermes cumulans*.

O fungo *M. anisopliae* (LPP133) na concentração de  $10^9$  conídios mL<sup>-1</sup> combinado com a dose-subletal do inseticida imidacloprid (0,1ppm) reduziu significativamente as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti*. Nesse estudo foi observado que as fêmeas do mosquito expostas ao papel filtro impregnado com a formulação do fungo com o inseticida por 3, 6 e 12h apresentaram percentual de sobrevivência de 44, 11 e 7%, respectivamente, enquanto que as fêmeas expostas somente ao fungo por 3, 6 e 12h, o percentual de sobrevivência foi de 51, 26 e 23%, respectivamente e a exposição somente ao inseticida pelo mesmo período de tempo o percentual foi de 85, 84 e 85%, respectivamente (Paula *et al.*, 2011). Em outro estudo foi verificado que as fêmeas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller ou selvagem expostas ao tecido preto impregnado com *M. anisopliae* (ESALQ 818) após 48h da alimentação sanguínea apresentaram 43% (Rockefeller) e 45% (selvagem) de sobrevivência, indicando que essa formulação é eficaz para controle do mosquito *A. aegypti* independente do seu estado nutricional (Paula *et al.*, 2013).

## **2.5 Encapsulamento de fungos em matriz de alginato de sódio**

Os sistemas de liberação controlada de inseticidas de baixa massa molecular foram utilizados pela primeira vez na agroindústria na década de 50. Já nos anos 70, novas formulações capazes de liberar inseticidas de alta massa molecular foram desenvolvidas e o empenho em desenvolver o encapsulamento de princípio ativo de inseticidas químicos e biológicos está em grande ascensão (Mogul *et al.*, 1996; Carballo 1998; Scher, 1999; Paula *et al.*, 2010).

O encapsulamento é definido como uma técnica capaz de revestir ou empacotar substâncias sólidas, líquidas ou gasosas, através de um revestimento polimérico, as quais seu conteúdo é liberado de forma controlada e sob condições específicas (Suave *et al.*, 2006; Favaro-Trindade *et al.*, 2008). As partículas

formadas no encapsulamento são subdivididas, segundo a sua estrutura, em esferas ou cápsulas.

As microesferas são um sistema matricial onde o encontra-se uniformemente disperso e/ou dissolvido em uma rede polimérica. Podem ser denominadas homogêneas ou heterogêneas, sendo que no primeiro caso a substância ativa encontra-se no seu estado molecular (dissolvido) e no segundo na forma de partículas (suspensão). Trata-se de um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Já as cápsulas são sistemas onde é possível diferenciar o núcleo, que contém a substância ativa, do invólucro constituído por polímeros de espessuras variáveis. Podem ser denominadas mononucleares ou polinucleares, pela divisão ou não do núcleo no interior da partícula revestida (Silva *et al.*, 2003). O sentido de encapsulação abrange tanto o conceito de esferas como o de cápsulas. De acordo com seu tamanho, as partículas são classificadas em macro- (>5000 µm), micro-(0,2-5000 µm) ou nanocápsulas/nanoesferas (<0,2 µm) (Araújo, 2011).

Os requisitos para seleção do material encapsulante englobam as propriedades físicas e químicas do agente ativo, a aplicação pretendida e o método utilizado para formar as partículas (Suave *et al.*, 2006).

O encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como raios ultravioleta, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo e ser econômico (Santos *et al.*, 2000).

Os sais de alginato são apropriados para o encapsulamento de produtos de diversas áreas, com destaque para a fitossanidade, pois possuem solubilidade em água e não apresentam toxidez ao micro-organismo formulado, nem ao homem (Salgado, 1993; Sanhueza e Melo, 1995; Batista Filho *et al.* 1998; Carballo 1998; Tsuji, 2001).

Os alginatos são extraídos de várias espécies de algas marinhas marrons (*Phaeophyta*), onde agem como componente estrutural na parede celular e nos espaços intracelulares, promovendo rigidez e ao mesmo tempo flexibilidade à parede celular, compreendendo cerca de 40% da matéria seca destes organismos. O ácido algínico pode ser obtido também através das bactérias *Pseudomonas* spp. e *Azotobacter vinelandii*, que sintetizam-no como uma mucilagem extracelular (polissacarídeo capsular), esse ácido algínico difere do ácido presente nas algas apenas por ser mais acetilado. O ácido algínico é insolúvel em água à temperatura ambiente, tornando-se solúvel em temperaturas elevadas. Portanto, os sais de sódio, cálcio e potássio do ácido algínico, solúveis em água, são preferidos para o emprego na indústria. (Garcia-Cruz *et al.*, 2008).

A viscosidade é a principal propriedade das soluções de alginato e, junto com a sua reatividade frente ao cálcio, gera as características únicas desses compostos como espessantes, estabilizantes e gelificantes. Quanto maior o peso molecular do alginato, mais viscosas são suas soluções. Os alginatos comerciais possuem o peso molecular (grau de polimerização) entre 100 e 1.000 unidades e diferentes graus de viscosidade (alta, média e baixa). Entre os sais de alginato mais amplamente usados, se encontra o alginato de sódio (Garcia-Cruz *et al.*, 2008).

O alginato de sódio é um polissacarídeo composto por resíduos dos ácidos  $\beta$ -D-manurônico e  $\alpha$ -L-gulurônico na forma de sal de sódio, unidos por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4) e distribuídos em diferentes proporções ao longo da cadeia (Smidsrod e Skjak-Braek, 1990; Johnson *et al.*, 1997). Suas propriedades gelificantes são provenientes de ligação cooperativa dos cátions divalentes localizados entre os blocos homopoliméricos de resíduos de guluronato ou blocos – G. As interações iônicas entre os blocos guluronato e os íons Ca conduzem à formação de um gel termoestável forte cujas propriedades dependem largamente das características do polímero e do método de preparação (Fundueanu *et al.* 1999, Vos *et al.*, 2009).

Dentre os diversos métodos de encapsulamento está o processo por gelificação iônica que é simples e de baixo custo (Mukai-Correa *et al.*, 2005). A gelificação iônica é um processo que utiliza principalmente o alginato como componente da membrana e a combinação com íons divalentes como o cálcio, para induzir a gelificação. O alginato gelifica após ligação dos íons bivalentes de

cálcio aos blocos de ácido gulurônico das cadeias de alginato constituindo o modelo da “caixa de ovos”. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  seguem difundindo-se no alginato, fazendo com que o gel vá endurecendo com o tempo (Gombotz, Wee, 1998).

O encapsulamento de agente de controle microbiano em matrizes poliméricas pode aumentar a sua estabilidade e viabilidade, fornecendo um microambiente benéfico por isolá-los da atmosfera e da umidade. Isto pode levar a uma vida de prateleira prolongada, aumentar seu potencial de aproveitamento econômico e manter sua atividade metabólica durante longos períodos de tempo, não só durante o armazenamento, mas também depois da aplicação (Vemmer e Patel, 2013).

A manutenção da atividade metabólica pode ser melhorada, fornecendo nutrientes que permitem o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo. Outra opção para melhorar as características de um agente de controle microbiano é a co-encapsulação de outros micro-organismos ou substâncias, tais como inseticidas, semioquímicos, extratos vegetais, os quais muitas vezes interagem sinergicamente em dose reduzida (Wang *et al.*, 2002; Paula *et al.*, 2011; Pant *et al.*, 2012).

Os micélios e conídios de fungos entomopatogênicos encapsulados em matriz de alginato possuem maior capacidade de sobrevivência em condições de campo (Pereira e Roberts, 1991). Nas formulações com alginato de sódio e fungos podem ser adicionados produtos que podem aumentar a produção e a eficiência da encapsulação, como também aumentar a virulência dos fungos encapsulados (Knudsen *et al.*, 1991). Liu e Liu (2009a) reportaram que o encapsulamento dos conídios de *M. anisopliae* contendo como material de revestimento o alginato de sódio e o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) produziu cápsulas com estruturas homogêneas e com boa eficiência de encapsulação, uma vez que 78% dos conídios encapsulados foram liberados na solução de PBS.

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* formulados em matriz de alginato mantiveram a viabilidade e a virulência contra *Diabrotica undecimpunctata howardi* após exposição à radiação solar artificial (Pereira e Roberts (1991).

A presença de quitina na formulação pode aumentar a virulência do fungo, pois a quitina induz a produção de quitinases, importante enzima que age sinergicamente com as proteases para hidrolisar cutícula do inseto (Fang *et al.*, 2005). Além disso, o encapsulamento de *B. bassiana* (Qu-B306) com alginato de

sódio, quitina (2%) e farelo de trigo (2%) aumentou em três vezes a concentração de conídios no interior das partículas e a contaminação por *Penicillium* foi reduzida quando a quitina foi incorporada na formulação (Gerding-González *et al.*, 2007).

O fungo fitopatogênico *Coniothyrium minutans* quando formulado com alginato e introduzido no solo, inibiu o desenvolvimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco (Moretini e Melo, 2007). A veiculação de *Trichoderma inhamatum* em grânulos de alginato de sódio contendo farelo de trigo é uma excelente forma de controle biológico de *Rhizoctonia solani* (Mafia *et al.*, 2003). Quando o fungo nematófago *Paecilomyces lilacinus* foi encapsulado pelo processo de gelificação iônica em matrizes de alginato de sódio, argila e sulfato de estreptomina, apresentou estabilidade na viabilidade durante doze meses. Essa característica permite a comercialização, distribuição e utilização desse agente de controle microbiano em condições de campo (Carneiro e Gomes, 1997).

### 3. OBJETIVO GERAL

Investigar em condições de laboratório a interação entre o fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana* com o inseticida diflubenzuron e encapsular o *M. anisopliae* visando melhorar o controle de larvas de *A. aegypti*.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Determinar a curva de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* após exposição ao inseticida diflubenzuron;
- Avaliar a suscetibilidade das larvas de *A. aegypti* na combinação dos fungos *B. bassiana* ou *M. anisopliae* e o inseticida diflubenzuron;
- Encapsular o fungo *M. anisopliae* em matriz de alginato de sódio;
- Determinar a curva padrão das concentrações do fungo *M. anisopliae*;
- Avaliar a liberação do fungo encapsulado em meio aquoso;
- Analisar processos de desidratação na virulência do fungo encapsulado sobre larvas de *A. aegypti*;
- Analisar a virulência do fungo encapsulado procedente do fungo inoculado no arroz sem prévia separação dos conídios sobre larvas de *A. aegypti*;
- Avaliar a influência de tempo, local de armazenamento e o tipo de embalagem na virulência da formulação fúngica encapsulada sobre larvas de *A. aegypti*;
- Determinar a curva de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* após exposição às dosagens do fungo encapsulado;
- Avaliar a virulência do fungo *M. anisopliae* após exposição às condições ambientais sobre as larvas de *A. aegypti*;

- Avaliar a virulência de *M. anisopliae* sobre larvas de *A. aegypti* ao longo do tempo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (UENF/CCTA/LEF), localizada na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

### 4.1 Criação de *Aedes aegypti*

As larvas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller foram utilizadas nos bioensaios. A criação dos insetos foi conduzida no insetário da UENF em sala climatizada à temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa  $80 \pm 10\%$  e fotofase de 12h. Para estimular a eclosão das larvas de *A. aegypti*, papéis com ovos foram submersos em bandejas plásticas (10 x 30 x 20 cm) de 1 L com 500 mL de água. Para alimentação das larvas foi adicionado 0,1g de ração comercial para gato triturada por bandeja. Após 24 horas de imersão, os papéis foram retirados e as larvas mantidas nas bandejas até o estágio de L3 para serem utilizadas nos experimentos. Um grupo de larvas foi mantido nas bandejas até o estágio de pupa. As pupas foram transferidas para potes de plásticos 20x10cm recobertos com tecido organza para emergência dos mosquitos adultos. Os mosquitos adultos foram alimentados com solução de sacarose (10%) e as fêmeas realizaram a alimentação sanguínea em camundongo com a finalidade de produção de ovos para manutenção da criação.



## 4.2 Produção de fungos entomopatogênicos

O isolado do fungo *M. anisopliae* foi obtido a partir da coleção da ESALQ (ESALQ 818) em Piracicaba (São Paulo), descrito como virulento a larvas (Pereira et al., 2009) e adultos de *A. aegypti* (Paula et al., 2008). O isolado do fungo *B. bassiana* foi obtido a partir da coleção da UENF, coletado em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Para a produção dos isolados, os conídios dos fungos foram semeados com auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura sólido (SDA) (10g de dextrose; 2,5g de peptona; 2,5g de extrato de levedura; 20g de Agar e 1000 mL de água destilada), previamente autoclavado a 121° C, por 15 minutos a 1 atm. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo BOD (Biological Oxygen Demand), a 27° C; 80 ±5% UR; em escotofase durante 15 dias para crescimento e esporulação do fungo.

Após esse período, com o auxílio de uma espátula estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri e inoculados em Erlemeyers de 250mL contendo 25g de arroz parboilizado e 10mL de água destilada, previamente autoclavados. Os Erlemeyers foram mantidos em BOD por 15 dias nas condições descritas anteriormente.

## 4.3 Separação e preparo da suspensão dos conídios dos fungos

O arroz com os conídios de *M. anisopliae* (ESALQ 818) foi embalado em sacos de papel e mantido a 33°C e 22% UR em uma incubadora de secagem (Nova Ética) por um período de 24h. Após esse período, com auxílio da máquina separadora de esporos (Mycoharvester – Inglaterra), os conídios previamente secos foram separados do arroz, formando o esporo fino (com pouco resíduo de arroz) e o esporo grosso (com maior quantidade de resíduo de arroz). O esporo fino foi utilizado nos experimentos. Após a separação, os esporos foram colocados em sacos plásticos, mantidos em um recipiente com sílica em gel e armazenados na geladeira. A suspensão a partir dos esporos finos foi realizada através de pesagem dos esporos e diluição com Tween 80 (0,05%).

O preparo da suspensão dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* proveniente do arroz sem prévia separação pela máquina foi realizado na câmara de fluxo laminar, previamente higienizada com álcool 70% e submetido a 15 minutos de luz UV. Com uma espátula estéril, foram retirados do Erlenmeyer os

grãos de arroz contendo os conídios e com o dispersante Tween 80 (0,05%) procedeu à separação dos conídios e posteriormente o preparo da suspensão do fungo. As concentrações de conídios nas suspensões foram determinadas em câmara de Neubauer.

#### **4.4 Ajuste da curva padrão de *Metarhizium anisopliae***

A curva padrão das concentrações de *M. anisopliae* foi determinada no leitor de Elisa. Para isso, os conídios foram diluídos em Tween 80 (0,05%) resultando nas concentrações de  $10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  e  $10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Alíquotas de 350  $\mu\text{L}$  de cada concentração foram colocadas em poços de placas de Elisa e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 595 nm. Para o controle foi realizada leitura de alíquotas de Tween 80 (0,05%) diluído em água destilada. Calibrou-se o leitor de Elisa com a solução de água + Tween 80 (0,05%), eliminando a diferença de absorvância dessa solução. Foi realizada a análise de regressão para estimar o melhor modelo que ajusta os dados.

#### **4.5 Encapsulamento de *Metarhizium anisopliae* em alginato de sódio**

O encapsulamento de *M. anisopliae* foi feito pelo método de gelificação iônica, em que uma solução polimérica, contendo os conídios do fungo, foi extrusada sobre uma solução reticulante. Esse método foi descrito como um método simples, de fácil reprodução, barato e eficiente (Silva *et al.*, 2012). Nesse procedimento, a solução de alginato (0,25% p/v) (Vetec, Sigma- Aldrich) e Agar (1% p/v) (Protoquímicos) foi preparada por dissolução em água destilada à temperatura de 20°C em agitador magnético (Vulcan, MS400 Magnetic Stirrer). Posteriormente, a suspensão fúngica, na concentração de  $5 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , foi adicionada na solução de alginato e Agar (100mL). A solução foi gotejada na solução de 0,04M cloreto de cálcio diidratado (Sigma-Aldrich) com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex L/S).

As partículas formadas foram retiradas da solução de cloreto de cálcio diidratado com auxílio de uma peneira e lavadas com água destilada. Em seguida, foram congeladas por 24h (-18°C) e posteriormente liofilizadas (Liotop, L101). As partículas foram retiradas do liofilizador após 24 h do início do processo (pressão de 1249  $\mu\text{Hg}$  e temperatura do condensador de -40°C).

#### **4.6 Liberação do fungo *Metarhizium anisopliae* encapsulado em alginato de sódio**

Para a análise da liberação do fungo encapsulado foram pesados 0,05g de esferas com fungo ou sem fungo e colocadas em recipiente plástico contendo 50 mL de água. Em intervalos de dois dias foram retiradas de cada tratamento alíquotas de 350 µL e colocadas nos poços das placas de leitor Elisa (Bio-Rad, modelo 680), em seguida foram realizadas as leituras no comprimento de onda de 595 nm. Para calibração foram realizadas leituras com água. A liberação do fungo encapsulado foi analisada pela diferença encontrada na absorbância da esfera com fungo e a esfera sem fungo.

As absorbâncias resultantes da diferença anteriormente mencionada foram relacionadas com a curva padrão de *M. anisopliae* obtidos no tópico 4.4, assim foram estimadas as concentrações de *M. anisopliae* liberadas no meio aquoso.

#### **4.7 Teste de sobrevivência larval**

Nos testes de sobrevivência larval, a unidade experimental consistiu em copo plástico de 250 mL contendo 100 ou 50 mL de solução com 10 larvas de *A. aegypti*. Cada repetição foi constituída por grupos de três copos plásticos com as larvas, resultando em 30 larvas/repetição. Os experimentos foram realizados com três repetições, totalizando 90 larvas em cada tratamento. A sobrevivência larval foi observada diariamente durante sete dias e posteriormente, analisada no programa GraphPad Prism 5, utilizando o teste Log Rank com 95% de significância para comparar as curvas de sobrevivência e calcular o tempo médio de sobrevivência ( $S_{50}$ ).

#### **4.8 Experimento 1: Determinação da curva de sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* após exposição ao diflubenzuron**

O diflubenzuron na formulação pó molhável foi diluído em água até obter as concentrações de 250, 10, 2, 0,25 e 0,01 ppb. Em seguida 100 mL de cada concentração do diflubenzuron foram colocados em copos plásticos e posteriormente foram adicionadas as larvas, sendo realizado o teste de

sobrevivência larval e análise como descrito no tópico 4.7. O controle foi realizado com água potável.

A sobrevivência larval foi avaliada também pela comparação de média e pela análise de regressão, para isso os dados foram previamente transformados por raiz quadrada do percentual de sobrevivência. Em seguida os dados transformados foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste *post hoc* de Duncan, admitindo-se  $\alpha = 0,05$  e a análise de regressão foi realizada para verificar a existência de uma interação funcional entre a variável dependente com as variáveis independentes. As referidas análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS for Windows (versão 11.0).

#### **4.9 Experimento 2: Efeito dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em associação com diflubenzuron sobre as larvas de *Aedes aegypti***

Os fungos *M. anisopliae* (ESALQ 818) e *B. bassiana* (LPP 139) foram testados na concentração de  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> individualmente. O tratamento somente com o inseticida diflubenzuron foi utilizado na concentração de 0,25 ppb. Essa concentração do inseticida foi definida para utilização nos testes de interação com os fungos por ser a menor concentração que proporcionou percentual de sobrevivência próximo a 50%, uma vez que o presente estudo visou estudar formulações que causem menor impacto ambiental.

Nos tratamentos dos fungos combinados com o diflubenzuron foram inoculados 2 mL de suspensão fúngica com  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> na diluição previamente preparada do inseticida resultando na concentração final de  $2 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>. O grupo controle foi tratado com água + Tween 80 (0,05%). Posteriormente, 100 mL de cada tratamento foram colocados em copos plásticos e realizado o teste de sobrevivência larval como descrito no tópico 4.7.

Os tratamentos feitos nesses testes foram os seguintes: (1) *M. anisopliae*, (2) diflubenzuron, (3) combinação de *M. anisopliae* + diflubenzuron, (4) *B. bassiana*, (5) combinação de *B. bassiana* + diflubenzuron e (6) controle.

Foi realizada a análise da curva de sobrevivência, tempo médio de sobrevivência e a comparação de média como relatado nos tópicos 4.7 e 4.8.

#### **4.10 Experimento 3: Efeitos do Polietilenoglicol e dos processos de secagem no encapsulamento de *Metarhizium anisopliae* em alginato de sódio sobre as larvas de *Aedes aegypti***

O fungo *M. anisopliae* (ESALQ 818) foi selecionado para ser utilizado nos demais experimentos, pois apresentou maior virulência sobre as larvas de *A. aegypti* que o fungo *B. bassiana* (LPP139).

Para avaliar os efeitos do polietilenoglicol (PEG) na virulência do fungo encapsulado foi utilizado PEG (Sigma), com massa molecular 8000, sendo denominado PEG 1, o produto com textura mais fina, e PEG 2, com textura mais grossa. As características das texturas foram definidas pela manipulação dos produtos.

Os processos de secagem avaliados foram secagem no liofilizador (Liotop, L101) ou secagem em incubadora (Nova Ética, Incubadora 411D).

As esferas produzidas com esporo fino de *M. anisopliae* foram separadas, sendo uma parte imersa na solução de PEG1 (10%) e outra na solução de PEG2 (10%) por 24h. Após esse período, os dois grupos de esferas produzidos passaram pelo processo de secagem em BOD (28°C) ou no liofilizador (-40°C). As esferas foram separadas por tipo de PEG e processo de secagem, ficando os tratamentos que foram denominados de P1B (esferas com PEG1 e secagem em BOD), P2B (esferas com PEG2 e secagem em BOD), P1L (esferas com PEG1 e secagem no Liofilizador), P2L (esferas com PEG2 e secagem no Liofilizador). Para controle as esferas foram produzidas e secas como anteriormente mencionado, porém não foi adicionada suspensão fúngica.

As esferas foram utilizadas no teste de sobrevivência larval como descrito no tópico 4.7, sendo colocado 0,05g de cada tratamento em copos plásticos brancos de 250mL contendo 50mL de água com 10 larvas por recipiente. Os tratamentos controle foram realizados com água e esferas sem fungo.

A avaliação desse experimento foi realizada pela análise da curva de sobrevivência, tempo médio de sobrevivência e comparação de média como relatado nos tópicos 4.7 e 4.8.

#### **4.11 Experimento 4: Avaliação da virulência de *Metarhizium anisopliae* encapsulado quando produzido a partir de conídios em arroz sem utilizar a máquina separadora**

As esferas foram produzidas com suspensão de *M. anisopliae* (ESALQ 818) proveniente dos esporos sem separação pela máquina separadora (Mycoharvester – Inglaterra). Para isso a suspensão foi preparada adicionando o dispersante Tween 80 (0,05%) no Erlenmeyer contendo os grãos de arroz inoculado com conídios, após agitação foi determinada a concentração da suspensão utilizando a Câmara de Neubauer. A concentração utilizada foi  $7 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para 100mL de solução de alginato e Agar. Em seguida procedeu a produção das esferas como descrito no tópico 4.5.

O teste de sobrevivência larval foi realizado para verificação da virulência do fungo encapsulado como descrito no tópico 4.7, entretanto, foram colocados 0,05g de esferas com fungo ou esferas sem fungo em copos plásticos brancos de 250mL contendo 50mL de água com 10 larvas por recipiente. A análise estatística realizada foi curva de sobrevivência e comparação de média.

#### **4.12 Experimento 5: Curva de sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao *Metarhizium anisopliae* encapsulado em alginato de sódio**

As esferas com o *M. anisopliae*, produzidas como relatado no tópico 4.5, foram adicionadas em copos plásticos de 250mL contendo 50mL de água com 10 larvas por recipiente. Em cada copo foram colocados 0,01; 0,05; 0,25 ou 0,5g de esferas com o fungo. Os tratamentos controle foram feitos com água e a mesma quantidade de esferas sem fungo. A sobrevivência larval foi avaliada como no tópico 4.7 e também pela comparação de média e análise de regressão como relatado no tópico 4.8.

#### **4.13 Experimento 6: Efeito do tipo de embalagem, condições e tempo de armazenamento na virulência de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Aedes aegypti***

Esse experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com estrutura fatorial, sendo os fatores analisados, embalagem com dois tipos (papel ou plástico), local de armazenamento em dois ambientes (geladeira ou BOD) e tempo de armazenamento com quatro níveis (5, 15, 30 e 60 dias)

totalizando dezesseis tratamentos para o fungo não encapsulado e dezesseis para o fungo encapsulado, ambos com três repetições. Os tratamentos controle foram os fungos encapsulado ou não encapsulado sem armazenamento ou apenas água.

Para isso, foram pesados 0,15g de esferas produzidas com esporo fino de *M. anisopliae* e 0,03g de esporos do fungo não encapsulado. Cada produto foi colocado no tubo criogênico e, esses tubos foram embalados em sacolas de papel ou sacolas de plástico fechado a vácuo. Ambas as embalagens continham 1g de sílica em gel. Após a embalagem os tratamentos foram armazenados por 5, 15, 30 e 60 dias na geladeira (6°C e 53% UR) ou na BOD (27°C e 65% UR).

Os grupos de tratamentos foram denominados como: F- fungo encapsulado não armazenado; FGP- fungo encapsulado armazenado na geladeira e embalado com papel; FBP- fungo encapsulado armazenado na BOD e embalado com papel; FGPL- fungo encapsulado armazenado na geladeira e embalado com plástico; FBPL- fungo encapsulado armazenado na BOD e embalado com plástico; E- esporos do fungo não encapsulado e não armazenado; EGP- esporos do fungo não encapsulado armazenado na geladeira e embalado com papel; EBP- esporos do fungo não encapsulado armazenado na BOD e embalado com papel; EGPL- esporos do fungo não encapsulado armazenado na geladeira e embalado com plástico e EBPL- esporos do fungo não encapsulado armazenado na BOD e embalado com plástico.

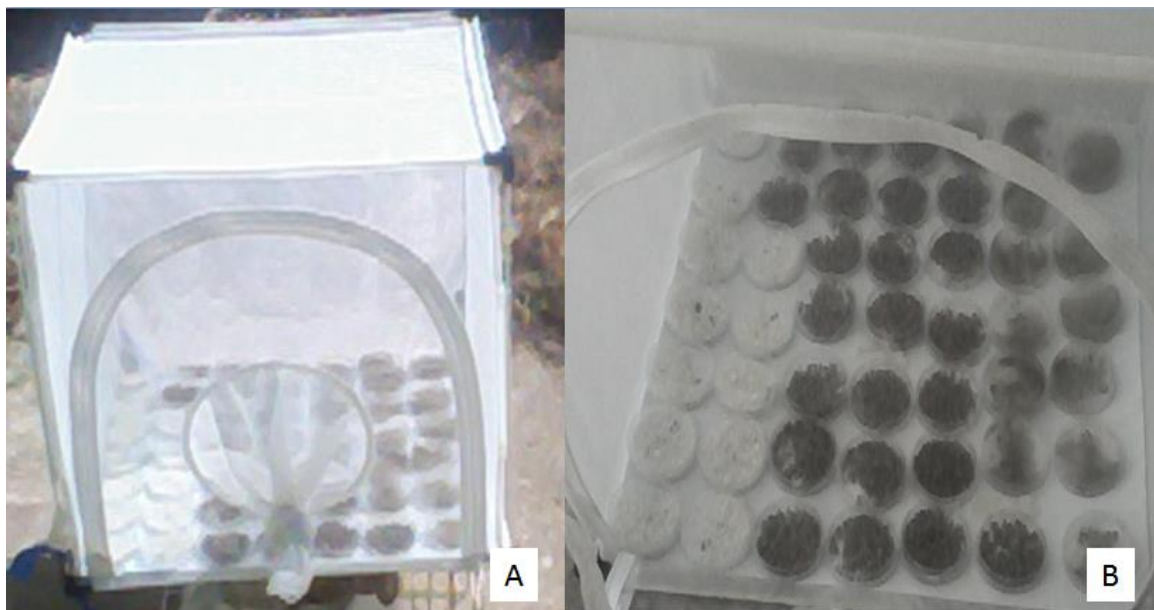
A virulência do fungo foi avaliada através de teste de sobrevivência larval, como descrito no tópico 4.7, sendo colocado em cada copo 0,05g de esferas com o fungo ou  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> do fungo não encapsulado. Foi realizada a análise da curva de sobrevivência, tempo médio de sobrevivência e comparação de média como relatado nos tópicos 4.7 e 4.8.

#### **4.14 Experimento 7: Efeito da exposição ambiental de *Metarhizium anisopliae* com ou sem encapsulamento sobre larvas de *Aedes aegypti***

Para avaliar a virulência do fungo após 24h em ambiente aberto sobre influência da radiação solar, vento, umidade relativa e temperatura foram colocados 0,1g do fungo encapsulado, fungo não encapsulado ou esferas sem fungo em placas de Petri descartável cobertas com parafilme perfurado.

Essas placas foram colocadas dentro de uma gaiola totalmente forrada com tecido organza branco (para evitar contato de insetos ou outros animais) e em seguida foram expostas em ambiente aberto por 24h. Outra parte desses tratamentos não foi exposta aos raios solares, sendo mantida em sala protegida do sol, simulando condição residencial (Figura 2). A temperatura média no período do experimento foi de 31°C, velocidade de vento 18km/h, umidade relativa 63% e duração do dia 13h18min. Os tratamentos foram denominados como: F- fungo encapsulado e não exposto às condições ambientais; FUV- Fungo encapsulado e exposto às condições ambientais; E- fungo não encapsulado e não às condições ambientais; EUV- fungo não encapsulado e exposto às condições ambientais; C- esferas sem fungo e não expostas às condições ambientais e CUV- esferas sem fungo e expostas às condições ambientais.

A virulência do fungo exposto a condições ambientais e radiação solar direta foi avaliada através de teste de sobrevivência larval. Nesse teste as esferas (0,1g) e os esporos do fungo não encapsulado ( $10^7$  conídios/ mL) foram adicionados em copos plásticos brancos de 250mL contendo 50 mL de água com 10 larvas por recipiente, sendo trinta larvas por repetição. O experimento foi realizado três vezes como no tópico 4.7. Foi realizada análise da curva de sobrevivência, comparação de média como descrito em 4.7 e 4.8.



**Figura 2** – A – Tratamento com fungo exposto às condições ambientais. B – Tratamento com fungo não exposto às condições ambientais



#### **4.15 Experimento 8: Avaliação da persistência do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre as larvas de *Aedes aegypti***

Para a avaliação da persistência do fungo *M. anisopliae* encapsulado com alginato de sódio, foram realizados os seguintes tratamentos: fungo encapsulado (F); esferas sem fungo (C); fungo não encapsulado (E) e o controle com água.

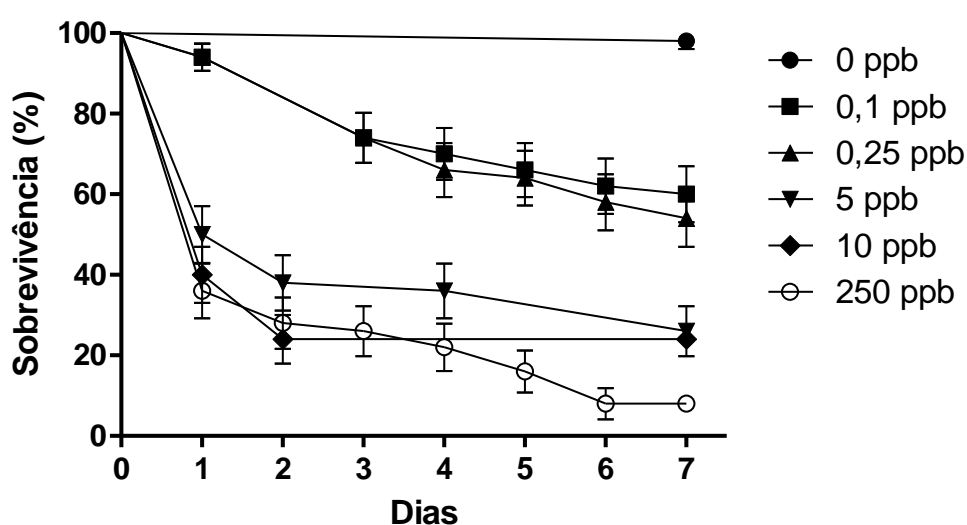
Nesse teste foram colocados nos copos plásticos contendo 50mL de água, 0,05g de fungo encapsulado (F); 0,05g de esferas sem fungo (C) ou  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> de fungo não encapsulado (E).

As larvas de *A. aegypti* foram adicionadas aos copos plásticos com os tratamentos após 0, 3, 5, 7 e 10 dias. Foram utilizadas 10 larvas por copo, 30 larvas por repetição e cada tratamento foi realizado três vezes. A sobrevivência larval foi avaliada diariamente por 7 dias e o controle foi realizado com apenas água. Os testes foram realizados em condições de laboratório. As análises estatísticas realizadas foram as curvas de sobrevivência, comparação de média e regressão como descrito nos tópicos 4.7 e 4.8.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Experimento 1: Curva de sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* após exposição ao diflubenzuron

As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com diferentes concentrações do inseticida diflubenzuron foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P < 0.0001$ ). O valor de  $S_{50}$  foi de um dia nas concentrações de 10 e 250 ppb e 1,5 dias na concentração de 5ppb. Nas concentrações de 0,25 e 0,1 ppb esse índice não foi alcançado (Figura 3).



**Figura 3.** Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com diflubenzuron nas concentrações de 0,1; 0,25; 5; 10 e 250ppb.

No terceiro dia de avaliação do tratamento com a concentração de 250 ppb havia apenas 26% de sobrevivência larval. No sétimo dia de avaliação dos experimentos concentrações de 10 e 5 ppb apresentaram taxas de sobrevivência larval de 24 e 26%, respectivamente. Na concentração de 0,25 ppb havia 55% de larvas sobreviventes no sétimo dia de avaliação.

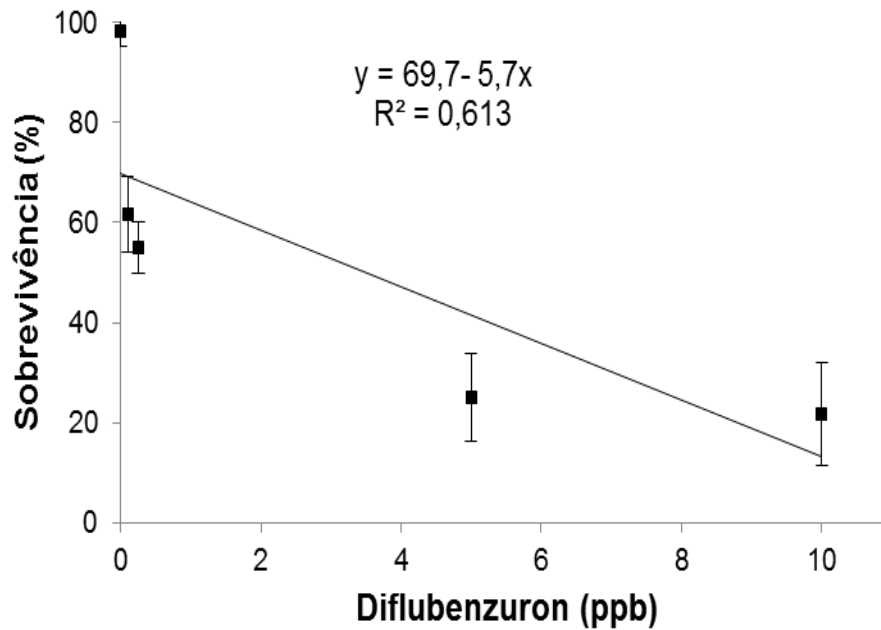
Os tratamentos apresentaram respostas significativamente diferentes pelo teste post-hoc de Duncan ( $F_{(5,17)} = 42,030$ ;  $P < 0,05$ ). A concentração de 250 ppb proporcionou 8,3% de sobrevivência larval (Tabela 1).

**Tabela 1** – Porcentagem de sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com diferentes doses do inseticida Diflubenzuron

Doses (ppb)	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	S <sub>50</sub>
0	98,3 $\pm$ 2,9 a*	ND
0,1	61,7 $\pm$ 7,6 b	ND
0,25	55,0 $\pm$ 5,0 b	ND
5	25,0 $\pm$ 8,7 c	1,5
10	21,7 $\pm$ 10,4 c	1,0
250	8,30 $\pm$ 2,9 d	1,0

ND = Dados não determinados. \*Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ).

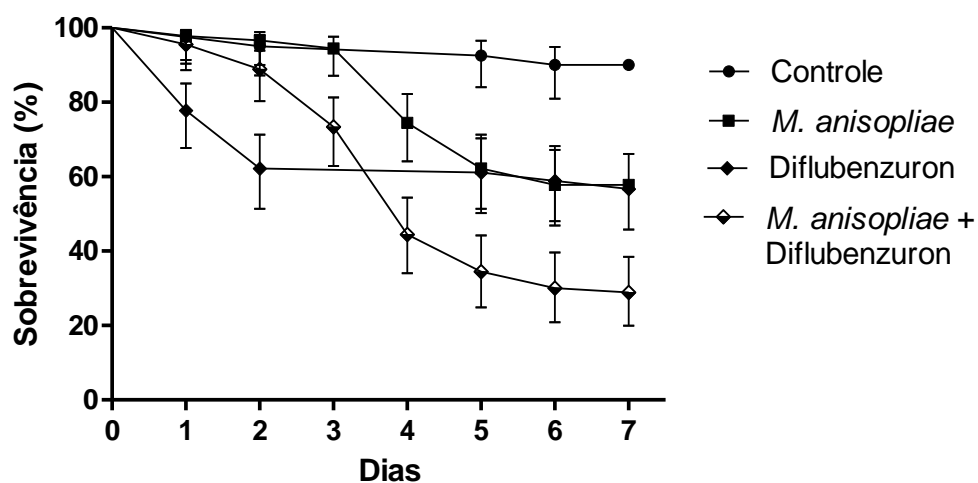
A análise de regressão linear relacionando a dosagem de diflubenzuron e a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* foi significativa ( $F_{(1,14)} = 20,626$   $P < 0,05$ ). A sobrevivência larval (y) dependeu da dose de diflubenzuron (x), sendo possível admitir que 61,3% das variâncias na sobrevivência larval são explicadas através da regressão linear  $y = 69,7 - 5,7x$  (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito das dosagens de diflubenzuron (0; 0,1; 0,25; 5 ou 10 ppb) na sobrevivência de larvas de *A. aegypti*.

## 5.2 Experimento 2: Efeito dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em associação com diflubenzuron sobre as larvas de *Aedes aegypti*

As curvas de sobrevivência das larvas infectadas com *M. anisopliae*, diflubenzuron e a combinação de *M. anisopliae* + diflubenzuron foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P < 0,0001$ ) e o valor de  $S_{50}$  foi de 4 dias para o tratamento *M. anisopliae* + diflubenzuron. No quarto dia de avaliação os tratamentos com *M. anisopliae* ou diflubenzuron sozinho a taxa de sobrevivência larval foi maior que 60%. Entretanto, nesse mesmo período o tratamento *M. anisopliae* + diflubenzuron apresentou índice de sobrevivência larval de 44,4% (Figura 5).



**Figura 5.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao fungo *M. anisopliae* ( $10^7$  conídios/mL), inseticida diflubenzuron (0,25ppb) ou combinação do fungo com inseticida durante sete dias.

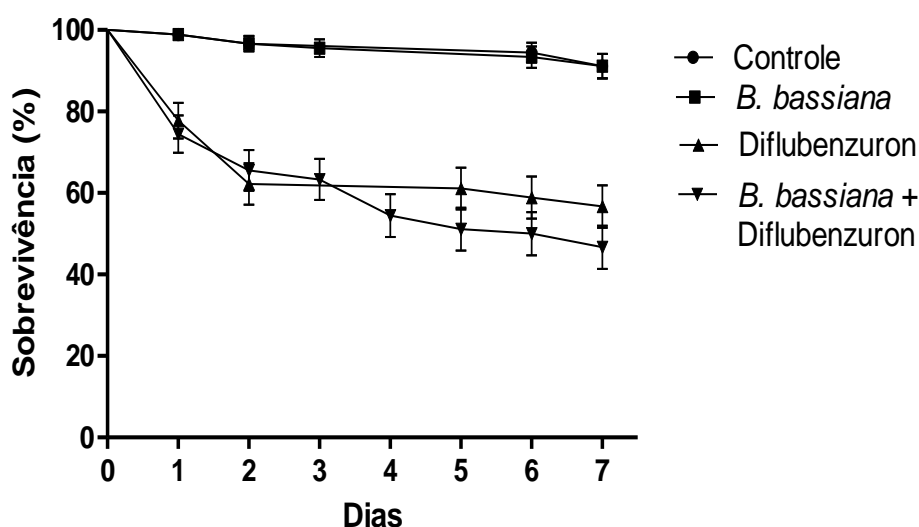
Os tratamentos apresentaram respostas significativamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $F_{(3,11)} = 23,710$ ;  $P < 0,05$ ). O tratamento com *M. anisopliae* causou percentual de sobrevivência estatisticamente semelhante ao tratamento com diflubenzuron. O fungo combinado com inseticida causou menor índice de sobrevivência quando comparado com os tratamentos com o fungo ou com inseticida sozinho (Tabela 2). Os resultados mostraram que a combinação *M. anisopliae* + diflubenzuron teve interação sinérgica. Quando os tratamentos foram combinados à sobrevivência larval a metade do percentual de sobrevivência foi encontrada nos tratamentos utilizados separadamente.

**Tabela 2** – Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* tratadas com fungo *Metarhizium anisopliae*, Diflubenzuron e uma combinação do fungo com inseticida

Tratamentos	Sobrevivência (%) ±DP	S <sub>50</sub>
Controle	90,0 ± 8,5 a*	ND
<i>M. anisopliae</i>	57,8 ± 6,9 b	ND
Diflubenzuron	56,7 ± 11,9 b	ND
<i>M. anisopliae</i> + Diflubenzuron	28,9 ± 6,9 c	4

\*Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). ND = Dados não determinados.

No experimento com *B. bassiana*, as curvas de sobrevivência das larvas expostas ao fungo *B. bassiana*, diflubenzuron e combinação de *B. bassiana*, diflubenzuron foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P<0.0001$ ). O valor de S<sub>50</sub> foi de 6,5 dias no tratamento de *B. bassiana* + diflubenzuron, nos demais tratamentos esse índice não foi atingido. No terceiro dia a sobrevivência larval foi maior que 60% nos tratamentos com diflubenzuron e com *B. bassiana* + diflubenzuron e 95,6% no tratamento com *B. bassiana* (Figura 6).



**Figura 6.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao fungo *B. bassiana* ( $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>), inseticida diflubenzuron (0,25ppb) ou combinação do fungo com inseticida durante sete dias.

Os tratamentos apresentaram respostas significativamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $F_{(3,11)} = 17,00$ ;  $P < 0,05$ ). O tratamento com *B. bassiana* proporcionou percentual de sobrevivência estatisticamente semelhante ao controle. Não houve diferença estatística entre os tratamentos do fungo combinado com inseticida e o inseticida sozinho (Tabela 3). Devido à baixa virulência de *B. bassiana* sobre as larvas de *A. aegypti*, esse isolado não foi utilizado nos experimentos posteriores.

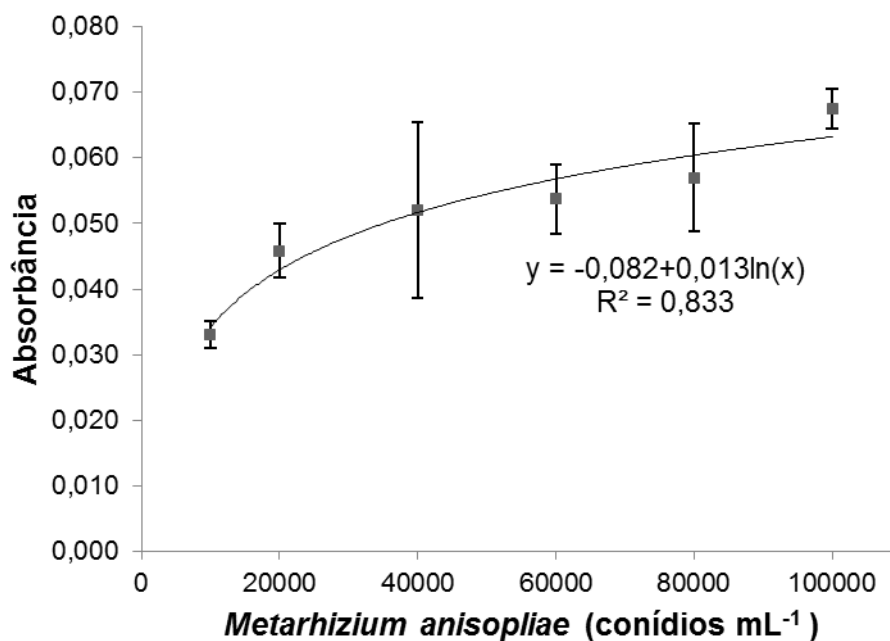
**Tabela 3** – Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* infectadas com fungo *Beauveria bassiana*, Diflubenzuron e combinação do fungo com inseticida

Tratamentos	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	S <sub>50</sub>
Controle	91,0 $\pm$ 8,5 a*	ND
<i>B. bassiana</i>	91,0 $\pm$ 1,7 a	ND
Diflubenzuron	56,7 $\pm$ 11,9 b	ND
<i>B. bassiana</i> + Diflubenzuron	46,7 $\pm$ 6,5 b	6,5

\*Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $\alpha=0,05$ ). ND = Dados não determinados.

### 5.3 Curva padrão do fungo *Metarhizium anisopliae*

As concentrações de *M. anisopliae* foram relacionadas com suas respectivas leituras de absorvância no comprimento de ondas de 595nm. As concentrações de  $10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  e  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> apresentaram médias de absorvâncias de 0,033 (dp $\pm$ 0,002); 0,046 (dp $\pm$ 0,004); 0,052 (dp $\pm$ 0,012); 0,054 (dp $\pm$ 0,005); 0,057 (dp $\pm$ 0,01) e 0,068 (dp $\pm$ 0,003), respectivamente. A regressão entre as concentrações de *M. anisopliae* e as leituras de absorvância a 595 nm foi estatisticamente significativa ( $F_{(1,23)} = 49,909$ ;  $P < 0,05$ ). A observância (y) dependeu da concentração fúngica (x), sendo que 83,3% das variâncias observadas na absorvância são explicadas através da curva de regressão logarítmica  $y = -0,082 + 0,013 \ln(x)$  (Figura 7).



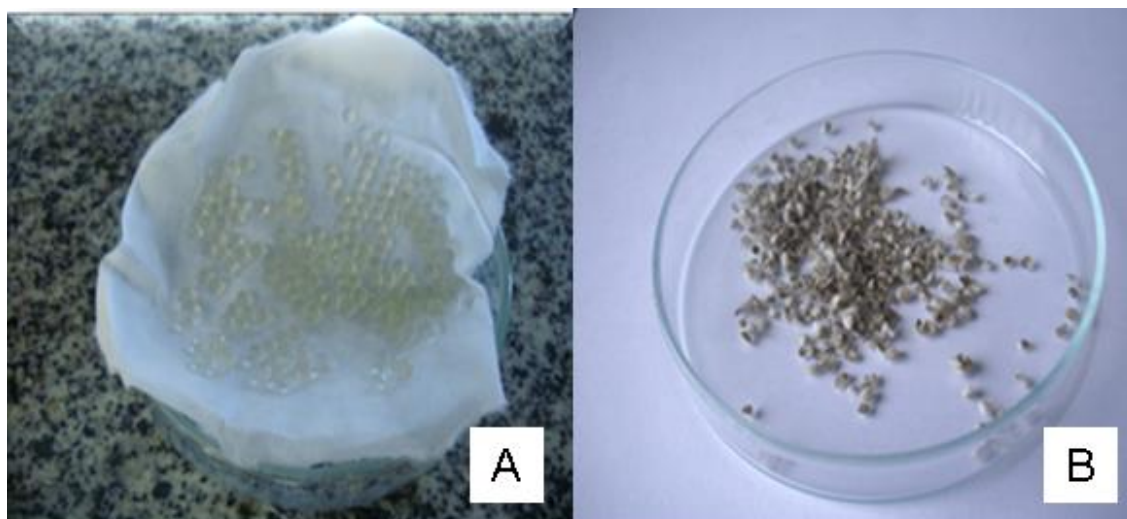
**Figura 7.** Regressão logarítmica entre as concentrações de *M. anisopliae* e as médias de absorbâncias em 595nm.

#### 5.4 Características de *Metarhizium anisopliae* encapsulado em alginato de sódio

As partículas formadas foram denominadas como esferas, pois o material ativo (conídios do fungo) apresentou disperso no material polimérico.

As esferas de alginato de sódio produzidas com *M. anisopliae* apresentaram formato arredondado quando úmidas e após a secagem, as esferas apresentaram formato irregular (Figura 8). O processo de secagem, liofilização ou BOD, não interferiu no formato e nem no peso seco das esferas produzidas ( $F_{(1,5)}=0,501$ ;  $P>0,05$ ), após a secagem o peso das esferas reduziu 96% nos dois processos de secagem, em 0,05g de material havia em média 104 esferas ( $dp \pm 3,4$ ).

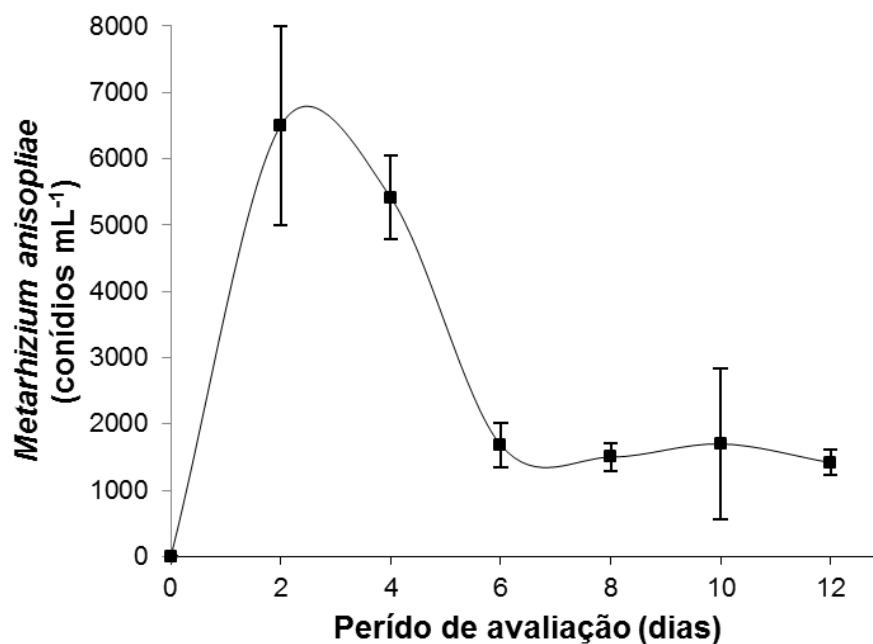




**Figura 8.** Esferas com fungo *M. anisopliae* antes (A) e após da secagem (B).

### **5.5 Liberação do fungo de *Metarhizium anisopliae* encapsulado em alginato de sódio**

Na figura 9 é apresentada a curva de liberação dos conídios de *M. anisopliae* durante doze dias do fungo encapsulado e imerso em água. A liberação do fungo pelas esferas teve aumento acentuado até o segundo dia, que apresentou  $6,5 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{dp} \pm 1500$ ), nos períodos posteriores foram verificados decréscimos na liberação, sendo observado no quarto dia a liberação de  $5,4 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{dp} \pm 630$ ), no sexto dia foram  $1,7 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{dp} \pm 331$ ), no oitavo dia foram  $1,5 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{dp} \pm 331$ ), no décimo dia foram  $1,7 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{dp} \pm 1330$ ) e no décimo segundo dia foram liberados  $1,4 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{dp} \pm 190$ ).



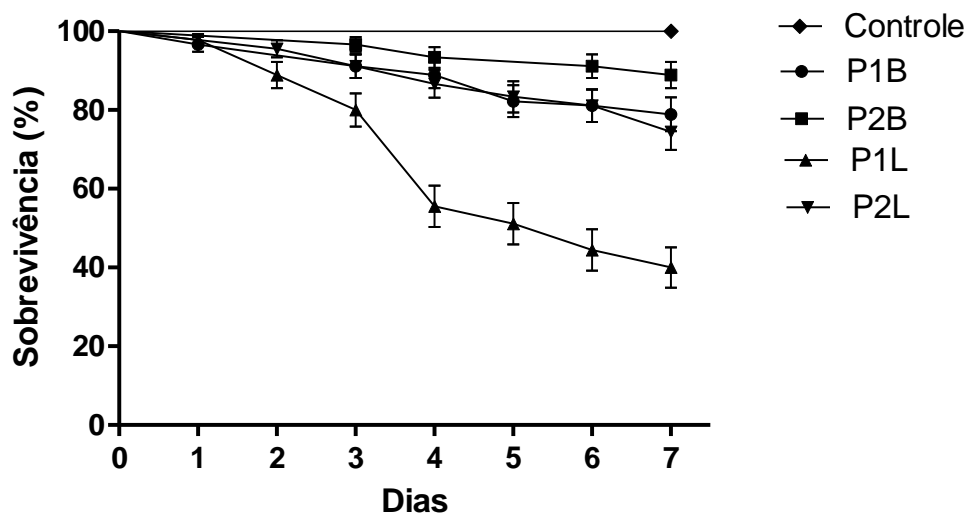
**Figura 9-** Liberação de *M. anisopliae* encapsulado em meio aquoso durante doze dias.

### 5.6 Experimento 3: Efeito do Polietilenoglicol e dos processos de secagem no encapsulamento de *Metarhizium anisopliae* em alginato de sódio sobre as larvas de *Aedes aegypti*

As esferas revestidas com PEG1 apresentaram maior aderência do produto. A falta de aderência foi observada pelos resíduos de PEG desprendidos das esferas após o processo de desidratação. As esferas desidratadas no liofilizador apresentaram menor dureza quando comparado com as esferas desidratadas na BOD, essa propriedade foi observada através da manipulação do produto.

As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com o fungo encapsulado com PEG1 ou PEG2 usando dois processos de desidratação (liofilização ou secagem em BOD) foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P < 0.0001$ ). No tratamento P1L o valor de  $S_{50}$  foi de 6 dias e nos demais tratamentos esse índice não foi atingido. A sobrevivência larval nos tratamentos P1B, P2B e P2L permaneceu acima de 70% em todo o período experimental. Nos controles, apenas água e esferas sem fungo produzidas com os tipos de PEG e

com processos de desidratação na BOD ou no liofilizador, a sobrevivência manteve em 100% (Figura 10).



**Figura 10.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* tratadas com *M. anisopliae* encapsulado. P1B (esferas com PEG1 e desidratação em BOD), P2B (esferas com PEG2 desidratação em BOD), P1L(esferas com PEG1 e desidratação no Liofilizador), P2L (esferas com PEG2 e desidratação no Liofilizador).

Os tratamentos proporcionaram sobrevivência larval significativamente diferente pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $F_{(4,14)} = 34,945$ ;  $P < 0,05$ ). As larvas tratadas com fungo encapsulado com PEG 1 e desidratadas no liofilizador (P1L) apresentaram sobrevivência de 38,9% enquanto que nos demais tratamentos os percentuais de sobrevivência foram maiores, sendo 78,9% em P1B, 88,9% em P2B e 75,6% em P2L. A sobrevivência larval nos tratamentos com o fungo encapsulado e desidratado na BOD (P1B e P2B) foi estatisticamente semelhante (Tabela 4).

**Tabela 4.** Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* infectada com fungo *M. anisopliae* encapsulado com dois tipos de PEG e desidratadas em BOD ou no liofilizador

Tratamentos	Sobrevivência (%) ±DP	S <sub>50</sub>
Controle	100,0 a*	ND
P1B	78,9±3,8 b	ND
P2B	88,9±1,9 ab	ND
P1L	38,9±10,7 c	6
P2L	75,6±3,9 b	ND

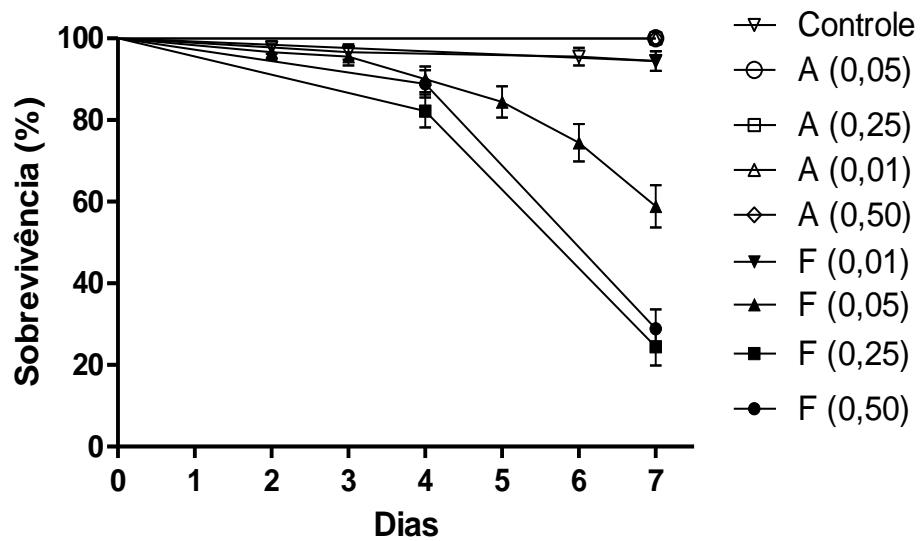
\*Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). A média sem valor de desvio padrão (DP) significa DP=0. P1B (esferas com PEG1 e desidratação em BOD), P2B (esferas com PEG2 e desidratação em BOD), P1L(esferas com PEG1 e desidratação no Liofilizador), P2L (esferas com PEG2 e desidratação no Liofilizador).

#### 5.7 Experimento 4: Avaliação da virulência de *Metarhizium anisopliae* encapsulado quando produzido a partir de conídios em arroz sem uso da máquina separadora

O fungo encapsulado produzido com a suspensão fúngica proveniente do fungo inoculado no arroz sem prévia separação pela máquina separadora de esporos, (Mycoharvester-Inglaterra) não proporcionou alteração na sobrevivência das larvas de *A. aegypti* durante o período do biensaio, ou seja, 100% das larvas sobreviveram, evidenciando que os resíduos do arroz na suspensão fúngica podem ter prejudicado a liberação dos esporos na esfera.

#### 5.8 Experimento 5: Curva de sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao *Metarhizium anisopliae* encapsulado em alginato de sódio

As curvas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao fungo encapsulado em diferentes concentrações foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P<0.0001$ ). Nos tratamentos com o fungo na dose de 0,05; 0,25 e 0,5g no 4º dia a sobrevivência larval foi de 88,9; 82,2 e 90, respectivamente. O valor de S<sub>50</sub> foi de sete dias nos tratamentos F (0,25) e F (0,5) e a DL<sub>50</sub> do fungo encapsulado sobre as larvas de *A. aegypti* foi de 0,052g em 50 mL de água. Nos tratamentos controle as curvas de sobrevivência ficaram estatisticamente semelhantes em todo o período de avaliação (Figura 11).



**Figura 11.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* tratadas com o fungo encapsulado (F), esferas sem fungo (A) nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,25 ou 0,5g.

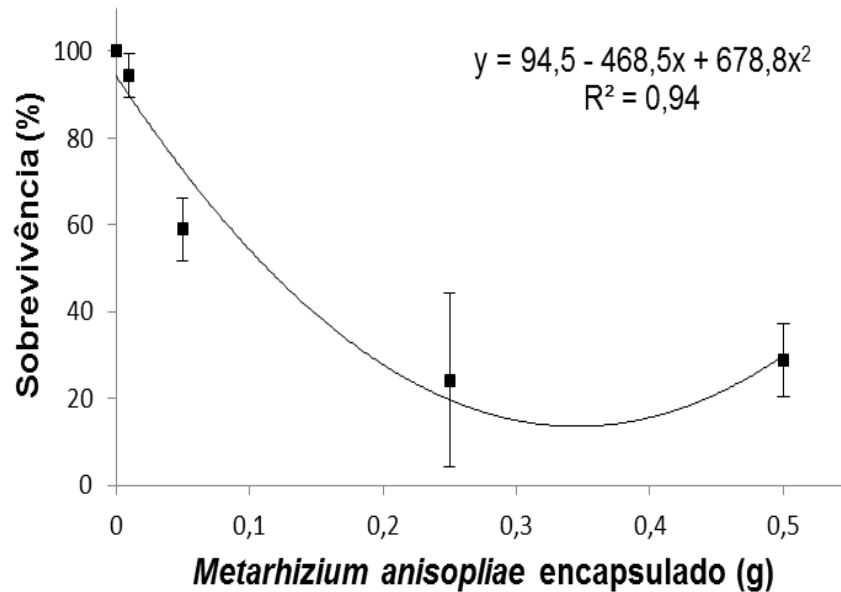
A curva de dose-resposta do fungo encapsulado sobre as larvas de *A. aegypti* foi significativamente diferente pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $F_{(8, 26)} = 18,382$ ;  $P < 0,05$ ). As doses de 0,25 e 0,5 g do fungo encapsulado promoveram o menor percentual com 24,3 e 28,9% de larvas sobreviventes, respectivamente. As esferas sem o fungo e o fungo encapsulado na concentração 0,01g/ 50 mL de água foram estatisticamente semelhantes ao controle (Tabela 5).

**Tabela 5.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao fungo encapsulado em diferentes concentrações

Tratamentos (g/50mL água)	Sobrevivência (%) $\pm$ DP	S <sub>50</sub>
Controle	100 a*	ND
A (0,01)	100 a	ND
A (0,05)	100 a	ND
A (0,25)	97,0 $\pm$ 3,8 a	ND
A (0,50)	100 a	ND
F (0,01)	94,4 $\pm$ 5,1 a	ND
F (0,05)	59,0 $\pm$ 7,2 b	ND
F (0,25)	24,3 $\pm$ 20,1 c	7
F (0,50)	28,9 $\pm$ 8,4 c	7

\*Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). ND = Dados não determinados. As médias sem valor de desvio padrão (DP) significam DP=0 . Esferas sem fungo (A) e fungo encapsulado (F) nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,25 e 0,5g/ 50mL de água.

A regressão quadrática foi o modelo mais apropriado para explicar a relação entre as doses do fungo encapsulado e a sobrevivência larval ( $F_{(2,14)}=45,173$ ;  $P<0,05$ ), 94% da variância pode ser explicada pela curva de regressão quadrática  $y=94,5 - 486,5x + 678,8x^2$  (Figura 12).

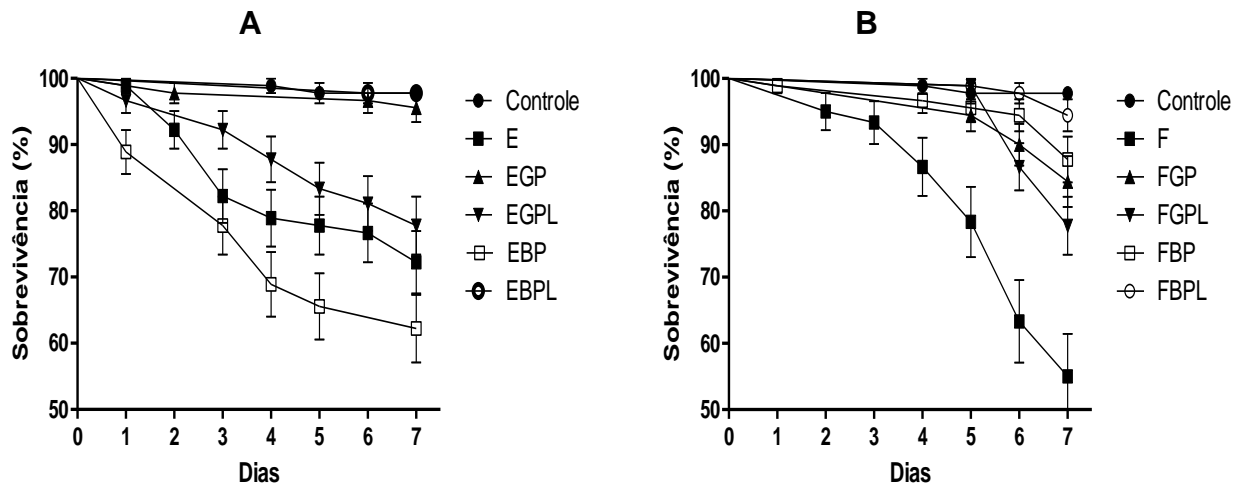


**Figura 12.** Relação da sobrevivência de larvas de *A. aegypti* em função das doses de *M. anisopliae* encapsulado.

### 5.9 Experimento 6: Efeito do tipo de embalagem, condições e tempo de armazenamento na virulência de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Aedes aegypti*

As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com *M. anisopliae* encapsulado ou não encapsulado e armazenado por diferentes dias foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P < 0.0001$ ). O índice  $S_{50}$  não foi determinado em nenhum dos tratamentos. As figuras 13, 14, 15 e 16 mostram as curvas de sobrevivência das larvas tratadas com fungo *M. anisopliae* armazenado por cinco, quinze, trinta e sessenta dias, respectivamente, sendo o índice A designado para o fungo não encapsulado (E) e o índice B para o fungo encapsulado (F).

No experimento realizado com o fungo armazenado por cinco dias foi verificado que entre os tratamentos com fungo não encapsulado, o tratamento EBP proporcionou menor percentual de sobrevivência, com 62,2% de sobrevivência larval (Figura 13A). E na análise com o fungo encapsulado a sobrevivência foi menor no tratamento FGPL com 77,8% de sobrevivência larval (Figura 13B).



**Figura 13.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao *M. anisopliae* não encapsulado (A) ou encapsulado(B) armazenado por cinco dias. (Esporo do fungo não encapsulado: EBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; EBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; EGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; EGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; E- sem armazenamento e sem embalagem). (Fungo encapsulado: FBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; FBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; FGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; FGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; F- sem armazenamento e sem embalagem).

Os tratamentos com o fungo não encapsulado e armazenado durante cinco dias apresentaram estatisticamente diferente pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $F_{(5,17)} = 37,536$ ;  $P < 0,05$ ). E os tratamentos com o fungo encapsulado também proporcionaram respostas diferenciadas na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* ( $F_{(5,17)} = 18,923$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 6). Os tratamentos armazenados na geladeira e embalados em plásticos (GPL) proporcionaram percentual de sobrevivência de 77,8% em ambos os grupos de tratamento, fungo não encapsulado e fungo não encapsulado.

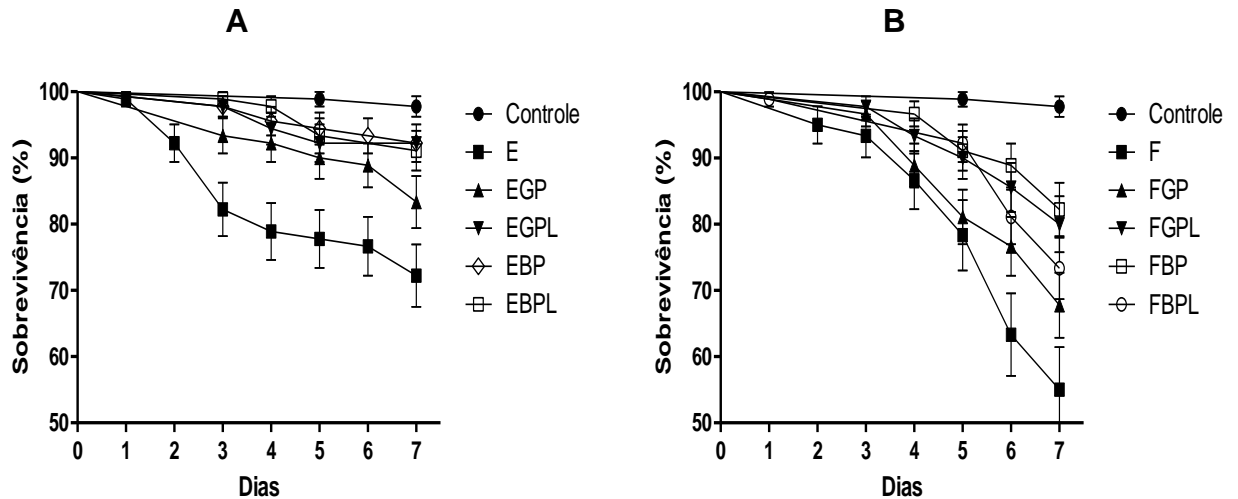


**Tabela 6.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas a fungo *M. anisopliae* armazenado por cinco dias

Condições de armazenamento	Sobrevivência ( $\pm$ ) DP	
	Fungo não encapsulado (E)	Fungo encapsulado (F)
Controle	100 a*	100 a*
BPL	97,8 $\pm$ 1,9 a	94,4 $\pm$ 1,9 ab
BP	62,2 $\pm$ 6,9 c	87,8 $\pm$ 1,9 abc
GPL	77,8 $\pm$ 4,0 b	77,8 $\pm$ 9,6 c
GP	95,6 $\pm$ 3,9 a	84,4 $\pm$ 6,9 bc
Sem armazenamento	72,2 $\pm$ 3,9 b	55,0 $\pm$ 10,0 d

\*Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentam diferença estatística na coluna pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). A média sem valor de desvio padrão (DP) significa DP=0 (BPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; BP- armazenado na BOD e embalagem de papel; GPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; GP- armazenado na geladeira e embalagem de papel).

Nos tratamentos armazenados por quinze dias foi verificado que as larvas de *A. aegypti* expostas ao fungo não encapsulado mantiveram a sobrevivência acima de 80% em todos os grupos de tratamentos (EBPL, EBP, EGPL e EGP) (Figura 14A). No grupo de tratamento com o fungo encapsulado, a sobrevivência larval foi menor no tratamento FGP com 67,8% (Figura 14B).



**Figura 14.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao *M. anisopliae* não encapsulado (A) ou encapsulado (B) armazenado por quinze dias. (Esporo do fungo não encapsulado: EBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; EBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; EGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; EGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; E- sem armazenamento e sem embalagem). (Fungo encapsulado: FBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; FBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; FGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; FGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; F- sem armazenamento e sem embalagem).

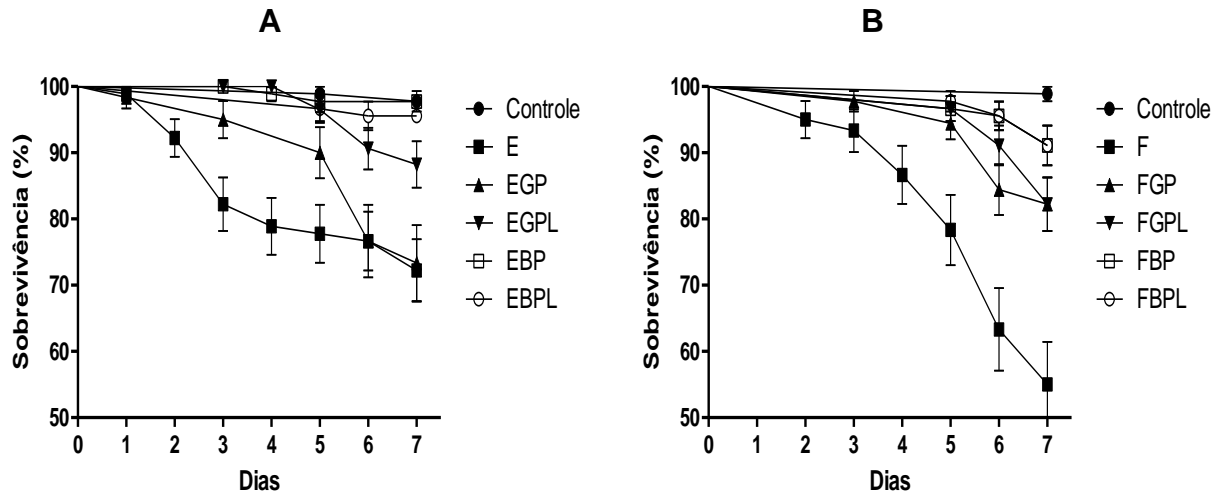
Nos tratamentos com o fungo não encapsulado e armazenado por quinze dias foram observadas diferenças estatísticas pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $F_{(5,17)} = 17,632$ ;  $P < 0,05$ ), o tratamento EGP apresentou o menor percentual de sobrevivência (83,3%) entre os tratamentos armazenados, porém sua virulência foi menor quando comparado com o tratamento E, que proporcionou percentual de sobrevivência de 72,2%. Nesse mesmo período de armazenamento, os tratamentos com o fungo encapsulado proporcionaram respostas diferenciadas na sobrevivência larval ( $F_{(5,17)} = 7,880$ ;  $P < 0,05$ ), o tratamento FGP com 67,8% foi estatisticamente semelhante ao tratamento F que proporcionou 55% de sobrevivência larval (Tabela 7).

**Tabela 7.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas a fungo *M. anisopliae* e armazenado por quinze dias

Condições de armazenamento	Sobrevivência ( $\pm$ ) DP	
	Fungo não encapsulado	Fungo encapsulado
Controle	97,8 $\pm$ 4,0 a	97,8 $\pm$ 3,9 a
BPL	91,1 $\pm$ 4,0 a	73,3 $\pm$ 11,9 b
BP	92,2 $\pm$ 3,8 a	82,2 $\pm$ 11,0 ab
GPL	92,2 $\pm$ 2,0 a	80,0 $\pm$ 3,0 ab
GP	83,3 $\pm$ 6,0 b	67,8 $\pm$ 7,9 bc
Sem armazenamento	72,2 $\pm$ 3,9 c	55,0 $\pm$ 10,0 c

\*Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentam diferença estatística na coluna pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). A média sem valor de desvio padrão (DP) significa DP=0 (BPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; BP- armazenado na BOD e embalagem de papel; GPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; GP- armazenado na geladeira e embalagem de papel).

As curvas de sobrevivência das larvas expostas ao fungo *M. anisopliae* armazenado por trinta dias são apresentadas na figura 15, os tratamentos com o fungo não encapsulado ou encapsulado mantiveram o percentual de sobrevivência acima de 70% em todos os tratamentos.



**Figura 15.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao *M. anisopliae* não encapsulado (A) ou encapsulado(B) armazenado por trinta dias. (Esporo do fungo não encapsulado: EBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; EBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; EGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; EGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; E- sem armazenamento e sem embalagem). (Fungo encapsulado: FBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; FBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; FGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; FGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; F- sem armazenamento e sem embalagem).

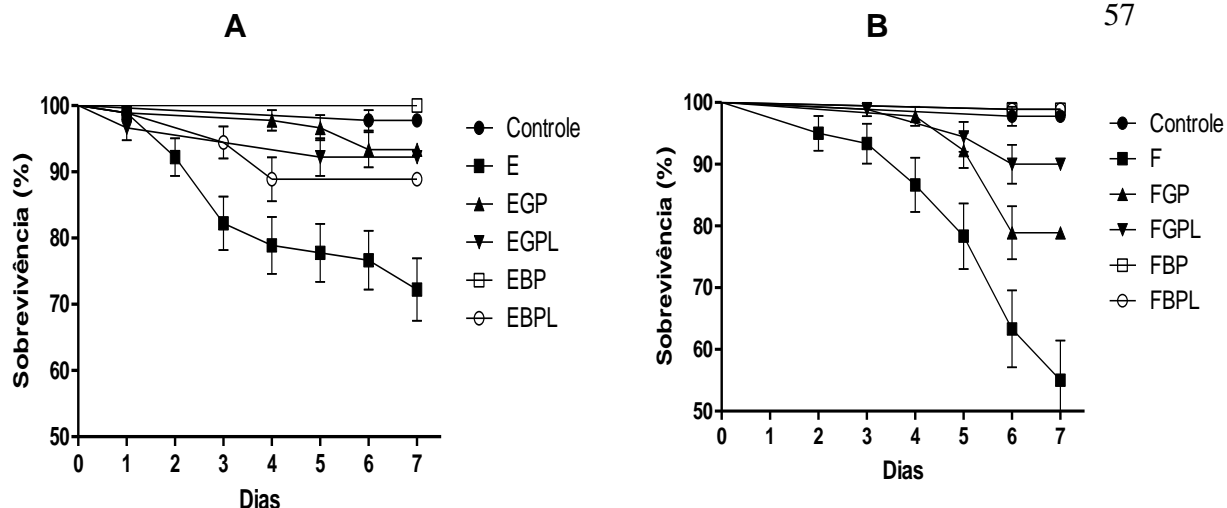
Após trinta dias de armazenamento, diferenças significativas também foram observadas pelo teste *post-hoc* de Duncan nos tratamentos com o fungo não encapsulado ( $F_{(5,17)} = 43,109$ ;  $P < 0,05$ ), nesse grupo de tratamento, o EGP com 73,3% de sobrevivência foi estatisticamente semelhante ao tratamento E com 72,2% de larvas sobreviventes e os tratamentos EBPL, EBP e EGPL apresentaram percentual de sobrevivência larval maior que 88%, sendo esse percentual estatisticamente diferente do tratamento com o fungo não armazenado (F). No grupo com o fungo encapsulado foi verificado que os tratamentos FBPL, FBP, FGPL e FGP permitiram a sobrevivência larval acima de 80%, diferindo estatisticamente do tratamento F que proporcionou 55% de larvas sobreviventes ( $F_{(5,17)} = 19,378$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas a fungo *M. anisopliae* e armazenado por trinta dias

Condições de armazenamento	Sobrevivência ( $\pm$ ) DP	
	Fungo não encapsulado	Fungo encapsulado
Controle	98,9 $\pm$ 1,9 a	98,9 $\pm$ 2,0 a
BPL	94,4 $\pm$ 1,9 ab	91,1 $\pm$ 1,9 ab
BP	97,8 $\pm$ 4,0 a	91,1 $\pm$ 4,9 ab
GPL	88,9 $\pm$ 4,0 b	82,2 $\pm$ 1,9 b
GP	73,3 $\pm$ 5,9 c	82,2 $\pm$ 8,0 b
Sem armazenamento	72,2 $\pm$ 3,9 c	55,0 $\pm$ 10,0 c

\*Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentam diferença estatística na coluna pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). A média sem valor de desvio padrão (DP) significa DP=0 (BPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; BP- armazenado na BOD e embalagem de papel; GPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; GP- armazenado na geladeira e embalagem de papel).

As larvas expostas ao *M. anisopliae* armazenado por sessenta dias em diferentes condições apresentaram percentual de sobrevivência acima de 85%, tanto para o grupo de tratamento com o fungo não encapsulado, quanto para os tratamentos com o fungo encapsulado (Figura 16).



**Figura 16.** Sobrevivência de larvas *A. aegypti* expostas ao *M. anisopliae* não encapsulado (A) ou encapsulado (B) armazenado por sessenta dias. (Esporo do fungo não encapsulado: EBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; EBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; EGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; EGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; E- sem armazenamento e sem embalagem). (Fungo encapsulado: FBPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; FBP- armazenado na BOD e embalagem de papel; FGPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; FGP- armazenado na geladeira e embalagem de papel; F- sem armazenamento e sem embalagem).

O fungo *M. anisopliae* armazenado por sessenta dias ocasionou respostas diferenciadas pelo teste *pos-hoc* Duncan na sobrevivência de larvas de *A. aegypti*. Os tratamentos com o fungo não encapsulado, EBPL, EBP, EGPL e EGP, que proporcionaram percentual de sobrevivência acima de 88% foram estatisticamente diferentes do fungo não armazenado (E) que permitiu 72,2% de larvas sobreviventes ( $F_{(5,17)} = 47,264$ ;  $P < 0,05$ ). Nos tratamentos com o fungo encapsulado, o tratamento FGP apresentou percentual de sobrevivência de 78,9% e os tratamentos FBPL, FBP e FGPL apresentaram percentual de sobrevivência maior que 89%, esses percentuais de sobrevivência foram estatisticamente diferentes do fungo não armazenado (F) que permitiu 55% de larvas sobreviventes ( $F_{(5,17)} = 31,916$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 9).

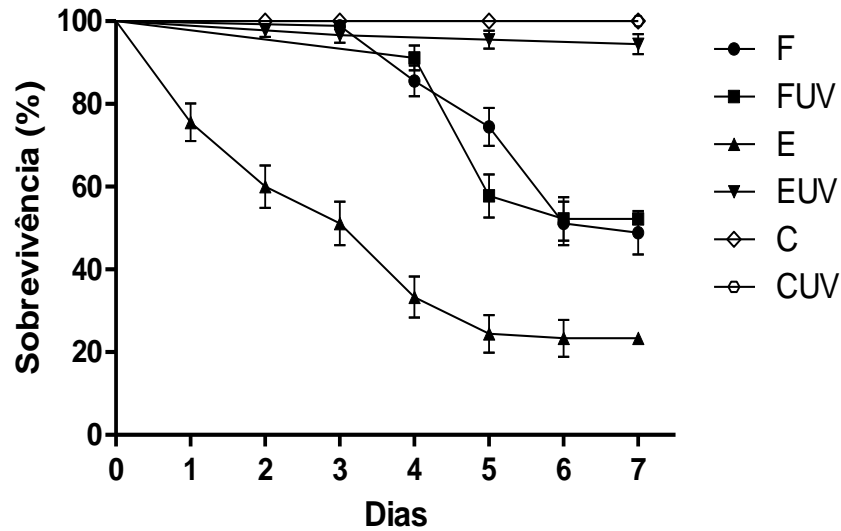
**Tabela 9.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas a fungo *M. anisopliae* e armazenado por sessenta dias

Condições de armazenamento	Sobrevivência ( $\pm$ ) DP	
	Fungo não encapsulado	Fungo encapsulado
Controle	97,8 $\pm$ 2,0 ab*	97,8 $\pm$ 2,0 a
BPL	88,9 $\pm$ 1,9 c	98,9 $\pm$ 2,0 a
BP	100 a	98,9 $\pm$ 2,0 a
GPL	92,2 $\pm$ 1,9 c	90,0 $\pm$ 3,0 a
GP	93,3 $\pm$ 3,0 bc	78,9 $\pm$ 3,9 b
Sem armazenamento	72,2 $\pm$ 3,9 d	55,0 $\pm$ 10,0 c

\*Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentam diferença estatística na coluna pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). A média sem valor de desvio padrão (DP) significa DP=0 (BPL- armazenado na BOD e embalagem de plástico; BP- armazenado na BOD e embalagem de papel; GPL- armazenado na geladeira e embalagem de plástico; GP- armazenado na geladeira e embalagem de papel).

#### **5.10 Experimento 7: Efeito da exposição ambiental de *Metarhizium anisopliae* com ou sem encapsulamento sobre larvas de *Aedes aegypti***

As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com o fungo encapsulado ou fungo não encapsulado expostas aos raios solares foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P<0.0001$ ). O valor de  $S_{50}$  foi de sete e quatro dias nos tratamentos F e E, respectivamente. No quarto dia de avaliação, a sobrevivência foi maior que 85% nos tratamentos F e FUV, e no tratamento EUV nesse mesmo período a sobrevivência foi menor que 35% (Figura 17).



**Figura 17.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* infectadas com fungo *M. anisopliae* encapsulado e não exposto a raios solares (F), fungo encapsulado exposto (FUV), esporo de fungo não exposto (E), esporo de fungo exposto (EUV) e esferas sem fungo e não expostas (C) e esferas sem fungo e expostas (CUV).

Os tratamentos com o fungo expostos aos raios solares foram estatisticamente diferente pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $F_{(5,17)} = 92,639$ ;  $P < 0,05$ ). O fungo não encapsulado e não exposto aos raios solares na concentração de  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  (E) proporcionou menor percentual de sobrevivência que os demais tratamentos. O tratamento com o fungo encapsulado exposto ou não exposto não foi estatisticamente diferente. Quando o fungo não encapsulado foi exposto aos raios solares a sua sobrevivência foi semelhante ao controle (Tabela 10).



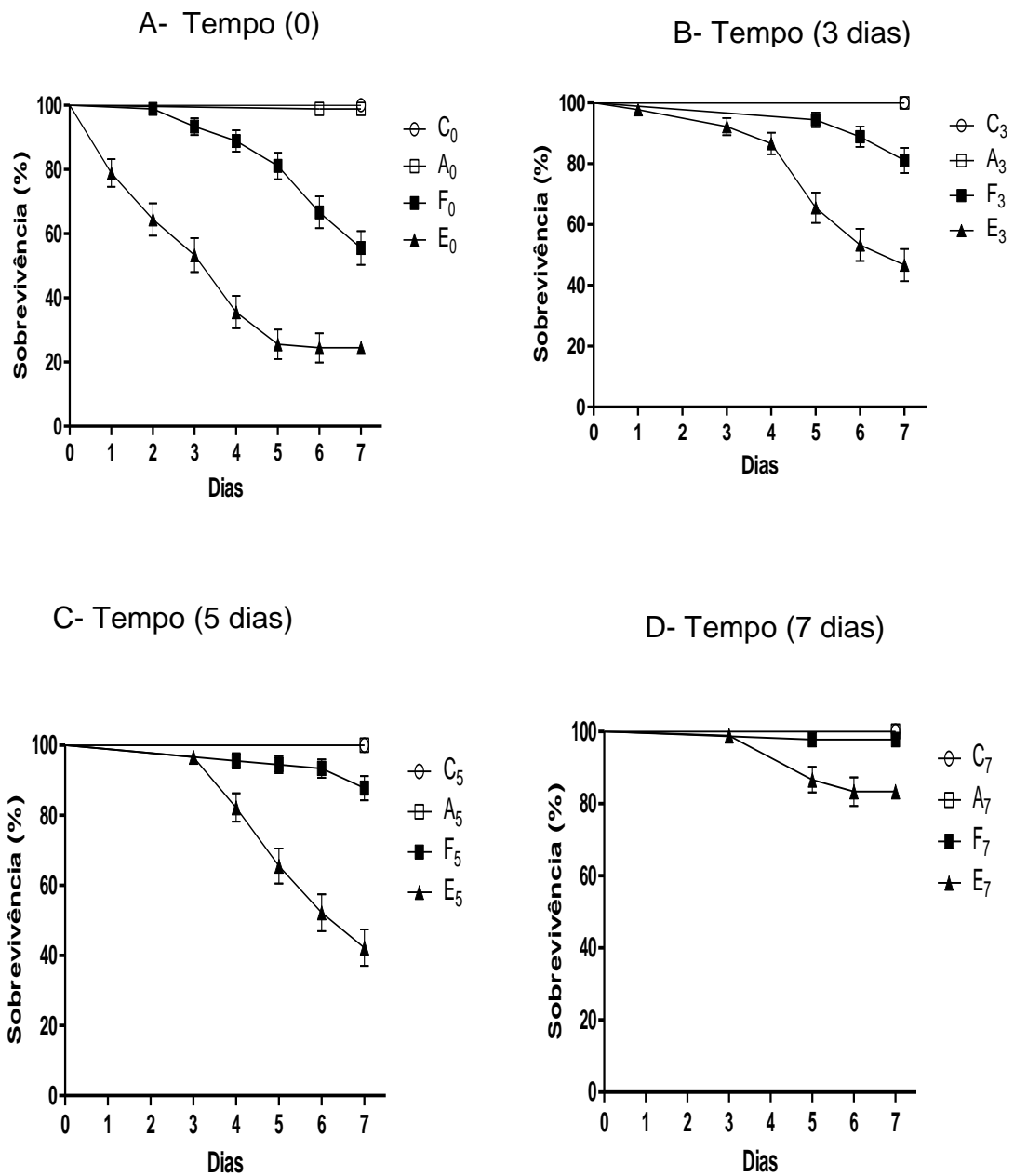
Tabela 10. Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao fungo *M. anisopliae* encapsulado ou não encapsulado exposto às condições ambientais

Tratamentos	Sobrevivência (%)±DP	S <sub>50</sub>
C	100 a*	ND
CUV	100 a	ND
F	48,9 ±3,8 b	7
FUV	52,2 ±11,7 b	ND
E	23,3 ±3,3 c	4
EUV	94,4 ±1,9 a	ND

\*Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste post-hoc de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). ND = Dados não determinados. A média sem valor de desvio padrão (DP) significa DP=0. **F**=Fungo encapsulado e não exposto às condições ambientais, **FUV**=fungo encapsulado e exposto às condições ambientais, **E**=fungo não encapsulado e não exposto às condições ambientais, **EUV**=fungo não encapsulado e exposto às condições ambientais, **C**= esferas sem fungo e não expostas às condições ambientais e **CUV**= esferas sem fungo e expostas às condições ambientais.

### 5.11 Experimento 8: Avaliação da persistência do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre as larvas de *Aedes aegypti*

As curvas de sobrevivência no teste de persistência de *M. anisopliae* foram estatisticamente diferentes pelo Log-rank Test ( $P<0.0001$ ). O tratamento F e o E não apresentaram persistência, tendo sua virulência diminuída no decorrer do experimento. A avaliação da persistência no tempo 0 proporcionou percentual de sobrevivência larval no tratamento F de 55,6% e no tratamento E a sobrevivência foi menor que 22% e o valor de S<sub>50</sub> foi de quatro dias. Após três dias de persistência do fungo, a sobrevivência aumentou tanto no tratamento com fungo encapsulado, como também no fungo não encapsulado, sendo encontrado percentual de 81,1% no tratamento F e 46,7% no tratamento E, o valor de S<sub>50</sub> no E aumentou para sete dias. A persistência de cinco dias promoveu índice de sobrevivência larval aproximado com a persistência de três dias, com 87,8 e 42,2% de larvas sobreviventes nos tratamentos F e E (Figura 18).



**Figura 18.** Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* infectada com *M. anisopliae* encapsulado (F- 0,05g mL<sup>-1</sup>), fungo não encapsulado (E- 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup>), esferas sem fungo (A) e controle com água (C). (A)- Teste sem persistência; (B)- Teste de persistência por 3 dias; (C)- Teste de persistência por 5 dias e (D)- Teste de persistência por 7 dias.

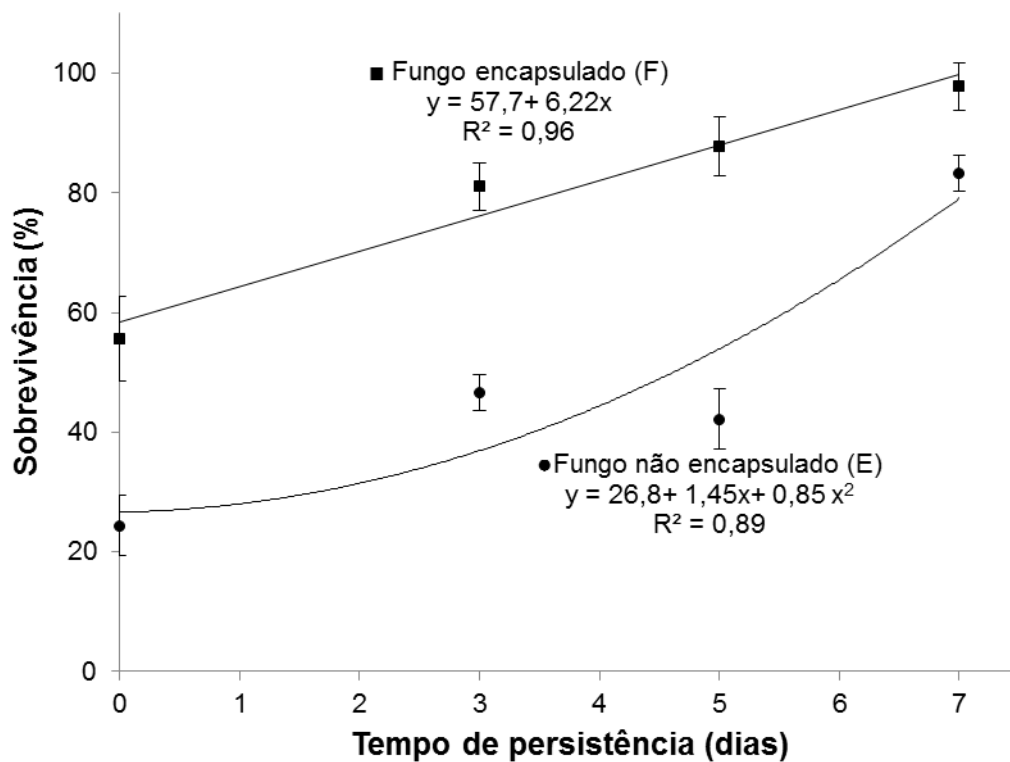
A avaliação da persistência de *M. anisopliae* através da análise da sobrevivência de larvas de *A. aegypti* foi estatisticamente diferente pelo teste *post-roc* de Duncan. Na avaliação sem persistência (T=0) os tratamentos com o fungo foram diferentes do controle, e o fungo não encapsulado (E) com 24,4% de sobrevivência apresentou maior virulência quando comparado com o fungo encapsulado com 55,6% ( $F_{(3,11)}=148,352$ ;  $P<0,05$ ). Nas avaliações posteriores, a virulência do tratamento E continua maior que no tratamento F, tanto para três dias de persistência ( $F_{(3,11)}=126,246$ ;  $P<0,05$ ) quanto para cinco dias ( $F_{(3,11)}=149,785$ ;  $P<0,05$ ), entretanto a partir do sétimo dia de persistência do fungo na água, apesar da diferença estatística o percentual de sobrevivência nos tratamentos F e E apresenta acima de 80% ( $F_{(3,11)}=23,342$ ;  $P<0,05$ ). Nas análises do tratamento F com três, cinco e sete dias de persistência, a sobrevivência larval foi 81,1; 87,8 e 97,8%, respectivamente ( $F_{(3,11)}=37,588$ ;  $P<0,05$ ). No tratamento E com três, cinco e sete dias de persistência, a sobrevivência larval foi de 46,7; 42,2 e 83,3%, respectivamente. A sobrevivência larval no tratamento E após sete dias de persistência aumentou três vezes mais que no tratamento sem persistência ( $F_{(3,11)}=57,850$ ;  $P<0,05$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Avaliação da persistência do fungo *M. anisopliae* sobre larvas de *A. aegypti*

Tratamento	Sobrevivência (%) $\pm$ DP			
	Tempo de Persistência (dias)			
	0	3	5	7
Controle	100 aA*	100 aA	100 aA	100 aA
A	98,9 $\pm$ 2,0 aA	100 aA	100 aA	98,9 $\pm$ 2,0 aA
F	55,6 $\pm$ 7,0 bC	81,1 $\pm$ 4,0 bB	87,8 $\pm$ 5,0 bAB	97,8 $\pm$ 4,0 aA
E	24,4 $\pm$ 5,0 cC	46,7 $\pm$ 3,0 cB	42,2 $\pm$ 5,0 cB	83,3 $\pm$ 3,0 bA

\* Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentam diferenças estatísticas na coluna e valores seguidos da mesma letra maiúscula não apresentam diferenças estatísticas na linha pelo teste *post-hoc* de Duncan ( $\alpha=0.05$ ). A média sem valor de desvio padrão (DP) significa DP=0 (A- esfera sem fungo; F- fungo encapsulado; E- fungo não encapsulado).

A análise de regressão foi realizada para avaliar a influência do tempo de persistência na virulência de *M. anisopliae*. No tratamento F, a regressão linear foi significativa para relacionar a sobrevivência das larvas de *A. aegypti* (y) com tempo de persistência do fungo *M. anisopliae* encapsulado (x) ( $F_{(1,11)}= 120,646$ ;  $P<0,05$ ), 96% da variância na sobrevivência larval pode ser explicada pela reta de regressão linear  $y= 57,7 +6,22x$ . No tratamento E, a regressão quadrática foi o modelo que ajustou melhor os dados ( $F_{(2,11)}=17,949$ ;  $P<0,05$ ), sendo observado que 89% da variância na sobrevivência larval pode ser explicada pela curva de regressão quadrática  $y=26,8 +1,453x +0,85x^2$  (Figura 19).



**Figura 19.** Relação entre a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* expostas ao fungo *M. anisopliae* encapsulado ou não encapsulado em função do tempo de persistência do fungo na água.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram realizados testes para determinar a curva dose-resposta de larvas de *A. aegypti* expostas ao diflubenzuron. O efeito do inseticida foi dependente das doses. A maior redução na sobrevivência foi observada na concentração de 250 ppb, sendo observado apenas 8,3% de larvas sobreviventes. A menor toxicidade foi observada em 0,1 e 0,25ppb. A análise de regressão mostrou que há relação entre as dosagens utilizadas e a sobrevivência larval, ou seja, à medida que aumenta a dose de diflubenzuron há redução no percentual de sobrevivência de larvas de *A. aegypti*.

Jahan et al. (2011) relataram que o diflubenzuron apresentou excelente efeito larvicida e alta toxicidade a larvas selvagens de *A. aegypti* no 4º estágio, sendo observado que a mortalidade foi dependente das doses, ou seja, doses mais elevadas (100, 10 e 1 ppm) causaram alta mortalidade larval e a emergência de adultos foi completamente inibida, enquanto a dose mínima (0,0001 ppm) também causou toxicidade aguda e 80% de inibição da emergência dos adultos.

No teste para investigar a interação do *M. anisopliae* com o diflubenzuron foi observado que houve interação sinérgica entre o inseticida e o fungo. O tratamento com o diflubenzuron combinado com *M. anisopliae* contra larvas de *A. aegypti* mostrou-se significativamente mais eficiente, apresentando o percentual de sobrevivência de 28,9%. Os tratamentos com o fungo sozinho ou inseticida sozinho foram significativamente semelhantes, com menos que 60% de sobrevivência larval.

No estudo da interação de *B. bassiana* com diflubenzuron a sobrevivência das larvas de *A. aegypti* no tratamento *B. bassiana* + diflubenzuron teve 46,7% de larvas vivas e foi estatisticamente semelhante ao tratamento com diflubenzuron sozinho que proporcionou 56,7% de larvas sobreviventes. Apesar da semelhança entre esses tratamentos, o fungo combinado com inseticida causou sobrevivência 10% menor que o inseticida sozinho. O fungo sozinho proporcionou sobrevivência larval semelhante ao controle, com mais de 90% de larvas vivas.

A interação sinérgica entre os fungos entomopatogênicos e os inseticidas envolve mudanças na fisiologia nos insetos, que influencia na penetração cuticular ou na proliferação inicial dos conídios dentro da hemocele do hospedeiro (Furlong e Groden, 2001). A interação sinérgica observada no presente estudo, entre *M. anisopliae* e o diflubenzuron, pode ser explicada pelo modo de ação do inseticida sobre as larvas, pois o diflubenzuron atua inibindo a síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto, causando a morte durante a ecdise (Mulla, 1995). Essa atuação facilita a invasão de outros agentes de controle, pois fragiliza o tegumento, uma das barreiras de defesa do inseto (Silva, 2002). Sendo assim, o fungo *M. anisopliae* que inicia o processo infeccioso a partir da adesão e germinação dos conídios na cutícula do inseto (Castrillo *et al.*, 2005) pode ter conseguido penetrar nas larvas com maior facilidade, ocasionando o menor percentual de sobrevivência das larvas tratadas com o fungo combinado com o inseticida.

Os testes realizados com larvas de 3º estágio de *Anomala cuprea* tratadas *M. anisopliae* (PMA-7) combinado com doses subletais dos inseticidas fenitrothion ou teflubenzuron apresentaram efeito sinérgico. Os hemócitos das larvas de *A. cuprea* foram significativamente afetados e a atividade da fenoloxidase foi inibida após a aplicação combinada do fungo com os inseticidas. Estes resultados indicaram que o sinergismo pode ser causado pela inibição do sistema imunológico celular larval e pelo sistema de defesa humoral larval, sendo por isso observada a maior e mais rápida mortalidade em larvas tratadas com a combinação do fungo com os inseticidas quando comparado com os tratamentos do fungo sozinho ou inseticida sozinho (Hiromori e Nishigaki, 2001).

Hassan e Charnley (1989) reportaram que a cutícula de larvas de *Manduca sexta* tratadas previamente com diflubenzuron (nome comercial:

Dimilin®) e posteriormente expostas ao *M. anisopliae* tiveram pouca resistência às hifas penetrantes do fungo e as larvas desintegraram durante a invasão.

Paula *et al.* (2011) observaram que *M. anisopliae* combinado com baixas concentrações do inseticida Imidacloprid reduziu significativamente a sobrevivência de adultos de *A. aegypti*, comparado com tratamentos feitos somente com o fungo.

As constatações da interação entre os fungos e o inseticida remetem à necessidade futura de trabalhos complementares, em que possam determinar os fatores responsáveis pelas interações, e de que modo esses fatores podem contribuir para uma melhoria nas abordagens do controle associado. Além da associação de fungos com inseticidas, o desenvolvimento de formulações fúngicas estáveis, de fácil aplicação e de baixo custo é fundamental para o avanço do controle biológico no manejo integrado de pragas e vetores, sendo também uma das etapas mais importantes na padronização do bioinseticida e de grande importância para a viabilização comercial (Alves, 1998).

Assim, buscando melhorar a eficiência de *M. anisopliae* foi desenvolvido seu encapsulamento em matriz de alginato e analisado virulência dessa formulação em diferentes condições. A formulação granulada é uma das mais adequadas para o controle de insetos em ambiente aquático (Batista-Filho *et al.*, 1998), como as larvas de *A. aegypti*.

Para a produção de esferas do fungo *M. anisopliae* foi necessário realizar a curva padrão das concentrações fúngicas conhecidas através de leituras no espectrofotômetro para comparar com as concentrações dos conídios liberados pelas esferas. A quantificação das concentrações foi medida no espectrofotômetro em 595nm, nesse estudo as leituras de absorvância das concentrações fúngicas apresentaram regressão logarítmica conforme foi aumentada a concentração.

A maior absorvância foi de 0,068 lida na concentração de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>, essa concentração fúngica apresentou absorvância duas vezes maior que a leitura em  $10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>. Essa proporção entre as concentrações é coerente, uma vez que o espectro de absorção é característico para uma determinada substância e a quantidade de absorção (intensidade) é dependente da concentração do composto (Skoog *et al.*, 2006).

As partículas formadas no presente estudo apresentaram os conídios dispersos no material polimérico, sistema monolítico, sem distinção do núcleo sendo, portanto denominada de esferas (Silva *et al.*, 2003) e o formato observado após a secagem foi irregular.

A liberação dos conídios pelas esferas foi analisada através de leitura de absorbância. As esferas com fungo nos recipientes com água sem larvas não apresentaram um padrão de liberação linear e nem quadrático, porém foi observada irregularidade nos níveis de liberação dos conídios e mantiveram íntegras em todo o período de avaliação. O segundo dia da avaliação apresentou a maior absorbância, sendo o valor encontrado correspondente à concentração de  $6,5 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , nos demais dias de leitura houve redução progressiva da liberação do fungo.

O fungo *M. anisopliae* encapsulado utilizado nos testes de sobrevivência larval apresentou completa dissolução no sétimo dia de avaliação, sendo possível observar os conídios dispersos na solução (observação pessoal). Esse tipo de liberação é denominado liberação com dissolução polimérica, no qual o material de recheio é liberado no meio, à medida que o polímero degrada (dissolve), ocorrendo o desprendimento físico das cadeias poliméricas na presença de excesso de água, sem mudança química, em pequenos fragmentos, por processos químicos ou biológicos (Cruz, 2004).

A alteração do pH da solução pode ter sido o processo químico responsável pela dissolução das esferas na presença das larvas, uma vez que o decréscimo do pH pode diminuir a força do gel (Morais *et al.*, 1989). Uma mudança no pH poderia estar relacionada com a excreção de substâncias pelas larvas, como também resíduos de exúvias.

Na presente pesquisa foram realizados testes para verificar o tipo de PEG e o procedimento de desidratação mais adequado para a produção das esferas. Nesse estudo foi constatado que o tratamento P1L foi o mais virulento contra larvas de *A. aegypti*. As esferas P1L foram revestidas com PEG com textura mais fina e desidratado por liofilização. Esse PEG apresentou maior aderência às esferas quando comparado com o outro PEG de textura mais grossa (observação pessoal), permitindo assim maior eficiência.

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero com elevada solubilidade em água e muitas das suas aplicações estão associadas com esta propriedade



(Tziampazis *et al.*, 2000). Esse polímero pode conduzir a formação de estruturas mais porosas, tornando-se útil na melhoria da velocidade de liberação do princípio ativo e aumentar a permeabilidade das esferas (Yeh, 2000).

Cruz (2004) observou que as microesferas de alginato revestidas com PEG atraíram maior quantidade de água e isto facilitou o transporte do material do recheio e o menor percentual da massa molecular do PEG acelerou a difusão do fármaco oxitetraciclina.

A adição de PEG 1500 às formulações de microesferas de acetobutirato de celulose foi mais promissora que a adição PEG 4000, uma vez que permitiu o desenvolvimento de poros nas partículas sem comprometer a eficiência de encapsulação da carbamazepina e proporcionou estrutura esférica. Esses resultados fornecem bons indicativos do potencial que o polietilenoglicol com menor peso molecular tem como adjuvante nas formulações de microesferas (Zanetti *et al.*, 2002).

A maior virulência do tratamento P1L pode ser atribuída pela maior liberação dos conídios do fungo na solução. Visto que, a liofilização não causa, geralmente, o encolhimento ou endurecimento do material que está sendo desidratado e as soluções desidratadas por este processo podem ser reidratadas mais rapidamente e facilmente, produzindo os poros microscópicos no produto resultante. Os poros são criados pelos cristais de gelo que sublimaram, deixando aberturas ou poros em seu lugar. Além das vantagens mencionadas, a liofilização tende a danificar menos o produto que está sendo desidratado do que outros métodos de desidratação, que envolvem temperaturas mais altas (Celestino, 2010).

Na análise realizada com esferas produzidas com esporos do fungo sem a prévia separação dos esporos demonstrou que não é viável essa metodologia, pois impede a liberação dos conídios da matriz de alginato. Os resíduos de arroz presente na suspensão fúngica poderiam ter dificultado a liberação (observação pessoal).

A curva de dose-resposta de *M. anisopliae* encapsulado sobre as larvas de *A. aegypti* apresentou regressão, demonstrando que a sobrevivência larval diminuiu à medida que aumentou a concentração do formulado (esferas) na solução, entretanto, após a concentração de 0,25g/50mL que proporcionou 24% de larvas sobreviventes, houve decréscimo na sobrevivência larval, com 28,9%

de larvas sobreviventes na concentração de 0,5g/50mL. As esferas produzidas com o alginato de sódio e o Agar sem o fungo não influenciaram a sobrevivência larval, sendo observado a sobrevivência de 100% das larvas, indicando que o fungo *M. anisopliae* foi o responsável pela redução na sobrevivência das larvas .

Nos estudos de Pereira *et al* (2009) as larvas *A. aegypti* (2° e 3° estágio) tratadas com suspensão de *M. anisopliae* (ESALQ 818) na concentração  $5 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> apresentaram 12% de sobrevivência e S<sub>50</sub> de seis dias. Esse percentual de sobrevivência é próximo com o valor encontrado usando a concentração de 0,25g/mL no presente estudo.

Outros estudos devem ser desenvolvidos para aumentar a eficiência de encapsulamento do fungo, de forma a aumentar a concentração dos conídios no interior das esferas e tendo um maior controle da liberação.

As características observadas nas esferas são dependentes de diferentes variáveis, sendo importante ressaltar a natureza do material a ser encapsulado e o método escolhido para o encapsulamento (Silva *et al.*, 2003). Liu e Liu (2009b) observaram que o fungo *B. bassiana* encapsulado pelo método “spray drying” libera completamente os conídios no período de cinco a dez minutos e apresentou formato esférico.

A rápida liberação do fungo observada no presente estudo pode ser também atribuída ao fato de que os biopolímeros hidrofílicos como o alginato apresentam alta porosidade, e pode causar elevado índice de difusão do princípio ativo (Batista *et al.*, 2014). E o formato irregular das esferas e a baixa retenção dos conídios podem ter sido influenciados pelas baixas concentrações dos reagentes utilizados no encapsulamento de *M. anisopliae* (0,25% de alginato de sódio e 0,04M de cloreto de cálcio diidratado). Cabe ressaltar que em testes preliminares foram utilizadas concentrações maiores, entretanto não foi observada liberação dos conídios, sendo então estabelecidas as referidas concentrações para a produção das esferas.

Pasqualim *et al.* (2010) observaram que a utilização de 0,5% de alginato de sódio e 0,5% de cloreto de cálcio resultou em microcápsulas de aparência menos homogênea, baixa resistência e pouca estrutura, entretanto, com o aumento na concentração, as microcápsulas formadas apresentaram-se mais uniformes, arredondadas e partículas com maior resistência. Nessa pesquisa foi verificado que o tempo de permanência das microcápsulas na solução de cloreto

de cálcio era diretamente proporcional à espessura da parede, ou seja, quanto maior o tempo na solução, mais espessa se mostrou a parede das microcápsulas.

Em outro estudo foi observado que o encapsulamento do fungo *Coniothyrium minutans* em alginato de sódio nas concentrações de 0,5 e 1% produziu grânulos irregulares após a secagem, porém quando foram utilizados 2% desse polímero, os grânulos foram morfologicamente mais uniformes, lisos e regulares após a secagem (Moretini e Melo, 2007).

O *M. anisopliae* encapsulado foi avaliado em diferentes condições de armazenamento, com a finalidade de verificar a estabilidade da formulação no decorrer do tempo. Alves (1997) relata que as formulações de fungos entomopatogênicos precisam garantir a estabilidade do produto na prateleira por maior tempo, mantendo suas características principais como viabilidade dos conídios e virulência sobre o inseto que se deseja controlar, sendo importante o conhecimento de local (temperatura) adequado para o armazenamento, como também o tempo de validade do produto.

A análise realizada no presente estudo verificou que o tipo de embalagem, papel ou plástico, não influenciou na virulência de *M. anisopliae* sobre as larvas de *A. aegypti*, porém o tempo ou o local de armazenamento foram os fatores que apresentaram significância.

Nas análises no fungo não encapsulado foi verificado que o tratamento EBP proporcionou a menor taxa de sobrevivência larval (62,2%) com cinco dias de armazenamento quando comparado com os demais tratamentos, entretanto, após quinze dias de armazenamento houve redução da virulência, pois a sobrevivência larval foi maior que 90%. No EBP com sessenta dias de armazenamento todas as larvas sobreviveram.

O tratamento EGP manteve sua virulência após trinta dias de armazenamento, pois apresentou percentual de sobrevivência larval de 73,3%, sendo estatisticamente semelhante ao fungo não armazenado (72,2%). Vale ressaltar que nesse tratamento o percentual de sobrevivência teve redução com o passar do tempo, porém após sessenta dias de armazenamento o índice de sobrevivência larval aumentou para 93,3%. Nos demais tratamentos com o fungo não encapsulado a sobrevivência larval foi maior que 75%, mostrando que a virulência foi afetada no decorrer do tempo.

As diferenças encontradas nos tratamentos podem estar relacionadas com a temperatura de armazenamento e com a umidade, uma vez que a redução da quantidade de água diminui o metabolismo das células e as baixas temperaturas tornam o metabolismo dos micro-organismos ainda mais lento. (Giroto *et al.*, 2008).

Marques e Alves (1996) trabalharam com armazenamento de *M. anisopliae* e verificaram que os conídios puros mantidos a 20°C durante 180 dias mantiveram apenas 63% de viabilidade.

Marques *et al.* (2000) verificaram que fungo puro de *B. bassiana* armazenado em freezer (-7°C) durante 80 meses manteve 100% de viabilidade e elevada virulência, uma vez que causou 94% de mortalidade em lagartas de *Diatraea saccharalis* e o tempo de armazenamento não afetou significativamente o TL<sub>50</sub>.

O encapsulamento de *M. anisopliae* em matriz de alginato não manteve a virulência do fungo após o armazenamento. Entretanto, entre os tratamentos analisados o FGP proporcionou a menor redução na virulência do fungo *M. anisopliae*. A falta da manutenção na virulência pode estar relacionada com ausência de ingredientes que podem proporcionar meio de crescimento ao fungo encapsulado, na formulação fúngica estudada havia apenas o alginato de sódio e Agar. Além disso, os micro-organismos possuem um tempo de viabilidade quando preservados por meio de diferentes técnicas, após esse período, ocorre a sua degeneração natural, que perde a capacidade de formar novos descendentes (Kitamoto *et al.*, 2002).

Os componentes presentes na formulação devem contribuir para o incremento da estabilidade, virulência e eficácia do agente entomopatogênico, devendo também aumentar a persistência do produto, ressaltando que temperatura, umidade e pH são fatores que também influenciam na estabilidade do micro-organismo (Batista-Filho *et al.*, 1998).

Trabalhos têm mostrado que a adição de ingredientes nas formulações aumenta a viabilidade de formulações fúngicas e a temperatura tem sido um fator importante para a manutenção de micro-organismos encapsulados. Kuek *et al.* (1992) afirmaram que dependendo da espécie fúngica, a imobilização em alginato permite que o inoculante seja armazenado por períodos maiores que sete meses.

Moretini e Melo (2007) mostraram que formulação granulada desenvolvida à base do fungo *Coniothyrium minitans* com alginato de sódio, celulose e caulim apresentou alto índice de viabilidade dos propágulos, quando armazenado a 4°C por um período de 14 meses.

A formulação granulada contendo alginato de sódio e farelo de trigo apresentou maior taxa de sobrevivência do fungo *Trichoderma harzianum* quando este foi armazenado a 4°C. A adição do farelo de trigo assegurou maior viabilidade e estabilidade do fungo após dois anos de armazenamento, além de preservar sua capacidade em parasitar o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Melo e Costa, 2005).

O fungo nematófago *Paecilomyces lilacinus* encapsulado em matrizes de alginato-argila e armazenado a 7°C por doze meses manteve o percentual de germinação maior que 90%, enquanto que o mesmo fungo não encapsulado teve sua viabilidade reduzida rapidamente no mesmo período e temperatura (Carneiro e Gomes, 1997).

A viabilidade do fungo *B. bassiana* microencapsulado apresentou as melhores taxas de germinação quando o encapsulamento foi realizado com o “spray drying” em baixa temperatura do que com o “spray drying” convencional. As taxas de germinação das microcápsulas armazenadas a 4 ou 25° C durante 1 mês foram 85 e 75%, respectivamente. Estes valores diminuíram para 80 e 65%, respectivamente, após seis meses, indicando que as taxas de germinação e a viabilidade das microcápsulas armazenadas a 4° C eram melhores do que as armazenadas a 25° C. Os de conídios *B. bassiana* encapsulados apresentaram uma vida útil mais longa do que os conídios não encapsulados (Liu e Liu, 2009b).

A temperatura de armazenamento e adição de nutrientes foram variáveis importantes para a preservação da viabilidade dos esporos e micélios do fungo *Phanerochaete chrysosporium* incorporado em cápsulas de alginato de sódio. As cápsulas armazenadas a 5°C, micélio com ou sem suplementação de nutrientes foram viáveis após um ano de armazenamento, entretanto em temperatura ambiente (25 ou 28°C) na ausência de suplementação nutricional, a viabilidade diminuiu acentuadamente em dois meses, porém com a adição de serragem ou sabugo de milho a viabilidade do micélio aumentou. Os esporos de *P. chrysosporium* incorporado em cápsulas de alginato juntamente com grãos de

sabugo de milho apresentaram 75% de viabilidade após nove meses de armazenamento em temperatura ambiente (Loomis *et al.*, 1997).

Elizei *et al.* (2014) reportaram que os micélios dos fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium solitum* foram encapsulados em matriz de alginato de sódio e avaliados os efeitos da temperatura de armazenamento sobre o crescimento micelial e a esporulação dos fungos imobilizados. Nesse teste foi verificado que apenas o fungo *C. cladosporioides* apresentou maior índice de crescimento micelial quando armazenado em freezer (-3 a -6°C) ou na geladeira (4 a 7°C), os demais apresentaram maior crescimento quando armazenados em temperatura ambiente. Com relação à esporulação de *A. niger*, *C. cladosporioides* e *P. solitum*, observou-se que a melhor temperatura de armazenamento foi a temperatura ambiente (18 a 27°C). O armazenamento dos grânulos com os fungos imobilizados no freezer reduziu a esporulação deles, indicando efeito negativo de baixas temperaturas.

No presente estudo foram investigados os efeitos das condições ambientais sobre o fungo *M. anisopliae* encapsulado ou não encapsulado. Sendo assim foi observado que o encapsulamento dos conídios do fungo *M. anisopliae* em matriz de alginato de sódio foi eficiente para preservar a virulência do fungo após exposição à radiação solar natural com influência da variação da temperatura, umidade e velocidade do vento.

O fungo não encapsulado na concentração  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> sem influência ambiental direta reduziu a sobrevivência de larvas de *A. aegypti* em 23,3%, entretanto, quando esses conídios foram expostos às condições ambientais, o percentual de sobrevivência larval aumentou quatro vezes, apresentando 94,4% de larvas vivas, evidenciando que a virulência do fungo diminuiu drasticamente. Em contrapartida, quando o fungo *M. anisopliae* foi encapsulado, o percentual de sobrevivência manteve estatisticamente semelhante, tanto sem a influência direta das condições ambientais com 48,9% de larvas sobreviventes, como sobre efeitos diretos dos fatores ambientais, apresentando 52,2% de sobrevivência larval.

Corroborando com o presente estudo, Rangel *et al.* (2008) relataram que a radiação solar ultravioleta e o calor reduzem drasticamente a viabilidade de conídios no campo, e estes fatores de estresse comprometeram a eficácia do fungo *M. anisopliae*. A exposição direta à radiação solar pode inativar em poucas

horas os conídios de *M. anisopliae* (Braga *et al.*, 2001c) e os conídios sobreviventes podem apresentar alterações genéticas e/ou fisiológicas que reduzem sua virulência (Braga *et al.*, 2001a, b).

Estudos têm sido desenvolvidos para buscar alternativas que possam melhorar a eficácia de *M. anisopliae* em condições de campo. Rangel *et al.* (2006) reportaram que o meio de cultura em que os conídios do fungo são cultivados pode influenciar na sua tolerância aos raios UV. Nesse estudo foi mostrado que os conídios do fungo *M. anisopliae* cultivados em meio mínimo sem suplementação de carbono (MM), ou em meio MM com arabinose, frutose, galactose, mio-inositol, lactose, manitol são pelo menos duas vezes mais tolerantes a UV-B que os conídios produzidos em meio rico PDAY (nitrogênio orgânico, glicose e amido de batata) ou em meio MM contendo glicose, glicerol, maltose, rafinose, sorbitol, sacarose, trealose ou xilose.

Os autores observaram também que para o fungo *M. anisopliae* a fonte de carbono ou o tipo de carboidrato é mais importante do que o tipo de fonte ou quantidade de nitrogênio no aumento da tolerância ao estresse, e a alta tolerância à radiação UV-B foi correlacionada com a acumulação de trealose e manitol.

Após o estudo dos efeitos das condições ambientais sobre o fungo *M. anisopliae* foi investigada a persistência da virulência do fungo sobre as larvas de *A. aegypti*. Nesse estudo foi observado que o fungo não encapsulado manteve a virulência após três e cinco dias de persistência na água, com 46,7 e 42,2% de larvas vivas, mas após sete dias de persistência a sobrevivência larval aumentou significativamente com 83,3% de larvas vivas. Esses resultados apresentaram semelhança com o estudo de Pereira *et al.* (2009), que verificaram a persistência de *M. anisopliae* na concentração  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> apenas por três e cinco dias, que proporcionou menos de 40% de larvas vivas, sendo observado após dez dias de persistência o percentual de sobrevivência maior que 60% de larvas. O fungo encapsulado não apresentou persistência em nenhum dos tempos estudados.

A perda da virulência do fungo pode ter sido causada pelo crescimento de micro-organismos antagonistas na solução que continha as esferas do fungo, uma vez que as esferas foram produzidas com Agar. As soluções e géis de Agar são conhecidos como meios férteis de contaminação por bactérias e fungos. Além

disso, Batista-Filho *et al.* (1998) relataram que a presença de ácidos orgânicos e gases tóxicos reduz drasticamente a persistência do bioinseticida.

Outros estudos devem ser desenvolvidos para buscar alternativas que mantenham a virulência do fungo ao longo do tempo e com maior persistência para viabilizar o controle de larvas de *A. aegypti* em condições de campo.



## 7. CONCLUSÕES

- O diflubenzuron na concentração de 250 ppb proporcionou 8,3% de larvas sobreviventes, sendo esse o menor percentual de sobrevivência entre as concentrações estudadas;
- A combinação de *M. anisopliae* com diflubenzuron apresentou interação sinérgica sobre as larvas *A. aegypti*, promovendo 28,9% de sobrevivência larval;
- A combinação de *B. bassiana* com diflubenzuron não apresentou interação, sendo encontrado percentual de sobrevivência de 46,7%, estatisticamente semelhante ao tratamento com diflubenzuron sozinho que ocasionou 56,7% de larvas sobreviventes;
- A maior liberação de *M. anisopliae* encapsulado foi no segundo dia de imersão na água, com  $6,5 \times 10^3$  conídios mL<sup>-1</sup> liberados;
- O fungo encapsulado desidratado no liofilizador e revestido com PEG 1 apresentou-se mais virulento contra larvas de *A. aegypti* dentre os tratamentos;
- As doses de 0,25 e 0,5 g/50 mL de *M. anisopliae* encapsulado promoveram o menor percentual com 24,3 e 28,9% de larvas sobreviventes;
- O fungo não encapsulado e o fungo encapsulado armazenado na geladeira e embalado com papel (EGP e FGP) apresentaram menor redução na virulência do fungo *M. anisopliae* entre os tratamentos;

- O encapsulamento de *M. anisopliae* em matriz de alginato de sódio protegeu o fungo das flutuações ambientais;
- *M. anisopliae* não encapsulado manteve a virulência após três e cinco dias de persistência na água, após sete e dez dias de persistência a sobrevivência larval aumentou, demonstrando a perda da virulência;
- No estudo de persistência com *M. anisopliae* encapsulado foi observado que o fungo diminuiu a virulência contra larvas de *A. aegypti* a partir do terceiro dia na água.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alizadeh, A., Samih, M.A., Khezri, M., Riseh, R.S. (2007) Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9:31-34.
- Alves S.B., Leucona R.E. (1998) Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves S.B. (ed) *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 97–169.
- Alves, S.B. (1998b) Fungos Entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (ed) *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 289-371.
- Alves, S.B. (1998b) Fungos Entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (ed) *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 289-371.
- Alves, S.B., Moino Jr., A., Almeida, J.E.M. (1998a) Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves S.B. (ed) *Controle microbiano de insetos*. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p. 217-238.
- Alves, S.B., Silveira Neto, S., Pereira, R.M., Macedo, N. (1987) Estudo de formulações de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. *Ecossistema* 12: 78-87.

- Antonio-Arreola, G.E., López-Bello, R., Romero-Moreno, D.K., Sánchez, D. (2011) Laboratory and field evaluation of the effects of the neonicotinoid imidacloprid on the oviposition response of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). *Mémoires Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8): 997-1001.
- Araújo Júnior, J. M., Marques, E.J, Oliveira, J.V. (2009) Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do óleo de nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: *Aphididae*). *Neotropical Entomology*, 38: 520-525.
- Araújo, A. L. (2011) Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
- Arruda, W., Lübeck, I., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37:231-244.
- Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Lamas, C. (2001) Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, 30(3): 437-447.
- Batista Filho, A., Alves, S.B., Alves, L.F.A., Pereira, R.M., Augusto, N.T. (1998) Formulação de entomopatógenos. In: Alves, S.B. (ed.) *Controle microbiano de insetos*. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p. 917-965.
- Batista, D.P.C., Souza R.S., Santos, N.S. M., Sena Filho, J. G., Teodoro, A. V., Grillo L. A. M., Dornelas, C.B. (2014) Polymer/layered silicate nanocomposite as matrix for bioinsecticide formulation. *Macromolecular Symposia*, 344: 14–21.
- Beserra, E.B., Fernandes, C.R.M., Queiroga, M.F.C., Castro Jr, F.P. (2007) Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. *Neotropical Entomology*, 36(2):303-307.
- Borges, L.R., Nova, M. X.V. (2011) Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no Manejo Integrado de Pragas – uma revisão. *Ambiência*, 7(1): 179 – 190.

- Borges, R.A., Cavasin, G.M., Silva, I.G., Arruda, W., Oliveira, E.S.F., Silva, H.H.G., Martins, F. (2004) Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise da larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista de Patologia Tropical*, 33(1): 91-104.
- Braga I.A., Galardo, A.K.R., Machado Filho, M.R., Zimmerman, R., Braga, I.L.(1999) Controle seletivo de vetores da malária: guia para o nível municipal. Brasília: Ministério da Saúde.
- Braga, G. U. L, Flint, S.D., Messias,C. L., Anderson A. J., Roberts,D.W. (2001a) Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology*, 73:140-146.
- Braga, G. U. L, Flint, S.D., Messias,C. L., Anderson A. J., Roberts,D.W. (2001b) Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*, *Mycological Research*. 105 (7): 874-882
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W. (2001c) Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 74, 734–739.
- Braga, I.A., Lima, J.B.P., Silva, S.S., Valle, D. (2004) *Aedes aegypti* resistance to temefós during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99:199-203.
- Braga, I.A.E., Valle, D. (2007) *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16 (4):179-293.
- Carballo M. (1998) Formulación de hongos entomopatógenos. *Revista Manejo Integrado de Plagas*, 47:1-4.
- Carneiro, R.M.D.G., Gomes, C.B. (1997) Encapsulação do fungo *Paecilomyces lilacinus* em matrizes de alginato-argila e avaliação da viabilidade dos conídios em duas temperaturas. *Nematologia Brasileira*, 21(2): 85-92.

- Carolino, A.T., Paula, A.R., Silva, C.P., Butt, T.M., Samuels, R. I. (2014) Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 7:198-2015.
- Castrillo, L.A; Roberts, D.W; Vandenberg, J.D. (2005) The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89:46-56.
- Catão, R.C. (2012) Dengue no Brasil: Abordagem geográfica na escala nacional. São Paulo: Cultura Acadêmica, 178p.
- Cavalcanti, L. P. D. G., Pontes, R. J. S., Regazzi, A. C. F., Júnior, P., Frutuoso, R. L., Sousa, E. P., Dantas Filho, F.F., Lima, J. W. D. O. (2007). Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. *Revista de Saúde Pública*, 41(4), 638-644.
- Celestino, S. M. C. (2010) Princípios de Secagem de Alimentos - Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados*, p. 33-46.
- Christophers, S.R. (1960) *Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure, Cambridge University Press, London, 738 p.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira R. L. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, Reimpressão. 225p.
- Costa, F.S., Silva, J.J., Souza, C.M., Mendes, J. (2008). Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(3), 309-312.
- Cruz, M.C.P. (2004) Influência do poli(etileno glicol) (PEG) no processo de microencapsulação da oxitetraciclina no sistema alginato/quitosana: modelamento "in vitro" da liberação oral. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas, 157p.
- Darbro, J.M., Graham, R.I., Kay, B.H., Ryan, P.A., Thomas, M.B. (2011) Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of

- the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Science and Technology*, 21(9):1027-1047.
- Eiras, A.E. (2005) Culicídeos. In: Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M. (eds.) *Parasitologia Humana*. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu I, p. 55-367
- Elizei, V.G., Chalfoun, S.M., Botelho, D.M.S., Rebelles, P.P.R. (2014). Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. *Arquivo Instituto Biol., São Paulo*, 81 (2):165-172.
- Elliot, S.L., Blanford, S., Thomas, M.B., 2002. Hostpathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1500), 1599-1607.1607.
- Ericsson, J.D., Kabaluk, J.T., Goettel, M.S., Myers, J.H. (2007) Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* against the exotic wireworm *Agriotes lineatus* and *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elatridae). *Journal of Economic Entomology*, 100(1): 31–38.
- Fang W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y., Pei, Y. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:363-370.
- Faria, M.R., Wraight, S.P.( 2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*, 43:237-256.
- Favaro-Trindade, C.S., Pinho, S.C., Rocha, G.A. (2008) Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of food Technology*, 11(2): 103-112.
- Fernandes, P.M. (1986) Influência da temperatura, umidade relativa do ar e dose na eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Ceratoma arcuata* Oliv. (COL.: CRYSEMELIDAE) Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola

- Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 67 f.
- Ferreira, L.F.H., Sampaio, S.M. (1996) Proposta de territorialização das ações municipais de controle dos vetores da dengue e febre amarela no município de Dracena. Relato de experiência. XI Jornada Paulista de Parasitologia. Faculdade de Saúde Pública/USP.
- Forattini, O.P. (2002) Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: vol.2. São Paulo: EDUSP, Brasil, 860p.
- Franceschini, M., Guimarães, A.P., Camassola, M., Frazzon, A.P., Baratto, C.M., Kogler, V., Silva, M.V., Dutra, V., Nakazato, L., Castro, L., Santi, L., Vainstein, M.H., Schrank, A. (2001) Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 23:32-37.
- FUNASA (2001) Dengue – Instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. Brasília: Ministério da Saúde, 84p.
- Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J., Rinaudo, M.(1999) Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials*, 20: 1427-1435, 1999.
- Furlong, M.J; Groden, E (2001) Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. *Journal of Economic Entomology*, 94 (2): 344-3.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti, F.O.E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Lopes, J.R.S., Omoto, C. (2002) Entomologia Agrícola, Piracicaba: FEALQ, 920 p.
- García-Munguía, A.M., Garza-Hernández, J.A., Rebollar-Tellez, E.A., Rodríguez-Pérez, M.A., Reyes-Villanueva, F. (2011) Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 4:24-30.



- Gerding-González, M., France, A., Sepulveda, M. E., Campos, J. (2007). Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 17(1): 105-110.
- Giroto, M.J., Aquino, L.F.B., Perez, R.B., Naves, M.F., Sacco, S.R. (2008) O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, Curitiba, 10(6): 1-7.
- Githeko, A.K., Lindsay, E.W., Confalonieri, E.U., Patz, J.A. (2000) Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin World Health Organization*, 78(9):1136-1147.
- Glasser, C. M., Gomes, A. C. (2002) Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, 36(2):166-172.
- Gombotz, W. R., Wee, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31:267-285.
- Gomes, A.S., Sciavico, C.J., Eiras, A.E. (2006) Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (*Diptera: Culicidae*) em laboratório e campo. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 39 (4): 327-32.
- Hassan, A.E.M., Charnley, A.K. (1989) Ultrastructural Study of the Penetration by *Metarhizium anisopliae* through Dimilin-Affected Cuticle of *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 117-124.
- Hiromori, H; Nishigaki, J. (2001) Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Applied Entomology and Zoology*, 36(2): 231–236.
- Howard, A.F.V., N'guessan, R., Koenraadt, C.J.M., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbéto, M., Thomas, M.B., Knols, B.G.J., Takken, W. (2010) The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 3:87-98.

- Jahan, N., Razaq, J., Jan, A. (2011) Laboratory evaluation of chitin synthesis inhibitors (Diflubenzuron and Buprofezin) against *Aedes aegypti* larvae from Lahore, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 43(6): 1079-1084.
- James, R. R., Croft, B. A., Shaffer, B. T., Lighthart, B. (1998) Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a *Coccinellid*, *Environmental Entomology*, 27(6): 1.506-1.513.
- Johnson, F.A., Craig, D.Q.M., Mercer, A.D. (1997) Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49:639-643.
- Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Knols, B.G.J., Koekemoer, L.L., Farenhorst, M., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Coetzee, M. (2010) The infectivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to insecticide-resistant and susceptible *Anopheles arabiensis* mosquitoes at two different temperatures. *Malaria Journal*, 9:71-80.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. (2001) Dictionary of the fungi. Wallingford: CAB International.
- Kitamoto, Y.; Suzuki, A.; Shimada, S.; Yamanaka, K. (2002) A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43(12):143-149.
- Knudsen, G.R., Eschen, D.J., Dandurand, L.M., Wang, Z.G. (1991) Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2864-2867.
- Konni, P.A., Ellar, D.J. (1994) Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic d-endotoxins. *Microbiology*, 140: 1869-1880.
- Kuek, C.; Tommerup, I.C.; Malajczuc, N. (1992) Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. *Mycological Research*, Cambridge, 96(4): 273-277.

- Lima, E. P., Paiva, M. H., de Araújo, A. P., Da Silva, E. V., Silva, U. M., Oliveira, L. N., Santana, A.E., Barbosa, C.N., Neto, C.C.P., Gourlart, M., Wilding, C.S., Ayres, C.F.J., Santos, M. A.V.N (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*, 4(5), 2-12.
- Lima, E.P., Oliveira Filho, A.M., Lima, J.W.O., Ramos Júnior, A.N., Cavalcanti, L.P.G., Pontes R.J.S. (2006) Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(3):259-263.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae*. Facsimile reprint of first volume. *British Museum Publications* (1939).
- Liu, C. P., Liu, S.D. (2009b). Low-temperature spray drying for the microencapsulation of the fungus *Beauveria bassiana*. *Drying Technology*, 27(6), 747-753.
- Liu, C.P., Liu, S.D. (2009a) Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. *Journal of Microencapsulation*, 26(5): 377–384.
- Loomis, A.K., Childress, A. M., Daigle, D., Bennett, J. W. (1997) Alginate encapsulation of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Current microbiology*, 34(2): 127-130.
- Luz, C., Tai, M.H.H., Santos, A.H., Silva, H.H.G. (2008) Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 103(2):214-215.
- Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Ventura, G.M., Sanfuentes, E.A. (2003) Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. *Fitopatologia brasileira*, 28(1): 101-105.
- Marques, E.J., Alves, S.B.(1996) Otimização de formulações na preservação de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae*

- (Metschn.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. Arq. Biol. Tecnol. 39: 861-877.
- Marques, E.J., Alves, S.B., Marques, I.M.R. (2000). Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(2), 303-307.
- Marques, R.P., Monteiro, A.C., Pereira, G.T. (2004) Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*, 34(6): 1675-1680.
- Melo, I.S. (2002) Recursos genéticos microbianos. In: Melo, I.S., Valadares-Ingliš, M.C., Nass, L.L., Valois, A.C.C. (eds.). *Recursos genéticos & melhoramentos - Microrganismos*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, p.2-48.
- Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) (1998) Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 264p.
- Melo, I.S., Costa, F.G. (2005) Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos. Comunicado Técnico 31. EMBRAPA, Jaguaraúna-SP.
- Ministério da Saúde (2001) Controle de Vetores Procedimentos de Segurança. Brasília: Ministério da Saúde- Fundação Nacional de Saúde, 187p.
- Ministério da Saúde (2005) Avaliação da eficácia de análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina no controle de *Aedes aegypti*. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/relatorio\\_estudo260811.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/relatorio_estudo260811.pdf). Acessado em 08/05/2012.
- Ministério da Saúde (2009) Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Brasília: Ministério da Saúde, 160 p.

- Ministério da Saúde (2015) Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 46(11):1-7.
- Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Lwetoijera, D. W., Mpingwa, M. W., Knols, B. G., Takken, W., Russell, T. L. (2009). Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*, 8: 309-321.
- Mogul, M.G., Akin, H., Hasirci, N., Trantolo, D. J., Gresser, J. D., Wise, D. L. (1996) Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. *Resources, Conservation and Recycling*, 16:289-320.
- Moino Jr., A., Alves, S.B. (1998) Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, 27(4): 611-619.
- Morais, C., Valle, J.L.E., Pizzinatto, A. (1989) Colóides de Algas Marinhas III, Considerações sobre o agar-agar, Colet. ITAL, 9(2): 121-128, *apud* Aliste, A. J. (1999) Efeito da radiação na viscosidade de carragenanas, agaranas e alginatos utilizados na indústria alimentícia. Tese (Mestre em Ciências)-São Paulo- SP, Universidade de São Paulo- IPEN, 400p.
- Moretini, A., Melo, I. S., (2007) Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 42(2): 155–161.
- Morris, O.N. (1977) Compatibility of 27 chemical insecticides with *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *The Canadian Entomologist*, 109(6): 855-864.
- Mukai-Correa, R., Prata A. S., Alvim, I.D., Grosso, C. (2005) Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtida por gelifi cação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8(1):73-80.

- Mulla, M.S. (1991) Insect growth regulators for vector control of mosquito pests and disease vectors. *Chinese Journal of Entomology Special Publication*, 6: 81-91.
- Mulla, M.S. (1995) The future of insect growth regulators in vector control. *J. Mosq. Control Assoc.* 11:269 -273.
- Neves, P.J., Alves, S.B. (1999) Controle associado de *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (*Isoptera: Termitidae*) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e imidacloprid. *Scientia Agricola*, 56(2): 305-311.
- Oliveira, C.N., Neves, P. M. O. J., Kawazoe, L. S. (2003) Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*, 60(4):663-667.
- Omoto, C. (2000) Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. In: Guedes, J. C.; Costa, I. D., Castiglione, E. (Org.) Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: Pallotti, p. 31-49.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (1995) Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, DC: OPS.
- Pachamuthu, P., Kamble S.T. (2000) In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) strain ESC-1 sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *Journal of Economic Entomology*, 93(1): 60–70.
- Pant, M., Dubey, S., Raza, S. K., Patanjali, P. K. (2012) Encapsulation of neem and karanja oil mixture for synergistic as well as larvicidal activity for mosquito control. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 71: 348-352
- Pasqualim, P., Culpi, T.A., Kaminski, G.A.T., Fin, M.T., Sasso, D.G.B., Costa, C.K., Miguel, M.D., Fujiwara, G.M., Rodrigues, B.H., Zanin, S.M.W. (2010) Cápsulas de alginato de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação

- ônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica. *Visão Acadêmica*, 11(1): 1518-5192.
- Paul, A., Harrington, L.C., Scott, J.G. (2006) Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 43: 55-60.
- Paula, A.R., Brito, E.S., Pereira, C.R., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of Adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue Vector Control. *Biocontrol Science and Technology*, 18:1017-1025.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Paula, C.O., Samuels, R.I. (2011) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Parasites & Vectors*, 4(8):1-8.56.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2013) Efficiency of fungus-impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Letters in Applied Microbiology*, 57:157-163.
- Paula, A.R; Carolino, A.T; Paula, C.O; Samuels, R.I. (2011) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Parasites & Vectors*, 4 (8):1-8.
- Paula, H.C.B., Oliveira, E.F., Abreu, F.O.M.S., Paula, R.C.M., Morais, S.M., Forte, M.M.C. (2010) Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. *Polímeros*, 20(2): 112-120.
- Pedrosa-Macedo, J.H. (1993) Manual de Pragas em Florestas – Pragas Florestais do sul do Brasil. IPEF/SIF, 112p.
- Pereira, C. R., de Paula, A. R., Gomes, S. A., Pedra Jr, P. C. O., Samuels, R. I. (2009). The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*

- isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 19(8), 881-886.
- Pereira, R.M., Roberts, D.W. (1991) Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, 84 (6):1657-1661.
- Pires, L.M., Marques, E.J., Oliveira, J.V., Alves, S. B. (2010) Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua compatibilidade com alguns inseticidas usados na cultura do tomateiro. *Neotropical Entomology* 39(6): 977-984.
- Polanczyk, R.A., Garcia, M.O., Alves, S.B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis Berliner* no controle de *Aedes aegypti*. *Revista Saúde Pública*, 37:813-816.
- Rangel, D.E.N., Anderson, A.J., Roberts, D.W. (2006) Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 127–134.
- Rangel, D.E.N., Anderson, A.J., Roberts, D.W. (2008) Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological research* 112, 13: 62 – 1372.
- Rehner, S.A. (2005) Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: Blackwell, M. (ed) *Insect-fungal Association Ecology and Evolution*. New York: Oxford University Press.
- Roberts, D.W., St Leger, R.J. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54:1-70.
- Salgado, S.M.L. (1993) Formulação do fungo *Arthrobotrys conoides* em alginato de sódio para controle de fitonematóide. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 37p.



- San Martín, J. L., Brathwaite-Dick, O. (2007). La estrategia de gestión integrada para la prevención y el control del dengue en la región de las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 21(1):55-63.
- Sanhueza, R.M.V.; Melo, I.S. (1995) Encapsulamento de microrganismos. In: Melo, I.S.; Sanhueza, R.M.V. (Coord.). Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA,1:60-63.
- Santos, A.B., Ferreira, V.P., Grosso, C.R.F (2000). Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 3(16): 26-30.
- Sanyang, S., Van, E.H.F., Moore, D. (2000) Laboratory shelf-life of oil formulated conidia of the locust and grasshopper fungal pathogen *Metarhizium flavoviridae* Gams & Rozsypal, in mixtures with the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *International Journal of Pest Management*, 46:165-168.
- Scher, B.H. (1999). Controlled release delivery systems for pesticides. Ed. Marcel Dekker, New York.
- Scholte, E.J, Ng`habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G. F., Knols, B. G. J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308:1641-1642.
- Scholte, E.J., Takken, W., Knols, B.G.J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102: 151-158.
- Schrank, A., Vainstein, M.H. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56: 1267-1274.
- Secretaria Municipal de Saúde de Campos dos Goytacazes (2015) Ações do CCZ prosseguem contra dengue e chikungunya. Disponível: <http://saude.campos.rj.gov.br/portal/eventos/acoes-do-ccz-prosseguem-contra-dengue-e-chikungunya/> Acesso em 04/ 05/2015.

- Shah, P.A, Pell, J.K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61:413-423.
- Silva, A.M., Gomes, A.C. (2008) Proteção de *Bromeliaceae* para evitar a formação de criadouros de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista de Patologia Tropical*, 37 (1): 43-47.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, 39(1), 1-20.
- Silva, C.C.A. (2002) Aspectos do Sistema Imunológico dos Insetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, DF, 68 – 72.
- Silva, I. P., Andrade, C. J., Neves, E. (2012) Encapsulamento de óleo de buriti para produção de alimentos funcionais. *Citino*, 2(3): 18-27.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2006) Fundamentos de química analítica. São Paulo : Pioneira Thomson Learning.
- Smidsrod, O., Skjak-Braek, G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3):71-78.
- Sousa, N.A. (2013) Controle de ovos de *Aedes aegypti* com *Metarhizium anisopliae* IP 46 por diferentes. Tese (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Goiânia-GO, Universidade Federal de Goiás, 49p.
- Sree, K.S., Padmaja, V., Murthy, Y.L. (2008) Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Management Science*. 64:119-125.
- Suave, J., Dall'agnol, E.C., Pezzin, A.P.T., Silva, D.A.K., Meier, M.M., Soldi, V. (2006) Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7( 2): 12-20.

- Tamai, M.A., Alves, S.B., 1, Lopes,R.B., Faion, M., Padulla, L.F.L. (2002) Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. *Arquivo Instituto Biológico*, 69(3): 89-96
- Tanzini, M.R., Alves, S.B., Stten, A. (2002) Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados no controle de *Leptopharsa heveae* para fungos entomopatogênicos. *Arquivo Instituto Biológico*, 69: 65-69.
- Tziampazis, E., Kohn, J., Moghe, P. V. (2000) PEG - Variant biomaterials as selectively adhesive protein templates: Model surfaces for controlled cell adhesion and migration, *Biomaterials*, 21: 511-520.
- Vásquez, C., Saldarriaga, Y., Pineda, F. (2006) Compatibilidad de *Beauveria bassiana* con fenoxicarb. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 78: 80-85.
- Vemmer, M., Patel, A.V. (2013) Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380-389
- Vieira, L.P., Paula, A.R., Paula, C.O., DaMatta, R. A., Samuels, R.I. (2013) Infection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and Adults by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 309-317.
- Vilarinhos, P.T.R., Dias, J.M.C.S., Andrade, C.F.S., Araújo-Coutinho, C. J. P. C. (1998) Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlideos. In: Alves SB. (ed) *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz; p. 447-80.
- Vos, P., Buckol, M., Gemeiner, P., Navrátil, M. (2009) Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. *Biomaterials*, 30(13): 2559-2570.
- Wang, C.S., Li, Z.Z., Butt, T. (2002) Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*,80:29–34.

WHO (1997) Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. In: Chavasse, D.C., Yap, H.H. (eds). Geneva: WHO, 138p.

WHO (2005) The WHO recommended classification of pesticides by hazard. Disponível em: [www.who.org/tdr](http://www.who.org/tdr). Acesso: 09/03/2012

WHO (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva: WHO, 147p.

WHO (2015) Chikungunya Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/> Acesso: 04/05/2015

Yeh, M. K. (2000) The stability of insulin in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol. *Journal microencapsulation*, 17(6):743-756.

Zanetti, B.G., Soldi, V., Lemos-Senna, E. (2002) Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de esferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(2): 229-236.

Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, X., Wang, G., Luo, Z., Fan, Y., Pei, Y. (2010) Requirement of a mitogen-activated protein kinase for appressorium formation and penetration of insect cuticle by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and environmental microbiology*, 76(7), 2262-2270.