



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE - ILMD  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO PATÓGENO  
HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)

KEMILY NUNES DA SILVA

ATIVIDADE ENTOMOPATOGÊNICA DE ESPÉCIES *Paecilomyces* CONTRA OVOS  
DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* LINNAEUS, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)

MANAUS – AM

2022

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE - ILMD  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO PATÓGENO  
HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)

KEMILY NUNES DA SILVA

ATIVIDADE ENTOMOPATOGÊNICA DE ESPÉCIES *Paecilomyces* CONTRA OVOS  
DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* LINNAEUS, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Dra. Priscila Ferreira de Aquino  
Co-orientador: Dr. José Joaquín Carvajal Cortés

MANAUS - AM

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586a

Silva, Kemily Nunes da

Atividade entomopatogênica de espécies *Paecilomyces* contra ovos de *Aedes (Stegomyia) Aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae). / Kemily Nunes da Silva. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

117 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Priscila Ferreira de Aquino.

1. Fungo nematófago 2. *Paecilomyces* 3. Atividade ovicida  
4. Controle biológico I. Título

CDU 576.8(043.3)

CDD 576

22. ed.

**Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – Bibliotecário CRB-11/287**

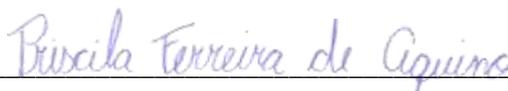
KEMILY NUNES DA SILVA

ATIVIDADE ENTOMOPATOGÊNICA DE ESPÉCIES *Paecilomyces* CONTRA OVOS  
DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* LINNAEUS, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

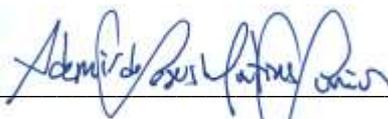
Aprovada em: 18/08/2021.

BANCA EXAMINADORA



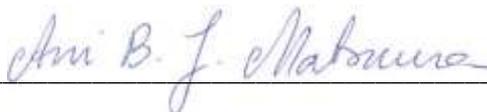
---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscila Ferreira de Aquino  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ



---

Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior  
Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ



---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

## EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
Jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

*“Todas as tentativas não são sinais de derrota.  
São um dos princípios da perfeição, se continuar tentando”*

Salatiel Santos

## DEDICATÓRIA

Dedico:

*“Ao meu pai e marido que desde sempre me incentivaram a estudar”*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, por me proporcionar a dedicação integral a esse projeto, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa.

Agradeço à algumas pessoas em especial: Ao meu marido Alvaro, que esteve comigo de todas as formas possíveis, como amigo, comediante (só para me fazer rir quando queria chorar a cada experimento errado), amante e companheiro. Sua admiração e orgulho me impulsionaram a continuar e nunca desistir (mesmo quando tudo estava desmoronando). Você foi fundamental nessa jornada, foi meu porto seguro! Obrigado por entender tudo... e por caminhar comigo pela vida!

Mãe e pai, dona Izandra e seu Biro, como não os agradecer? Apoiaram-me mesmo sem no início terem compreendido o que eu estava fazendo. Souberam compreender minha ausência, os momentos complicados, e até os pedidos de “não posso ir visitar” ... assim como em todas as outras etapas da minha vida, vocês foram (e são!) muito importantes! Á minha irmã e melhor amiga, Kelythe, por me ouvir, apoiar, dá conselhos e sempre estar ao meu lado diariamente (mesmo que por telefone).

Não posso deixar de agradecer ao Yunier, por me auxiliar nas tarefas domésticas e por me ajudar diversas vezes com o computador, principalmente quando me deixava “a ver navios”.

Ao meu anjinho de quatro patas, Tobias (*In memoriam*) pela companhia e imensa alegria que me proporcionaste.

Agradeço à minha orientadora, Priscila Aquino. Se não fosse você ter me acolhido lá em 2016 e mostrado que a pesquisa “apesar dos desafios” pode ser gostosa de se trabalhar (quando se recebe uma orientação de qualidade), essa dissertação não estaria sendo entregue hoje. Obrigada Priscila pelo grande ensinamento teórico-prático da ciência... ser orientada por você me amadureceu muito como profissional! Considero você um exemplo nessa profissão pela dedicação, eficiência e honestidade.

Ao meu coorientador Joaquin, que aceitou orientar uma pessoa “leiga” em entomologia, que confiou em mim e acreditou no meu trabalho. Obrigado por toda orientação, ensinamentos, ajuda e apoio.

Meu muito obrigado ao Dr. Grafe e a MSc. Andreia, por serem a minha “ponte” com o Centro de Entomologia da FMT-HVD. Por fornecerem as amostras de ovos de *Ae. aegypti* quando

precisava (em grande quantidade e em pouco tempo) e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Ao meu grupo de pesquisa: Luana, Cláudia, Alessandra, Salomão, Thaís, Mesaqueuri, Kérciany e Ketlen. Obrigado pelos aprendizados, pelas risadas, lanches da tarde e pelos momentos de descontração. E meu agradecimento especial a Sofia Angiole, pela pronta-ajuda (principalmente nas etapas finais), pelos ensinamentos compartilhados, por me ouvir, pelas frustrações compartilhadas, pela companhia até a noite, pelos *drinks* de Coca-Cola e momentos agradáveis. Além desses, agradeço as pessoas que passaram pelo grupo e fizeram parte da minha jornada: Juliana, Valderjane, Genésio, Renato, Kallem e Ana Beatriz, vocês têm o meu eterno carinho.

Ao Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela realização do curso de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e em especial a Jessica, por analisar as minhas amostras.

À Coleção de Fungos Filamentosos (CFF/Fiocruz) e a Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM/Fiocruz) pelo fornecimento das cepas fúngicas utilizadas nesse trabalho.

A minha turma de mestrado do PPGBio-Interação (2019-2021), em especial a Jokebede.

Aos técnicos do ILMD, Rejane, Sebastião, Dona Jura e Mota pela ajuda em tudo que precisei na esterilização e por serem sempre prestativos. Além disso, agradeço ao ex-técnico e agora doutorando Eric Marialva pelas conversas sobre o *Ae. aegypti* e por tirar as dúvidas “mais bestas” sobre esse vetor.

À atual banca examinadora por aceitar o nosso convite.

Às agências de fomento FAPEAM (através do programa PPP) e CNPq (através do programa Universal), pelo financiamento dos projetos de pesquisa que proporcionaram insumos e os equipamentos necessários para a execução desse trabalho.

E, por fim, ao Instituto Leônidas e Maria Deane e a Fundação Oswaldo Cruz.

Muito obrigado!

## RESUMO

O desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de vetores está se tornando essencial, devido à rápida evolução da resistência a inseticidas e à ascensão de agentes patógenos que afetam a saúde pública, causando doenças como dengue, chikungunya e Zika. Deste modo, os biopesticidas à base de fungos são alternativas promissoras aos inseticidas sintéticos, pois são ecologicamente corretos e eficazes na infecção de insetos por meio do contato. Embora a suscetibilidade de larvas e mosquitos adultos aos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* seja bem conhecida, há pouca informação disponível sobre a atividade de outros gêneros contra o mosquito *Aedes aegypti*, principalmente quanto à ação ovicida. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade entomopatogênica de diferentes espécies do gênero *Paecilomyces* contra ovos do vetor *Aedes aegypti*. Para isso, sete espécies fúngicas foram reativadas da coleção de fungos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD). Posteriormente, os ovos de *Ae. aegypti* foram expostos a cada espécie fúngica formulada em cinco concentrações; sendo que estes foram aplicados de duas formas distintas. Logo após, a eclosão quantitativa foi realizada e as larvas nascidas, avaliadas quanto ao seu desenvolvimento até a morte ou fase adulta. Em paralelo, os fungos foram submetidos a ensaios qualitativos das enzimas protease e quitinase. Adicionalmente, o comportamento das espécies fúngicas sobre os ovos foi observado por microscopia eletrônica de varredura. Além disso, os perfis de proteínas de cada espécie frente aos ovos foram quantificados e verificados através do gel de poliacrilamida. Como resultado, observou-se que todas as cepas de *Paecilomyces* exibiram micélio sobre os ovos. Curiosamente, sobre os ovos, algumas espécies apresentaram características como formação de mucilagem e decomposição que merecem maiores investigações. Nos bioensaios, mais de 90% dos ovos expostos ao *P. lilacinus* eclodiram, principalmente nas concentrações mais altas. Já as larvas oriundas dos ovos expostos ao *P. viridis*, *P. farinosus* e *P. niveus* mostraram desenvolvimento tardio e locomoção lenta. Na análise descritiva, notou-se que as taxas de eclosão foram consideravelmente menores em relação ao controle para todas as espécies. E ainda, as formas de aplicação do inóculo sobre os ovos não demonstraram diferença significativa entre si; todavia, a concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL apresentou maior impacto em relação as demais concentrações, com taxas de eclosão inferior a 50%. Na análise por MEV, verificou-se que todos os fungos em 48 horas já possuíam atuação significativa sobre os ovos, com conídios aderidos. Além disso, nas eletronicografias observou-se a formação de tubos germinativos e de apressórios pelo fungo *P. farinosus*. E ainda, identificou-se indícios de penetração de hifas das espécies *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. byssochlamydoides* e *P. zollerniae* nos ovos. No ensaio enzimático, apenas *P. farinosus* e *P. lilacinus* produziram protease, porém somente *P. lilacinus* sintetizou quitinases. Em adição, no gel de poliacrilamida verificou-se que todas as espécies se desenvolveram melhor quando cultivadas juntamente com os fragmentos de ovos; onde observou-se bandas proteicas para todas as espécies fúngicas, variando entre 20 kDa e 250 kDa. Portanto, a capacidade dessas cepas de se desenvolver sobre os ovos do vetor *Aedes aegypti* indicam um potencial entomopatogênico dessas espécies *Paecilomyces*.

**Palavras-chave:** *Paecilomyces*; controle biológico; *Aedes*; atividade ovicida

## ABSTRACT

The development of alternative vector control strategies is becoming essential due to the rapid evolution of insecticide resistance and the rise of pathogens that affect public health, causing diseases such as dengue, chikungunya and Zika. Thus, fungal-based biopesticides are promising alternatives to synthetic insecticides, as they are ecologically correct and effective in the infection of insects through contact. Although the susceptibility of larvae and adult mosquitoes to the genera *Beauveria* and *Metarhizium* is well known, there is little information available on the activity of other genera against the *Aedes aegypti* mosquito, especially regarding their ovicidal action. Thus, the aim of the present study was to evaluate the entomopathogenic activity of different species of the genus *Paecilomyces* against eggs of the *Aedes aegypti* vector. For this, seven fungal species were reactivated from the fungal collection of the Oswaldo Cruz Institute (IOC) and the Leonidas and Maria Deane Institute (ILMD). Later, the eggs of *Ae. aegypti* were exposed to each fungal species formulated at five concentrations; and these were applied in two different ways. Soon after, quantitative hatching was performed, and the hatched larvae were evaluated for their development until death or adulthood. In parallel, the fungi were subjected to qualitative assays of the protease and chitinase enzymes. Additionally, the behavior of fungal species on eggs was observed by scanning electron microscopy. In addition, the protein profile of each species against eggs was quantified and verified using a polyacrylamide gel. As a result, it was observed that all *Paecilomyces* strains exhibited mycelium on the eggs. Interestingly, some species showed characteristics about the eggs such as, mucilage formation and decomposition that deserve further investigation. In bioassays, more than 90% of eggs exposed to *P. lilacinus* hatched, mainly at the highest concentrations. The larvae from eggs exposed to *P. viridis*, *P. farinosus* and *P. niveus* showed late development and slow locomotion. In the descriptive analysis, it was noted that hatch rates were considerably lower compared to the control for all species. Furthermore, the forms of application of the inoculum on the eggs did not show any significant difference between them; however, the concentration  $1 \times 10^5$  conidia/mL had a greater impact than the other concentrations, with hatch rates below 50%. In the SEM analysis, it was found that all fungi within 48 hours already had a significant action on the eggs, with adhered conidia. Furthermore, the electronmicrographs showed the formation of germ tubes and appressoria by the fungus *P. farinosus*. In addition, evidence of hyphae penetration of the species *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. byssochlamydoides* and *P. zollerniae* in eggs was identified. In the enzymatic assay, only *P. farinosus* and *P. lilacinus* produced protease, but only *P. lilacinus* synthesized chitinases. In addition, in the polyacrylamide gel it was found that all species developed better when cultivated together with the egg fragments; where proteic bands were observed for all fungal species, ranging between 20 kDa and 250 kDa. Therefore, the ability of these strains to develop on the eggs of the *Aedes aegypti* vector indicates the entomopathogenic potential of these *Paecilomyces* species.

**Keywords:** *Paecilomyces*; biological control; *Aedes*; ovicidal activity

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** — Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Nesta, temos os ovos depositados acima da linha d'água, seguido das fases larvais (1° instar – 4° instar), pupa e no ambiente terrestre o adulto. ....29
- Figura 2** — Ovos de *Aedes aegypti* fotografados quanto à vista externa, caracterizados pela coloração preta brilhante (2a) e esquema ilustrativo caracterizando o interior do ovo de *Aedes* sp. (2b), representado através das cores cinza (exocóricion), preto (endocóricion), azul (cutícula serosa), vermelho (serosa) e verde (embrião).. ....32
- Figura 3** — Esquema ilustrativo do processo geral de infecção de fungos entomopatogênicos. **(1)** O conídio se adere à cutícula do inseto, germina e forma a estrutura de infecção, o apressório; **(2)** Além da secreção de proteases e quitinases, gotículas lipídicas são transferidas do conídio mãe para o apressório para hidrólise, o que gera uma alta concentração de glicerol para formar pressão e romper a cutícula; **(3)** Durante este processo e após atingir o hemocele do hospedeiro, as células fúngicas modificam suas estruturas da parede celular (representadas em rosa) em resposta ao reconhecimento, encapsulamento e melanização de hemócitos. Além disso, as células fúngicas secretam proteínas e metabólitos secundários para escapar da imunidade do hospedeiro, neutralizando os receptores do hospedeiro; **(4)** Para colonizar com sucesso a hemocele e matar o inseto, as células filamentosas que escapam mudam para uma estratégia de propagação do tipo levedura para formar corpos hifais (também chamados de blastóporos) para crescimento rápido e privação de nutrientes do hospedeiro. Fonte: Adaptado de WANG e WANG (2017). ....39
- Figura 4** — Micrografia em coloração azul de lactofenol de *Paecilomyces* sp. com aumento de 40x. Nesta, verifica-se a visualização dos (1) conídios; (2) fiálide; (3) hifa; (4) septos; (5) conidióforo. Fonte: Arquivo pessoal. ....47
- Figura 5** — Fluxograma das etapas experimentais realizadas neste trabalho. ....51
- Figura 6** — Esquema ilustrativo representando o procedimento de sucessivas diluições e o plaqueamento das três últimas diluições em placas de petri. ....53
- Figura 7** — Esquema ilustrativo da contagem de esporos na câmara de Neubauer. Na imagem, os números 1 e 2 representam os dois campos, sendo no primeiro campo “em zoom” os cinco subcompartimentos a serem contados. ....54
- Figura 8** — Esquema representativo dos tratamentos realizados em ovos de *Ae. aegypti*, com conídios formulados em água e Tween 80 a 0,05 %; sendo a aplicação direta dos conídios sobre a superfície do ovo e a indireta com a aplicação dos conídios sobre os papeis filtros para a exposição posterior dos ovos. ....55
- Figura 9** — Macrocolônia das espécies de *Paecilomyces* em meio de cultura MEA, utilizadas neste trabalho, com sete dias de crescimento e incubadas a 28°C. ....62
- Figura 10** — Ovos de *Aedes aegypti* com desenvolvimento de micélio, após a aplicação de conídios das cepas fúngicas estudadas, formulados em água com Tween 80 a 0,05%, incubados a 28°C por 20 dias. ....63

**Figura 11** — Características de alguns ovos de *Ae. aegypti* após o tratamento com os fungos *P. lilacinus*, *P. niveus* e *P. byssochlamydoides*. Da esquerda para a direita temos: (1) Formação de camada polimérica sobre a superfície dos ovos após tratamento com *P. lilacinus*; (2) Formação de camada polimérica sobre a superfície dos ovos após tratamento com *P. niveus*; (3) Decomposição dos ovos de *Ae. aegypti* após tratamento com *P. byssochlamydoides*.....64

**Figura 12** — Resultado dos bioensaios dos ovos expostos ao fungo *P. lilacinus*. Nesta, é ilustrada a eclosão das larvas (seta na cor vermelha) e a presença de micélio (seta na cor amarela) sobre os ovos. ....65

**Figura 13** — Eletronmicrografias da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos as espécies de *Paecilomyces* por 48 horas. Visualização do comportamento das hifas de diferentes espécies de *Paecilomyces* sobre os ovos de *Ae. aegypti* nos aumentos de: 150x (*P. farinosus*); 450x (*P. lilacinus*); 200x (*P. variotii*); 900x (*P. byssochlamydoides*); 400x (*P. viridis*); 270x (*P. niveus*); 330x (*P. zollerniae*) e 330x (controle).....81

**Figura 14** — Eletronmicrografias da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos às diferentes espécies de *Paecilomyces* por 48 horas. Visualização do conídio germinando (cor verde) e tubos germinativos (cor vermelha) de diferentes espécies de *Paecilomyces* sobre os ovos de *Ae. aegypti* nos aumentos de: 3.000x (*P. farinosus*); 1.300x (*P. lilacinus*); 900x (*P. viridis*); 850x (*P. byssochlamydoides*).....82

**Figura 15** — Eletronmicrografia da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos a espécie *Paecilomyces farinosus* por 48 horas. Visualização do esporo (seta cor azul) ao lado da estrutura apressório (seta cor rosa) em um aumento de 3.000x.....83

**Figura 16** — Eletronmicrografias da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos às diferentes espécies de *Paecilomyces* por 48 horas. Visualização dos indícios de penetração (cor amarela) de diferentes espécies de *Paecilomyces* sobre os ovos de *Ae. aegypti* nos aumentos de: 4.500x (*P. farinosus*); 3.700x (*P. lilacinus*); 3.000x (*P. byssochlamydoides*) e 12.000x (*P. zollerniae*).....84

**Figura 17** — Resultado do ensaio qualitativo da enzima protease das espécies *P. farinosus* e *P. lilacinus* após o período de 7 dias a 28°C. As setas na cor verde indicam a formação de halos translúcidos ao redor da colônia dos fungos.....86

**Figura 18** — Resultado positivo do ensaio qualitativo da enzima quitinase indicado pela formação de uma zona translúcida abaixo da colônia da espécie *P. lilacinus* após o período de 7 dias a 28°C.....87

**Figura 19** — Produção de biomassa das espécies fúngicas, após a filtração à vácuo, quando submetidas ao cultivo submerso por 20 dias na ausência ou presença de ovos de *Ae. aegypti*. ....89

**Figura 20** — Eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras oriundas dos cultivos por 20 dias à 28°C do controle e das espécies *P. zollerniae*, *P. variotii* e *P. viridis* na ausência ou presença de

fragmentos de ovos de *Ae. aegypti*. Os números representam: (1) cultivo na ausência de fragmentos de ovos; (2) cultivo na presença de fragmentos de ovos. As caixas de diferentes cores estão destacando bandas proteicas diferenciais de cada espécie fúngica.....91

**Figura 21** — Eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras oriundas dos cultivos por 20 dias à 28°C das espécies de *P. niveus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus* e *P. byssochlamydoides* na ausência ou presença de fragmentos de ovos de *Ae. aegypti*. Os números representam: (1) cultivo na ausência de fragmentos de ovos; (2) cultivo na presença de fragmentos de ovos. As caixas de diferentes cores estão destacando bandas proteicas diferenciais de cada espécie fúngica.....92

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão de *Ae. aegypti* (%) por cada espécie fúngica estudada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).....67
- Gráfico 2** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas de *Ae. aegypti* (%) por cada espécie fúngica estudada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).....68
- Gráfico 3** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de emergência de adultos de *Ae. aegypti* (%) por cada espécie fúngica estudada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).....69
- Gráfico 4** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas (%) do *Ae. aegypti* por cada forma de aplicação de inóculo. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ). .....70
- Gráfico 5** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas do *Ae. aegypti* (%) por cada concentração empregada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).....71
- Gráfico 6** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão de *Ae. aegypti* por cada espécie fúngica na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).....73
- Gráfico 7** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas de *Ae. aegypti*, por cada espécie fúngica na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).....74
- Gráfico 8** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de emergência de adultos (%) por cada espécie fúngica na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ). .....75
- Gráfico 9** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da quantidade de ovos de *Aedes aegypti* que foram expostos ao *Paecilomyces lilacinus* imersos em água por cada concentração avaliada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e o símbolo ° representa valores *outliers*. .....76
- Gráfico 10** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão dos ovos exposto a espécie *P. lilacinus* em diferentes concentrações. A linha horizontal dentro de cada

caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ). .....77

**Gráfico 11** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas com diferentes concentrações referente ao fungo *P. lilacinus*. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ). .....79

**Gráfico 12** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de emergência de adultos em diferentes concentrações referente ao fungo *P. lilacinus*. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ). .....79

**Gráfico 13** — Dados representativos das médias dos índices de atividade enzimática de protease das espécies *P. lilacinus* e *P. farinosus*, expressos em mm e, com desvios padrão. ....87

**Gráfico 14** — Concentração de proteínas das diferentes espécies de *Paecilomyces* estudadas, quando cultivadas a 28°C na ausência ou presença de fragmentos de ovos. Os números representam: (1) cultivo na ausência de fragmentos de ovos; (2) cultivo na presença de fragmentos de ovos. ....90

**Gráfico 15** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão acumulada considerando os ovos eclodidos durante e após o bioensaio em diferentes concentrações. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde a mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers*. As letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ). .....117

**Gráfico 16** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão acumulada considerando os ovos eclodidos durante e após o bioensaio quando submetidos à concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde a mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ). .....117

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** — Classificação com base filogenética atual de algumas espécies anteriormente classificadas na seção *Isarioidea* de *Paecilomyces*. .....46
- Tabela 2** — Visão geral das espécies *Paecilomyces* empregadas nos estudos contra as diferentes fases do vetor *Ae. aegypti*. .....50
- Tabela 3** — Espécies do gênero *Paecilomyces* utilizadas nesse estudo.....52

## PRINCIPAIS ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
<b>ABCBio</b>	Associação Brasileira de Empresas de Controle Biológico
<b>ACE</b>	Agentes de Combate a Endemias
<b>ACS</b>	Agentes Comunitários de Saúde
<b>AMP</b>	Adenosina Monofosfato (do inglês: <i>Adenosine Monophosphate</i> )
<b>BOD</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio (do inglês: <i>Biochemical Oxygen Demand</i> )
<b>Bti</b>	<i>Bacillus thuringiensis israelenses</i>
<b>Bya</b>	Bilhões de anos atrás (do inglês: <i>Billions of Years Ago</i> )
<b>CFAM</b>	Coleção de Fungos da Amazônia
<b>CFF</b>	Coleção de Fungos Filamentosos
<b>CHIKV</b>	Vírus Chikungunya
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração Letal Média
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetros quadrado
<b>CP15</b>	Proteína do córion 15 (do inglês: <i>Chorion Protein 15</i> )
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CWP10</b>	Proteína de parede celular 10 (do inglês: <i>Cell Wall Protein 10</i> )
<b>DENV</b>	Vírus Dengue
<b>e.g.</b>	Por exemplo (do latim: <i>exempli gratia</i> )
<b>ERN</b>	Espécies Reativas do Nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies Reativas do Oxigênio
<b>FAU</b>	Febre Amarela Urbana
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FMT-HVD</b>	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>hrs</b>	Horas
<b>i.e.</b>	Isto é (do latim: <i>id est</i> )
<b>IAE</b>	Índice de Atividade Enzimática
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz
<b>JNK</b>	Jun N-Terminal Kinase

<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>L</b>	Litro
<b>L1-L4</b>	Larvas de primeiro a quarto estágio
<b>M</b>	Molar
<b>Mad1</b>	Proteína deficiente de parada mitótica 1 (do inglês: <i>Mitotic Arrest Deficiency Protein 1</i> )
<b>Mad2</b>	Proteína deficiente de parada mitótica 2 (do inglês: <i>Mitotic Arrest Deficiency Protein 2</i> )
<b>MCE</b>	Membrana de Éster Celulose
<b>MEA</b>	Extrato de Malte Ágar (do inglês: <i>Malte Extract Ágar</i> )
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>mg</b>	Miligrama
<b>Min</b>	Minuto
<b>MM</b>	Meio Mínimo
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Mya</b>	Milhões de Anos Atrás (do inglês: <i>Millions of Years Ago</i> )
<b>N°</b>	Número
<b>PEAa</b>	Plano de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês: <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> )
<b>PO</b>	Fenoloxidase (do inglês: <i>Phenoloxidase</i> )
<b>PPO</b>	Profenoloxidase (do inglês: <i>Prophenoloxidase</i> )
<b>Pr1</b>	Patogênese relacionada 1 (do inglês: <i>Pathogenesis Related 1</i> )
<b>PRR</b>	Receptores de Reconhecimento do Patógeno (do inglês: <i>Pathogen Recognition Receptors</i> )
<b>PVDF</b>	Membrana de fluoreto de polivinilideno
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SCZ</b>	Casos de síndrome congênita do Zika
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>spp.</b>	Várias espécies (do inglês: <i>several species</i> )

<b>Tris</b>	Tris-Hidroximetil-aminometano
<b>UR</b>	Umidade Relativa
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>µL</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	26
4.1 O INSETO <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> .....	26
4.1.1 Impacto dos arbovírus transmitidos.....	26
4.1.2 Ciclo de vida do <i>Ae. aegypti</i> .....	28
4.1.3 Características gerais dos ovos .....	31
4.1.4 Principais métodos empregados no controle vetorial .....	32
4.2 O CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS.....	34
4.3 VISÃO GERAL SOBRE OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS .....	36
4.3.1 Classificação dos fungos entomopatogênicos .....	37
4.3.2 Interação fungo entomopatogênico-hospedeiro .....	38
4.4 O GÊNERO <i>Paecilomyces</i> .....	44
4.4.1 Taxonomia .....	45
4.4.2 Características gerais.....	46
4.4.3 O potencial do gênero no controle biológico .....	48
4.4.4 Espécies <i>Paecilomyces</i> contra o vetor <i>Ae. aegypti</i> .....	50
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
5.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL .....	51
5.2 ORIGEM E REATIVAÇÃO DAS CULTURAS FÚNGICAS .....	52
5.3 CULTURA MONOSPÓRICA.....	53
5.4 ORIGEM E PROCESSAMENTO DOS OVOS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	54
5.5 PREPARO E QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO .....	54
5.6 BIOENSAIOS COM OVOS .....	55
5.7 ANÁLISE DOS DADOS, DESCRITIVA E ESTATÍSTICA.....	56
5.8 CONIDIOGÊNESE DAS LARVAS .....	57
5.9 ANÁLISE DOS OVOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	58
5.10 PREPARO DA QUITINA COLOIDAL.....	58
5.11 ENSAIO ENZIMÁTICO QUALITATIVO DE QUITINASES E PROTEASES....	59

5.12 CULTIVO E OBTENÇÃO DO SECRETOMA FÚNGICO .....	59
5.13 CONCENTRAÇÃO, DESSALINIZAÇÃO E PRECIPITAÇÃO PROTEICA .....	60
5.14 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	60
5.15 ANÁLISE POR ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL .....	61
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>62</b>
6.1 CULTURA FÚNGICA .....	62
6.2 BIOENSAIO COM OS OVOS.....	62
6.2.1 Desenvolvimento das espécies fúngicas sobre os ovos .....	62
6.2.2 Comportamento pós-tratamento e conidiogênese.....	64
6.2.3 Eclosão quantitativa .....	66
6.2.4 Avaliação das formas de aplicação e concentrações na patogênese .....	70
6.2.5 Avaliação do efeito da concentração $1 \times 10^5$ conídios/mL no desenvolvimento de <i>Ae. aegypti</i> .....	72
6.2.6 Avaliação do efeito entomopatígeno do fungo <i>P. lilacinus</i> sobre o desenvolvimento de <i>Ae. aegypti</i> .....	76
6.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	80
6.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS ENZIMAS PROTEASES E QUITINASES ..	85
6.5 CULTIVO FÚNGICO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DO GEL DE POLIACRILAMIDA .....	88
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>116</b>
APÊNDICE A — COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO TRABALHO .....	116
APÊNDICE B — DADOS COMPLEMENTARES DOS BIOENSAIOS.....	117

## 1. INTRODUÇÃO

Os vetores são organismos que podem transmitir patógenos que causam doenças infecciosas entre os seres humanos ou de animais para humanos (VALLE et al., 2021). No mundo, as doenças transmitidas por esses hospedeiros causam mais de 1 milhão de mortes por ano (LOUIS et al., 2020; NETO et al., 2020). Muitos desses vetores são insetos e um dos mais conhecidos é o *Aedes aegypti*. Esse culicídeo é o principal vetor urbano dos arbovírus chikungunya, Zika, febre amarela e dos quatro sorotipos dos vírus dengue (RAHMAN et al., 2021; ZARA et al., 2016). Com relação a dengue em específico, só no Brasil, foram registrados mais de 970 mil casos prováveis, os quais resultaram em 528 mortes no ano de 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020c).

O *Ae. aegypti* é um díptero de hábitos antropofílicos e está intimamente ligado ao *habitat* humano, preferencialmente no intradomicílio para repousar e realizar o repasto sanguíneo (CRAWFORD et al., 2017; GIBSON et al., 2014; GOMES et al., 2005). Como em todos os culicídeos, *Ae. aegypti* é holometábolo apresentando as fases de ovo, larva (L1-L4), pupa e adulto (CHRISTOPHERS, 1960; TRAGER, 1937). Em particular, os ovos e embriões, embora tenham o potencial de ser um alvo de controle adequado, é o estágio menos estudado em mosquitos (RESCK et al., 2020). Para oviposição, as fêmeas depositam seus ovos acima da linha d'água em superfícies úmidas, esses precisam resistir até que sua imersão na água permita a eclosão e o desenvolvimento posterior (LELES; D'ALESSANDRO; LUZ, 2012; PONTES, 2018). Os ovos fora da água resistem à dessecação prolongada durante as estações secas, evitando a eclosão até o início do período chuvoso e contribuindo no restabelecimento das populações, aumentando assim, o risco de transmissão dessas arboviroses (LUZ et al., 2007; RESCK et al., 2020; TSUNODA et al., 2010). No interior dos ovos, os embriões são expostos à predação e infecção por patógenos, particularmente fungos que podem invadir os ovos ativamente através do exocório e afetá-los com proteínas e/ou metabólitos tóxicos (LUZ et al., 2007).

O controle vetorial tem sido realizado com medidas direcionadas ao controle mecânico, químico e biológico nos domicílios, pontos estratégicos e locais de grande fluxo de pessoas, com ações direcionadas a identificar, eliminar e/ou destinar adequadamente reservatórios naturais ou artificiais de água que possam servir de criadouro para o desenvolvimento das formas imaturas, conscientização da população

e campanhas de combate ao vetor (ZARA et al., 2016). Adicionalmente, outras tecnologias têm sido desenvolvidas como alternativas no controle do *Ae. aegypti*, utilizando-se diferentes mecanismos de ação, como medidas sociais, monitoramento seletivo da infestação, dispersão de larvicidas pelos próprios mosquitos, novos agentes de controle químico e biológico e procedimentos moleculares para controle populacional dos mosquitos, incluindo combinações entre técnicas (BARDACH et al., 2019; ZARA et al., 2016).

O uso intensivo e constante dos mesmos princípios ativos têm gerado populações de *Ae. aegypti* resistentes (CAMPOS et al., 2020; MOYES et al., 2017). Dessa forma, uma nova alternativa para o controle de insetos é a utilização de bioinseticidas, tendo como base os fungos entomopatogênicos, que são considerados alternativas seguras e ecológicas comparados à maioria dos inseticidas químicos (RAMIREZ et al., 2018). Um exemplo é a espécie *Paecilomyces lilacinus*, comumente encontrado em solos e que tem se mostrado efetivo no controle dos ovos de diversos nematoides (HOMTHONG et al., 2016). O processo de infecção por esses entomopatógenos começa com a penetração das hifas fúngicas, envolvendo processos físicos, devido à pressão da hifa que rompe áreas membranosas e processos bioquímicos, resultantes da liberação de enzimas, colonização da carcaça do hospedeiro e por fim, a conidiogênese (BUTT et al., 2016; LEGER et al., 1991).

No *Ae. aegypti*, apesar da suscetibilidade das larvas e adultos aos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* seja bem conhecido, as informações disponíveis sobre a atividade de outros gêneros contra o mosquito é escassa, principalmente referente à atividade ovicida. Deste modo, a prospecção de novas cepas entomopatogênicas do gênero *Paecilomyces* que possam ser virulentas à fase imatura do vetor se faz necessária, pois as informações obtidas podem contribuir com melhorias no controle biológico do mosquito *Ae. aegypti*.

## 2. JUSTIFICATIVA

O *Aedes aegypti* é um vetor epidêmico competente de diversos arbovírus, dentre esses os quatro sorotipos da dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e febre Amarela (FA). De acordo com o Ministério da saúde, só no ano de 2020, foram confirmados 971.136 casos prováveis, com pelo menos 528 óbitos em todo o país. Assim, diante de um quadro grave e preocupante em relação às arboviroses e dos desafios de controle do vetor adulto, a fase aquática do *Ae. aegypti* torna-se interessante para o estudo, em específico o ovo, que é a forma mais resistente e possibilita a manutenção das populações. Nesse contexto, o uso de fungos entomopatogênicos pode ser uma opção de controle, visto que além de causarem doenças e morte aos insetos, podem reduzir a viabilidade dos ovos; afetando assim, o potencial reprodutivo dessa população de insetos. Em específico, a capacidade do gênero *Paecilomyces* em controlar adultos de *Ae. aegypti* já foi relatado. Entretanto, há poucas informações na literatura sobre esse gênero contra os ovos de *Ae. aegypti*, necessitando de maiores investigações. Assim, a prospecção de microrganismos no combate de vetores pode fornecer informações que contribuam cientificamente na busca por cepas mais eficientes, bem como auxiliar em ferramentas de combate do vetor, causando uma diminuição significativa na transmissão de DENV, CHIKV e ZIKV.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade entomopatogênica de diferentes espécies do gênero *Paecilomyces* contra ovos do vetor *Aedes (Stegomyia) aegypti*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desenvolvimento de sete espécies do gênero *Paecilomyces* sobre os ovos de *Ae. aegypti*;
- Verificar o efeito de diferentes concentrações e formas de aplicação na eclosão das larvas;
- Buscar evidências de penetração das hifas nos ovos quando expostos as cepas fúngicas;
- Avaliar o perfil proteico das espécies quando cultivadas na presença dos ovos de *Aedes aegypti*.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 O INSETO *Aedes (Stegomyia) aegypti*

Oriundo do Velho Mundo, o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* foi originalmente descrito no Egito em 1762, mas seu nome só foi estabelecido em 1818 (VALLE et al., 2021). Essa espécie pertence à classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae e ao gênero *Aedes* (DESAI; CAMPBELL, 2020).

O *Ae. aegypti* acompanhou o homem em sua longa migração pelo mundo, e permaneceu onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação (POWELL; TABACHNICK, 2013). Hoje é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais, mas dentro das zonas de 20°C, pois não sobrevive em temperaturas muito baixas (FARJANA; TUNO; HIGA, 2012). Além disso, a sua distribuição também é limitada pela altitude, normalmente encontrado em regiões com até 2.550 metros acima do nível do mar (CASTILLO-QUINO et al., 2018). Apesar de ser encontrado longe de aglomerados humanos em algumas áreas do Velho Mundo, no Brasil está restrito às vilas e cidades, sempre ligado ao peridomicílio e ao domicílio humano; sendo encontrado nos locais de maior concentração humana e raramente em ambientes semi-silvestres (VALLE et al., 2021).

#### 4.1.1 Impacto dos arbovírus transmitidos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que os agentes etiológicos transmitidos por vetores representam cerca de 17% das doenças transmissíveis no mundo, causando 700 mil mortes anualmente e acometendo de modo desproporcional populações mais pobres (WHO, 2020). Estas arboviroses afetam principalmente as zonas tropicais e subtropicais por propiciar condições para a prevalência dos vetores transmissores (FARRAR et al., 2014; RIZZOLI et al., 2019). Contudo, estudos apontam que com as mudanças climáticas e ambientais, o rápido aumento não-planejado de cidades e o fluxo internacional de produtos e pessoas, estejam ampliando a presença destes vetores e também acarretando epidemias de doenças (FAUCI; MORENS, 2016; MESSINA et al., 2019; RIZZOLI et al., 2019; WHO, 2017).

Os vetores de doenças transmissíveis são de modo majoritário artrópodes

hematófagos (e.g. mosquitos, carrapatos e moscas) infectados com vírus, parasitas ou bactérias patogênicos (FARRAR et al., 2014; RIZZOLI et al., 2019; WHO, 2017). Dentre estes, destaca-se os mosquitos do gênero *Aedes* devido à prevalência e impacto humano das doenças transmitidas por este gênero, em especial as arboviroses: dengue, febre amarela, Zika e chikungunya. De modo geral, essas arboviroses são infecções virais sistêmicas caracterizadas por síndromes febris; a grande maioria dos casos é assintomática, porém as manifestações clínicas podem variar de quadros leves a graves (FARRAR et al., 2014; SIMMONS et al., 2012).

A dengue é considerada uma das mais importantes arboviroses devido à sua proporção: são 100 milhões de casos sintomáticos e consequentes 10 mil óbitos por ano no mundo, com registros em 128 países (BRADY et al., 2012; FARRAR et al., 2014; MESSINA et al., 2019). Apesar de menos frequente, os casos graves são uma das principais causas de admissão hospitalar e morte entre crianças em países com alta incidência (SIMMONS et al., 2012). Os casos sintomáticos provocam tanto um custo humano quanto econômico, o qual já foi estimado no agregado global em 8.9 bilhões de dólares somente para o ano de 2013 (SHEPARD et al., 2016). No Brasil, desde 1986 se enfrentam epidemias de dengue (VALLE; PIMENTA; AGUIAR, 2016); sendo que somente para o ano de 2020 foram registrados ao menos 970 mil casos – dos quais 799 graves, e 528 mortes decorrentes da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020c)

Endêmica no Brasil e na África, a febre amarela ganha relevância pelo quadro clínico e mortalidade nos casos graves: entre 15-60% das pessoas infectadas desenvolvem a forma grave – que inclui desde icterícia, hemorragia a insuficiência renal e hepática; nestes casos, de 20 a 50% dos pacientes vão a óbito (BARRETT, 2018; WHO, 2019). Em 2018, foram estimadas cerca de 30 mil mortes em decorrência de febre amarela no mundo, a maioria na África (WHO, 2019). No Brasil, desde 2014 houve uma reemergência da doença que avançou pelo território em regiões com baixa cobertura vacinal – da região Centro Oeste para o eixo Sul-Sudeste; segundo o Ministério da Saúde, os maiores surtos de febre amarela já registrados ocorreram no período de 2016-2018 quando foram registrados cerca de 2,1 mil casos e mais de 700 óbitos pela doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). O ponto de maior preocupação no controle desta doença é impedir a introdução do vírus em áreas de alta densidade populacional (ciclo de transmissão urbano), uma vez que a infestação de mosquitos vetores urbanos podem vir a possibilitar epidemias em larga escala

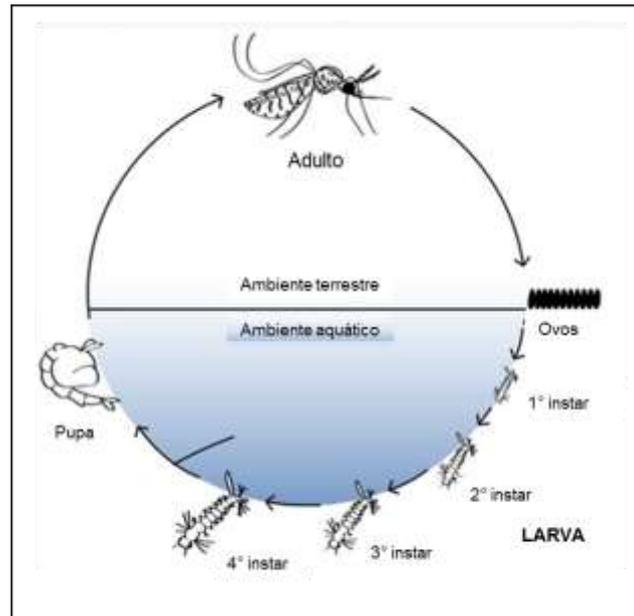
(BARRETT, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a)

A infecção pelo vírus Zika ganhou notoriedade no Brasil após a epidemia de casos em 2015, a partir da qual foi observada uma correlação desta infecção viral com a microcefalia e outras más formações fetais congênitas (FAUCI; MORENS, 2016; ZORRILLA et al., 2017). Adicionalmente, em conjunto a dados da epidemia de Zika na Polinésia Francesa, sugeriu-se também que a infecção possa ter como sequelas a síndrome de Guillain-Barré e outras condições neurológicas (FAUCI; MORENS, 2016; ZORRILLA et al., 2017). De forma que, em resposta a epidemia, o Ministério da Saúde estabeleceu que casos clínicos suspeitos são de notificação compulsória e firmou um programa para a vigilância de casos da Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ) e outras etiologias infecciosas. Neste, a premissa é acompanhar os números de novos casos, bem como o acesso ao tratamento médico das mais de 2800 crianças afetadas desde 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Baseado no exposto, considera-se essencial a aplicação de medidas visando o controle dessas doenças dado o impacto na expectativa e qualidade de vida das pessoas acometidas, a repercussão nas condições socioeconômicas, especialmente de populações mais pobres, além da sobrecarga em serviços do sistema de saúde pública (BARRETT, 2018; FAUCI; MORENS, 2016; WHO, 2020; ZORRILLA et al., 2017).

#### **4.1.2 Ciclo de vida do *Ae. aegypti***

Assim como diversos insetos, o *Ae. aegypti* tem seu desenvolvimento por metamorfose completa (*i.e.*, holometábolo) com um ciclo de vida até a fase adulta variando de 10 a 30 dias, apresentando as fases de ovo, larva (L1-L4), pupa e adulto (Figura 1) (CHRISTOPHERS, 1960; TRAGER, 1937). Em particular, tanto o macho quanto a fêmea de *Ae. aegypti* se alimentam de substâncias que contêm açúcar (*e.g.*, néctar, seiva); mas como o macho não produz ovos, somente a fêmea se alimenta de sangue para a maturação nos ovários e desenvolvimento completo dos ovos (VALLE et al., 2021).



**Figura 1** — Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Nesta, temos os ovos depositados acima da linha d'água, seguido das fases larvais (1º instar – 4º instar), pupa e no ambiente terrestre o adulto. Fonte: Adaptado de Coon et al., (2014).

O *Ae. aegypti* é de hábito diurno, cujos picos de atividade hematofágica acontecem durante o amanhecer ou no período vespertino, alimentando-se ou colocando seus ovos (PONLAWAT; HARRINGTON, 2005). A fêmea pode realizar diversos repastos sanguíneos para produzir e amadurecer os ovos, em um mesmo ciclo gonotrófico, embora levem de 48 a 72 horas para digerir a alimentação (CLEMENTS, 1993; KLOWDEN; BRIEGEL, 1994). Os ovos do *Ae. aegypti* são depositados nas paredes internas de diferentes locais/estruturas/recipientes preenchidos com água, bem próxima à superfície da água. Estes locais de oviposição onde ocorre o desenvolvimento das fases imaturas (*i.e.*, larvas e pupas) são denominados de criadouros (VALLE et al., 2021). Os criadouros podem ser naturais (*e.g.*, bromélias, tronco oco de árvores e bambus) ou artificiais (*e.g.*, toneis, pneus abandonados, vasos de plantas, calhas, reservatórios de água potável e qualquer recipiente capaz de acumular água). Uma característica comum a muitos deles é a sua transitoriedade de permanência funcional nos ambientes, e, portanto, são denominados criadouros temporários (VALLE et al., 2021).

O comportamento de oviposição tem início quando a fêmea identifica um ou mais criadouros propícios no ambiente e distribui em grupos os ovos, maturados em um mesmo ciclo gonotrófico, depositando-os individualmente em mais de um criadouro, comportamento conhecido como “oviposição em saltos” (CLEMENTS,

1993; KLOWDEN; BRIEGEL, 1994; PANT; YASUNO, 1973). O desenvolvimento completo do embrião dura em média 77,5 horas, sob temperatura constante de 25°C (FARNESI et al., 2009), mas esse tempo pode variar dependendo das condições de temperatura e umidade. Após o período de desenvolvimento, estes ovos podem entrar em dormência e permanecerem viáveis no ambiente por um período até de 1.883 dias (MAYILSAMY, 2019). Esse comportamento é considerado importante para o controle desta espécie, uma vez que, representa seu principal mecanismo de permanência e dispersão no ambiente (DINIZ et al., 2017).

O contato direto ou mesmo indireto com a água gera o estímulo que sinaliza a condição favorável para a eclosão das larvas (VALLE et al., 2021). No ambiente aquático, as larvas se alimentam de partículas dispersas na água, por filtração. O desenvolvimento larvário está compreendido por quatro fases sucessivas de crescimento, os quais vão do L1 ao L4, caracterizado pela muda do exoesqueleto (*i.e.*, ecdise), durando em torno de 4 a 7 dias e as L4 sofrem mudanças para pupa (CLEMENTS, 1993; FORATTINI, 2002). O corpo das larvas está dividido em cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é dividido em oito segmentos e têm quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão para a respiração na superfície da água. Para respirar, estas se movimentam em forma de serpente até a superfície, onde ficam em posição quase vertical. É sensível a movimentos bruscos na água e, sob feixe de luz, deslocam-se com rapidez, buscando refúgio longe da luz (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; VALLE et al., 2021).

Na forma pupal não há alimentação, assim nessa etapa ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto. Em adição, esta fase se apresenta com aparência que lembra à uma vírgula, podendo distinguir o cefalotórax e o abdômen; sendo que tal estágio dura cerca de dois a três dias (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

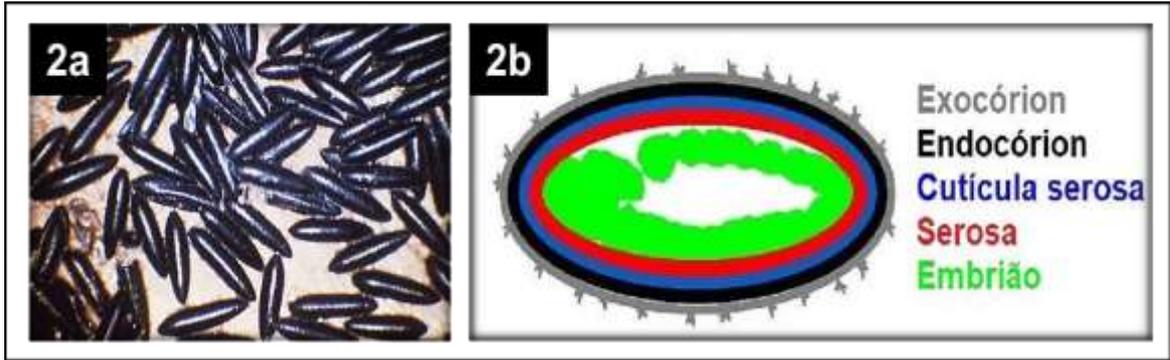
Já a fase adulta de *Ae. aegypti* se caracteriza morfológicamente pela cor escura e manchas brancas nos segmentos tarsais. Os adultos medem cerca de 3 a 6 mm, e os machos se distinguem da fêmea essencialmente pelas antenas com aspecto plumoso; visto que nas fêmeas são curtos e com aparência pilosa (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As fêmeas apresentam aparelho bucal do tipo picador-sugador com palpos menores que a probóscida, enquanto os machos possuem o aparelho picador- sugador com palpos maiores que a probóscida (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Depois de emergir, o inseto adulto procura pousar sobre as paredes do recipiente, permanecendo assim durante várias horas, para ocorrer o endurecimento do

exoesqueleto e das asas; logo após 24 horas, podem acasalar (DESAI; CAMPBELL, 2020). Vale lembrar que uma única cópula é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida. A longevidade da fêmea é em média de 45 dias, sendo que o macho vive menos (CLEMENTS, 1993; PANT; YASUNO, 1973).

#### 4.1.3 Características gerais dos ovos

Os ovos do *Ae. aegypti* são externamente alongados, de simetria bilateral, ligeiramente achatados, afunilados em direção à extremidade micropilar e medem aproximadamente 0,4 mm de comprimento (CHRISTOPHERS, 1960; VALLE et al., 2021). Além disso, as fêmeas colocam aproximadamente 100 ovos, os quais no momento da postura são brancos e moles; mas após as primeiras 3 a 4 horas de desenvolvimento embrionário, ocorre o enrijecimento e escurecimento dos ovos, tornando-os pretos brilhantes, conforme a Figura 2a (LI; LI, 2006). Adicionalmente, os ovos apresentam no exocórrion protuberâncias, que servem para fixá-los no substrato durante a oviposição (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

Internamente “dentro dos ovos” existem características gerais comuns aos ovos de outros insetos (Figura 2b) (CLEMENTS, 1993; FORATTINI, 2002). Antes da fertilização do ovócito, há resquícios de células rodeadas por um revestimento, denominado córrion, formado a partir do epitélio folicular dessa célula germinativa. O córrion apresenta uma camada externa, denominada exocórrion e uma camada interna, o endocórrion, que juntos formam a casca do ovo. O exocórrion é uma membrana delicada, incolor e ligeiramente transparente, que é facilmente danificada quando o ovo é recém-posto. Já o endocórrion é uma membrana densa e mais resistente, a qual é responsável pela morfologia e a rigidez do ovo (CHRISTOPHERS, 1960).



**Figura 2** — Ovos de *Aedes aegypti* fotografados quanto à vista externa, caracterizados pela coloração preta brilhante (2a) e esquema ilustrativo caracterizando o interior do ovo de *Aedes* sp. (2b), representado através das cores cinza (exocócion), preto (endocócion), azul (cutícula serosa), vermelho (serosa) e verde (embrião). Fonte: 2a: Google imagens (<https://images.app.goo.gl/TipuZ3sv8VymYq347>); 2b: Adaptado de Rezende et al. (2008).

Dentro do endocócion e em torno do embrião há outra membrana muito fina, denominada serosa a qual vai secretar a cutícula serosa, que por sua vez vai ser a terceira membrana extra-embriônica (CLEMENTS, 1993); sendo que esta estrutura que promove resistência à dessecação, ou seja, impede que a haja perda de água do embrião para o meio (REZENDE et al., 2008). Essa membrana extra-embriônica possui em sua composição quitina e lipídeos que promovem a impermeabilização do ovo, protegendo o embrião de perdas de componentes internos e, conseqüentemente, proporcionando uma viabilidade prolongada (JACOBS et al., 2013). Quando os ovos são depositados no ambiente, são permeáveis à água, que é absorvida, fazendo esses aumentarem seu volume antes de desenvolverem uma casca escura e rígida, ainda durante a embriogênese (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; JACOBS et al., 2013).

#### 4.1.4 Principais métodos empregados no controle vetorial

Impulsionados pela primeira campanha bem-sucedida contra o *Ae. aegypti* na capital cubana em 1901 (MAGALHÃES, 2016), o estado de São Paulo determinou que o combate às larvas fosse incluído como medida preventiva da doença Febre Amarela (MAGALHÃES, 2016). Após isso, com o incentivo da Fundação Rockefeller, foram executadas intensas campanhas de erradicação de *Ae. aegypti* no continente americano que levaram, em 1955, à erradicação do mosquito no Brasil. Em 1958, o país foi considerado livre do vetor pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, a erradicação não recobriu a totalidade do continente americano e o vetor permaneceu nas áreas que englobam a América do Sul e o Caribe, sendo detectado

novamente em território nacional a partir de 1967 (BRAGA; VALLE, 2007b; CAMARGO, 1967; MAGALHÃES, 2016; VALLE et al., 2021).

No ano de 1973, o mosquito foi novamente considerado erradicado no território brasileiro e em 1976 foi novamente detectado. Já em 1996, o Ministério da Saúde executou o Plano de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa) (MAGALHÃES, 2016). Porém, a estruturação do combate ao vetor, com foco na erradicação, não teve a atuação necessária e, em 2001, o governo desistiu dessa meta e passou a considerar o controle vetorial, com foco nos municípios mais acometidos pela dengue (BRAGA; VALLE, 2007b). Atualmente, tal controle é realizado por Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combates a Endemias (ACE), em parceria com a população. Estes, em conjunto, realizam ações que visam eliminar ou destinar adequadamente os reservatórios naturais ou artificiais de água que possam servir de criadouros para o *Aedes* (ZARA et al., 2016).

O controle do *Ae. aegypti* – ainda – é um grande desafio no Brasil e no mundo; sendo que o elo vulnerável na cadeia de transmissão das arbovírus é o vetor. Uma vez que o isolamento dos portadores do vírus é uma medida inefetiva e atualmente não há vacinas registradas para essas arboviroses, com exceção da febre amarela (MOYES et al., 2017; TAUILL, 2006). Dessa forma, o combate ao vetor consiste em medidas, principalmente, contra as larvas e o adulto, uma vez que os ovos só podem ser eliminados de forma manual (ZARA et al., 2016). Nessas ações são utilizadas basicamente três mecanismos de controle: o mecânico, químico e o biológico.

No controle mecânico, é realizada a eliminação de possíveis locais de incubação dos ovos do mosquito (*i.e.*, todo local que acumule água parada) (ZARA et al., 2016). Outra forma de controle mecânico são as armadilhas adesivas de oviposição, que atraem os mosquitos adultos graças a sua forma, cor e, em alguns casos, pela presença de feromônios (DEGENER et al., 2015). Além de prenderem os insetos na sua borda adesiva, as armadilhas induzem as fêmeas a depositarem seus ovos em uma substância larvicida, como o BTi (*Bacillus thuringiensis israelenses*) (SILVA et al., 2018).

Já o controle químico se refere à utilização de substâncias químicas que podem ser neurotóxicas, análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina, para matar larvas e o inseto adulto (*e.g.*, *malation*; *pyriproxyfen* e *diflubenzuron*) (BRAGA; VALLE, 2007a; ZARA et al., 2016). São os mesmos compostos utilizados nos agrotóxicos e, portanto, são tóxicos também para outras

espécies, inclusive para o ser humano, e podem ter um efeito cumulativo ao longo da cadeia alimentar. Outro problema é que o uso de inseticidas contínuo e sem acompanhamento pode acabar selecionando insetos resistentes (CAMPOS et al., 2020; VONTAS et al., 2012). Um exemplo de estratégia de controle químico é o fumacê, que ataca a forma adulta do inseto (ZARA et al., 2016).

E por fim, tem-se o controle biológico, baseado na utilização de predadores ou patógenos com potencial de reduzir a população vetorial (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017). Entre as alternativas disponíveis de predadores estão os peixes e os invertebrados aquáticos (e.g., *Gambusia affinis*), que se alimentam das larvas e pupas (SINGARAVELU; MAHALINGAM; BHARATHI, 1997), e os patógenos que liberam toxinas, como bactérias, fungos e parasitas (SAJJAD; ARIF, 2019). Um exemplo disso é o *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), um bacilo com potente ação larvicida por sua produção de endotoxinas proteicas (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003). Entretanto, apesar de o *Bti* ser eficaz na redução do número de larvas de *Aedes* nos recipientes tratados à curto prazo, não há evidências de que esse método isolado possa impactar na redução da morbidade da dengue à longo prazo (BOYCE et al., 2013; ZARA et al., 2016).

#### 4.2 O CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS

Para reduzir o uso de inseticidas químicos, os pesquisadores têm buscado alternativas para o controle de insetos. Com isso, a utilização de patógenos microbianos se mostrou interessante em relação aos inseticidas convencionais, por não poluírem o ambiente e não serem tóxicos para o homem e outros animais (ALVES, 1998; HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017).

Em 1919, Harry Scott Smith foi o primeiro entomologista a usar a expressão “Controle Biológico” para denominar a utilização de inimigos naturais no controle de insetos-pragas (BOARDMAN, 1977). Contudo, o conhecimento sobre a redução das populações de pragas por patógenos é muito antiga, sendo os chineses os primeiros a usarem formigas da espécie *Oecophylla smaragdina* para controlar pragas dos citros no século III a.C. (LI et al., 2010b; PARRA et al., 2002). Com isso, o controle biológico por conceito é tido como o fenômeno natural que consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais (SAJJAD; ARIF, 2019). No entanto, outra

definição aceita inclui o uso do macho estéril, inseticidas de origem vegetal ou à base de patógenos (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017).

No Brasil, o uso do controle biológico ainda é recente quando comparado com outros países (e.g., Estados Unidos). Poucos antagonistas foram introduzidos, tendo início em 1921 com o uso do parasitoide *Prospaltella berlesi* contra a cochonilha-branca-do-pessegueiro, (*Pseudaulacaspis pentagona*) (PARRA et al., 2002). Desde esse período, a indústria brasileira de controle biológico vem tendo um acentuado crescimento com os biopesticidas, os quais em 2019 representaram aproximadamente 20% dos pesticidas registrados no Brasil (BETTIOL et al., 2019). Em específico, a Associação Brasileira de Empresas de Controle Biológico (ABCBio) no ano de 2018 registrou uma expansão de 77% em relação ao ano de 2017, com a ordem de R\$ 464,5 milhões frente ao faturamento de R\$ 262,4 milhões; demonstrando assim, a tendência de maior adoção dessa tecnologia. Dentre os biopesticidas, o mercado de biofungicidas demonstrou um incremento de 148% só em 2018 quando comparado ao ano anterior (BRASIL, 2019).

Apesar do crescente incremento do controle biológico no Brasil, são diversos os desafios para o desenvolvimento de bioinseticidas. Dentre esses, pode-se citar a disponibilidade de produtos biológicos como novos agentes de biocontrole (BETTIOL et al., 2019). Nesse tópico, é imprescindível a realização de estudos com o isolamento e a seleção de novos bioagentes, pois atualmente são poucas os comercializados (BETTIOL et al., 2019). Outro desafio é o desenvolvimento de formulações adequadas para a manutenção da viabilidade do princípio ativo, as quais devem visar a proteção das estruturas, a persistência e a eficácia em campo; bem como vida de prateleira (LEGGETT et al., 2011). Desta forma, a demanda de pesquisa abrangendo esses itens demonstram lacunas a serem preenchidas.

Para a implementação do controle biológico, este pode ser realizado de três formas (ALVES, 1998). São eles: o clássico, no qual há a introdução de uma pequena quantidade de inimigos naturais numa região, sendo um processo de longo prazo; o natural, onde o controle ocorre naturalmente nos diferentes ecossistemas; e o aplicado, onde há liberação inundativa de parasitas ou entomopatógenos após a criação massal em laboratório (BERTI FILHO; MACEDO, 2011). Esse último, é o tipo mais aceito e empregado devido à redução das populações-alvo em um curto período, denominados “inseticidas biológicos”; de maneira que, a população de praga fique abaixo do nível de equilíbrio (BERTI FILHO; MACEDO, 2011; PARRA et al., 2002).

O controle de um determinado inseto pode ser realizado com diferentes tipos de agentes, são eles os predadores, parasitoides e os entomopatógenos (ALVES, 1998). O predador é um organismo de vida livre durante todo o seu ciclo, que mata a presa para o seu completo desenvolvimento, sendo normalmente maior que a presa (ALVES, 1998). Já o parasitoide é muitas vezes do tamanho do hospedeiro, mata e exige somente uma presa para completar seu desenvolvimento. E por fim o entomopatógeno, que se refere a microrganismos (e.g., bactérias, protozoários, vírus, nematoides e fungos) que vivem e se alimentam dentro ou sobre um organismo hospedeiro (PARRA et al., 2002).

#### 4.3 VISÃO GERAL SOBRE OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos entomopatogênicos são um grupo de microrganismos filogeneticamente diverso, heterotrófico, eucariótico, unicelular ou multicelular (filamentoso) que se reproduzem por meio de esporos sexuais ou assexuados (GOETTEL; EILENBERG; GLARE, 2005). Em específico, o termo entomopatogênico refere-se aos fungos que são capazes de atacar insetos usando-os como hospedeiros para desenvolver parte de seus ciclos de vida, bem como aqueles que reduzem populações de insetos-praga em níveis que não causam efeitos econômicos, danos às culturas ou aqueles que são um meio de controle na redução de vetores de doenças (SINHA; CHOUDHARY; KUMARI, 2016). Eles também são definidos como parasitas facultativos ou obrigatórios de insetos, com alta capacidade de esporulação e sobrevivência (SKINNER; PARKER; KIM, 2014).

Esse grupo é de grande interesse para o controle biológico, pois aproximadamente 80% das doenças que ocorrem em insetos têm um fungo como agente causador (ALVES, 1998; SKINNER; PARKER; KIM, 2014). Praticamente todos os insetos são suscetíveis a algumas das doenças causadas por esses fungos, que pode levar à morte (SINHA; CHOUDHARY; KUMARI, 2016). Existem fungos que podem invadir insetos mortos, chamados saprófagos, e fungos que infectam insetos vivos, chamados entomófagos (SINHA; CHOUDHARY; KUMARI, 2016). Dos estimados 1,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos no mundo, aproximadamente 750 a 1.000 são entomopatógenos fúngicos distribuídos em mais de 100 gêneros (CHANDLER, 2017).

#### 4.3.1 Classificação dos fungos entomopatogênicos

Os patógenos de insetos evoluíram na maioria das principais linhagens fúngicas, com exceção do filo Glomeromycota (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2018). Os modos nutricionais dos primeiros fungos permanecem pouco compreendidos, mas a capacidade de infectar insetos está claramente representada em vários filos (e.g., Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Entomophthoromycota) (HUMBER, 2008). Enquanto a datação molecular e os registros fósseis estimaram que os fungos evoluíram entre 0,5 a 1,5 bya (bilhões de anos atrás), os registros fósseis de Ascomycota e Basidiomycota datam do período de cerca de 400 mya (milhões de anos atrás) (HUMBER, 2008).

O número aproximado de entomopatógenos de insetos descritos variam de apenas alguns em Chytridiomycota, Blastocladiomycota e Basidiomycota para um número substancial no Ascomycota e quase completa dominância no filo Entomophthoromycota (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2018). A posição filogenética na ordem dos Ascomycotas que abriga a maior parte dos patógenos de insetos são os Hypocreales e os Onygenales, sinalizando que a capacidade entomopatogênica evoluiu rapidamente no filo Ascomycota (SHAH; PELL, 2003).

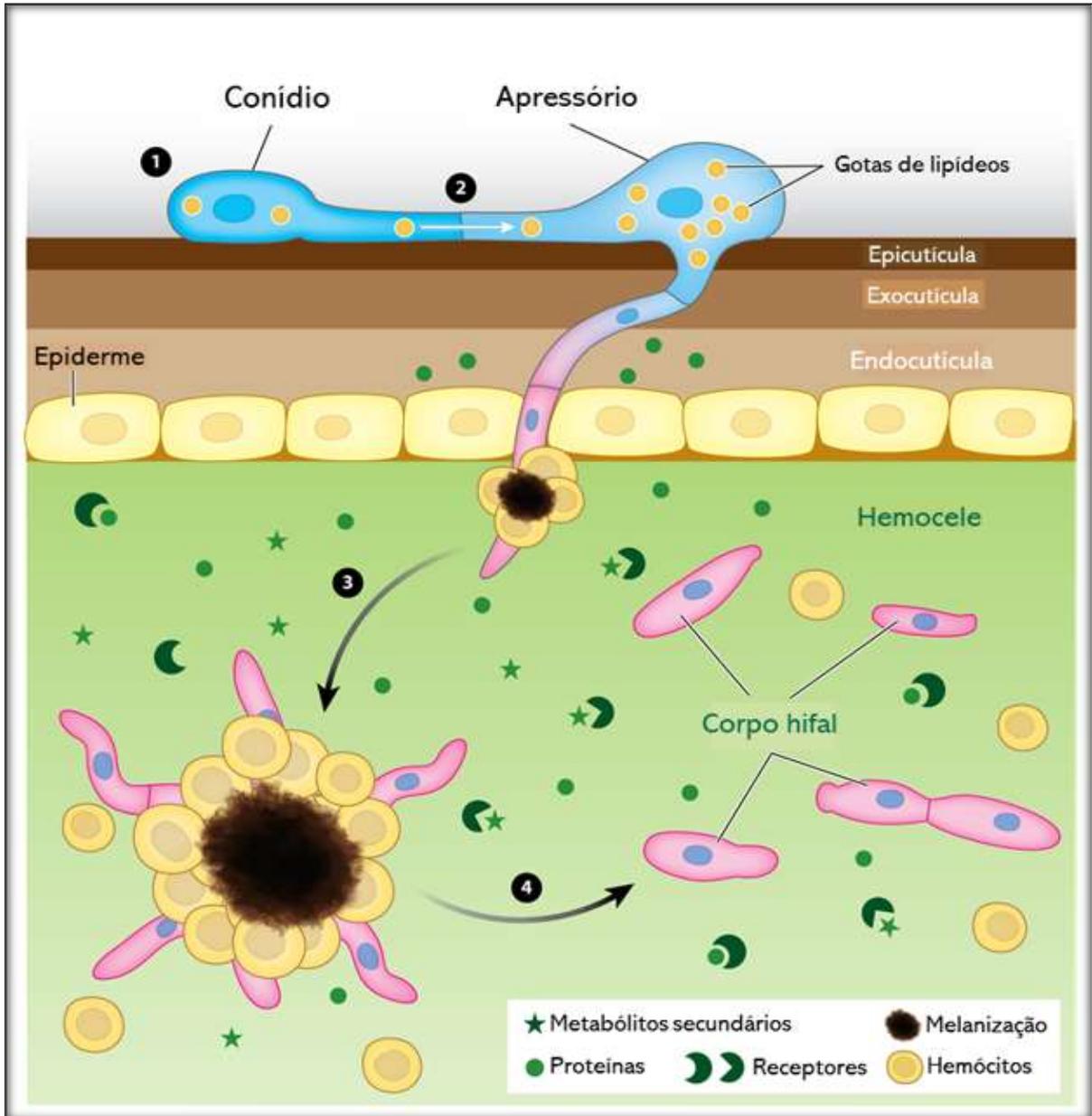
A frequência extremamente baixa de espécies patogênicas aos insetos que pertencem ao filo Basidiomycota sugere que sua adaptação foi impulsionada por outras funcionalidades ecológicas do que parasitar insetos (HUMBER, 2008), marcando uma diferença fundamental com o Entomophthoromycota, no qual quase todas as 280 espécies conhecidas são patógenos de hospedeiros artrópodes (ARAÚJO; HUGHES, 2016). Além disso, várias linhagens pertencentes ao filo Ascomycota desenvolveram patógenos de insetos. Estes incluem algumas espécies de Dothideomycetes e a ordem Eurotiales, que pertencem à classe Eurotiomycetes (ARAÚJO; HUGHES, 2016; MORA; CASTILHO; FRAGA, 2018).

O desenvolvimento de características osmofílicas (e.g., capacidade de crescer em substratos com alto teor de açúcar) pelos membros da Eurotiales, pode ter levado à necessidade de especificidade de *habitat* (SINHA; CHOUDHARY; KUMARI, 2016). Em sua maioria, essas espécies parecem ser patógenos facultativos oportunistas, sem muita especialização de hospedeiro (SAMSON; EVANS; LATGÉ, 1988; SHAH; PELL, 2003). No entanto, a forma de vida oportunista dessa ordem pode ser benéfica durante as infecções no hospedeiro, ou seja, a exploração rápida do tecido do

hospedeiro pode permitir que fungos do gênero *Aspergillus* (Ordem Eurotiales) superem espécies entomopatógenas como *Metarhizium anisopliae* (BAWIN et al., 2016).

#### **4.3.2 Interação fungo entomopatogênico-hospedeiro**

Os fungos entomopatogênicos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros como ovos, larvas, pupas e adultos; sendo essa, uma característica desejável e muito específica desse grupo (LELES et al., 2010; LUZ et al., 2007, 2008). Alguns podem ser mais agressivos, porém, a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento (BUTT et al., 2016). O processo de interação fungo-hospedeiro ocorre basicamente em quatro etapas: adesão, germinação, penetração e colonização (Figura 3).



**Figura 3** — Esquema ilustrativo do processo geral de infecção de fungos entomopatogênicos. **(1)** O conídio se adere à cutícula do inseto, germina e forma a estrutura de infecção, o apressório; **(2)** Além da secreção de proteases e quitinases, gotículas lipídicas são transferidas do conídio mãe para o apressório para hidrólise, o que gera uma alta concentração de glicerol para formar pressão e romper a cutícula; **(3)** Durante este processo e após atingir o hemocele do hospedeiro, as células fúngicas modificam suas estruturas da parede celular (representadas em rosa) em resposta ao reconhecimento, encapsulamento e melanização de hemócitos. Além disso, as células fúngicas secretam proteínas e metabólitos secundários para escapar da imunidade do hospedeiro, neutralizando os receptores do hospedeiro; **(4)** Para colonizar com sucesso a hemocele e matar o inseto, as células filamentosas que escapam mudam para uma estratégia de propagação do tipo levedura para formar corpos hifais (também chamados de blastóporos) para crescimento rápido e privação de nutrientes do hospedeiro. Fonte: Adaptado de WANG e WANG (2017).

#### 4.3.2.1 Adesão e germinação do propágulo na superfície do hospedeiro

A primeira etapa no processo de infecção dos fungos entomopatogênicos é a adesão dos conídios na superfície do hospedeiro (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2014).

Essa etapa se inicia imediatamente após o contato entre os conídios e a cutícula do inseto, envolvendo forças hidrofóbicas, eletrostáticas e interações moleculares entre o patógeno e a superfície do hospedeiro (BUTT et al., 2016). Uma vez que a mortalidade é dependente da dose, é vital que o máximo possível de conídios sejam aderidos à cutícula. A superfície dos conídios da maioria dos fungos entomopatogênicos é composta por proteínas de hidrofobina que conferem a carga hidrofóbica, facilitando a fixação dos conídios a superfícies hidrofóbicas (CHANDLER, 2017). Em contraste com os blastósporos, os conídios aderem mal a superfícies hidrofílicas, especialmente em ambientes aquáticos (ALKHAIBARI et al., 2016; ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013).

Nesse processo várias proteínas da parede celular desempenham papéis importantes (BUTT et al., 2016). A CWP10 é uma delas, pois é responsável por aumentar a hidrofobicidade e a adesão dos conídios (LI et al., 2010a), enquanto a CP15 ajuda os conídios a lidar com o estresse térmico e oxidativo (YING; FENG, 2011). Já a Mad1 e Mad2 facilitam a adesão aos artrópodes e raízes de plantas, respectivamente (WANG; ST LEGER, 2007). Além disso, várias enzimas também estão atuando nessa etapa. Os conídios virulentos possuem altos níveis de Pr1, que juntamente com outras enzimas podem degradar compostos na superfície do hospedeiro, fazendo assim liberar nutrientes que estimulem a germinação (QU; WANG, 2018).

A rápida germinação é um atributo das cepas mais virulentas (QU; WANG, 2018). Com isso, a infecção é facilitada quando as condições ambientais são favoráveis. Essa etapa é iniciada após cerca de 10hrs e, em geral, é concluída em 20hrs com a formação do tubo germinativo e hifas (KHACHATOURIANS, 1996). Porém, em alguns fungos há formação de apressório (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013). Os múltiplos locais de penetração permitem que o patógeno colonize rapidamente o hospedeiro (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2014).

A cutícula é a primeira e mais importante barreira ao fungo entomopatogênico (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013). As interações dinâmicas na superfície influenciam na capacidade dos patógenos de infectar seus hospedeiros (JARROLD et al., 2007). Conídios de espécies de *Metarhizium* não se fixam à superfície de larvas de mosquitos (e.g., *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*) devido a forças de adesão mais fracas em comparação com aquelas entre os conídios e hospedeiros terrestres (GREENFIELD et al., 2014). Em adição, a natureza hidrofílica da cutícula larval

impede os conídios de se aderirem. No entanto, os blastósporos produzem mucilagem (*i.e.*, substância gelatinosa pegajosa) que permite seu estabelecimento na cutícula larval e parece ser relativamente estável debaixo d'água (DAOUST; WARD; ROBERTS, 1982; MANNINO et al., 2019).

#### 4.3.2.2 Formação de apressório

Os apressórios (*i.e.*, estruturas diferenciadas nas pontas dos tubos germinativos) (LEE; DEAN, 1994) podem ser produzidos diretamente dos conídios, no final da germinação ou mesmo lateralmente a partir de hifas (WANG; WANG, 2017). Algumas espécies fúngicas não produzem apressórios, mas podem penetrar diretamente (ZHANG et al., 2010). A composição cuticular do hospedeiro influencia na diferenciação e fenótipo dos apressórios, os quais podem ser clavados, esféricos ou em forma de taça; e ainda, formados em superfícies duras, pobres em nutrientes e hidrofóbicas (LEE; DEAN, 1994; ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013).

#### 4.3.2.3 Penetração e colonização do tegumento

Para que a infecção seja bem sucedida, os fungos entomopatogênicos devem penetrar na cutícula do inseto (JARROLD et al., 2007), composto por uma rede de polímeros com polissacarídeos incorporados em uma matriz de proteínas (LEGER et al., 1991). A forma como ocorre a penetração no hospedeiro depende das propriedades da cutícula, como espessura, esclerotização e a presença de substâncias nutricionais (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013).

Após a germinação, cada apressório produz uma cavilha de penetração estreita que fixa o fungo na cutícula para neutralizar a pressão descendente gerada pela cavilha (PEDRINI, 2018). Em seguida, a cutícula é ocasionalmente distorcida no local de penetração, sugerindo a aplicação de uma força substancial durante a infecção (HARITH-FADZILAH; ABD GHANI; HASSAN, 2021). Os blastósporos, por sua vez, podem produzir cavilhas de penetração a partir de apressórios ao longo do comprimento ou na ponta do blastósporos (MANNINO et al., 2019). A pressão exercida pelas hifas nas áreas membranosas em associação com o coquetel enzimático, produzidos durante esse processo, favorecem a penetração (LEGER et al., 1991). Então, estas se ramificam e colonizam o tegumento do inseto e posteriormente,

atingem a hemocele (VALERO-JIMÉNEZ et al., 2016)

Uma vez que o fungo entomopatogênico invade a hemolinfa, eles se multiplicam como blastósporos de paredes finas semelhantes a leveduras ou corpos hifais (ALKHAIBARI et al., 2016). Estes se multiplicam nesta forma até que os nutrientes se esgotem e, durante essa etapa são encontradas as defesas celulares e humorais do hospedeiro (BUTT et al., 2016; QU; WANG, 2018). Todavia, o fungo escapa dessas defesas através da formação de estruturas como corpos hifais e a secreção de toxinas que suprimem a resposta imune de insetos (BUTT et al., 2016; SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2014). Essas toxinas, associadas a alterações patológicas na hemocele, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento do micélio e início do processo de esporulação, causam a morte do inseto. No cadáver, o fungo coloniza o corpo gorduroso, sistema digestivo, hipoderme, sistema nervoso, músculos e traqueias. Em seguida, as hifas emergem através de espiráculos e da cutícula. Adicionalmente, associada ao crescimento do micélio, ocorre a esporulação do fungo no cadáver e a disseminação de propágulos fúngicos, podendo contaminar e infectar novos insetos em diferentes fases de desenvolvimento (ALVES, 1998; KHACHATOURIANS, 1996; MORA; CASTILHO; FRAGA, 2018; PONTES, 2018).

#### 4.3.2.4 Resposta imunológica do hospedeiro

Os fungos entomopatogênicos têm um grande impacto em seus hospedeiros, e a sobrevivência dos insetos depende de seus mecanismos de defesa (QU; WANG, 2018). Ao contrário dos vertebrados que possuem a resposta do sistema imunológico adaptativo, os insetos não têm a capacidade de produzir anticorpos (ALI MOHAMMADIE KOJOUR; HAN; JO, 2020). Os hospedeiros combatem a invasão com a ajuda de um sistema imunológico inato composto principalmente por mecanismos humorais e celulares (HOFFMANN, 1995; QU; WANG, 2018).

Na imunidade humoral dos insetos, as Adenosina Monofosfato (AMP) desempenham papéis cruciais (PAL; WU, 2009). A produção desses peptídeos é ativada, principalmente, por meio das vias de sinalização Toll e IMD, que são responsáveis pela detecção de diferentes classes de micróbios (IMLER; ZHENG, 2004; KIM et al., 2017). Além das AMPs, a imunidade humoral envolve uma ampla gama de defesas como a melanização em cascata, produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (LU; ST. LEGER, 2016). As AMPs são

sintetizados no corpo gorduroso, hemócitos, epiderme e epitélios, e subsequentemente secretados na hemolinfa para combater os patógenos (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2018). Aliás, os fungos invasores são reconhecidos por meio de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) do hospedeiro, levando à amplificação do sinal de infecção pelas serina proteases (KIM et al., 2017). A infecção ativa as vias de sinalização Toll que leva à produção de AMPs. Adicionalmente, outras cascatas de sinalização como JAK-STAT e as vias JNK também são ativadas após a infecção fúngica (ALI MOHAMMADIE KOJOUR; HAN; JO, 2020; PEDRINI, 2018). Ademais, o inseto hospedeiro também produz moléculas como lisozima (e.g., associado a atividade antifúngica), apolipoforia III (e.g., detecção dos fungos), hemocianina e transferrina (QU; WANG, 2018; WANG; WANG, 2017). Essas moléculas têm funções múltiplas e tendem a trabalhar sinergicamente para aumentar a eficácia no combate à infecção fúngica. As vias de sinalização Toll também desempenham um papel crítico na resposta imune do inseto, já que envolve a fagocitose de micróbios, encapsulamento e a eliminação de parasitas (IMLER; ZHENG, 2004). Em adição, junto com outras vias, controla a proliferação e a densidade de hemócitos (BUTT et al., 2016; PEDRINI, 2018).

As respostas imunes celulares dos insetos dependem dos hemócitos (KURUCZ et al., 2003). Estes estão envolvidos em uma série de defesas celulares, incluindo nodulação, fagocitose e encapsulamento (LU; ST. LEGER, 2016). Um exemplo é em *Drosophila*, na qual os plasmócitos reconhecem os patógenos por meio de receptores fagocíticos como Eater e Dscam nas suas superfícies (HOFFMANN, 2003). Outras moléculas que têm papel importante na defesa são as proteínas contendo tioéster (TEPs), pois aumentam a fagocitose ligando-se ao patógeno (ZHANG et al., 2021).

Além das respostas imunes humorais e celulares, cascatas proteolíticas complexas, que induzem a resposta de melanização, podem ser ativadas em resposta à infecção fúngica (QU; WANG, 2018). Durante a invasão, os PAMPs do patógenos são reconhecidos pelos PRRs do hospedeiro, induzindo a maturação da profenoloxidase (PPO) em fenoloxidase (PO) por meio de uma série de reações enzimáticas, levando à formação de quinonas reativas tóxicas e melanina (MANNINO et al., 2019; PEDRINI, 2018). Esses substratos tóxicos podem ajudar na morte do patógeno e são eficazes contra algumas infecções fúngicas. A cascata de PPO é rigidamente regulada pelas serina proteases e inibidores de serina proteases. Muitos fungos entomopatogênicos desenvolveram atividade anti-PO evitando que suas

próprias proteases ativem a cascata de PPO (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2018; WANG; WANG, 2017).

#### 4.4 O GÊNERO *Paecilomyces*

Em 1907, o gênero *Paecilomyces* foi descoberto por Bainier com a descrição da espécie *Paecilomyces variotii* (BAINIER G., 1907). Além disso, Bainier enfatizou sua relação com os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (MALLOCH; CAIN, 1972). No entanto, o artigo de Bainier atraiu pouca atenção na época. No ano de 1910, Thom, sem saber do artigo de Bainier, descreveu a mesma espécie como *Penicillium divaricatum* (PITT; HOCKING, 1997). O artigo de Thom foi amplamente estudado, já que foi a primeira vez que algum tipo de ordem foi incluído no gênero *Penicillium*. A descrição da espécie foi detalhada e acompanhada por figuras cuidadosamente desenhadas, e a maioria das referências a *P. variotii* durante as próximas duas décadas foram encontradas sob o nome de *P. divaricatum* (DONG et al., 2012; RAPER; THOM, 1949; SAMSON et al., 2009).

Porém o pesquisador Westling, em 1911, discutiu a questão das espécies de *Penicillium* que não são verdes (PITT; HOCKING, 1997). Ele se referia a *P. divaricatum* e *P. lilacinum*, afirmando que estes não pertenciam ao gênero *Penicillium* e deveriam ser transferidos para outros gêneros. Entretanto, em 1912, Sopp descreveu um novo gênero *Corollium* para incluir um isolado que ele encontrou (BROWN; SMITH, 1957). Por sua descrição e figuras, não houve dúvidas de que a espécie *Corollium dermatophagum* seria outro sinônimo de *P. variotii*. Contudo, Sopp, Thom e Westling, não tinham conhecimento da descrição de *Paecilomyces* de Bainier (DONG et al., 2012).

Uma cultura que estava descrita como *P. divaricatum* foi examinada por Biourge em 1923. Biourge relatou que se tratava de uma espécie pertencente ao gênero *Scopulariopsis* (BROWN; SMITH, 1957). Não obstante, Zaleski em 1927 não estava familiarizado com os gêneros *Scopulariopsis* e *Paecilomyces* ao classificar suas espécies em várias subseções de *Penicillium*. Mas em 1930, Thom reconheceu o gênero *Paecilomyces* de Bainier e dedicou um capítulo para ele (DONG et al., 2012). Nesse, ele afirmou que *P. divaricatum* deve ser considerado um sinônimo de *P. variotii*. Além disso, Thom descreveu o gênero de forma mais precisa, o que tornou mais fácil o reconhecimento da espécie (BROWN; SMITH, 1957; DONG et al., 2012;

SAMSON et al., 2009).

#### 4.4.1 Taxonomia

As espécies *Paecilomyces* pertencem ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes e seu teleomorfo é sugerido como dentro do gênero *Byssochlamys* (SAMSON et al., 2009). Após vários anos de pesquisa, a análise filogenética provou que o gênero *Paecilomyces* é polifilético pertencente à duas ordens do Ascomycetes, são estes o Eurotiales e Hypocreales (DONG et al., 2012). Estes fungos filamentosos têm muitas espécies, tanto patogênica quanto saprofítica, e pode ser encontrado em uma ampla variedade de *habitats*, incluindo solo, material vegetal ou alimento em decomposição, produtos alimentícios pasteurizados, insetos, nematoides, a rizosfera de várias plantas, entre outros (DAI; WANG; LI, 2020; DONG et al., 2012; HE et al., 2011).

A descrição desse gênero foi revisada por Brown e Smith, e Samson (SAMSON, 1974) definiu 31 espécies divididas em duas seções: seção *Paecilomyces* caracterizada por membros termofílicos, termotolerantes e mesofílicos, com colônias marrom-amarelada, sendo as espécies nas formas assexuadas pertencentes aos gêneros *Talaromyces* e *Thermoascus*; e a seção *Isarioidea* caracterizada por espécies entomopatogênicas e nematófagas, mesófilas com colônias roxas, rosas, amarelas e verdes, os quais incluem *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus* e *Paecilomyces tenuipes* (HE et al., 2011; SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020). Atualmente, de acordo com o banco de dados *Index Fungorum* ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)), esse gênero contém cerca de 145 espécies no mundo todo (MORENO-GAVÍRA et al., 2020).

A classificação desses fungos é baseada na morfologia característica, que muitas vezes são altamente subjetivas, com identificação equivocada ao nível de espécie (SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020). Além disso, as diferenças morfológicas observadas pode ser o produto de mutações simples ou efeito do cultivo e, portanto, nem sempre são confiáveis (LI et al., 2020). No entanto, com o avanço da biologia molecular e conseqüentemente a adição desses dados, houve uma maior confiabilidade na identificação; de maneira que, resultou na reclassificação da seção *Isarioidea* do gênero *Paecilomyces*, distinguindo antigas espécies em três famílias, conforme descrito na tabela 1 (LUANGSA-ARD et al., 2011,

2005; SUNG et al., 2007).

**Tabela 1** — Classificação atual com base filogenética de algumas espécies anteriormente descritas na seção *Isarioidea* de *Paecilomyces*.

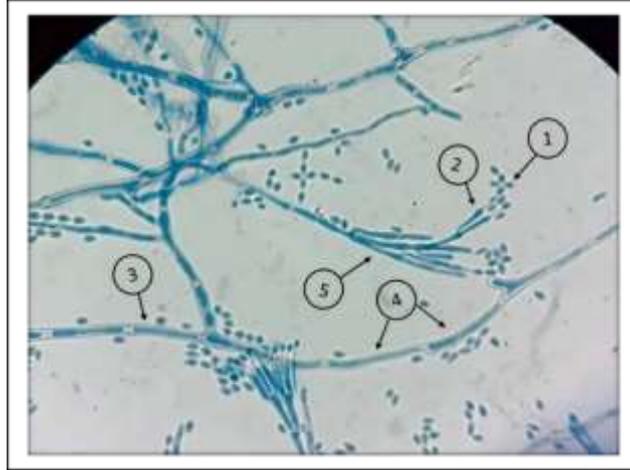
<b>Espécies reclassificadas</b>	<b>Gênero</b>	<b>Família</b>
<i>P. carneus</i> , <i>P. marquandii</i>	<i>Paecilomyces</i>	Clavicipitaceae
<i>P. amoenorosea</i> , <i>P. cateniannulata</i> , <i>P. cateniobliqua</i> , <i>P. cicadae</i> , <i>P. coleopterora</i> , <i>P. farinosa</i> , <i>P. fumosorosea</i> , <i>P. ghanensis</i> , <i>P. tenuipes</i>	<i>Isaria</i>	Cordycipitaceae
<i>P. lilacinus</i>	<i>Purpureocillium</i>	Ophiocordycipitaceae

Essa revisão taxonômica se iniciou com a lectotipificação e a determinação do *status* *Isaria* (HODGE et al., 2005), um nome utilizado anteriormente como sinônimo de *Paecilomyces*. Após isso, Gams et al. (2005), definiu formalmente o gênero *Isaria* (GAMS et al., 2005). Porém, a reclassificação da maioria das espécies ocorreu através de um estudo filogenético que confirmou a natureza polifilética do gênero *Paecilomyces* (LUANGSA-ARD; HYWEL-JONES; SAMSON, 2004). Neste, verificou-se o retorno das espécies *P. javanicus* e *P. farinosus* ao gênero *Isaria* (LUANGSA-ARD; HYWEL-JONES; SAMSON, 2004), ressuscitando assim o gênero *Isaria*. A transferência de *P. viridis* para *Chamaeleomyces* (SIGLER et al., 2010) e alocação de *P. lilacinus* em um novo gênero (ainda monotípico) como *Purpureocillium lilacinum* (LUANGSA-ARD et al., 2011).

#### 4.4.2 Características gerais

Como visto anteriormente, o gênero *Paecilomyces* está intimamente relacionado com o gênero *Penicillium* (MALLOCH; CAIN, 1972). As espécies pertencentes ao *Paecilomyces* são distinguidos por fiáldes de tubulares curtos, ou mais ou menos inchados na porção basal e afinando em tubos longos e delgados com conídios, os quais são, principalmente, curvados ou ligeiramente dobrados para longe do eixo principal da célula (LI et al., 2020). Como observa-se na figura 4, as fiáldes são dispostas de maneira variada, parcialmente em verticilos e sistemas de ramificação que sugerem ser *Penicillium*; parcialmente arranjadas irregularmente em

ramificações curtas, parcialmente sésseis e surgindo individualmente das hifas férteis; e conídios em cadeias (DONG et al., 2012; HE et al., 2011; SAMSON et al., 2009).



**Figura 4** — Micrografia em coloração azul de lactofenol de *Paecilomyces* sp. com aumento de 40x. Nesta, verifica-se a visualização dos (1) conídios; (2) fiálide; (3) hifa; (4) septos; (5) conidióforo. Fonte: Arquivo pessoal.

O crescimento vegetativo tende a ser mais ou menos flocoso, comparativamente fino, consistindo de uma teia emaranhada de hifas aéreas, profundamente flocosa, solta ou densa (DONG et al., 2012). Algumas espécies tendem a produzir colônias úmidas e viscosas, especialmente nos estágios iniciais de crescimento, tornando-se ligeiramente colorido à medida que a produção de conídios atinge o seu máximo (SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020). O reverso das colônias variam consideravelmente, com os tons mais comuns de brancos sujos, amarelos opacos e marrons. Adicionalmente, poucas espécies produzem gotas de transpiração (*i.e.*, exsudato), que são características marcantes da maioria das espécies do gênero *Penicillium* (LI et al., 2020; SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020).

Em relação às estruturas, os conidióforos surgem principalmente de hifas aéreas. Elas são septadas, exceto quando muito curtas, e podem ser de diâmetro variável de acordo com cada espécie (DONG et al., 2012). Nos conidióforos raramente há qualquer rugosidade, como encontrado nas espécies de *Penicillium*. Em todas as espécies, estruturas de esporos que carecem de conidióforos definidos são comuns e, em algumas espécies, conidióforos bem definidos raramente são formados (HE et al., 2011). Além disso, os conídios são unicelulares, hialinos ao microscópio, mas muitas vezes de cor pálida e principalmente liso. Entretanto, estes podem ser as vezes

finamente rugoso, geralmente ovalado, alongado ou quase cilíndrico (SAMSON, 1974). Em adição, espécies do gênero *Paecilomyces* têm altas taxas de esporulação de crescimento e se propagam em uma ampla gama de temperatura e substratos. Como resultado disso, sua rápida multiplicação propicia o desenvolvimento viável e acessível de formulações comerciais (DONG et al., 2012; SAMSON, 1974; SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020).

#### 4.4.3 O potencial do gênero no controle biológico

*Paecilomyces* tem mostrado grande potencial de aplicação na indústria, agricultura e medicina (LI et al., 2020). Além disso, várias espécies de *Paecilomyces* têm sido consideradas importantes agentes de biocontrole, incluindo *Paecilomyces carneus*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces lilacinus* (MORENO-GAVÍRA et al., 2020; ZIMMERMANN, 2008). Essas descobertas sugerem que as espécies desse gênero são um recurso microbiano de alto valor, não apenas por seu uso potencial, mas também por sua capacidade de produzir várias substâncias bioativas (BARKER et al., 2014; LI et al., 2020).

As espécies desse gênero usam diferentes mecanismos microbianos na ação contra insetos, os quais são: o parasitismo, a competição e a antibiose (SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020). No parasitismo, as espécies *Paecilomyces* são capazes de parasitar fungos, nematoides e artrópodes. Nesse processo logo após o reconhecimento e a interação, ocorre a penetração e a secreção de coquetel enzimático, levando o desenvolvimento fúngico às custas de seu hospedeiro (SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020). Já na competição, a concorrência por nutrientes e espaço regula o crescimento fúngico no mesmo nicho (MORENO-GAVÍRA et al., 2020). Embora esse mecanismo tenha um impacto direto no controle, a competição é frequentemente acompanhada por outros mecanismos. Assim, o rápido crescimento das espécies fúngicas impede o desenvolvimento de outros patógenos, como acontece no caso das plantações. Já na antibiose, a produção de metabólitos secundários com efeito antimicrobiano pelas espécies tem sido empregado como mecanismo de ação (LI et al., 2020; MORENO-GAVÍRA et al., 2020).

Em relação a seus hospedeiros, alguns estudos têm demonstrado seu efeito em controlar doenças causadas por bactérias e fungos fitopatogênicos

(MOHAMMADI; SOLTANI; PIRI, 2016). Um exemplo é o estudo dos pesquisadores Neshia e Siddiqui (2017), os quais observaram uma redução na podridão mole e queima-das-folhas causadas pelos fungos *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* e a bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *Carotae*, respectivamente, após o uso de *Paecilomyces lilacinus*; bem como um aumento no peso seco e no conteúdo de clorofila de uma safra de cenoura (NESHA; SIDDIQUI, 2017). Além disto, estudos têm relatado que as espécies *P. variotii* e *P. lilacinus* são as principais espécies que tem se mostrado eficaz contra as doenças de plantas (MORENO-GAVÍRA et al., 2020).

Adicionalmente, os fungos *Paecilomyces* são considerados fungos nematófagos e já podem ser encontrados em uma variedade de formulações biológicas de uso agrícola (e.g., BioAct®, Biomyces®, Biostat®, Nemacontrol®, Paecyl®, Safelomyces®, Nemata®) (BETTIOL et al., 2012). Seus principais hospedeiros incluem *Meloidogyne* spp. (TAZI et al., 2021), *Globodera* spp. (HAJJI et al., 2017), *Rotylenchulus* spp. (VYAS; SHARMA; BHARGAVA, 2011), *Heterodera* spp. (MANHONG; XINGZHONG; ZHIBO, 2002); reduzindo drasticamente suas populações, tanto nos testes *in vitro* quanto nos testes de campo (MORENO-GAVÍRA et al., 2020). Aliás, o *Paecilomyces* spp. atua nos diferentes estágios de desenvolvimento do nematóide, infectando-os jovens ou adultos (MOHAMMADI; SOLTANI; PIRI, 2016). Um estudo de Ahmad et al. (2019) verificou que *P. lilacinus* e *P. variotii* causaram uma redução (*i.e.*, mortalidade) de 100% nos ovos de *Fasciola giganteca*, agente causador da fasciolose (AHMAD et al., 2019).

No controle de artrópodes, entre os fungos entomopatogênicos, as espécies de *Paecilomyces* parecem fontes viáveis para a elaboração de micoinseticidas, pois os substratos são de baixo custo e os propágulos (*i.e.*, blastósporos ou conídios) podem ser facilmente produzidos em grande escala (SENTHILKUMAR; ANANDHAM; KRISHNAMOORTHY, 2020). Conforme Moreno-Gavíra (2020), a maioria dos testes em condições laboratoriais e controlados são avaliados quanto a aplicação de suspensões de conídios de *Paecilomyces* spp. sobre as amostras, os quais fornecem resultados claros sobre a infectividade das espécies testadas (MORENO-GAVÍRA et al., 2020). No trabalho de Ansari et al. (2008), foi demonstrado que *P. fumosoroseus* é capaz de causar mais mortes do que alguns inseticidas comerciais, como o Fipronil, quando usado contra *Frankliniella occidentalis* (ANSARI et al., 2008). De forma complementar, existem numerosas ordens de artrópodes vulneráveis aos fungos *Paecilomyces* spp., que incluem hemípteros, como aleirodídeos, pulgões,

lepdópteros, himenópteros e dípteros (LI et al., 2020; MORENO-GAVÍRA et al., 2020).

#### 4.4.4 Espécies *Paecilomyces* contra o vetor *Ae. aegypti*

Especificamente contra o *Ae. aegypti*, estudos com espécies *Paecilomyces* ainda é incipiente quando comparado ao acervo de outros gêneros (e.g., *Metharhizium* e *Beauveria*). Um resumo dos estudos realizados nas últimas duas décadas com as espécies de *Paecilomyces*, contra as diferentes fases do *Ae. aegypti* está listada na Tabela 2. De modo geral, não foi constatada uma espécie sendo mais extensamente estudada, porém pontua-se que *P. lilacinus* foi frequentemente empregado nos estudos.

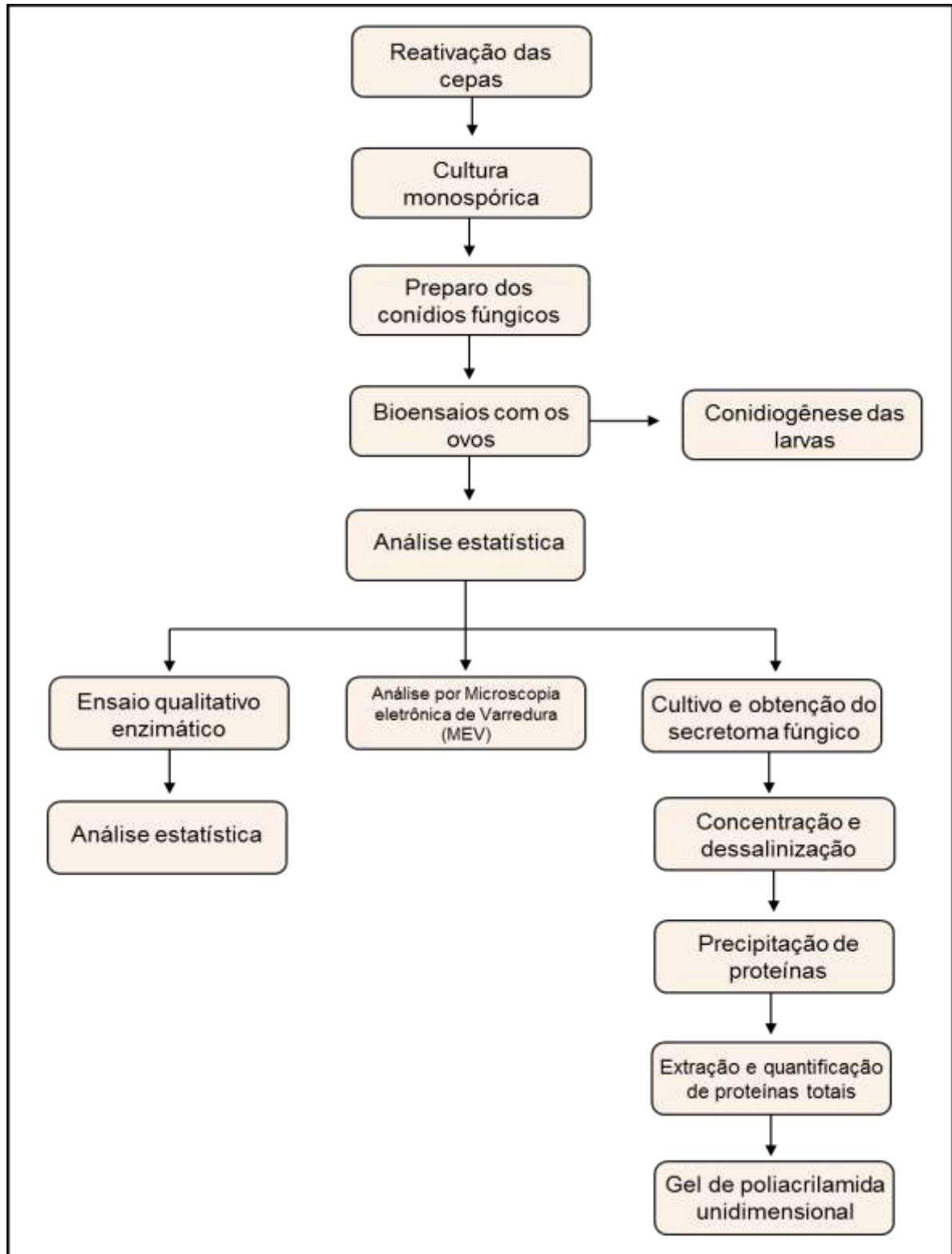
**Tabela 2** — Visão geral das espécies *Paecilomyces* empregadas nos estudos contra as diferentes fases do vetor *Ae. aegypti*.

Espécie(s)	Fase infectada	Referências
<i>P. lilacinus</i>	Larvas de IV ínstar	AGARWALA; SAGAR; SEHGAL (1999)
<i>P. lilacinus</i>	Ovo Larvas Pupa Adulto	GUTIÉRREZ HUAMÁN; GUTIÉRREZ HUAMÁN (2017)
<i>P. carneus</i> <i>P. lilacinus</i> <i>P. marquandii</i> <i>P. chlamydosporia</i>	Adulto	LELES et al., (2010)
<i>P. carneus</i> <i>P. lilacinus</i> <i>P. marquandii</i> <i>P. chlamydosporia</i>	Ovo	(LUZ et al., 2007)

Portanto, levando-se em consideração a carência de bibliografia pertinente ao controle biológico com o gênero *Paecilomyces* contra o vetor *Ae. aegypti*, ressalta-se que existe um potencial a ser explorado, pelas particularidades desse gênero.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



**Figura 5** — Fluxograma das etapas experimentais realizadas neste trabalho.

## 5.2 ORIGEM E REATIVAÇÃO DAS CULTURAS FÚNGICAS

As culturas fúngicas utilizadas neste trabalho (Tabela 3) foram cedidas pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), e pela Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

**Tabela 3** — Espécies do gênero *Paecilomyces* utilizadas nesse estudo

Espécie
<i>Paecilomyces farinosus</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>
<i>Paecilomyces zollerniae</i>
<i>Paecilomyces niveus</i>
<i>Paecilomyces variotii</i>
<i>Paecilomyces byssochlamydoides</i>
<i>Paecilomyces viridis</i>

Obs.: Para fins de futuras pesquisas e/ou patentes, o acervo biológico e o número de acesso não serão disponibilizados. Além disso, apesar da nova atribuição das espécies *P. farinosus*, *P. lilacinus* e *P. viridis* a diferentes gêneros, neste trabalho, considerou-se estas espécies pertencentes ao gênero *Paecilomyces*.

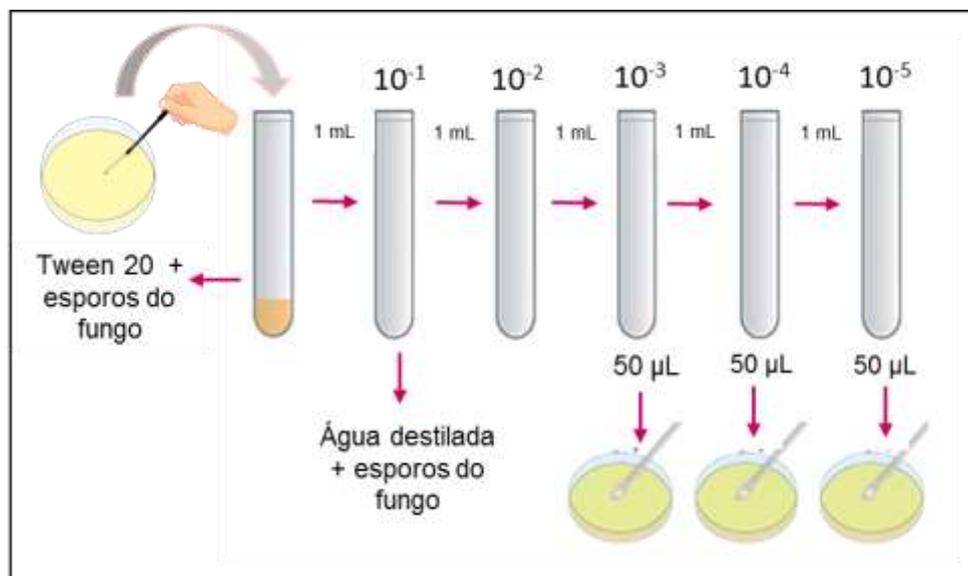
As espécies oriundas da CCFF/IOC vieram conservadas pelo método de liofilização e estavam armazenadas em frasco âmbar; assim, os fungos foram submetidos a um processo de reativação. Para isso, foi realizada a desinfecção dos frascos com gaze embebida em álcool 70% e deixados para secar. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foi rompida a parte superior do lacre e retirada a tampa de borracha. Após isso, foi adicionado 0,5 mL de água destilada estéril e deixado em repouso por 30 minutos. Posteriormente, o sedimento foi homogeneizado e retirado 0,1 mL da suspensão, o qual foi aplicado em placas contendo o meio Ágar Extrato de Malte (MEA). Estas foram inubadas durante sete dias à 28 °C em câmara BOD. Já para as culturas obtidas da CFAM/ILMD, o processo de reativação foi realizado sob a responsabilidade da curadora da coleção, Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes.

Após o procedimento de reativação, tais culturas foram autenticadas através da observação de suas características morfofisiológicas, seguindo os critérios de

chave de identificação estipulados por Samson (1974).

### 5.3 CULTURA MONOSPÓRICA

Nesse procedimento, as culturas foram submetidas a uma diluição seriada (SANTOS et al., 2009b), visando obter hifas produzidas a partir da geminação de um único conídio de cada fungo estudado; representando um grau de pureza adicional a esses microrganismos. Assim, esporos de cada fungo foram transferidos com o auxílio de *Swab* a tubos de ensaio distintos, contendo 2,5 mL da solução Tween-20% (solução estoque). Posteriormente, retirou-se 1,0 mL da solução estoque e transferiu-se a um outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada para as cinco diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ). Em seguida, 50  $\mu$ L das três últimas diluições foram plaqueadas, em duplicata, no meio Extrato de Malte Ágar (Figura 6). Após a observação do surgimento de conídios (48 horas), transferiu-se da última diluição ( $10^{-5}$ ), um fragmento do meio contendo o esporo do fungo para uma nova placa de petri, com o mesmo meio de cultura usado anteriormente. Esta foi mantida a 28°C por 7 dias para o crescimento e a esporulação de cada fungo.



**Figura 6** — Esquema ilustrativo representando o procedimento de sucessivas diluições e o plaqueamento das três últimas diluições em placas de petri.

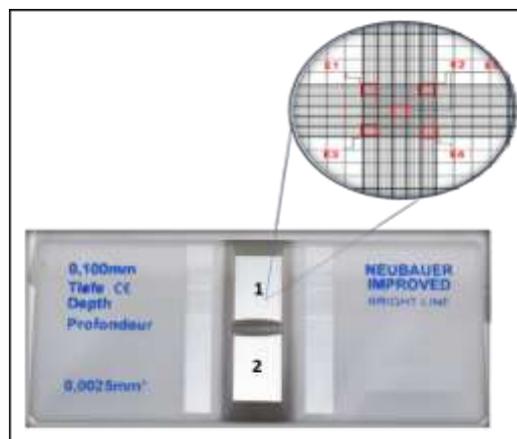
#### 5.4 ORIGEM E PROCESSAMENTO DOS OVOS DE *Aedes aegypti*

As amostras de ovos utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo Centro de Entomologia, da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Oriundos de uma colônia estabelecida (linhagem PP-Campos), os ovos foram obtidos de adultos mantidos a temperatura de 26-28°C, umidade de 70-80%, alimentados com glicose a 10% e a alimentação sanguínea realizada em camundongos do tipo suíço. As fêmeas depositaram os ovos em papéis filtros, estes foram secos à temperatura ambiente e acondicionados em sacos plásticos até as próximas etapas do experimento (PAZ, 2018).

Os experimentos foram realizados com ovos de três a vinte dias de idade. Esses foram expostos, antes dos procedimentos, a luz ultravioleta por 15 minutos para reduzir a carga microbiana da sua superfície.

#### 5.5 PREPARO E QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO

Com o auxílio de *Swab*, transferiu-se esporos das espécies fúngicas para tubos de ensaios inclinados contendo o meio de cultura MEA e incubou-se a 28°C em câmara BOD por 7 dias. Após esse período, 5 mL de água destilada estéril com Tween 80 a 0,05% foram adicionados e, o conteúdo foi filtrado em gaze estéril; resultando assim, na suspensão estoque. Para a determinação da concentração da suspensão estoque, utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada. Na quantificação, considerou-se os dois campos e os cinco subcompartimentos (Figura 7) que contém 16 quadrados.



**Figura 7** — Esquema ilustrativo da contagem de esporos na câmara de Neubauer. Na imagem, os números 1 e 2 representam os dois campos, sendo no primeiro campo “em zoom” os cinco subcompartimentos a serem contados.

Para a contagem de esporos, retirou-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque e colocou-se entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70%. A contagem de esporos foi realizada em microscópio óptico utilizando um aumento de 400 vezes. A concentração foi obtida empregando os dados no *software* CALIBRA®. Posteriormente, as soluções estoques foram ajustados para as concentrações de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios/mL com água estéril contendo Tween 80 a 0,05%.

## 5.6 BIOENSAIOS COM OVOS

Os ensaios ovicidas foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Luz et al. (2007), com algumas modificações. Para os bioensaios, foram utilizadas placas de petri contendo o meio de cultura água-ágar 2%, afim de manter as condições ideais de umidade para o desenvolvimento fúngico. Nesses, foram colocados papeis filtros estéreis (4cm<sup>2</sup>) com divisões na área superficial de 1cm<sup>2</sup>. Os experimentos foram realizados com dois tipos de tratamento (aplicação direta ou indireta) (Figura 8), com cinco concentrações distintas ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios/mL).



**Figura 8** — Esquema representativo dos tratamentos realizados em ovos de *Ae. aegypti*, com conídios formulados em água e Tween 80 a 0,05 %; sendo a aplicação direta dos conídios sobre a superfície do ovo e a indireta com a aplicação dos conídios sobre os papeis filtros para a exposição posterior dos ovos.

Em cabine de fluxo laminar, trinta ovos foram cuidadosamente colocados, com o auxílio de um pincel, sobre o papel filtro e tratados topicamente, caracterizando a aplicação direta. Já para aplicação indireta, o papel filtro foi tratado com conídios e em seguida, trinta ovos foram colocados sobre esta superfície. Independente do tipo de

tratamento foram aplicados, com pipetas semiautomáticas, 15  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  da suspensão de conídios referente as cinco concentrações diferentes estudadas. Para os brancos, foram aplicados 15  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  de água com Tween 80 a 0,05% sem conídios, de forma direta e indireta; e nos bioensaios controle não foi realizado nenhum tipo de tratamento. Posteriormente, os papeis filtro foram secos por 15 minutos em condições ambiente e as placas de petri colocadas em uma incubadora do tipo *shaker* refrigerada a 28 °C.

Os ovos foram examinados 24 horas após incubação e aqueles que apresentaram dano físico visível ou eclosão de larvas foram retirados do teste. Independente da ocorrência ou não de dano, somente 20 ovos, foram mantidos em cada teste. Após 20 dias de incubação, os papeis filtro contendo os ovos foram submersos em 250mL de água de torneira estéril, contendo uma pequena quantidade de ração triturada para peixe; sendo os copos mantidos a  $25 \pm 1$  °C.

A eclosão quantitativa foi dada após 96 horas de imersão dos papeis filtros, e as formas imaturas foram acompanhadas durante seu desenvolvimento até a morte ou a emergência de adultos. Em paralelo, 15  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  da solução de  $1 \times 10^4$  conídios/mL foi plaqueada, nos quatro cantos da placa de petri contendo o meio de cultura MEA, a fim de verificar a viabilidade de crescimento de cada espécie.

Adicionalmente, os ovos que não eclodiram e as larvas ou pupas mortas foram retiradas dos copos, secos a temperatura ambiente e armazenados a 4°C para posteriores testes.

## 5.7 ANÁLISE DOS DADOS, DESCRITIVA E ESTATÍSTICA

O desenho do estudo foi inteiramente casualizado, com sete fungos em cinco concentrações diferentes e duas formas de aplicação. A partir disso, foram realizadas três repetições, de modo que para cada bioensaio foram utilizados 60 ovos (20 ovos por repetição).

Com os dados obtidos dos bioensaios, os indicadores entomológicos principais analisados nesse estudo foram a taxa de eclosão, a taxa de mortalidade das formas imaturas e a taxa de emergência de adultos. A taxa de eclosão correspondeu à razão entre o número de larvas nascidas e a quantidade de ovos imersos em água:

$$Tx. \text{ de eclos\~{a}o} = \left( \frac{N^\circ \text{ de larvas nascidas}}{N^\circ \text{ de ovos imersos em \u00e1gua}} \right) \times 100$$

J\u00e1 a taxa de mortalidade das formas imaturas correspondeu \u00e0 raz\u00e3o entre a soma do n\u00famero de larvas e pupas mortas pelo n\u00famero de larvas nascidas:

$$Tx. \text{ de mortalidade das formas imaturas} = \left( \frac{(n^\circ \text{ de larvas mortas} + n^\circ \text{ de pupas mortas})}{N^\circ \text{ de larvas nascidas}} \right) \times 100$$

Em rela\u00e7\u00e3o a taxa de emerg\u00eancia de adultos, esta correspondeu \u00e0 raz\u00e3o entre o n\u00famero de adultos emergidos pelo n\u00famero de larvas nascidas:

$$Tx. \text{ de emerg\u00eancia de adultos} = \left( \frac{n^\circ \text{ de adultos emergidos}}{N^\circ \text{ de larvas nascidas}} \right) \times 100$$

Uma vez verificada a normalidade dos dados, foram realizadas an\u00e1lises de vari\u00e2ncia (ANOVA) e o p\u00f3s-teste de Tukey considerando um n\u00edvel de signific\u00e2ncia de 5%, a fim de verificar a diferen\u00e7a m\u00ednima significativa entre os bioensaios f\u00fangicos com seus respectivos controles. Logo, as an\u00e1lises de frequ\u00eancias foram visualizadas mediante diagrama de caixa (*Boxplot*). Para as an\u00e1lises descritivas e inferenciais, foi utilizado o programa R version 4.0.3 (2020-10-10).

## 5.8 CONIDIOG\u00caNESE DAS LARVAS

Para descartar a hip\u00f3tese de que as larvas morreram devido a ingest\u00e3o de con\u00eddios, foi realizada a conidiog\u00eane. Para isso, as larvas mortas foram lavadas com solu\u00e7\u00f5es de hipoclorito de s\u00f3dio a 2% por 1min, \u00e1lcool a 70% por 2min e duas vezes com \u00e1gua destilada est\u00e9ril por 3min (PONTES, 2018). Em seguida, estas foram transferidas para placas de petri contendo papel filtro sobre o meio de cultura \u00e1gua-\u00e1gar 2% e incubadas por 10 dias \u00e0 28\u00b0C em c\u00e2mara BOD.

## 5.9 ANÁLISE DOS OVOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para cada cepa fúngica estudada, foi preparada uma suspensão de conídios na concentração e na forma de aplicação selecionada. O preparo dos conídios foi realizado de acordo com condições previamente estabelecidas no item 5.5. No entanto, os bioensaios foram realizados em 48 horas e os ovos foram previamente lavados com hipoclorito de sódio a 1,5% por 20 segundos e em seguida foram realizadas duas lavagens com água destilada estéril por 30 segundos, cada.

Os pedaços de papel filtro, contendo as amostras originárias dos bioensaios, foram transferidos para microtubos. O protocolo de preparo das amostras foi baseado nos trabalhos de Araújo (2019) e Zhang; Shi; Feng (2014). Com isso, foi adicionada a solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7.2) e deixado *overnight* à 4°C. Logo após, foi realizada uma lavagem (3x) com tampão cacodilato de sódio 0,1M por 5 minutos cada e realizada a pós-fixação com solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora. Posteriormente, foi feito novamente a lavagem com o tampão cacodilato de sódio 0,1M e por fim, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos em cada concentração, e a última etapa (100%) feita duas vezes. Por fim, as amostras foram secas usando o aparelho de ponto crítico de CO<sub>2</sub>, montadas em *stubs* contendo fitas de carbono e revestidas com ouro. As eletronicografias foram realizadas no aparelho JEOL JSM-IT500HR na plataforma de Microscopia do Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas CMABIO/UEA.

## 5.10 PREPARO DA QUITINA COLOIDAL

O substrato quitina coloidal foi previamente preparado seguindo o método de Homthong et al. (2016). Quatro gramas (4g) de quitina grau prático foram misturados com 40 mL de HCl a 37% sob agitação por 50 min. Logo após, 1000mL de água destilada gelada foi adicionada à mistura. Essa mistura foi então centrifugada e o *pellet* obtido lavado com água destilada até atingir o pH de 5,0.

## 5.11 ENSAIO ENZIMÁTICO QUALITATIVO DE QUITINASES E PROTEASES

Para verificar se as cepas fúngicas, diante do substrato, podem sintetizar as enzimas quitinases e proteases, foi realizado um ensaio qualitativo. De cada cepa fúngica, uma suspensão de conídios foi preparada na concentração selecionada no item 5.7. Dessa solução, 15 µL foram inoculados em placas de petri contendo o meio de cultura específico de cada enzima.

Para a avaliação da enzima quitinase foi seguido a metodologia de Saima et al., (2013), com modificações. Neste, o meio de cultura utilizado foi o ágar-quitina, composto por 6g de fosfato de sódio, 3g de fosfato de potássio, 0,5g de cloreto de sódio, 0,05g de extrato de levedura, 15g de ágar e quitina coloidal 1% para 1L de água.

Para os ensaios referente a proteases, foi seguido o protocolo desenvolvido por Teixeira et al. (2011), com adaptações. O meio de cultura utilizado foi ágar-leite, contendo leite (5%), ágar (90%) e gelatina (5%) como suplemento.

As placas foram incubadas por 7 dias à 28°C. Para ambas as enzimas, como resultado positivo foi considerado a formação de uma zona clara (halo) sem a necessidade de uma solução reveladora. A atividade enzimática foi determinada pelo índice de atividade enzimática (IAE), calculado de acordo com a equação abaixo (PRADO et al., 2021):

$$IAE = \frac{\text{diâmetro total (mm)}}{\text{diâmetro da colônia (mm)}}$$

## 5.12 CULTIVO E OBTENÇÃO DO SECRETOMA FÚNGICO

Essa etapa experimental foi baseada na metodologia de Murad et al., (2007), com algumas adaptações. Inicialmente, uma solução contendo fragmentos de ovos de *Ae. aegypti* foi preparada. Para isso, 1g de ovo foi seco em estufa à 60°C por 24 horas. Passado esse período, essa quantidade foi fragmentada com pistilo em Gral e ressuspenso em 5mL de água destilada estéril. Posteriormente, essa solução foi esterelizada duas vezes por 45 minutos na autoclave. Em paralelo, o inóculo fúngico foi previamente preparado conforme o item 5.5 na concentração selecionada no item

## 5.7.

Desta suspensão, foi realizado o inóculo em erlenmeyers contendo 120mL de meio de cultura mínimo (MM) líquido suplementado com 0,5% da solução de fragmentos de ovos. O cultivo submerso ocorreu em uma incubadora *shaker*, sob agitação de 50% do líquido à 28 °C, durante 20 dias. Em paralelo, para cada cepa fúngica, um cultivo denominado branco foi realizado nas mesmas condições, porém, contendo apenas o meio MM. Além disso, um cultivo controle sem o fungo foi também realizado.

A separação do micélio e do secretoma ocorreu por meio de filtração a vácuo com uma membrana em éster de celulose (MCE), com 0,45µm de porosidade. Na sequência, tais secretomas foram submetidos a outra filtração complementar usando filtros de seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com porosidade de 0,22µm.

### 5.13 CONCENTRAÇÃO, DESSALINIZAÇÃO E PRECIPITAÇÃO PROTEICA

Os secretomas resultantes da etapa anterior foram concentrados, dessalinizados e reduzidos até o volume de 5mL, utilizando cartuchos *Centripep*® de 3,0 kDa. Para isso, tais cartuchos contendo os secretomas foram submetidos a centrifugações sucessivas por 90 minutos, a 4400 rpm e 4°C.

As proteínas presentes nas amostras foram precipitadas com a adição de 20mL de acetona gelada pura, utilizando a proporção de 1:4 (secretoma/solvente). Posteriormente, foi realizado um *vórtex* durante 1min e as amostras ficaram *overnight* a -20°C. No dia seguinte, estas foram submetidas a centrifugação a 4400 rpm por 30 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Então, o precipitado resultante foi lavado mais duas vezes com 1mL de acetona gelada pura, em uma proporção de 1:2 (precipitado/solvente); sendo realizada uma centrifugação a 4400 rpm durante 15 minutos a 4°C em cada lavagem.

### 5.14 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A extração e solubilização de proteínas foi realizada com a adição de 100µL da solução de ureia/tiouréia (7M/2M) no *pellet* proteico. Em seguida, foi realizado *vórtex* por 1 minuto nas amostras e deixadas *overnight* à 4°C para a melhor extração.

Após esse período, foi realizada uma centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado. A concentração proteica de cada amostra foi obtida através do ensaio fluorimétrico *Qubit® 3.0 (Invitrogen)*, de acordo com as instruções do fabricante.

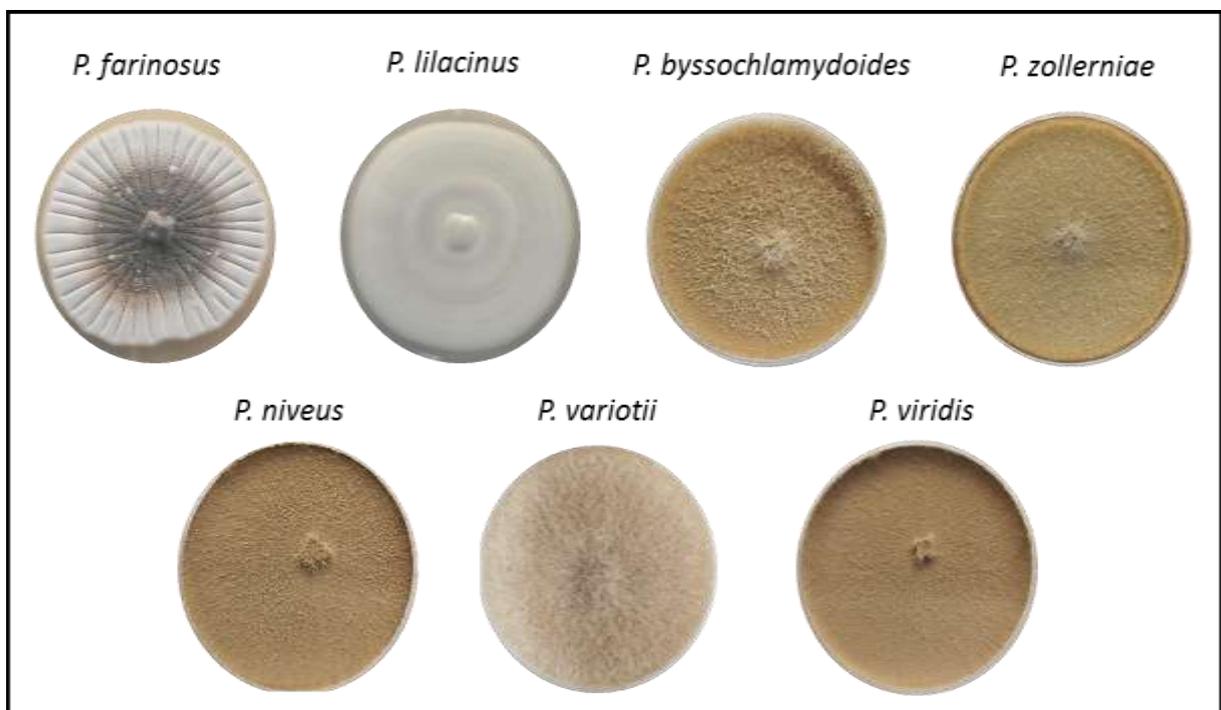
### 5.15 ANÁLISE POR ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL

Trinta e cinco microgramas (35µg) de proteínas de cada amostra foram usadas para a eletroforese unidimensional. O volume correspondente a essa quantidade de proteínas foi diluído no tampão de amostra Laemmli [2x], contendo Tris-HCl 0,5M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol a 1%. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho seco a 95°C durante 10 minutos. Dez microlitros (10 µL) do marcador molecular também foram usados. O gel de poliacrilamida foi preparado a 15% (1,15 mL de água destilada, 2,5 mL de 30% acrilamida mix, 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, 50 µL de 10% SDS, 50 µL de 10% de persulfato de amônio e 2,0 µL de TEMED); já o gel de empilhamento a 5% (1,4mL de água destilada, 330 µL de 30% acrilamida mix, 250 µL de 1,5M Tris pH 8.8, 20 µL de 10% SDS, 20 µL de 10% de persulfato de amônio e 2,0 µL de TEMED), conforme instruções do fabricante Mini Protean II (GREEN; SAMBROOK, 1989). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M e SDS 0,1%) a 120 volts, durante 90min. Após as corridas, os géis foram deixados *overnight* em solução corante (*Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,2% dissolvido na solução contendo ácido acético 10%, etanol 40% e água destilada). Posteriormente, descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v). Por fim, a solução foi descartada, adicionado água destilada para a completa descoloração e o gel foi escaneado.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 CULTURA FÚNGICA

As cepas fúngicas foram reativadas e passaram pelo processo de autenticação, onde foram observadas suas características morfofisiológicas, de acordo como descrito por Samson (1974). Na figura 9, é possível observar as características da macrocolônia com sete dias de crescimento, das espécies do gênero *Paecilomyces* utilizadas nos bioensaios deste estudo.



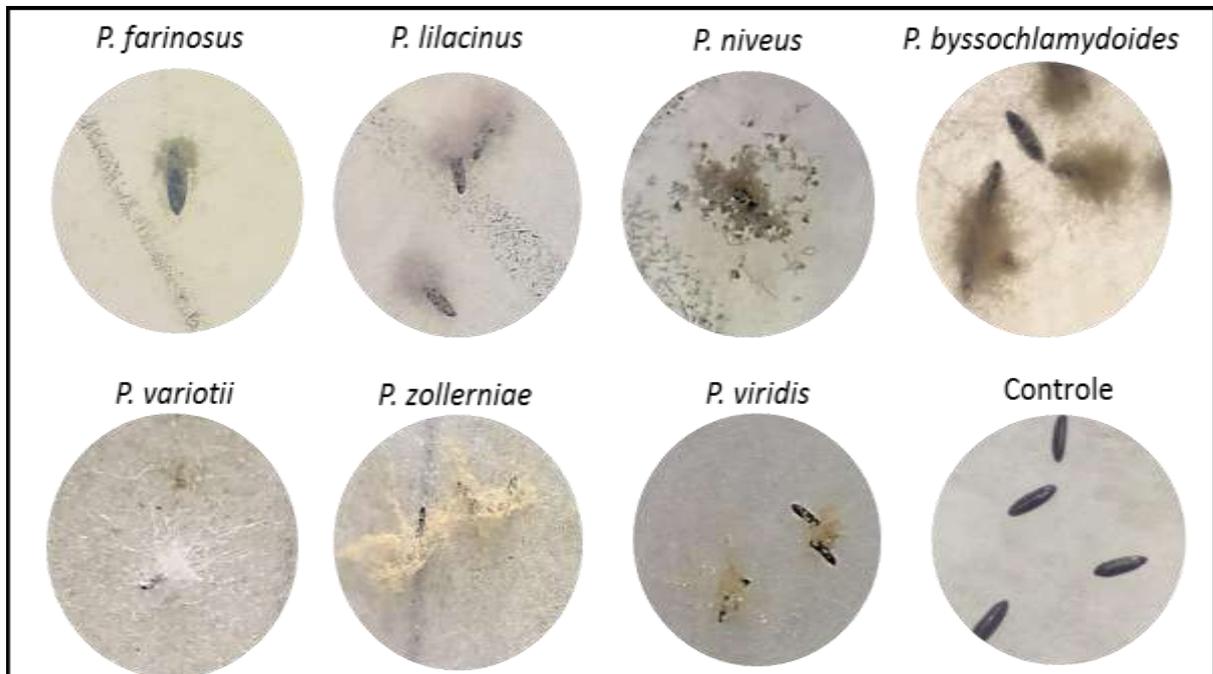
**Figura 9** — Macrocolônia das espécies de *Paecilomyces* em meio de cultura MEA, utilizadas neste trabalho, com sete dias de crescimento e incubadas a 28°C.

### 6.2 BIOENSAIO COM OS OVOS

#### 6.2.1 Desenvolvimento das espécies fúngicas sobre os ovos

Nos bioensaios com ovos de *Ae. aegypti*, as sete culturas fúngicas foram avaliadas. Neste, verificamos que independente da concentração e do tipo de tratamento, após o período de vinte dias todas as cepas apresentaram micélio sobre a superfície do ovo (Figura 10). Entretanto, o desenvolvimento de alguns fungos se destacou aos demais, desses citam-se: *P. lilacinus*, *P. niveus* e *P.*

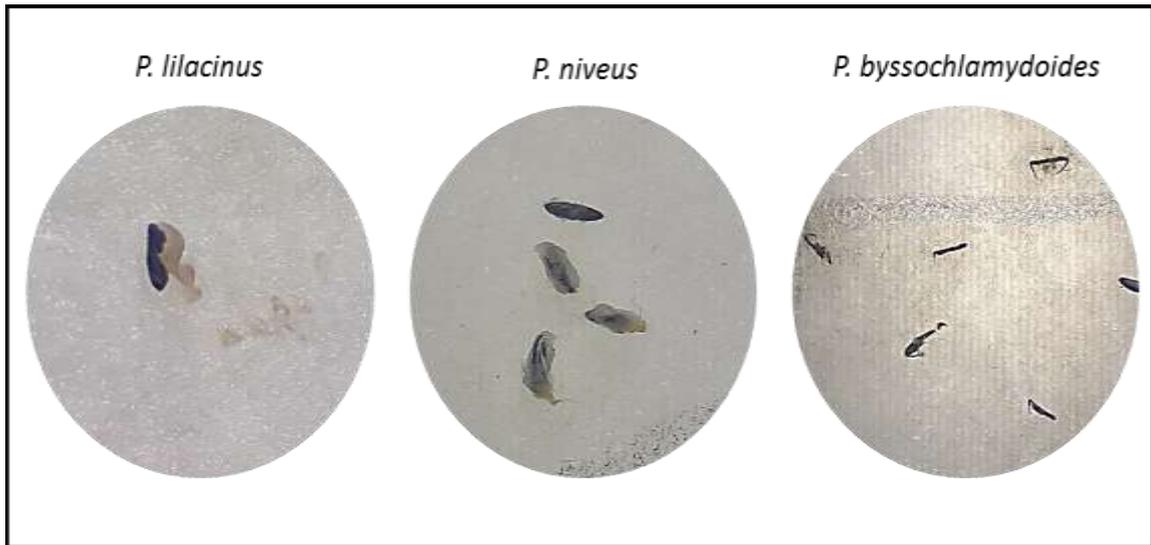
*byssochlamydoides*, os quais cobriram uma grande quantidade de ovos durante o teste, após 7 dias de incubação.



**Figura 10** — Ovos de *Aedes aegypti* com desenvolvimento de micélio, após a aplicação de conídios das cepas fúngicas estudadas, formulados em água com Tween 80 a 0,05%, incubados a 28°C por 20 dias.

A possibilidade desses fungos em utilizar os ovos de *Ae. aegypti* como substrato para o seu crescimento, indica um potencial ovicida. Em adição, a verificação dos efeitos sobre os ovos depende principalmente do tempo de exposição, antes da submersão em água (LUZ et al., 2007). Assim, para algumas espécies, sete dias de incubação foi o suficiente para seu desenvolvimento. De forma complementar, já foi relatado em outros trabalhos que, fungos que apresentaram desenvolvimento de micélio sobre ovos de mosquito (LUZ et al., 2007, 2008; RODRIGUES et al., 2018; SANTOS et al., 2009a) e, de carrapatos (HABEEB; ASHRY; SAAD, 2017; MENT et al., 2010) podem afetar a eclosão.

Além disso, após o período de exposição aos conídios dos fungos, foram observadas algumas peculiaridades sobre alguns ovos, como a formação de um tipo de camada exopolimérica sobre a superfície pelas cepas de *P. lilacinus* e *P. niveus*, e a decomposição causada pela exposição à espécie *P. byssochlamydoides* (Figura 11).



**Figura 11** — Características de alguns ovos de *Ae. aegypti* após o tratamento com os fungos *P. lilacinus*, *P. niveus* e *P. byssochlamydoides*. Da esquerda para a direita temos: (1) Formação de camada polimérica sobre a superfície dos ovos após tratamento com *P. lilacinus*; (2) Formação de camada polimérica sobre a superfície dos ovos após tratamento com *P. niveus*; (3) Decomposição dos ovos de *Ae. aegypti* após tratamento com *P. byssochlamydoides*.

A formação desses exopolissacarídeos sobre a superfície do ovo está correlacionada à resposta do fungo ao hospedeiro (ALKHAIBARI et al., 2016). Em específico, essa matriz extracelular (MEC) é um dos principais mecanismos dos fungos entomopatogênicos, na qual se inicia com a fixação dos conídios no hospedeiro e, em seguida, ocorre a secreção de mucilagem durante a germinação (DOSS et al., 1993). Além disso, a MEC é secretada pelos tubos germinativos e apressórios, mas não pelos próprios conídios (DOSS, 2020; DOSS et al., 1995). Em um estudo com *M. anisopliae*, Céspedes-Acuña et al., (2014) verificaram que a síntese dessa mucilagem é em virtude da associação de biomoléculas presente entre o hospedeiro e o entomopatógeno, bem como, a secreção destas permite a tolerância desses fungos à dessecação, devido a presença de água livre.

Em paralelo a esses resultados, o fungo *P. byssochlamydoides* teve a capacidade de decompor alguns ovos, um comportamento, até o momento, na revisão realizada, não relatado em outros trabalhos com entomopatógenos.

### 6.2.2 Comportamento pós-tratamento e conidiogênese

Apesar do desenvolvimento fúngico, a micotização (*i.e.*, presença de micélio na superfície) desses ovos acelerou a eclosão de algumas larvas durante o experimento. Tal comportamento foi observado no decorrer dos vinte dias de incubação para os

ovos tratados com conídios das sete cepas, mas não para ovos do controle, que teve pouca eclosão observada somente nos dois primeiros dias. Em específico, esse comportamento foi observado com maior intensidade para a espécie *P. lilacinus* (Figura 12), onde será visto com mais detalhes no item 6.2.6, na qual quando exposto à altas concentrações de inóculo, todos os ovos contidos no papel filtro chegaram a eclodir e, logo após o fungo emergiu sobre eles.



**Figura 12** — Resultado dos bioensaios dos ovos expostos ao fungo *P. lilacinus*. Nesta, é ilustrada a eclosão das larvas (seta na cor vermelha) e a presença de micélio (seta na cor amarela) sobre os ovos.

Sugere-se que a principal causa desse resultado da eclosão das larvas sobre o papel filtro, após a exposição dos ovos aos formulados fúngicos, seja estimulada pela presença de conídios sobre a superfície do ovo, com as etapas de fixação e germinação ou até mesmo, pela produção de proteínas e/ou metabólitos. Além disso, descartou-se a hipótese em que os embriões e/ou as larvas dentro dos ovos podem ter sido estimuladas a eclodirem, devido ao breve umedecimento de parte ou toda a superfície dos ovos durante a aplicação inicial de formulados do fungo, seja ela tópica ou por exposição dos ovos ao papel filtro tratado e úmido; uma vez que, os baixos índices de eclosão larval nos controles indicam que o umedecimento inicial dos ovos durante os tratamentos estimulou apenas uma pequena fração das larvas a eclodirem durante as primeiras 48 horas. E ainda, foi perceptível que as larvas continuaram a eclodir de ovos tratados com o fungo, mas não de ovos não tratados (controle) durante os 20 dias de incubação.

Esses dados se assemelham aos encontrados por Leles; D'alessandro; Luz, (2012) e Sousa et al. (2013), que também observaram a eclosão de larvas de *Ae. aegypti* a partir de ovos colocados sobre solo e papel filtro, respectivamente, tratados com *M. anisopliae*. No trabalho de Leles; D'alessandro; Luz (2012), as evidências mostraram que as larvas de *Ae. aegypti* foram estimuladas a eclodirem em ambiente com microbiota abundante (POMBO, 2016), ocorrendo de forma semelhante ao presente estudo, onde algumas larvas dentro dos ovos podem ter sido estimuladas a eclodirem em resposta aos estímulos realizados pelos fungos.

De forma complementar, algumas características foram observadas durante o desenvolvimento das larvas oriundas dos ovos expostos às espécies fúngicas. As larvas expostas aos fungos *P. niveus* e *P. viridis* apresentaram deficiência no crescimento, pois mostraram tamanho similar ao instar 2 por semanas e posterior mortalidade. Já algumas larvas dos bioensaios de *P. viridis* permaneceram com tais características por até 2 meses. Além disto, as larvas expostas a espécie *P. farinosus* ficaram reclusas no fundo do copo e exibiram locomoção lenta. Ainda, a mortalidade total das larvas em alguns tratamentos ocorreu durante os primeiros 5 dias, sugerindo uma ação larvicida.

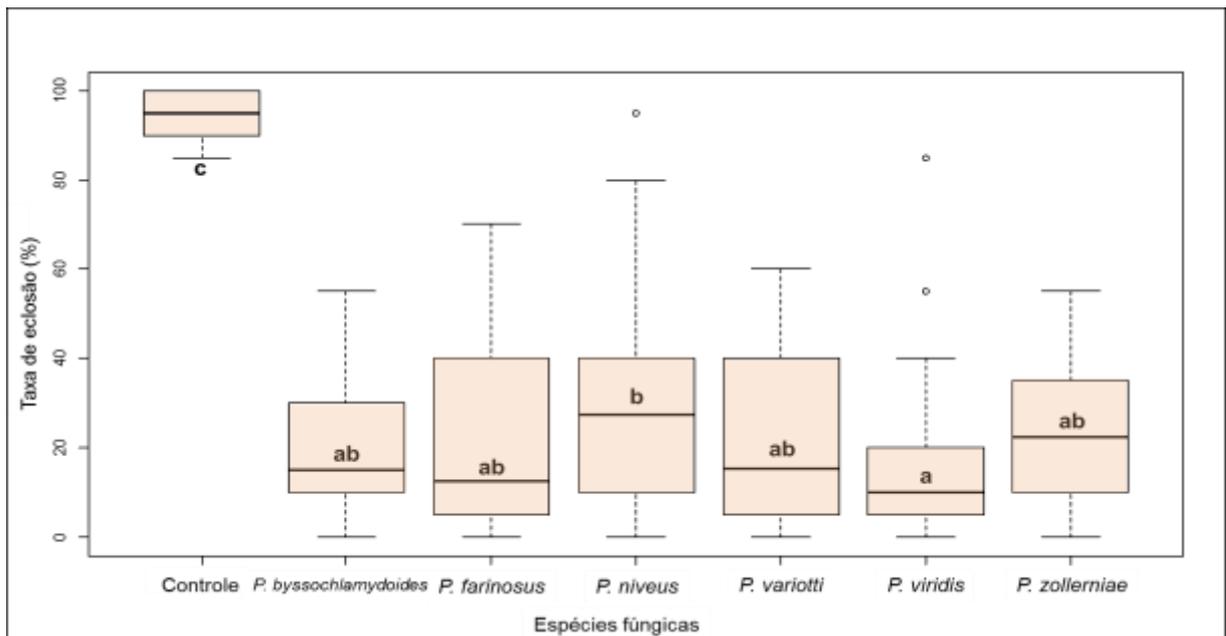
Para descartar a ideia de que as larvas morreram devido a ingestão de conídios, foi realizada a conidiogênese dos cadáveres larvais, com a incubação destes em meio ágar-água por 10 dias. Após esse período, notou-se que não houve o desenvolvimento de micélio sobre nenhuma larva do tratamento, sugerindo assim que as mortalidades podem ser consequência da exposição dos ovos às espécies fúngicas.

### 6.2.3 Eclosão quantitativa

Após 96 horas de imersão dos ovos na água, as larvas nascidas foram contabilizadas e se acompanhou o desenvolvimento das formas imaturas até a morte ou emergência dos adultos. A partir disso, foram elaborados indicadores da taxa de eclosão, de mortalidade das formas imaturas e da emergência de adultos. Devido a característica peculiar do fungo *P. lilacinus*, de eclodir quase ou todos os ovos amostrais, as análises descritivas e inferenciais dessa espécie fúngica foram realizadas separadamente.

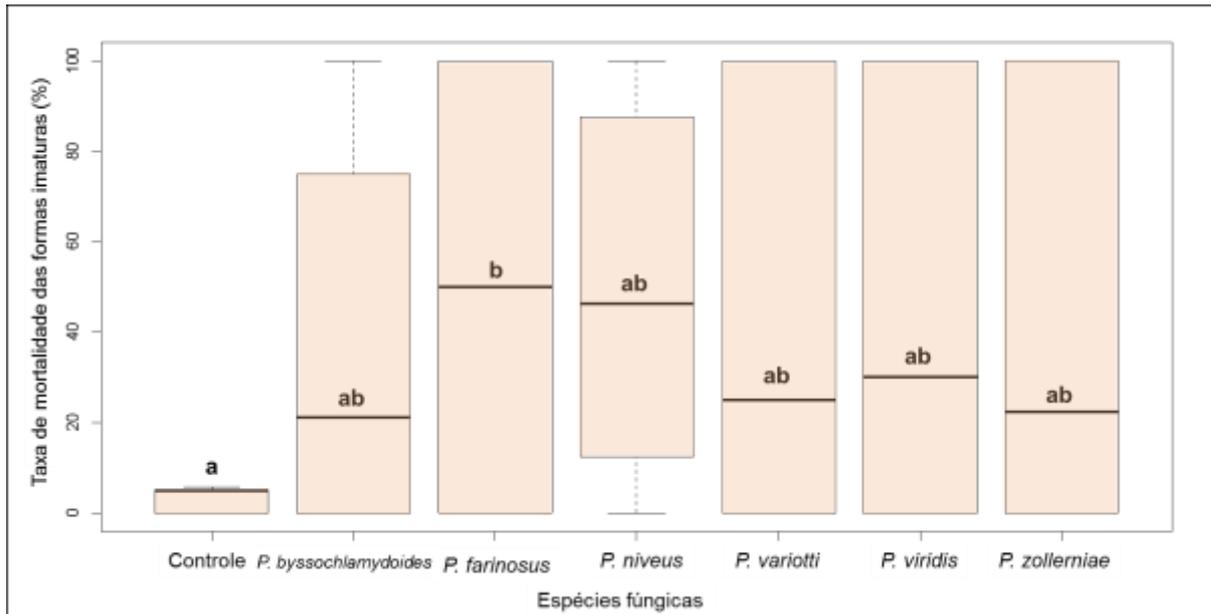
Para uma visualização geral dos dados, realizou-se uma análise agregada das

espécies fúngicas independente das diferentes concentrações e formas de aplicação empregadas. No gráfico 1, observa-se que as taxas de eclosão nos diferentes ensaios com fungos, quando comparado com o controle (MED=95%[90%-100%]), foram consideravelmente menores, se destacando *P. niveus* (MED=25%[6,25%-33,75%];  $p<0,001$ ) e *P. viridis* (MED=10%[5%-18,95%];  $p<0,001$ ), sugerindo que possivelmente houve um efeito dos fungos sobre a eclosão dos ovos.



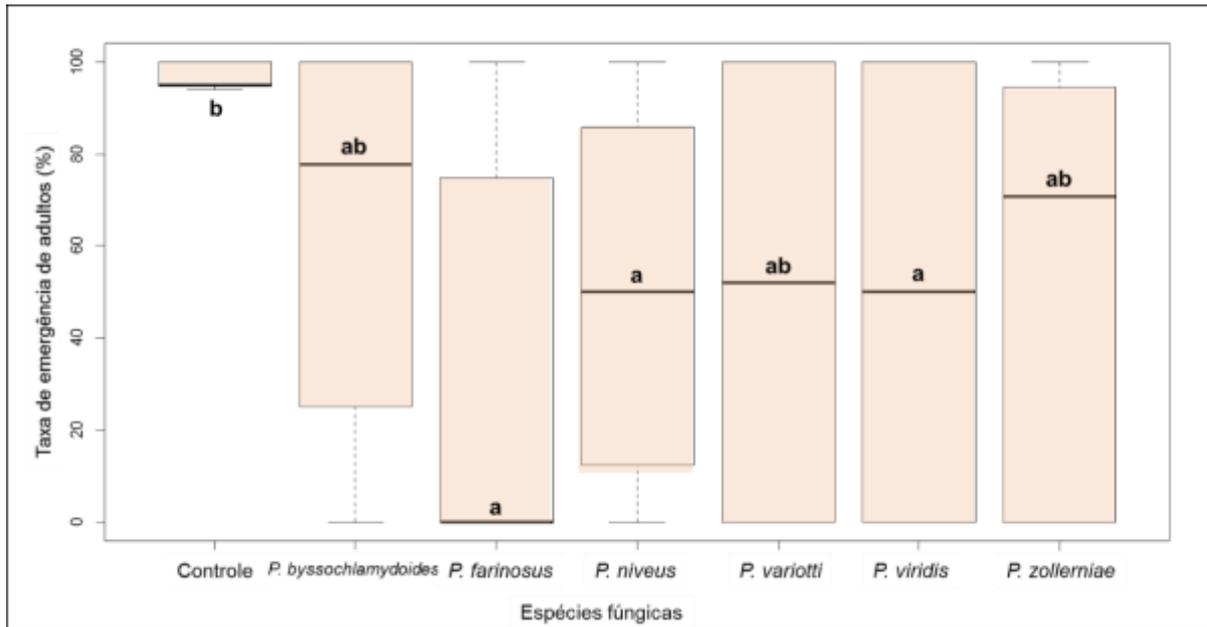
**Gráfico 1** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão de *Ae. aegypti* (%) por cada espécie fúngica estudada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p<0,05$ ).

O efeito das espécies *Paecilomyces* poderia ir além das baixas taxas de eclosão e influenciar no desenvolvimento de outras fases do ciclo de vida do mosquito. Dessa forma, observou-se o desenvolvimento das larvas oriundas dos ovos expostos às cepas até a morte ou emergência de adultos. No gráfico 2, verificou-se que as taxas de mortalidade das formas imaturas de *Ae. aegypti* nos diferentes ensaios com fungos, quando comparado com o controle (MED=5%[0%-5,26%]), foram maiores, se destacando *P. farinosus* (MED=50%[0%-100%];  $p<0,05$ ); sugerindo assim, que possivelmente houve efeito dos fungos sobre o desenvolvimento das formas imaturas de *Ae. aegypti*.



**Gráfico 2** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas de *Ae. aegypti* (%) por cada espécie fúngica estudada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

No gráfico 3, pode se observar que as taxas de emergência de adultos de *Ae. aegypti* nos diferentes ensaios com fungos, quando comparado com o controle (MED=95%[94,8%-100%]), foram consideravelmente menores, se destacando *P. farinosus* (MED=0%[0%-50%];  $p < 0,01$ ), *P. niveus* (MED=50%[12,5%-85,8%];  $p < 0,05$ ) e *P. viridis* (MED=50%[0%-100%];  $p < 0,05$ ); sugerindo também que um possível efeito nas fases de ovo, larva e pupa, propiciaram a morte da maioria dos indivíduos, resultando nas baixas taxas de emergência de adultos. No entanto, os fungos *P. byssochlamydoides* e *P. zollerniae* mostraram as maiores taxas de emergência de adultos de *Ae. aegypti*.

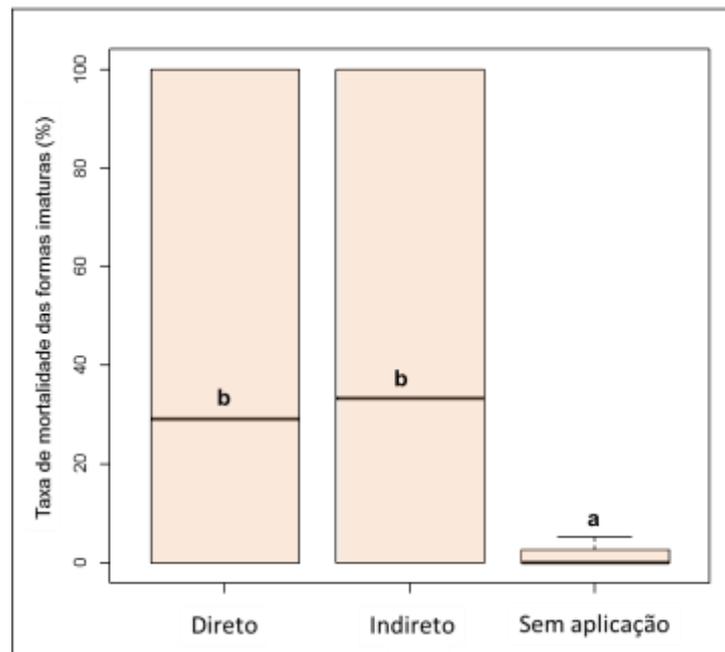


**Gráfico 3** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de emergência de adultos de *Ae. aegypti* (%) por cada espécie fúngica estudada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

Assim, diante dos resultados do controle com os bioensaios fúngicos, estes sugerem que todas as espécies tiveram efeitos significativos sobre os ovos de *Ae. aegypti*, podendo a ação ocorrer diretamente sobre os ovos ou de forma mais tardia, como sobre as larvas/pupas e, impactando na emergência de adultos. Embora as informações sejam escassas sobre as formas de atuação desse gênero, Ortiz-Urquiza e Keyhani (2013) especulam que a diversidade e as alterações na composição cuticular que podem ocorrer entre os insetos e os diferentes estágios de vida interferem nas estratégias empregadas pelos fungos entomopatogênicos. Além disso, a susceptibilidade dos ovos de *Ae. aegypti* à maioria das espécies testadas reforça o interesse por esse gênero entomopatógeno. De forma semelhante, Luz et al. 2007 e Leles et al. 2010 também verificaram o efeito ovicida e adulticida, respectivamente, de diferentes espécies de *Paecilomyces* contra *Ae. aegypti*. Em seu trabalho, Luz et al. 2007 relatou uma atividade ovicida com valores baixos de eclosão das espécies *P. farinosus*, *P. carneus*, *P. marquandii* e *P. lilacinus* com a presença abundante de micélio após 25 dias de incubação. Corroborando com nossos resultados, os autores apontam que períodos mais longos de incubação e, conseqüentemente a infecção da larva dentro do ovo por fungos invasores, podem acarretar problemas na integridade das larvas, pupas e adultos; sendo este um processo dos fungos entomopatogênicos que ainda não está claro.

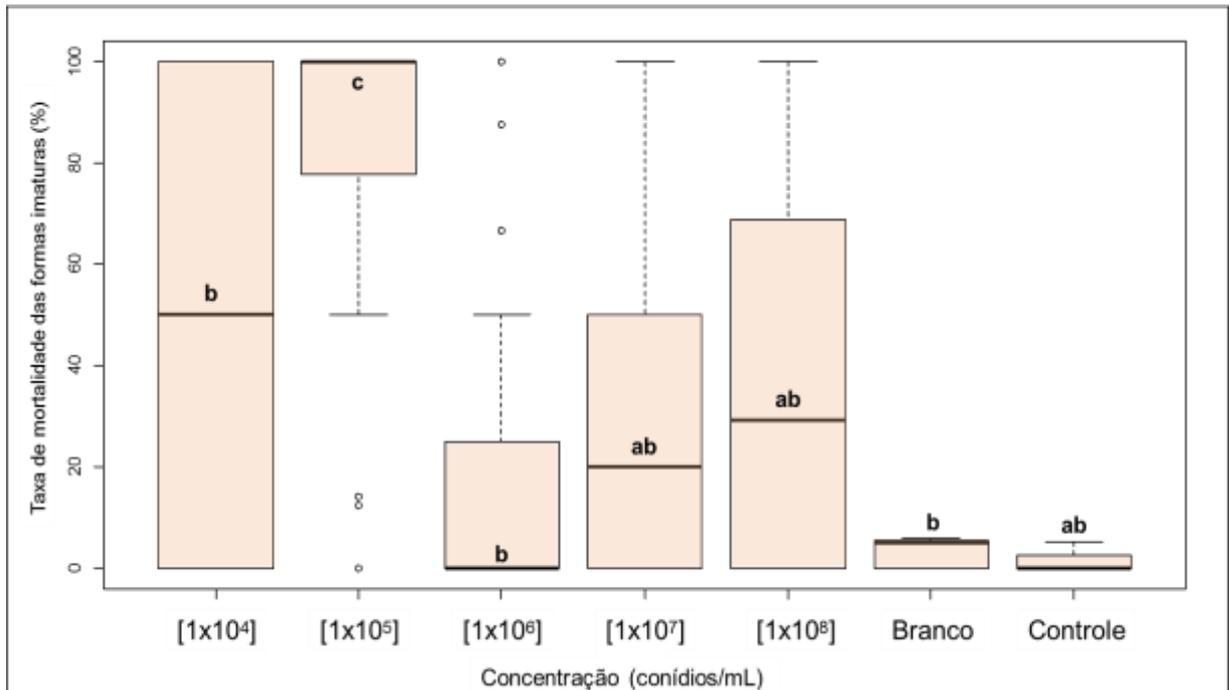
### 6.2.4 Avaliação das formas de aplicação e concentrações na patogênese

Para uma otimização sucinta dos parâmetros do bioensaio, foi verificado o efeito de cinco concentrações diferentes de conídios fúngicos, aplicados de duas formas distintas, sendo estas: indireta e direta sobre os ovos. Para essa análise, foi considerado os dados oriundos das taxas de eclosões, mortalidade de larvas e pupas. Através do gráfico 4, observa-se que não houve diferença significativa entre as formas de aplicação do propágulo na taxa de mortalidade das formas imaturas de *Ae. aegypti*.



**Gráfico 4** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas (%) do *Ae. aegypti* por cada forma de aplicação de inóculo. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

Com relação as diferentes concentrações, nota-se que todas apresentaram mortalidade das formas imaturas em algum tratamento. Em comparação ao controle, a concentração  $1 \times 10^6$  conídios/mL causou menor impacto (MED=0%[0%-24,3%]). Em contrapartida, a dosagem  $1 \times 10^5$  conídios/mL apresentou o maior impacto sobre as formas imaturas (MED=100%[83,8%-100%];  $p < 0,01$ ) frente as demais concentrações e controle. Além disso, a mediana das outras concentrações não ultrapassaram 50% de taxa de mortalidade. Logo, a concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL foi a selecionada para as próximas etapas do estudo.



**Gráfico 5** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas do *Ae. aegypti* (%) por cada concentração empregada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

Com o objetivo de aprimorar a atividade entomopatogênica, especialmente contra o *Ae. aegypti*, são necessárias pesquisas de diferentes dosagens e formas de aplicação para potencializar a virulência dos conídios (SOUSA et al., 2013). Além disso, determinar a concentração ótima é economicamente importante, visto que utilizar menos propágulo com a maior eficácia reduz custos (ASI; BASHIR; AFZAL, 2009). Segundo Luz e Batagin (2005), a aplicação direta de conídios sobre um inseto pode levar a uma maior contaminação comparada a aplicação indireta, ou seja, sobre uma área tratada com conídios, na qual o inseto entrará em contato posteriormente. Em adição, trabalhos com *Ae. aegypti* e *M. anisopliae* mostraram que a aplicação direta de conídios sobre os ovos proporcionaram um elevado crescimento fúngico sobre os ovos e uma reduzida taxa de eclosão, mesmo em baixas concentrações de conídios (LUZ et al., 2008; SANTOS et al., 2009a). Portanto, levando em consideração tais informações, a aplicação direta dos propágulos fúngicos sobre os ovos foi escolhida como método.

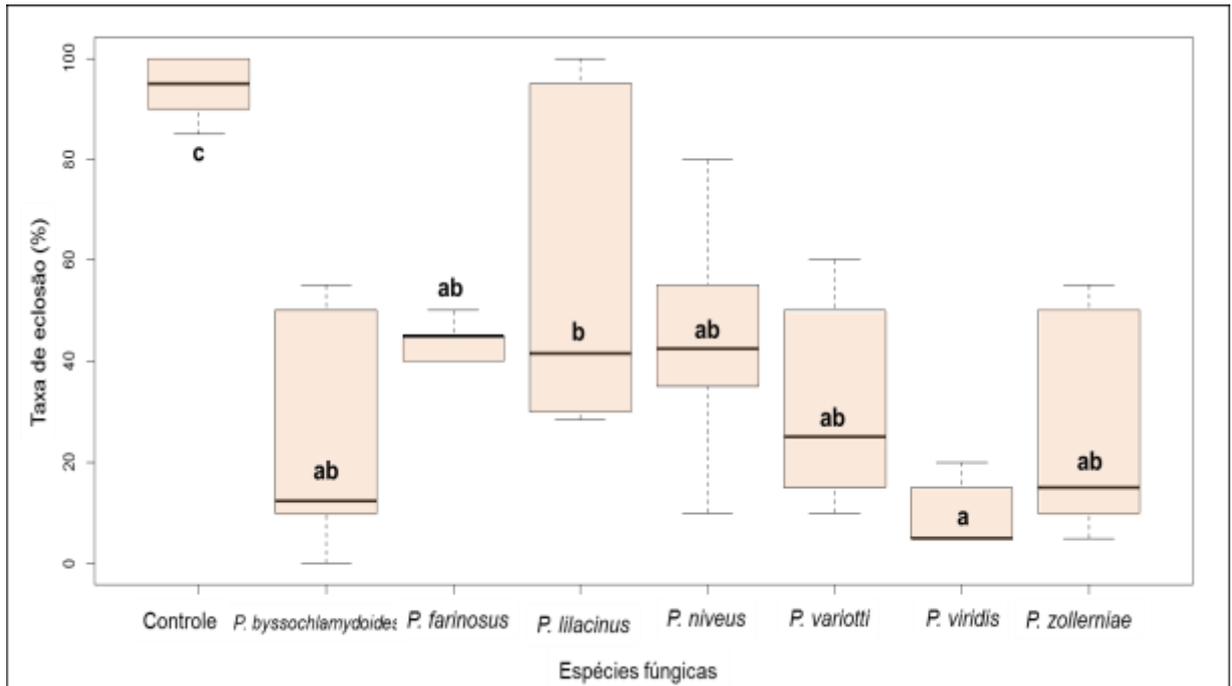
Sabe-se que baixas concentrações de conídios e tempos curtos de exposição podem resultar em pequenas doses infecciosas, as quais podem ser combatidas pelo vetor (MNYONE et al., 2009). Apesar disso, nessa etapa do experimento, observou-se que as concentrações mais baixas causaram as maiores mortalidades, com

destaque na dosagem  $1 \times 10^5$  conídios/mL. Esse resultado corrobora com o de Rodrigues et al. (2018), no qual *Culicinomyces clavisporus* foi patogênico e altamente virulento para larvas de *Ae. aegypti* na concentração de  $10^5$  conídios/mL. Além de que, os autores salientam que concentrações entre  $10^4$  a  $10^6$  conídios/mL são suficientes para provocar 100% de mortalidade nas fases imaturas de *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (RODRIGUES et al., 2018). De forma semelhante, Vu; Hong; Kim (2007) também analisaram o efeito de cinco diferentes concentrações do fungo *L. Lecanii* contra diversos pulgões, e observaram que a concentração ideal para mortalidade de 50% dos indivíduos ( $CL_{50}$ ) era de  $6.55 \times 10^5$  conídios/mL.

Outro parâmetro que influencia diretamente na atividade dos fungos é o tempo necessário para que os conídios infectem e matem o vetor (JARROLD et al., 2007). O tempo de exposição no estudo atual foi de 20 dias, no entanto, o presente estudo partiu de 25 dias de incubação (dados não mostrados). Conforme Mnyone et al. (2009), os conídios são virulentos até 28 dias após a aplicação, sob temperatura de  $26^\circ\text{-}27^\circ\text{C}$ . No entanto, esse período é considerado relativamente longo visando um biocontrole aplicado. De forma que, sugere tal fato como lacunas a serem preenchidas ainda.

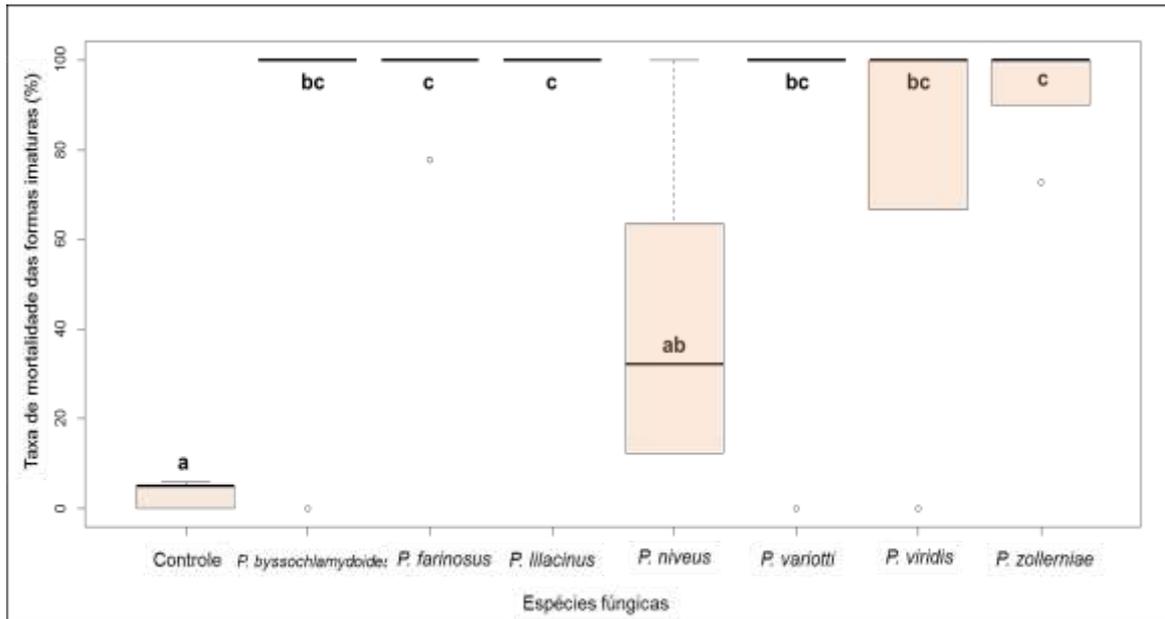
#### **6.2.5 Avaliação do efeito da concentração $1 \times 10^5$ conídios/mL no desenvolvimento de *Ae. aegypti***

A concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL foi selecionada e analisou-se o efeito nas diferentes fases do ciclo de vida de *Ae. aegypti*. De forma geral, no gráfico 6 nota-se que a mediana da taxa de eclosão em todos os bioensaios foi inferior a 50% ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o controle (MED=95%[90%-100%];  $p < 0,01$ ). Os fungos *P. viridis* (MED=5%[5%-12,5%];  $p < 0,001$ ), *P. byssochlamydoides* (MED=15%[10%-50%];  $p < 0,001$ ) e *P. zollerniae* (MED=15%[11,3%-41,2%];  $p < 0,001$ ), apresentaram as menores taxas de eclosão, sugerindo uma ação entomopatogênica mais acentuada nessa concentração.



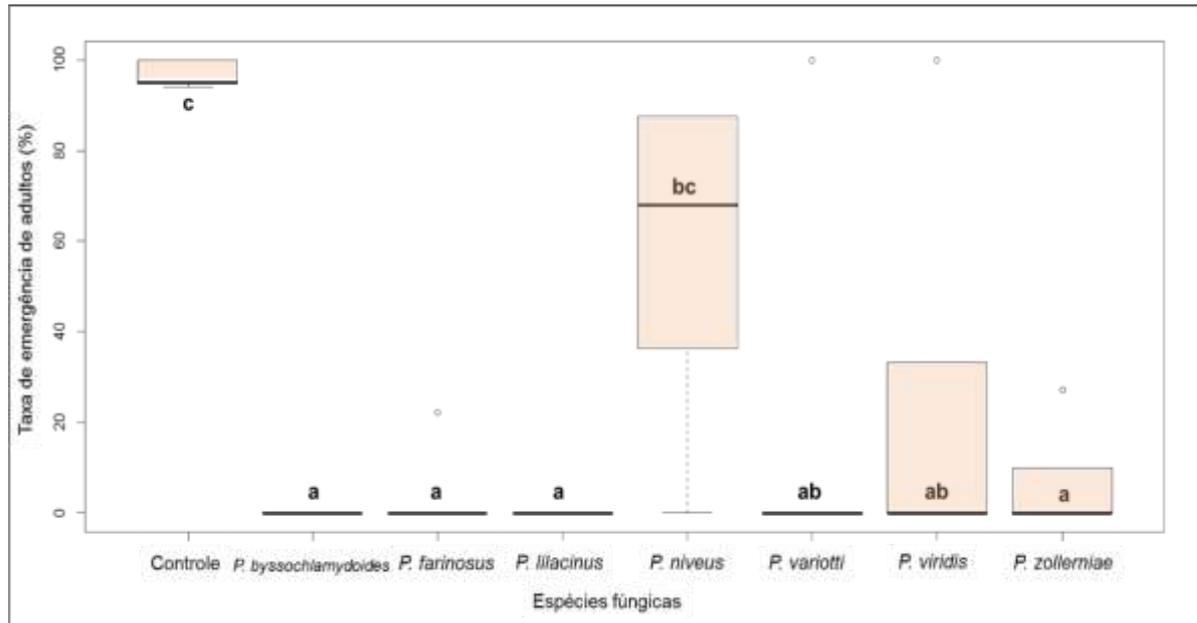
**Gráfico 6** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão de *Ae. aegypti* por cada espécie fúngica na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

A eliminação do vetor antes que ocorra a mudança de estágio, principalmente se for para a fase adulta, causa a interrupção no seu ciclo (MNYONE et al., 2009). Com base nisso, verificou-se o comportamento das fases imaturas diante da concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. No gráfico 7, observa-se que as taxas de mortalidade de formas imaturas de *Ae. aegypti* nos diferentes ensaios com fungos, quando comparado com o controle (MED=5%[0%-5,26%]), foram claramente maiores, se destacando os fungos *P. byssochlamydoidei* (100%;  $p < 0,001$ ), *P. farinosus* (100%;  $p < 0,001$ ), *P. lilacinus* (100%;  $p < 0,001$ ) e *P. variotti* (100%;  $p < 0,001$ ); apresentando bioensaios com taxas de mortalidade de 100%. Já o *P. niveus* (MED=32,1%[12,5%-60,2%];  $p < 0,147$ ) demonstrou a taxa de mortalidade mais baixa.



**Gráfico 7** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas de *Ae. aegypti*, por cada espécie fúngica na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo  $\circ$  representa valores *outliers* e letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

Como consequência das altas taxas de mortalidade das formas imaturas, não teve emergência de adultos de *Ae. aegypti* nos bioensaios com *P. byssoclamydoides*, *P. farinosus*, *P. lilacinus* e *P. variotii* (Gráfico 8). Já as espécies *P. viridis* (MED=0%[0%-25%];  $p < 0,001$ ) e *P. zollerniae* (MED=0%[0%-7,5%];  $p < 0,001$ ) apresentaram uma menor taxa de emergência de adultos, quando comparada com o controle (MED=95%[94,7%-100%]). De forma similar à taxa de mortalidade das formas imaturas (Gráfico 7), as maiores taxas de emergência de adultos foi apresentada pelo fungo *P. niveus* (MED=67,9%[39,7%-87%];  $p < 0,05$ ).



**Gráfico 8** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de emergência de adultos (%) por cada espécie fúngica na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo  $\circ$  representa valores *outliers* e letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados aqui apresentados são divergentes com relação às descobertas de Asi et al., (2013); Asi; Bashir; Afzal (2009); Burhan; Annon (2019) e; Komaki et al., (2017), os quais relataram que a atividade entomopatogênica de espécies *Paecilomyces* aumentava de acordo com a concentração de conídios. Nos estudos de Asi et al. (2013) com *Paecilomyces fumosoroseus*, verificou-se que a concentração letal para matar 50% dos ovos e larvas de *Spodoptera littoralis* se dava na ordem de  $10^6$  e  $10^7$ , respectivamente. De forma semelhante, em outro estudo também de Asi; Bashir; Afzal (2009) com *P. fumosoroseus* contra pulgões, constaram que a concentração de  $3,48 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> era a ideal para a mortalidade em até 7 dias. Já Komaki et al. (2017) testou duas concentrações ( $10^5$  e  $10^7$ ) de *P. farinosus* e notou que as duas tinham efeito sobre *Tribolium confusum*, causando 85,3% e 100% de mortalidade, respectivamente, quando exposto a 10 dias. Adicionalmente, Burhan e Annon (2019) avaliaram diferentes concentrações ( $10^5$  até  $10^9$ ) de *P. lilacinus* contra ovos de *Musca domestica* e constataram que as concentrações na ordem de  $10^5$  causaram as menores taxas de eclosões.

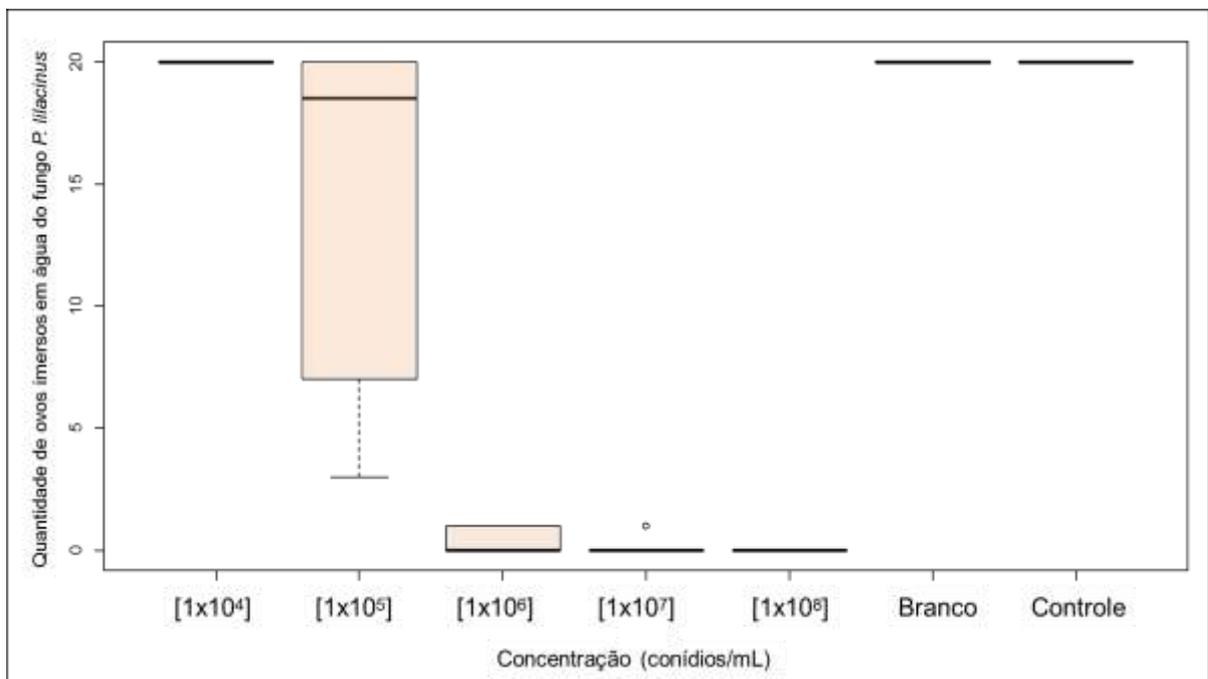
Apesar disso, no presente estudo, as diferentes espécies de *Paecilomyces* formuladas na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL impactou diretamente no ciclo do vetor *Ae. aegypti*, com a diminuição da emergência de adultos. De forma que, estes achados indicam que o tratamento *in loco* dos ovos com as espécies *P.*

*byssochlamydoides*, *P. farinosus*, *P. lilacinus* e *P. variotii* pode vir a ser uma alternativa no controle desse vetor.

### 6.2.6 Avaliação do efeito entomopatígeno do fungo *P. lilacinus* sobre o desenvolvimento de *Ae. aegypti*

Durante os bioensaios, notamos o comportamento atípico do isolado *P. lilacinus*. Dessa forma, optamos por analisá-lo individualmente. Os ovos expostos à essa espécie fúngica foram eclodidos nos primeiros 7 dias e quando chegavam aos 20 dias de incubação reduzia o número de ovos a serem imersos em água. Esse efeito foi aumentado gradualmente de acordo com a concentração utilizada.

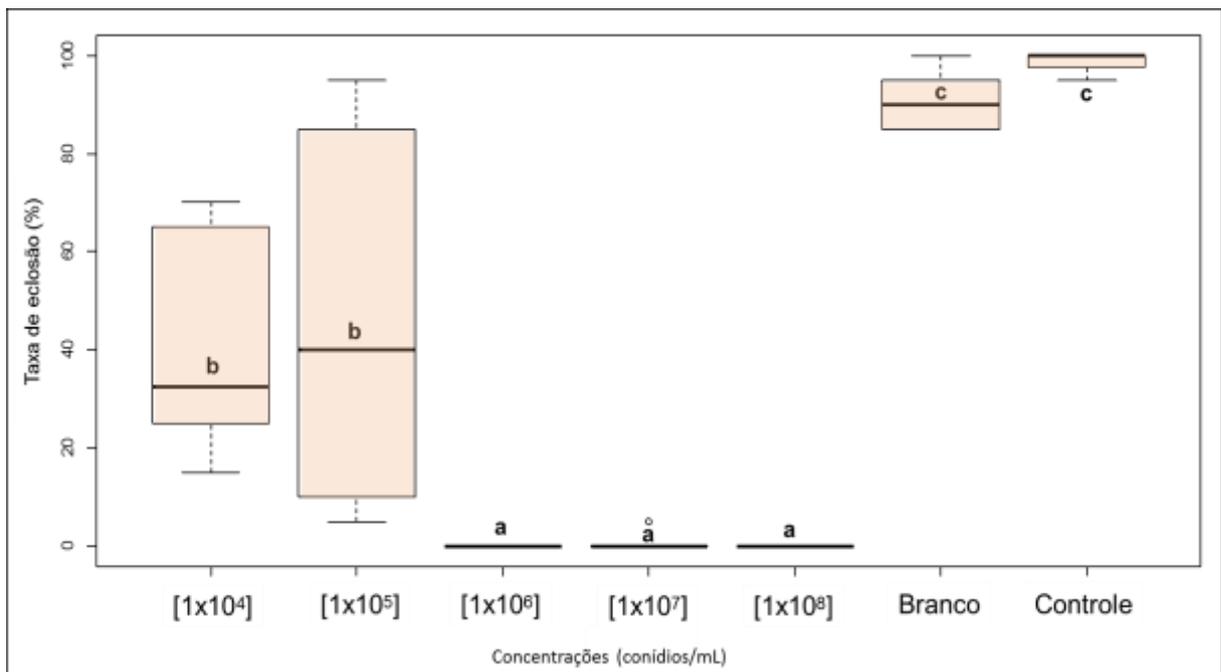
Através do gráfico 9, observa-se que os ensaios relacionados às concentrações  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  conídios/mL continham aproximadamente 20 ovos até o final do período de incubação. Em específico, nas concentrações  $1 \times 10^5$  conídios/mL, 50% das placas continham entre 7 e 17 ovos viáveis e, 25% das placas tinham 20 ovos viáveis para serem imersos em água. Vale ressaltar que, consideramos ovos viáveis aqueles que tinham a presença de micélio, mas não haviam eclodido.



**Gráfico 9** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da quantidade de ovos de *Aedes aegypti* que foram expostos ao *Paecilomyces lilacinus* imersos em água por cada concentração avaliada. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e o símbolo ° representa valores *outliers*.

Logo após a eclosão nas placas, verificava-se o surgimento de conídios aéreos

ou micélio sobre as larvas. Adicionalmente, no gráfico 10, as dosagens  $1 \times 10^4$  conídios/mL (MED=32,5%[26,3%-57,5%];  $p < 0,01$ ) e  $1 \times 10^5$  conídios/mL (MED=41,6%[30,8%-83,8%];  $p < 0,14$ ) apresentaram as menores taxas de eclosão, quando comparadas com o controle (MED=95%[90%-100%]). As concentrações  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios/mL sugerem um possível efeito ovicida do fungo *P. lilacinus*, fato pelo qual não conseguimos avaliar seu efeito em outras fases de desenvolvimento (Gráfico 9 e 10).



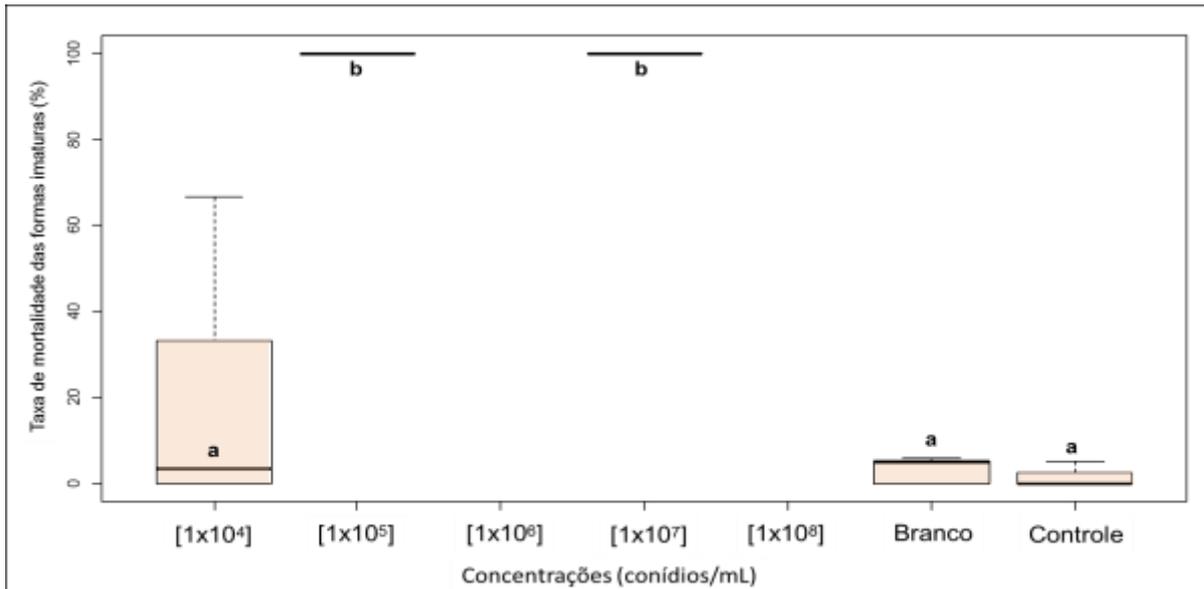
**Gráfico 10** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão dos ovos exposto a espécie *P. lilacinus* em diferentes concentrações. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers* e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

O fungo *P. lilacinus* cada vez mais tem ganhado notoriedade, devido à sua atuação patogênica em diferentes fases e hospedeiros. No entanto, essa atuação se tornou mais significativa quando observada sua ação contra ovos de nematóides (AHMAD et al., 2019; AL-HAZMIA et al., 2019; MONJIL; AHMED, 2017; YOUSSEF; EL-NAGDI; LOTFY, 2020) e também helmintos (ARAUJO et al., 2010; BRAGA et al., 2008; NAJAFI et al., 2017). Em seu estudo, Ahmad et al. (2019) observou a redução de 100% dos ovos do trematódeo *Fasciola gigantica* em 4 dias. De forma equivalente, Youssef; El-Nagdi; Lotfy (2020) notaram que os esporos de *P. lilacinus* causaram a redução de mais de 85% dos ovos de nematoides na concentração  $1 \times 10^8$  conídios/mL.

Além de nematoides e helmintos, pesquisadores têm verificado o efeito de *P.*

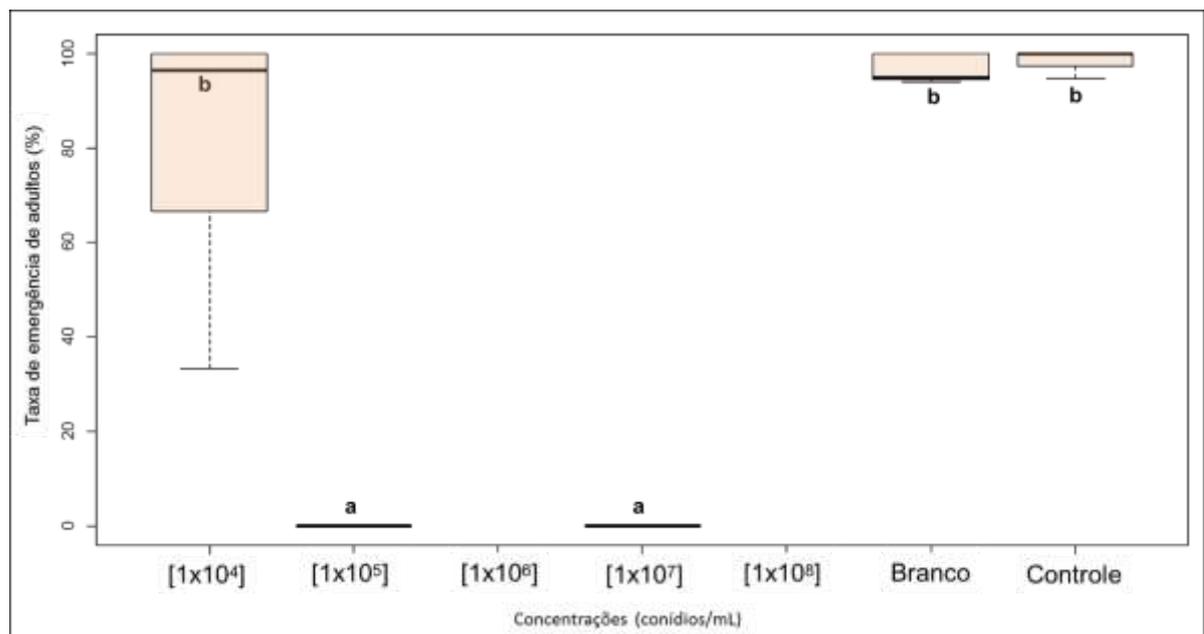
*lilacinus* contra mosquito vetores (AL-HASNAWI, 2020; LUZ et al., 2007, 2008). Em sua revisão, Scholte et al. (2004) afirma que nos últimos anos o interesse em fungos que matam mosquitos está ressurgindo, principalmente, devido ao risco global contínuo e a crescente transmissão dos patógenos pelos mosquitos. Com base nisso, Al-Hasnawi (2020) verificou a atividade ovicida e larvicida de *P. lilacinus* contra ovos e larvas de *An. stephensi* e *Cx. quinquefasciatus* em diferentes concentrações. Nesta, o autor observou que os ovos de *An. stephensi* foram mais susceptíveis a infecção, com a eliminação de 50% dos ovos, utilizando uma dosagem de  $4,3 \times 10^8$  conídios/mL. Já a mortalidade larval estava relacionada diretamente com a concentração de conídios e o tempo de exposição, onde as maiores mortalidades foram alcançadas após 72 horas utilizando uma dosagem na ordem  $10^8$  conídios/mL (AL-HASNAWI, 2020). Adicionalmente, corroborando nossos dados, Luz et al. (2007) investigou a atividade ovicida de diversas espécies de *Paecilomyces*, dentre esses de *P. lilacinus* contra *Ae. aegypti*. Esse isolado mostrou forte atividade ovicida com o desenvolvimento de micélio em mais de 80% dos ovos e taxa de eclosão acumulada 93,8% dos ovos eclodidos após 10 dias de incubação (LUZ et al., 2007).

No gráfico 11, as larvas oriundas dos bioensaios na concentração de  $1 \times 10^4$  conídios/mL apresentaram uma baixa taxa de mortalidade (MED=7,14%[0%-33,3%];  $p < 0,54$ ), quando comparado com o controle (MED=5%[0%-5,3%]). Em contrapartida, a concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL apresentou uma taxa de mortalidade de 100%. Nesse tratamento todas as larvas morreram, sugerindo um efeito significativo do fungo sobre os ovos de *Ae. aegypti*. Vale frisar que nas concentrações de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios/mL não conseguimos avaliar seu efeito em outras fases de desenvolvimento, porque a maioria de ovos eclodiram antes da avaliação.



**Gráfico 11** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de mortalidade das formas imaturas com diferentes concentrações referente ao fungo *P. lilacinus*. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

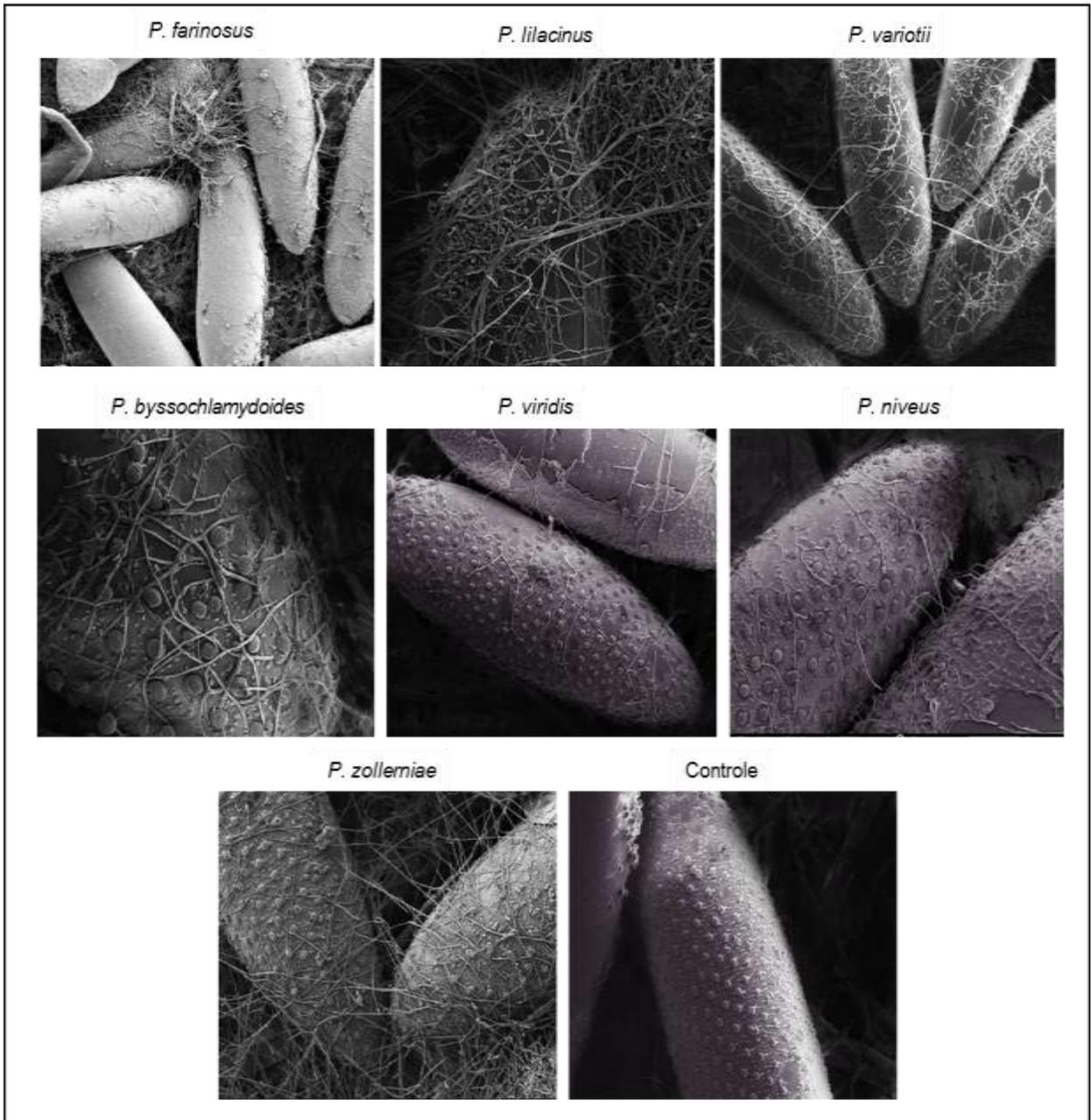
Em relação à emergência de adultos, nas concentrações superiores a  $1 \times 10^5$  conídios/mL, não foi possível avaliar esse indicador; no entanto nossos dados mostraram que a concentração  $1 \times 10^4$  conídios/mL (MED=96,4%[66,6%-100%];  $p < 0,54$ ), apresentou uma taxa similar ao observado no controle (MED=95%[94,7%-100%]).



**Gráfico 12** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de emergência de adultos em diferentes concentrações referente ao fungo *P. lilacinus*. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde à mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

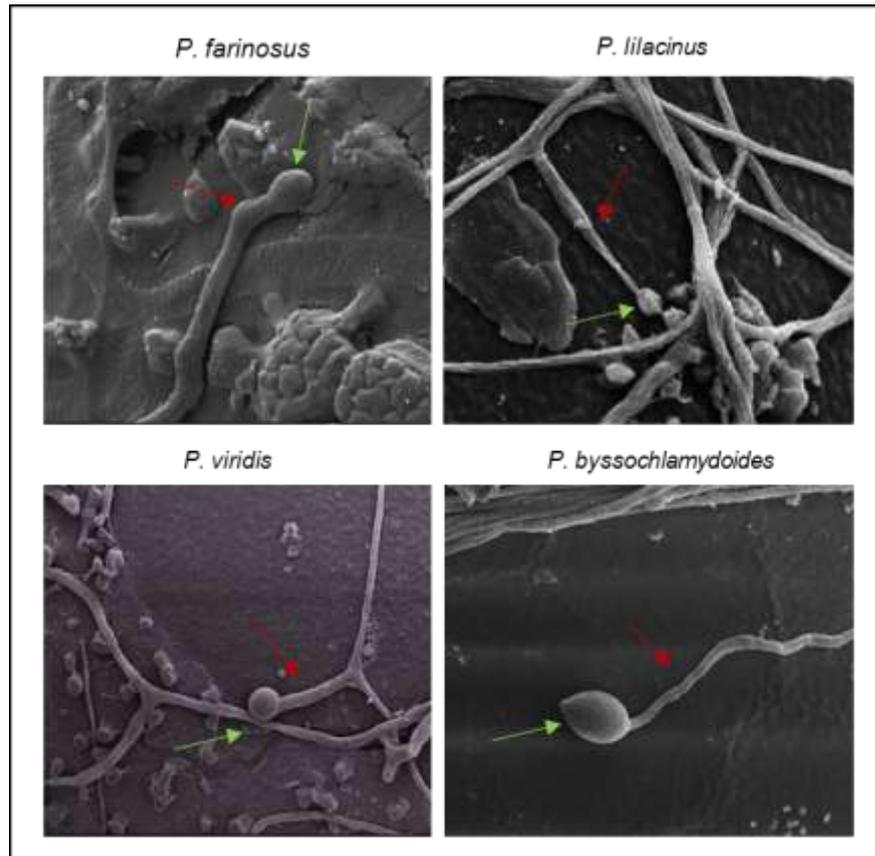
### 6.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com a finalidade de fazer uma visualização do comportamento das hifas, foi realizada uma análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos ovos de *Ae. aegypti* expostos às diferentes espécies fúngicas. De modo geral, as eletronicografias dos ovos infectados mostraram grande quantidade de conídios aderidos à superfície externa dos ovos de forma difusa (Figura 13). Em particular, os fungos *P. farinosus*, *P. variotti*, *P. byssochlamydoides* e *P. zollerniae* apresentaram maior produção de hifas sobre os ovos, diferentemente das cepas *P. niveus* e *P. viridis*, que exibiram um comportamento tardio no processo de crescimento sobre o hospedeiro no período de 48 horas quando incubados a 28°C. Em relação ao controle, sua rede exocoriônica foi visualizada nos ovos, sendo esta uma característica do *Ae. aegypti* sem a presença de filamentos fúngicos.



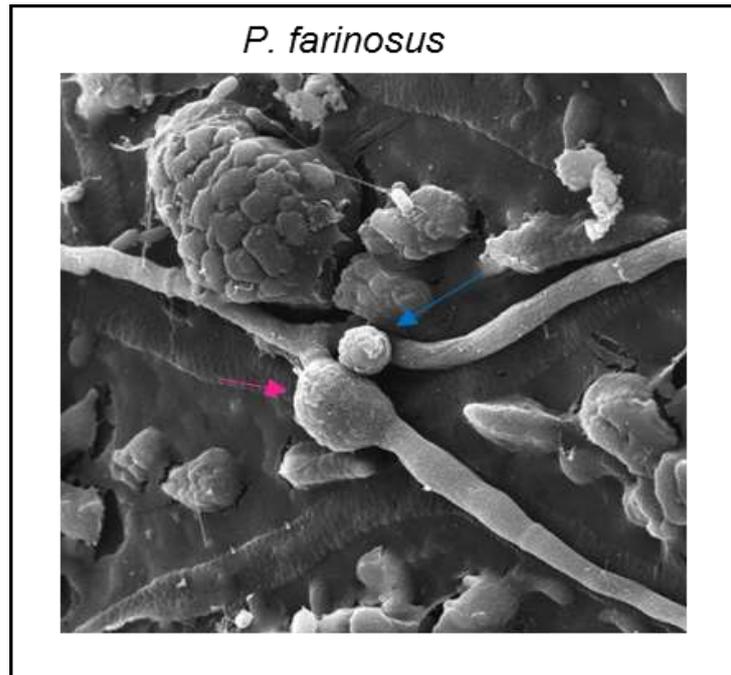
**Figura 13** — Eletronmicrografias da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos as espécies de *Paecilomyces* por 48 horas. Visualização do comportamento das hifas de diferentes espécies de *Paecilomyces* sobre os ovos de *Ae. aegypti* nos aumentos de: 150x (*P. farinosus*); 450x (*P. lilacinus*); 200x (*P. variotii*); 900x (*P. byssochlamydoides*); 400x (*P. viridis*); 270x (*P. niveus*); 330x (*P. zollerniae*) e 330x (controle).

De forma mais detalhada, verifica-se algumas características, entre as espécies fúngicas estudadas, como por exemplo: os conídios (Figura 14 – seta de cor verde) dando origem aos tubos germinativos (Figura 14 – seta de cor vermelha), e se alongando na superfície do ovo para localizar um local apropriado para penetração. Na literatura, poucos trabalhos podem ser encontrados, mostrando por meio da microscopia eletrônica de varredura, a adesão e a germinação de conídios sobre os ovos de *Ae. aegypti*.



**Figura 14** — Eletronmicrografias da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos às diferentes espécies de *Paecilomyces* por 48 horas. Visualização do conídio germinando (cor verde) e tubos germinativos (cor vermelha) de diferentes espécies de *Paecilomyces* sobre os ovos de *Ae. aegypti* nos aumentos de: 3.000x (*P. farinosus*); 1.300x (*P. lilacinus*); 900x (*P. viridis*); 850x (*P. byssochlamydoides*).

Curiosamente, nas eletronmicrografias de *P. farinosus* identificou-se a formação de apressório (Figura 15 – seta cor rosa) sobre o ovo ao lado do esporo fúngico (Figura 15 – seta cor azul). Tal fato é interessante, visto que essa estrutura adere firmemente à superfície do hospedeiro para facilitar a penetração do fungo, e é reconhecida por ser achatada, formada pelo inchaço do tubo germinativo ou da hifa (COUTO; MENEZES, 2004).

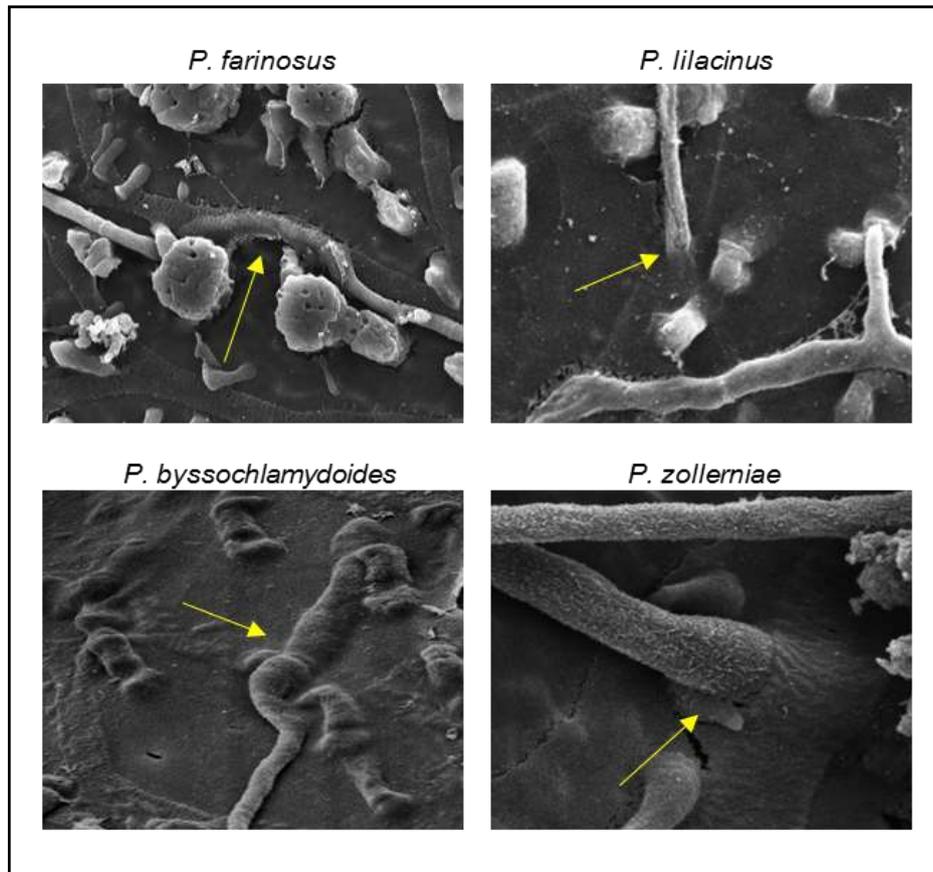


**Figura 15** — Eletronmicrografia da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos a espécie *Paecilomyces farinosus* por 48 horas. Visualização do esporo (seta cor azul) ao lado da estrutura apressório (seta cor rosa) em um aumento de 3.000x.

WANG; ZHANG; ZHANG (2009) investigaram a formação de apressório de *P. farinosus* em diferentes meios de cultura líquidos. Os resultados mostraram que de forma semelhante a este trabalho, essa espécie produz tubos germinais bipolares (*i.e.*, dois tubos que germinam ao mesmo tempo). E ainda, o topo de cada tubo influencia na formação do apressório; sendo que estes podem ser esféricos, triangulares e ovais, mas quando anexado ao hospedeiro tendem a se tornar esférico achatado (WANG; ZHANG; ZHANG, 2009).

Além disso, nos bioensaios de algumas espécies fúngicas pode-se visualizar alguns indícios de penetração (Figura 16). Após o período de 48 horas, as espécies *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. byssochlamydoides* e *P. zollerniae* exibiram na camada mais externa dos ovos de *Ae. aegypti* (exocócion) a penetração dos tubos germinativos. No entanto, interessante, as hifas exibiram padrões diferentes de penetração, com os tubos germinativos parcialmente ou totalmente introduzidos no exocócion. As hifas das espécies *P. farinosus* e *P. byssochlamydoides* tendiam a ser parcialmente embutidas na superfície por uma extensão específica, formando corcovas sobre a superfície. Já as espécies *P. lilacinus* e *P. zollerniae* exibiram seus tubos germinativos completamente embutidos no exocócion com cavilhas de penetração (Figura 16 - seta de cor amarela), penetrando na casca do ovo para absorção de nutrientes dentro do período de 48 horas. Adicionalmente, é importante

frisar que nos bioensaios anteriores ambos os fungos cresceram abundantemente a partir dos ovos mortos.



**Figura 16** — Eletronmicrografias da análise por microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Ae. aegypti* expostos às diferentes espécies de *Paecilomyces* por 48 horas. Visualização dos indícios de penetração (cor amarela) de diferentes espécies de *Paecilomyces* sobre os ovos de *Ae. aegypti* nos aumentos de: 4.500x (*P. farinosus*); 3.700x (*P. lilacinus*); 3.000x (*P. byssochlamydoides*) e 12.000x (*P. zollerniae*).

A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta oportuna para observar o modo de ação dos fungos entomopatogênicos e estudar como as espécies de *Paecilomyces* podem ser capazes de colonizar e infectar os ovos de *Ae. aegypti*. Nesse sentido, a análise por MEV permitiu observar a adesão, formação dos tubos germinativos e estruturas de penetração sobre os ovos. Além disso, visualizamos que algumas espécies como *P. farinosus* e *P. lilacinus* podem colonizar eficazmente os ovos de *Ae. aegypti* em condições de laboratório. Segundo Lysek (1976), os fungos podem ser considerados ovicidas quando três efeitos são observáveis durante todo o curso experimental, são eles: (1) adesão das hifas à casca do ovo sem alterações morfológicas; (2) alterações morfológicas na casca do ovo e embrião sem penetração de hifas e; (3) penetração das hifas nos ovos e alterações morfológicas nos ovos. No

presente trabalho, foi possível visualizar de forma eficaz o efeito (1) e por limitações da técnica, indícios de penetração. Assim, ressalta-se que para investigar as demais etapas serão necessárias mais investigações e aprimoramentos metodológicos.

O mecanismo de penetração dos fungos ovicidas nos ovos parasitados ainda não está totalmente esclarecido. Segundo Nordbring-Hertz (1988), esses fungos penetram mecanicamente nos ovos por meio de hifas vegetativas, com ou sem associação de enzimas extracelulares. No entanto, Lysek (1976) considera a atividade enzimática desses fungos como um dos principais elementos no processo de ataque e penetração nos ovos.

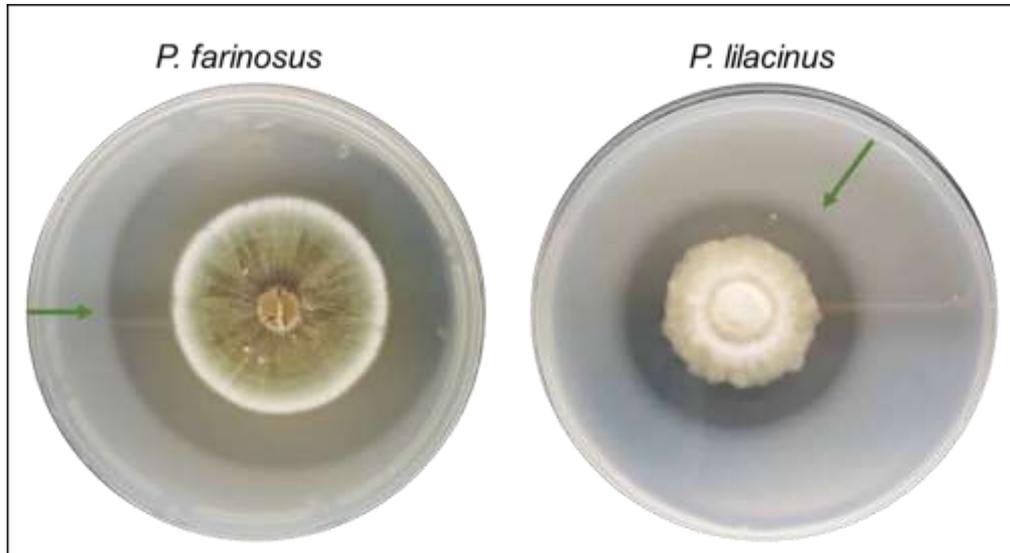
Até o momento, este é o primeiro relato da ação de espécies de *Paecilomyces* sobre ovos de *Ae. aegypti*. Embora os ovos desse vetor sejam bastante espessos, alguns isolados “parecem” penetrar no ovo. De acordo com Braga et al. (2007), a frequência e a taxa de sucesso da penetração do ovo por fungos dependem da composição das camadas do ovo. Os ovos de *Ae. aegypti* são muito resistentes e possuem duas camadas reconhecíveis no córion composto principalmente por proteínas, denominadas endocóron e exocóron (LI; LI, 2006). O endocóron é uma camada densa e o exocóron consiste em uma camada com turbéculos protuberantes ou uma rede fribiliar (VALLE et al., 1999).

#### 6.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS ENZIMAS PROTEASES E QUITINASES

Como dado complementar e visto a importância das enzimas proteases e quitinases no biocontrole, foi realizada a avaliação qualitativa destas enzimas para visualizar o potencial de produção enzimática das espécies fúngicas frente ao substrato. Os resultados foram avaliados para a produção das enzimas através da presença ou ausência de atividade a partir de halos formados no meio de cultivo, ao redor da colônia. Além disso, foi mensurado o nível de degradação do substrato específico considerando, em milímetros, o diâmetro dos halos de degradação, sendo estes expressos através do índice de atividade enzimática (IAE) que, por sua vez, expressa a relação entre o diâmetro médio do halo de atividade e o diâmetro médio da colônia correspondente (STAMFORD; ARAUJO; STAMFORD, 1998).

Para isso, 15µL na concentração de  $1 \times 10^5$  conídios/mL foram inoculados em placas de petri contendo os meios de cultura específicos de cada enzima. No ensaio de protease, apenas as espécies *P. farinosus* e *P. lilacinus* formaram halos

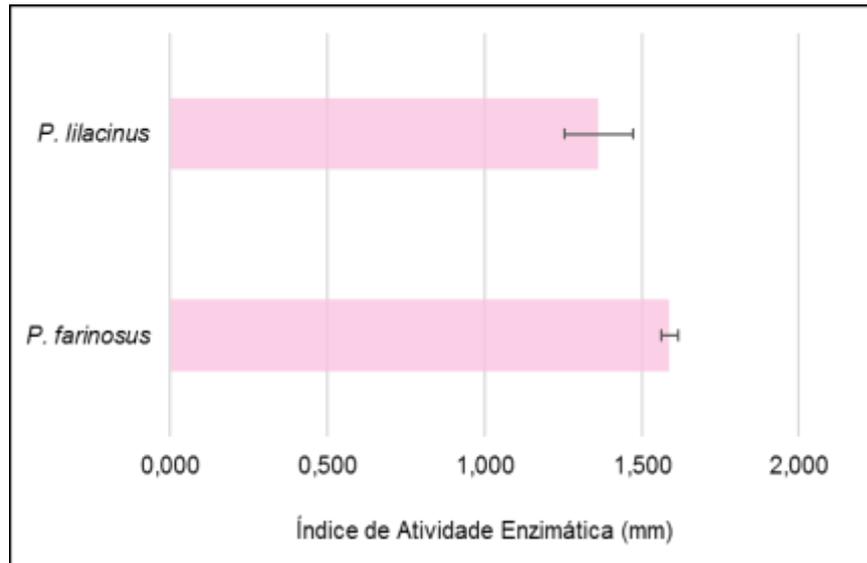
translúcidos ao redor da colônia (Figura 17 – seta da cor verde) no período de 7 dias; indicando um resultado positivo.



**Figura 177** — Resultado do ensaio qualitativo da enzima protease das espécies *P. farinosus* e *P. lilacinus* após o período de 7 dias a 28°C. As setas na cor verde indicam a formação de halos translúcidos ao redor da colônia dos fungos.

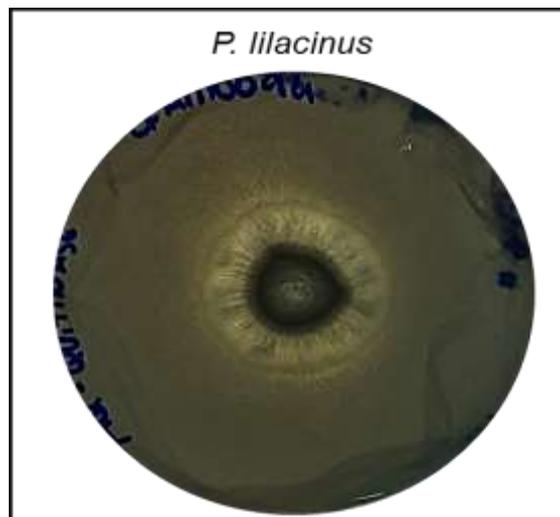
Adicionalmente, os halos foram medidos e representados de acordo com o índice de atividade enzimática (IAE). Os índices de atividade enzimática médios expressam a habilidade de cepas em produzir e secretar as enzimas de interesse e compõem uma escala arbitrária, que agrupa os fungos, segundo seu nível de habilidade, em três grupos: cepas com IAE entre 0 e 1; cepas com IAE maior ou igual a 1 e menor que 2 e, cepas com IAE igual ou superior a 2. Uma cepa pode ser considerada como fraca, moderada ou forte quanto à habilidade de produção enzimática conforme o índice enzimático médio se enquadrada dentro do primeiro, segundo ou do terceiro agrupamento respectivamente, ou seja, com  $0 < \text{IAE} < 1$ ;  $1 \leq \text{IAE} < 2$  ou  $\text{IAE} \geq 2$  (FARIAS, 2008).

Logo, através do gráfico 13, nota-se que tanto a espécie *P. farinosus* ( $1,588 \pm 0,027$  mm) quanto *P. lilacinus* expressaram uma atividade moderada ( $1,363 \pm 0,109$  mm) para a enzima protease.



**Gráfico 13** — Dados representativos das médias dos índices de atividade enzimática de protease das espécies *P. lilacinus* e *P. farinosus*, expressos em mm e, com desvios padrão.

Com relação à atividade da enzima quitinase, apenas a cepa *P. lilacinus* exibiu a formação de uma zona translúcida abaixo da colônia (Figura 18), indicando um resultado positivo para síntese dessa enzima. Entretanto, salienta-se que apesar do resultado negativo das demais espécies, não se descarta a hipótese da produção de um coquetel proteico durante a interação com o ovo de *Ae. aegypti*.



**Figura 188** — Resultado positivo do ensaio qualitativo da enzima quitinase indicado pela formação de uma zona translúcida abaixo da colônia da espécie *P. lilacinus* após o período de 7 dias a 28°C.

Estes dados indicam que os fungos *P. farinosus* e *P. lilacinus* têm a capacidade de sintetizar a enzima protease. Mas apenas *P. lilacinus* produz quitinases. As proteases formam um grande grupo de enzimas hidrolíticas que clivam as ligações

peptídicas das proteínas e as quebram em pequenos peptídeos e aminoácidos (MONDAL et al., 2016; STERCHI; STÖCKER, 1999). Esse grupo de enzimas é considerado importante para o processo infeccioso, de maneira que, a união das funções biológicas já relatadas das proteases à essa ação entomopatogênica, promovem uma potencial demanda industrial por essas enzimas (LIU et al., 2007). Já as enzimas quitinases hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4 da quitina; sendo este um dos polímeros mais abundantes na natureza depois da celulose (GOMES et al., 2010). Juntamente com a protease, elas colaboram para degradar a cutícula do inseto e estão associados a diferentes estágios do ciclo de vida de fungos entomopatogênicos (MONDAL et al., 2016; SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2014).

A atuação das proteases em ovos de diversos hospedeiros tem sido relatada. Khan; Williams; Nevalainen (2004) observaram que a protease secretada por *P. lilacinus* interrompeu o desenvolvimento de ovos de *Meloidogyne javanica*, reduziu o número de juvenis (*i.e.*, estágio que antecede os nematóides adultos) incubados e matou um grande número de juvenis eclodidos. Resultados semelhantes foram observados por Bonants et al. (1995), que descobriu com outra cepa de *P. lilacinus* que o tratamento com protease alterou a embriogênese dos ovos de *Meloidogyne incognita*, impedindo a eclosão de juvenis.

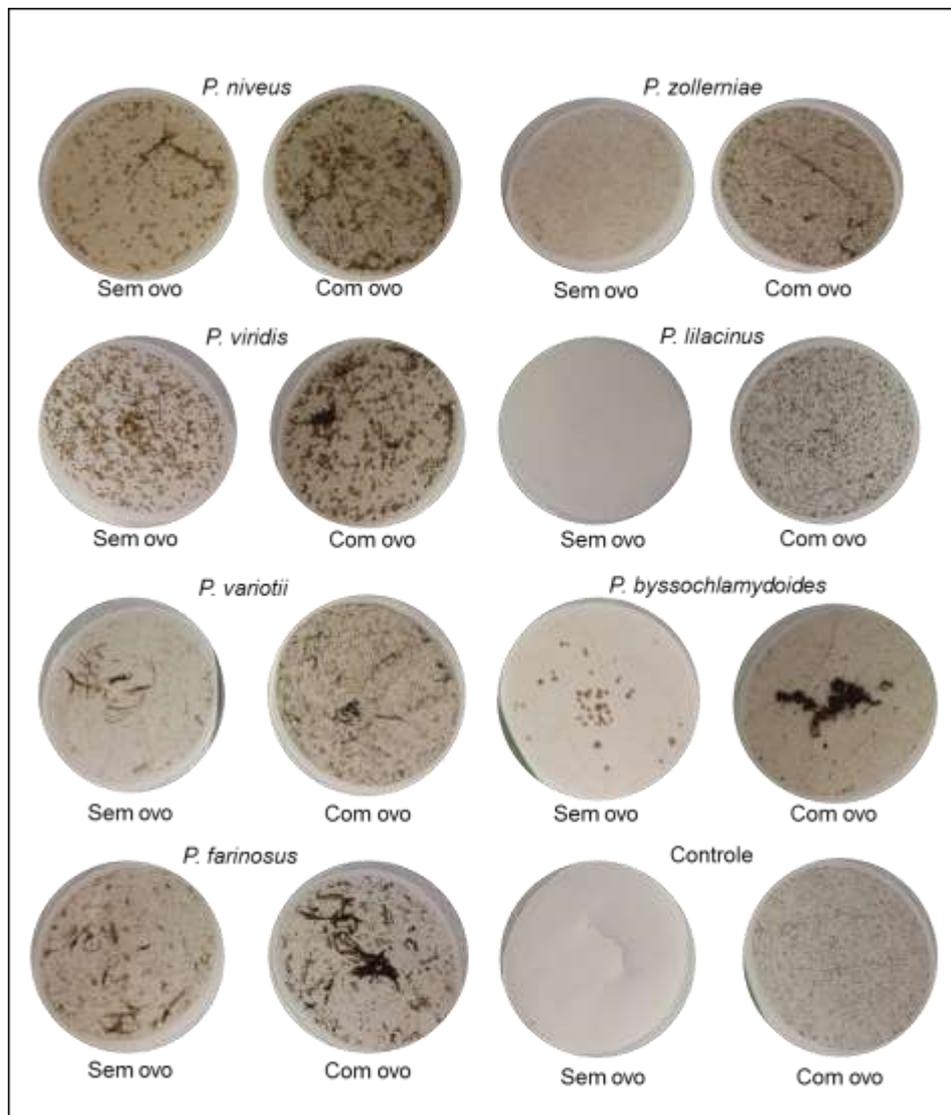
Em paralelo, mudanças estruturais na casca do ovo de nematóides foram observadas apenas com as quitinases de *P. lilacinus*; sendo que as principais mudanças ocorreram nas camadas de quitina (KHAN; WILLIAMS; NEVALAINEN, 2004). Essa mesma observação foi demonstrada por Morgan-Jones; White; Rodriguez-Kabana (1984) com *P. lilacinus*, na qual a camada de quitina ficou cheia de vacúolo durante a penetração do fungo nos ovos.

## 6.5 CULTIVO FÚNGICO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DO GEL DE POLIACRILAMIDA

Cada espécie fúngica foi submetida ao cultivo submerso por 20 dias à 28°C na ausência ou presença de fragmentos de ovos de *Ae. aegypti*. Estas foram cultivadas em 120mL de meio mínimo e ao final todos os secretomas tiveram um rendimento de aproximadamente 100mL. Além disso, o pH de cada meio líquido foi mensurado antes e após o cultivo. Através desse, notou-se que o pH inicial era levemente ácido (pH 5) e permaneceu inalterado nos 20 dias. Durante todo o cultivo, os fungos se

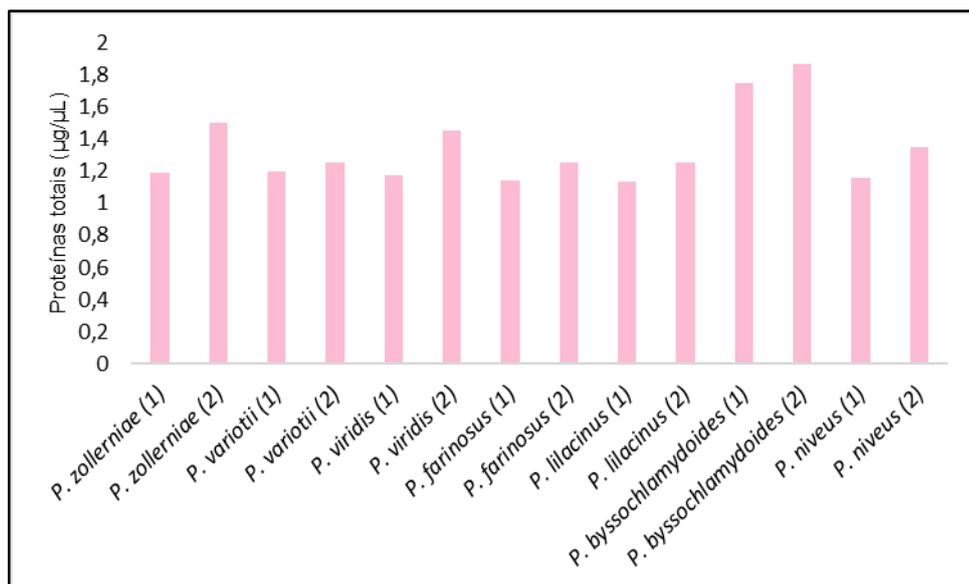
desenvolveram nos primeiros 10 dias com formação de micélio ao redor dos fragmentos de ovos, formando pequenos aglomerados; ao passo em que no cultivo em meio à ausência do ovo, a formação de micélio era totalmente dispersa.

A produção do micélio de todas as espécies fúngicas foi perceptível quando na ausência ou presença de fragmentos de ovos, conforme demonstrado na figura 19. De forma geral, todos os fungos, se desenvolveram melhor na presença de ovos. Em particular, as espécies *P. niveus*, *P. byssochlamydoides* e *P. farinosus* tiveram, visualmente, a maior produção de micélio (Figura 19). Vale frisar que o meio utilizado é bastante limitado em nutrientes, contendo apenas os sais minerais essenciais para a sobrevivência do microrganismo.



**Figura 19** — Produção de biomassa das espécies fúngicas, após a filtração à vácuo, quando submetidas ao cultivo submerso por 20 dias na ausência ou presença de ovos de *Ae. aegypti*.

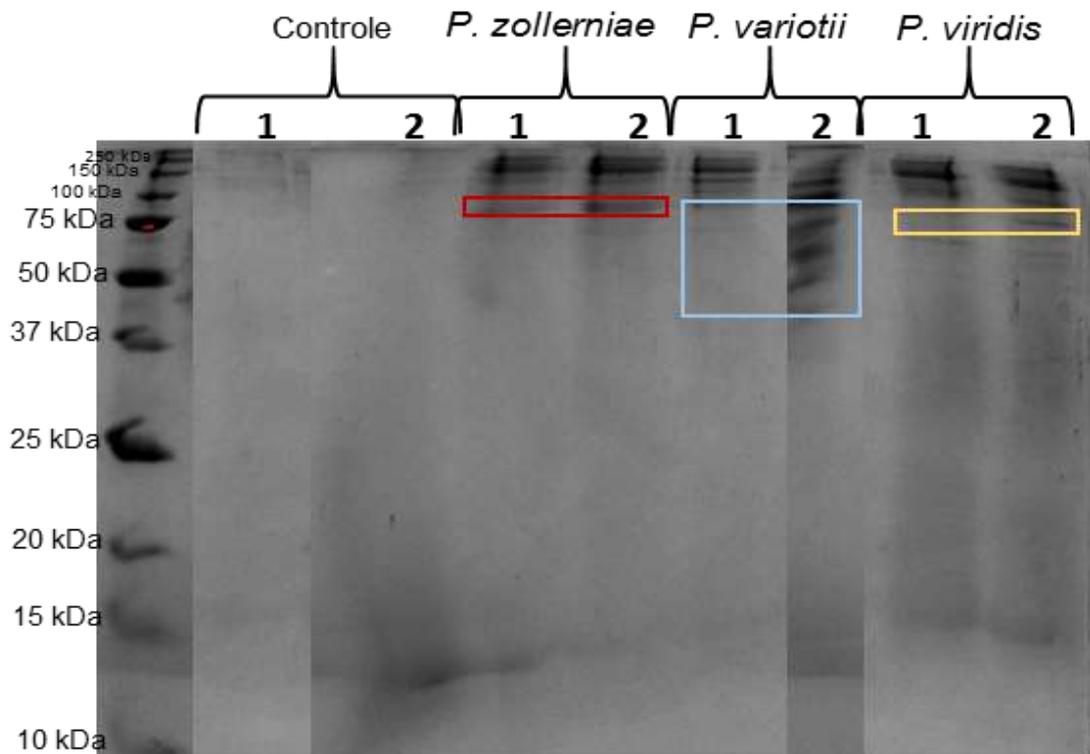
As proteínas foram extraídas dos respectivos secretomas e quantificados através do ensaio fluorimétrico Qubit 3.0, cujos resultados se encontram no gráfico 14. Neste, verifica-se que todos os fungos produziram mais proteínas na presença de ovos, sendo os dados coerentes com a produção de micélio (Figura 19). Essa síntese proteica apresentou uma variação entre 1,13  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a 1,87  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , desconsiderando as amostras controle. Em particular, a espécie *P. byssochlamydoides* se destacou diante das demais com o maior conteúdo proteico, sendo 1,75  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para o cultivo na ausência e 1,87  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  na presença do substrato ovo. Outras espécies que chamaram a atenção foram: *P. zollerniae* (1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e *P. viridis* (1,45  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) que tiveram uma dosagem proteica significativa na presença de ovo. Em contrapartida, as espécies *P. variotii*, *P. farinosus* e *P. lilacinus* demonstraram o menor conteúdo proteico no secretoma na ausência ou presença de fragmentos de ovos.



**Gráfico 14** — Concentração de proteínas das diferentes espécies de *Paecilomyces* estudadas, quando cultivadas a 28°C na ausência ou presença de fragmentos de ovos. Os números representam: (1) cultivo na ausência de fragmentos de ovos; (2) cultivo na presença de fragmentos de ovos.

Em adição, um gel unidimensional de poli-acrilamida foi preparado a fim de visualizar o perfil de proteínas expressas pelas espécies fúngicas, quando cultivados a 28°C, por 20 dias na presença ou ausência de fragmentos de ovos. Neste, observou-se que todas as espécies de *Paecilomyces* tiveram a capacidade de produzir proteínas em um meio de cultura limitado, como o meio mínimo. Além disso, conforme verificado na quantificação proteica, os fungos expressaram mais proteínas na presença dos fragmentos de ovos de *Ae. aegypti*; enquanto as amostras referentes

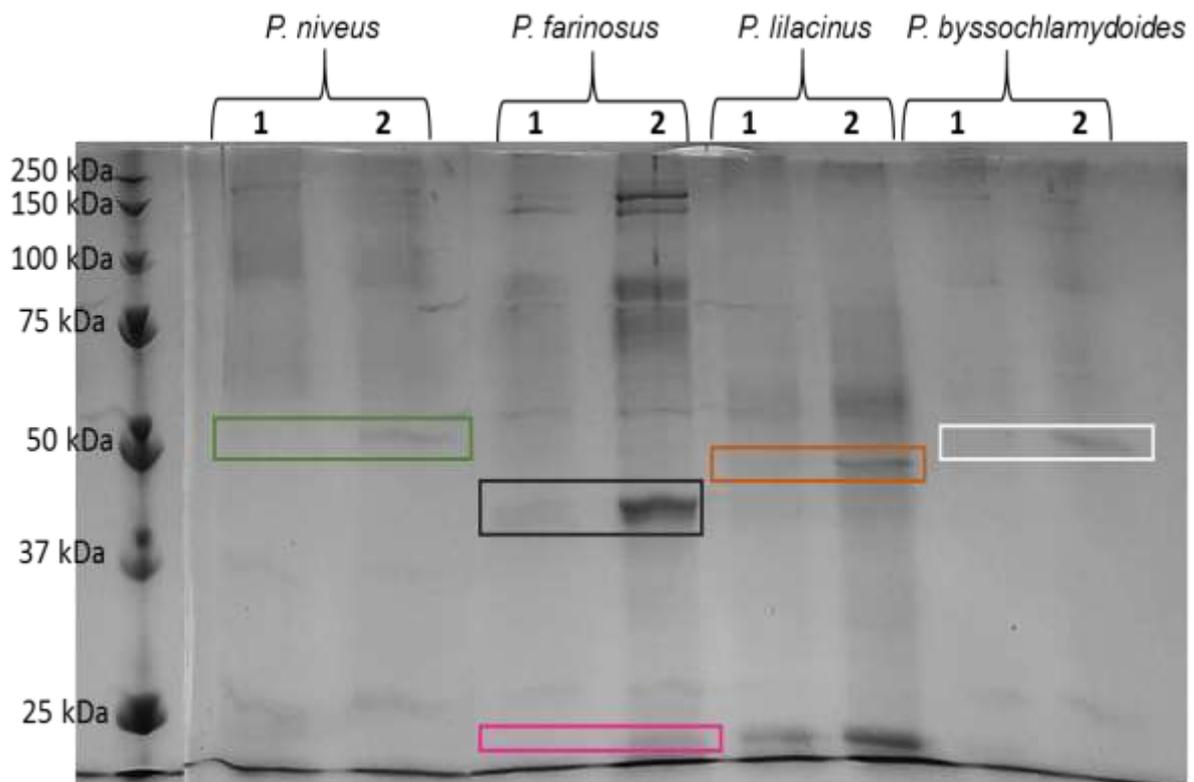
ao controle tiveram ausência de bandas proteicas (Figura 20). Com relação às espécies fúngicas *P. zollerniae*, *P. variotii* e *P. viridis*, estas exibiram bandas com peso molecular variando entre 50 kDa e 250 kDa (Figura 20). Em específico, a espécie *P. zollerniae* demonstrou bandas proteicas entre 75 kDa e 100 kDa (Figura 20 – quadrado na cor vermelha), sendo estas mais expressas nas amostras contendo fragmentos de ovos. Além disso, este mesmo isolado demonstrou bandas similares expressas entre 150 kDa e 250 kDa. Já a espécie *P. variotii* demonstrou bandas diferenciais entre 50 kDa e 100 kDa no meio de cultura induzido pelo substrato ovo (Figura 20 — quadrado na cor azul). E ainda, o fungo *P. viridis* demonstrou uma sucinta banda de proteínas diferencial no meio induzido, de aproximadamente 75 kDa (Figura 20 — quadrado na cor amarela).



**Figura 20** — Eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras oriundas dos cultivos por 20 dias à 28°C do controle e das espécies *P. zollerniae*, *P. variotii* e *P. viridis* na ausência ou presença de fragmentos de ovos de *Ae. aegypti*. Os números representam: (1) cultivo na ausência de fragmentos de ovos; (2) cultivo na presença de fragmentos de ovos. As caixas de diferentes cores estão destacando bandas proteicas diferenciais de cada espécie fúngica.

Algumas bandas de proteínas com diversos pesos moleculares podem ser visualizadas nas amostras de *P. niveus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus* e *P. byssochlamydoides*, distribuídos entre 20 kDa e 250 kDa (Figura 21). Todavia, ao contrário dos dados da quantificação proteica, as espécies *P. farinosus* e *P. lilacinus* apresentaram maiores expressão de proteínas, com fortes bandas proteicas,

principalmente nas amostras oriundas dos meios contendo fragmento de ovos. No perfil de *P. niveus*, nota-se uma banda diferencial de aproximadamente 50 kDa (Figura 21 — quadrado na cor verde). Já a expressão proteica do fungo *P. farinosus*, exibiu uma banda diferencial de peso molecular em torno de 20 kDa (Figura 21 — quadrado na cor rosa) e entre 37kDa e 50 kDa (Figura 21 — quadrado na cor preta). Já a espécie *P. lilacinus* exibiu uma banda diferencial um pouco abaixo de 50 kDa (Figura 21 — quadrado na cor laranja) e forte expressão de bandas similares a outras espécies em torno de 20 kDa. De maneira semelhante a espécie *P. niveus*, o fungo *P. byssochlamydoides* apontou uma discreta banda diferencial equivalente a 50 kDa (Figura 21 — quadrado na cor branca).



**Figura 21** — Eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras oriundas dos cultivos por 20 dias à 28°C das espécies de *P. niveus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus* e *P. byssochlamydoides* na ausência ou presença de fragmentos de ovos de *Ae. aegypti*. Os números representam: (1) cultivo na ausência de fragmentos de ovos; (2) cultivo na presença de fragmentos de ovos. As caixas de diferentes cores estão destacando bandas proteicas diferenciais de cada espécie fúngica.

De maneira geral, as proteínas nas faixas moleculares aqui apresentadas podem estar associados a determinados processos fundamentais de entomopatogenicidade (MURAD et al., 2007). Como a maioria dos entomopatógenos, as espécies *Paecilomyces* podem usar uma combinação de quitinases, proteases e lipases para se aderir e colonizar o hospedeiro (MENG et al., 2015).

Em sua revisão, Kubicek et al. (2001) relata que quitinases de 102 kDa oriundas de fungos entomopatogênicos, podem ser responsáveis pelo primeiro ataque ao hospedeiro. Nesse sentido, a maioria dos fungos entomopatogênicos podem produzir mais de um tipo de quitinases, como N-acetil-glucosamina (102 kDa e 73 kDa), endocitase (52, 42, 33, 31 kDa) e quitobiosidase (40 kDa) (DUO-CHUAN, 2006). E ainda, um estudo com *Metarhizium anisopliae* demonstrou uma distribuição proteica entre 27 kDa e 82 kDa (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Adicionalmente, outros autores identificaram compostos inseticidas de diversos fungos entomopatogênicos, entre esses incluem: dextruxinas — 22 kDa (STRASSER; VEY; BUTT, 2000), beauverolídeos — 22 kDa (VEY; HOAGLAND; BUTT, 2001), tenelina — 60 kDa (ZIMMERMANN, 2007), oosporeína — 83 kDa (GUPTA; MONTLLOR; HWANG, 1995). Ademais, Meng et al. (2015) também encontraram outras proteínas do entomopatógeno *Beauveria* sp. em torno de 50 kDa.

Logo, pode-se dizer que a interação entre as espécies de *Paecilomyces* e o ovo de *Aedes aegypti* induziram a produção de um coquetel proteico, como visualizado através do gel de poliacrilamida. No entanto, a limitação da técnica nos permite apenas inferir possíveis proteínas que possam estar envolvidas nesse processo.

## 7. CONCLUSÕES

Com os dados apresentados nesse trabalho, foi possível observar que todas as sete espécies de *Paecilomyces* tiveram a capacidade de se desenvolver sobre a superfície dos ovos. Em específico, durante a incubação os fungos *P. lilacinus* e *P. niveus* formaram uma camada de exopolissacarídeos ao redor dos ovos de *Ae. aegypti*. E curiosamente, no tratamento com o fungo *P. byssochlamydoides* houve a decomposição de alguns ovos, necessitando de maiores investigações sobre esses efeitos.

Verificou-se que a espécie *P. lilacinus* causou eclosão de praticamente todos os ovos antes da imersão em água, principalmente nas concentrações mais altas e posterior crescimento sobre as larvas. Além disso, as larvas oriundas dos bioensaios de *P. viridis*, *P. niveus* e *P. farinosus* mostraram dificuldades no desenvolvimento e locomoção lenta. Ademais, as larvas expostas ao *P. farinosus* tiveram uma mortalidade total em alguns tratamentos.

Na análise quantitativa dos bioensaios, notou-se que as taxas de eclosão nos diferentes ensaios com os fungos, foram consideravelmente menores em relação ao controle, se destacando as espécies *P. niveus* e *P. viridis*. Quanto as formas de aplicação, estas não tiveram efeito significativo sobre os bioensaios, ao passo em que a concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL apresentou o maior impacto frente as demais concentrações e controle.

Analisando somente a concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL, observou-se que a mediana da taxa de eclosão em todos os bioensaios foi inferior a 50%, sendo que os dados dos fungos *P. viridis*, *P. byssochlamydoides* e *P. zollerniae* sugeriram uma ação patogênica mais acentuada. Adicionalmente, o comportamento de *P. lilacinus* foi analisado isoladamente e verificou-se que os ovos tratados com concentrações acima de  $1 \times 10^5$  conídios/mL resultaram na emergência de nenhum mosquito.

A análise por MEV permitiu observar que todas as espécies se desenvolveram sobre os ovos, no período de 48 horas. Em particular, os ovos mostraram grande quantidade de conídios aderidos, se destacando o fungo *P. lilacinus*. Ao analisarmos de forma mais detalhada, observou-se a formação de tubos germinativos nas espécies *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. viridis* e *P. byssochlamydoides*. De tal modo que, foi possível visualizar a formação de apressório do fungo *P. farinosus* sobre os ovos, uma característica típica dos entomopatógenos. E ainda, as espécies *P. farinosus*, *P.*

*lilacinus*, *P. byssochlamydoides* e *P. zollerniae* mostraram indícios de penetração no ovo.

Já na análise qualitativa das enzimas protease e quitinase, notou-se que apenas as espécies *P. farinosus* e *P. lilacinus* mostraram-se como produtoras de proteases; e somente *P. lilacinus* foi positivo para quitinase.

Adicionalmente, observou-se que todas as espécies se desenvolveram melhor quando cultivados na presença de fragmentos de ovos, produzindo mais proteínas frente a esse substrato. Já no gel de poliacrilamida, observou-se bandas de alto peso molecular variando entre 50 kDa e 250 kDa nas amostras das espécies *P. zollerniae*, *P. variotii* e *P. viridis*. Enquanto, as espécies *P. niveus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus* e *P. byssochlamydoides* apresentaram bandas proteicas distribuídas entre 20 kDa e 250 kDa; sendo que todas as espécies mostraram bandas proteicas diferenciais.

Portanto, as informações obtidas no presente estudo podem ser consideradas pertinentes na prospecção de novas cepas entomopatogênicas na fase imatura do vetor *Aedes aegypti*. De forma que, estes dados podem servir como base para futuros estudos que visem o desenvolvimento de produtos alternativos para o biocontrole do mosquito *Aedes aegypti*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWALA, S. P.; SAGAR, S. K.; SEHGAL, S. S. Use of mycelial suspension and metabolites of *Paecilomyces lilacinus* (Fungi: Hyphomycetes) in control of *Aedes aegypti* larvae. **The Journal of Communicable Diseases**, v. 31, n. 3, p. 193–196, 1999.
- AHMAD, R. Z. et al. *Paecilomyces lilacinus* and *P. variotii* as a predator of nematode and trematode eggs. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 299, n. 1, p. 012056, 2019.
- AL-HASNAWI, M. R. A. Insecticidal activity of Conidia of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson against Malaria and Filariasis Vectors. **Eurasian Journal of Biosciences**, v. 14, n. 2, p. 5695–5701, 2020.
- AL-HAZMIA, A. S. et al. Effects of humic acid, *Trichoderma harzianum* and *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica*. **Int J Agric Environ Biores**, v. 4, n. 1, p. 61–74, 2019.
- ALI MOHAMMADIE KOJOUR, M.; HAN, Y. S.; JO, Y. H. An overview of insect innate immunity. **Entomological Research**, v. 50, n. 6, p. 282–291, 2020.
- ALKHAIBARI, A. M. et al. *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: attack on several fronts accelerates mortality. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005715, 2016.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba - SP: Editora Fealq, 1998. v. 1
- ANSARI, M. A. et al. Efficacy of entomopathogenic fungi against soil-dwelling life stages of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in plant-growing media. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 127, n. 2, p. 80–87, 2008.
- ARAÚJO, C. P. M. DE. **Avaliação da formação de biofilme e análise das proteínas do secretoma e biofilme de *Aspergillus fumigatus***. Dissertação—Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz, 2019.
- ARAUJO, J. M. et al. The ovicidal activity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Taenia saginata* eggs in laboratory trial. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 165–169, 2010.

ARAÚJO, J. P. M.; HUGHES, D. P. Chapter One - Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? In: LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. (Eds.). **Advances in Genetics**. Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. Pennsylvania: Academic Press, v. 94p. 1–39. 2016.

ASI, M. R. et al. Potential of Entomopathogenic Fungi for Biocontrol of *Spodoptera Litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 23, n. 3, p. 913–918, 2013.

ASI, M. R.; BASHIR, M. H.; AFZAL, M. Effect of conidial concentration of entomopathogenic fungi on mortality of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 7, n. 2, p. 175–180, 2009.

BAINIER G. Mycothèque de l'école de Pharmacie. XI. *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. **Bulletin Trimestrielle de la Societe de Mycologie Française**, v. 23, n. 1, p. 26–27, 1907.

BARDACH, A. E. et al. Interventions for the control of *Aedes aegypti* in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 5, p. 530–552, 2019.

BARKER, A. P. et al. Complexities associated with the molecular and proteomic identification of *Paecilomyces* species in the clinical mycology laboratory. **Medical Mycology**, v. 52, n. 5, p. 537–545, 2014.

BARRETT, A. D. T. The reemergence of yellow fever. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 847–848, 2018.

BAWIN, T. et al. Production of two entomopathogenic *Aspergillus* species and insecticidal activity against the mosquito *Culex quinquefasciatus* compared to *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 617–629, 2016.

BERTI FILHO, E.; MACEDO, L. P. M. **Fundamentos de controle biológico de insetos-praga**. 1. ed. Natal - RN: Editora IFRN, v. 1, 2011.

BETTIOL, W. et al. **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Embrapa Meio Ambiente, 2012. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/930378/1/Doc881.pdf>>.

Acesso em: 17 jul. 2021

- BETTIOL, W. et al. Uso atual e perspectivas do Trichoderma no Brasil. In: **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 21–43.
- BOARDMAN, R. Biological control: pitting insects against insects. **California Agriculture**, v. 31, n. 10, p. 8–11, 1977.
- BONANTS, P. J. M. et al. A basic serine protease from Paecilomyces lilacinus with biological activity against Meloidogyne hapla eggs. **Microbiology**, v. 141, n. 4, p. 775–784, 1995.
- BOYCE, R. et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* ( *Bti* ) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 5, p. 564–577, 2013.
- BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.
- BRAGA, F. R. et al. Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos Duddingtonia flagrans, Monacrosporium thaumasium e Verticillium chlamydosporium sobre ovos de Ascaris lumbricoides (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 356–358, 2007.
- BRAGA, F. R. et al. Efeito do fungo Paecilomyces lilacinus sobre ovos de Taenia saginata. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 686–688, 2008.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes Aegypti: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007a.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007b.
- BRASIL. **Mercado de bio defensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 21 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-bio defensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>>. Acesso em: 8 jul. 2021
- BROWN, A. H.; SMITH, G. The genus Paecilomyces Bainier and its perfect stage Byssochlamys Westling. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 40, n. 1, p. 17-IN3, 1957.

BURHAN, A. H.; ANNON, M. R. Pathogenesis of *Paecilomyces lilacinus* against the immature stages of *Musca domestica* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11, n. 4, p. 1595–1601, 2019.

BUTT, T. M. et al. Chapter Nine - Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. In: LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. (Eds.). **Advances in Genetics**. Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. [s.l.] Academic Press, v. 94, p. 307-364, 2016.

CAMARGO, S. DE. History of *Aedes aegypti* eradication in the Americas. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 36, n. 4, p. 602, 1967.

CAMPOS, K. B. et al. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 531, 2020.

CASTILLO-QUINO, R. et al. Adaptación del mosquito *Aedes aegypti* a 2 550 m snm Cochabamba, Bolivia. Febrero 2016. **Gaceta Médica Boliviana**, v. 41, n. 1, p. 24–30, 2018.

CESPEDES-ACUÑA, C. L. et al. Structural studies of the exopolysaccharide produced by a submerged culture of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 13, n. 1, p. 359–365, 2014.

CHANDLER, D. Chapter 5 - Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Microbial Control of Insect and Mite Pests**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 69–89.

CHRISTOPHERS, S. R. **Aedes aegypti the yellow fever mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1960.

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. Volume 1: Development, nutrition and reproduction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 718, 1993.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. v. 1

COON, K. et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 1, p. 2727–2739, 2014.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 406–412, 2004.

CRAWFORD, J. E. et al. Population genomics reveals that an anthropophilic population of *Aedes aegypti* mosquitoes in West Africa recently gave rise to American and Asian populations of this major disease vector. **BMC biology**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2017.

DAI, Z.-B.; WANG, X.; LI, G.-H. Secondary Metabolites and Their Bioactivities Produced by *Paecilomyces*. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5077, 2020.

DAOUST, R. A.; WARD, M. G.; ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, n. 2, p. 228–236, 1982.

DEGENER, C. M. et al. Mass trapping with MosquiTRAPs does not reduce *Aedes aegypti* abundance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 517–527, 28 abr. 2015.

DESAI, K.; CAMPBELL, S. Insecta Class: Flies and Mosquitoes. In: **Dermatological Manual of Outdoor Hazards**. 1. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2020. v. 1.

DINIZ, D. F. A. et al. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.

DONG, Q. et al. Identification and characterization of a special species of *Paecilomyces*. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1587–1592, 2012.

DOSS, R. P. et al. Adhesion of Nongerminated *Botrytis cinerea* Conidia to Several Substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1786–1791, 1993.

DOSS, R. P. et al. Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 260–265, 1995.

DOSS, R. P. Composition and Enzymatic Activity of the Extracellular Matrix Secreted by Germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 404–408, 2020.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345–360, 2006.

FARIAS, M. V. D. **Produção De Enzimas Hidrolíticas Por Leveduras Isoladas De Solos De Áreas Preservadas Em Roraima, Brasil**. Dissertação de mestrado—Boa vista - RO: Universidade Federal de Roraima, 2008.

FARJANA, T.; TUNO, N.; HIGA, Y. Effects of temperature and diet on development and interspecies competition in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Medical and veterinary entomology**, v. 26, n. 2, p. 210–217, 2012.

FARNESI, L. C. et al. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 124–126, 2009.

FARRAR, J. et al. **Manson's tropical diseases: expertconsult.com gives you fully searchable text and more online**. 23. ed. Edinburgh: Elsevier Saunders, 2014.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. **New England journal of medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia Vol. 2**. 1. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. v. 2

GAMS, W. et al. Proposal to conserve the name *Isaria* (anamorphic fungi) with a conserved type. **Taxon**, v. 54, n. 2, p. 537–537, maio 2005.

GIBSON, G. et al. Conditions of the household and peridomicile and severe dengue: a case–control study in Brazil. **Infection ecology & epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 22110, 2014.

GOETTEL, M. S.; EILENBERG, J.; GLARE, T. 6.11 - Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. In: GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 361–405.

GOMES, A. DE C. et al. Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. **Revista de saude publica**, v. 39, p. 206–210, 2005.

GOMES, L. P. et al. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinífera* L. cv Red Globe) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882–1886, 2010.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Analysis of DNA. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 2p. 81–157.

GREENFIELD, B. P. J. et al. Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. **Royal Society Open Science**, v. 1, n. 2, p. 140193, 2014.

GUPTA, S.; MONTLLOR, C.; HWANG, Y.-S. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 733–738, 1995.

GUTIÉRREZ HUAMÁN, A. R.; GUTIÉRREZ HUAMÁN, J. P. Evaluación in vitro de los diferentes estadios del ciclo biológico de *Aedes aegypti* frente a la inoculación del concentrado mixto de esporas de *Paecilomyces lilacinus*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Micosplag), Quillabamba - Cusco. **Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco**, 2017.

HABEEB, S. M.; ASHRY, H. M.; SAAD, M. M. Ovicidal effect of chitinase and protease enzymes produced by soil fungi on the camel tick *Hyalomma dromedarii* eggs (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 1, p. 268–273, 2017.

HAJJI, L. et al. Biocontrol potential of *Verticillium leptobactrum* and *Purpureocillium lilacinum* against *Meloidogyne javanica* and *Globodera pallida* on potato (*Solanum tuberosum*). **American journal of potato research**, v. 94, n. 2, p. 178–183, 2017.

HARITH-FADZILAH, N.; ABD GHANI, I.; HASSAN, M. Omics-based approach in characterising mechanisms of entomopathogenic fungi pathogenicity: A case example of *Beauveria bassiana*. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 2, p. 101332, 2021.

- HE, J. et al. *Paecilomyces wawuensis*, a new species isolated from soil in China. **Mycotaxon**, v. 115, n. 1, p. 303–310, 2011.
- HODGE, K. T. et al. Lectotypification and status of *Isaria* Pers. : Fr. **Taxon**, v. 54, n. 2, p. 485–489, 2005.
- HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 1, p. 4–10, 1995.
- HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 33–38, 2003.
- HOMTHONG, M. et al. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 4, p. 232–242, 2016.
- HUANG, Y.-J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. **Insects**, v. 8, n. 1, p. 21, 2017.
- HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 3, p. 262–266, 2008.
- IMLER, J.-L.; ZHENG, L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 1, p. 18–26, 2004.
- JACOBS, C. G. et al. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1764, p. 20131082, 2013.
- JARROLD, S. L. et al. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. **Mycological Research**, v. 111, n. 2, p. 240–249, fev. 2007.
- KHACHATOURIANS, G. G. Biochemistry and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. In: HOWARD, D. H.; MILLER, J. D. (Eds.). **Human and Animal Relationships**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. v. 6p. 331–363.
- KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 346–352, 2004.

KIM, S. G. et al. Tm SR-C, scavenger receptor class C, plays a pivotal role in antifungal and antibacterial immunity in the coleopteran insect *Tenebrio molitor*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89, p. 31–42, 2017.

KLOWDEN, M. J.; BRIEGEL, H. Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 4, p. 618–622, 1994.

KOMAKI, A. et al. Laboratory assessment for biological control of *Tribolium confusum* du Val., 1863 (Coleoptera: Tenebrionidae) by entomopathogenic fungi. **Turkish Journal of Entomology**, v. 41, n. 1, p. 95–103, 2017.

KUBICEK, C. P. et al. Trichoderma: from genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, n. 2, p. 11–23, 2001.

KURUCZ, E. et al. Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2622–2627, 2003.

LEE, Y.-H.; DEAN, R. A. Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 115, n. 1, p. 71–75, 1994.

LEGER, R. S. et al. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 2, p. 168–179, 1991.

LEGGETT, M. et al. Formulation of microbial biocontrol agents – an industrial perspective. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 101–107, 2011.

LELES, R. N. et al. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 107, n. 5, p. 1271–1274, 2010.

LELES, R. N.; D’ALESSANDRO, W. B.; LUZ, C. Effects of *Metarhizium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. **Parasitology research**, v. 110, n. 4, p. 1579–1582, 2012.

LI, J. et al. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 975–984, jan. 2010a.

LI, J. S.; LI, J. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 12, p. 954–964, 2006.

LI, X.-Q. et al. A Systematic Review on Secondary Metabolites of *Paecilomyces* Species: Chemical Diversity and Biological Activity. **Planta Medica**, v. 86, n. 12, p. 805–821, 2020.

LI, Z. et al. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 117–136, 2010b.

LIU, S.-Q. et al. Characterizing structural features of cuticle-degrading proteases from fungi by molecular modeling. **BMC Structural Biology**, v. 7, n. 1, p. 33, 2007.

LOUIS, M. L. M. et al. Mosquito larvicidal activity of Avocado (*Persea americana* Mill.) unripe fruit peel methanolic extract against *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 1–4, 2020.

LU, H.-L.; ST. LEGER, R. J. Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi. In: **Advances in Genetics**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 94p. 251–285.

LUANGSA-ARD, J. et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*: *Purpureocillium*, a new fungal genus for *P. lilacinus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 321, n. 2, p. 141–149, 2011.

LUANGSA-ARD, J. J. et al. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycological research**, v. 109, n. 5, p. 581–589, 2005.

LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; SAMSON, R. A. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 773–780, 2004.

LUZ, C. et al. Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 5, p. 799–804, 2007.

LUZ, C. et al. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 214–215, 2008.

LUZ, C.; BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. **Mycopathologia**, v. 160, n. 1, p. 51–62, 2005.

LYSEK, H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. **Acta Univ Palack Olomue**, v. 1, n. 76, p. 9–13, 1976.

MAGALHÃES, R. C. DA S. **A Erradicação do *Aedes aegypti*: febre amarela, Fred Soper e saúde pública nas Américas (1918-1968)**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2016.

MALLOCH, D.; CAIN, R. F. The Trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. **Canadian Journal of Botany**, v. 50, n. 12, p. 2613–2628, 1972.

MANHONG, S.; XINGZHONG, L.; ZHIBO, J. Effects of *Paecilomyces lilacinus* on egg hatching and juvenile mortality of *Heterodera glycines*. **Acta Phytophylacica Sinica**, v. 29, n. 1, p. 57–61, 2002.

MANNINO, M. C. et al. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **Journal of fungi**, v. 5, n. 2, p. 33, 2019.

MAYILSAMY, M. Extremely Long Viability of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Eggs Stored Under Normal Room Condition. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p. 878–880, 2019.

MENG, H. et al. Cloning and expression analysis of the chitinase gene *Ifu-chit2* from *Isaria fumosorosea*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 381–389, 2015.

MENT, D. et al. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**, v. 114, n. 1, p. 49–56, 2010.

MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020**. Brasília: Secretaria em Vigilância da Saúde, 2020a. Disponível em: <<https://www.rets.epsjv.fiocruz.br/biblioteca/boletim-epidemiologico-da-febre-amarela-no-brasil-20192020>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em 2020, até a SE 45**. Brasília: Secretaria em Vigilância da Saúde, 2020b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Secretaria em Vigilância da Saúde, 24 dez. 2020c. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_51.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf)>.

MNYONE, L. L. et al. Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 309, 2009.

MOHAMMADI, S.; SOLTANI, J.; PIRI, K. Soilborne and invertebrate pathogenic *Paecilomyces* species show activity against pathogenic fungi and bacteria. **Journal of Crop Protection**, v. 5, n. 3, p. 377–387, 2016.

MONDAL, S. et al. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2016.

MONJIL, M. S.; AHMED, S. *Paecilomyces lilacinus* on egg hatching and larval population of *Moloidogyne* sp. **Bangladesh Journal of Plant Pathology**, v. 33, p. 71–78, 2017.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, 2018.

MORENO-GAVÍRA, A. et al. *Paecilomyces* and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1746, 2020.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Phytonematode Pathology: Ultrastructural Studies. II. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* Eggs and Larvae by *Paecilomyces lilacinus*. **Nematropica**, v. 14, n. 1, p. 57–71, 1984.

MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005625, 2017.

MURAD, A. M. et al. Screening and secretomic analysis of entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 3, p. 333–338, 2007.

- NAJAFI, F. et al. In Vitro Assay of Paecilomyces lilacinus biocontrol effects on Fasciola hepatica eggs illustrated in scanning electron micrographs. **Iranian journal of parasitology**, v. 12, n. 1, p. 22, 2017.
- NESHA, R.; SIDDIQUI, Z. A. Effects of Paecilomyces lilacinus and Aspergillus niger alone and in combination on the growth, chlorophyll contents and soft rot disease complex of carrot. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 258–264, 2017.
- NETO, M. F. DE A. et al. Identification of novel Aedes aegypti odorant-binding protein 1 modulators by ligand and structure-based approaches and bioassays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–13, 2020.
- NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 108–116, 1988.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 357–374, 2013.
- PAL, S.; WU, L. P. Lessons from the Fly: Pattern Recognition in Drosophila melanogaster. In: KISHORE, U. (Ed.). **Target Pattern Recognition in Innate Immunity**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, v. 653, p. 162-174, 2009.
- PANT, C. P.; YASUNO, M. Field Studies on the Gonotrophic Cycle of Aedes Aegypti in Bangkok, Thailand. **Journal of Medical Entomology**, v. 10, n. 2, p. 219–223, 1973.
- PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. 1. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2002. v. 1
- PAZ, A. D. C. **Avaliação da competência vetorial de populações de Aedes albopictus de Manaus, Amazonas ao Zika Vírus**. Dissertação—Manaus: Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2018.
- PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 538–545, 2018.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Penicillium and Related Genera. In: PITT, J. I.; HOCKING, A. D. (Eds.). **Fungi and Food Spoilage**. Boston, MA: Springer US, 1997. p. 203–338.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. DE O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 813–816, 2003.

POMBO, A. P. M. M. **Aedes aegypti: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no município de São Paulo**. Tese de doutorado—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2016.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 844–849, 2005.

PONTES, G. O. **Seleção de fungos filamentosos de solos da Amazônia para controle biológico de larvas e adultos de Aedes aegypti L, vetor dos vírus da dengue, chikungunya e zika**. Tese—Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2018.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. suppl 1, p. 11–17, 2013.

PRADO, F. B. et al. Feasibility of protease production by Aspergillaceae species and screening of coagulants from bovine milk. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 16356–16373, 2021.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental & Comparative Immunology**, Insect innate immunity in China. v. 83, p. 96–103, 2018.

RAHMAN, R. U. et al. Insecticide resistance and genetic structure of *Aedes aegypti* populations from Rio de Janeiro State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0008492, 2021.

RAMIREZ, J. L. et al. Strain-specific pathogenicity and subversion of phenoloxidase activity in the mosquito *Aedes aegypti* by members of the fungal entomopathogenic genus *Isaria*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

RAPER, K.; THOM, C. **A manual of Penicillia**. 1. ed. Baltimore: MD, 1949. v. 1

RESCK, M. E. B. et al. Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13642, 2020.

REZENDE, G. L. et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. **BMC Developmental Biology**, v. 8, n. 1, p. 82, 2008.

RIZZOLI, A. et al. Parasites and wildlife in a changing world: The vector-host- pathogen interaction as a learning case. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, n. 1, p. 394–401, 2019.

RODRIGUES, J. et al. Efficacy of *Culicinomyces* spp. against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 157, n. 1, p. 104–111, 2018.

SAIMA et al. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2013.

SAJJAD, H.; ARIF, N. Biological Control of Mosquito Vectors. **Scientific Inquiry and Review**, v. 3, n. 1, p. 25–32, 2019.

SAMSON, R. A. **Paecilomyces and some allied hyphomycetes**. 6. ed. Netherlands: Studies in Mycology, 1974. v. 1

SAMSON, R. A. et al. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. **Persoonia**, v. 22, n. 1, p. 14, 2009.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LATGÉ, J.-P. **Atlas of entomopathogenic fungi**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988. v. 1

SÁNCHEZ-PÉREZ, L. DE C. et al. Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. **Advances in Enzyme Research**, v. 02, n. 02, p. 65–76, 2014.

SANTOS, A. H. et al. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v. 50, n. 1, p. 37–42, 2009a.

SANTOS, F. J. DOS et al. **Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos II - *Hirsutella thompsonii* (Fischer)** Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009b. Disponível em:

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/513522/1/bp43.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2021.

SCHOLTE, E.-J. et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of insect science**, v. 4, n. 1, p. 19, 2004.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Metarhizium anisopliae enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267–1274, 2010.

SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; KRISHNAMOORTHY, R. Chapter 41 - Paecilomyces. In: AMARESAN, N. et al. (Eds.). . **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. 1. ed. India: Academic Press, 2020. v. 1p. 793–808.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5–6, p. 413–423, 2003.

SHEPARD, D. S. et al. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 8, p. 935–941, 2016.

SIGLER, L. et al. Disseminated Mycosis in Veiled Chameleons ( *Chamaeleo calyptratus* ) Caused by *Chamaeleomyces granulomatis* , a New Fungus Related to *Paecilomyces viridis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3182–3192, 2010.

SILVA, W. R. DA et al. Oviposition of *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 and *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) under laboratory and field conditions using ovitraps associated to different control agents, Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 4, p. 304–310, 2018.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 2012.

SINGARAVELU, G.; MAHALINGAM, S.; BHARATHI, K. J. Predatory efficiency of larvivorous fish, *Gambusia affinis* on the mosquito larvae of *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Current Science**, p. 512–514, 1997.

SINHA, K. K.; CHOUDHARY, A. KR.; KUMARI, P. Chapter 15 - Entomopathogenic Fungi. In: OMKAR (Ed.). **Ecofriendly Pest Management for Food Security**. San Diego: Academic Press, p. 475-505, 2016.

SKINNER, M.; PARKER, B. L.; KIM, J. S. Chapter 10 - Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. In: ABROL, D. P. (Ed.). . **Integrated Pest Management**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 169–191.

SOUSA, N. A. et al. New insights on the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulation and application against *Aedes aegypti* eggs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 193–199, 2013.

STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciencia e tecnologia de alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382–385, 1998.

STERCHI, E. E.; STÖCKER, W. (EDS.). **Proteolytic Enzymes: Tools and Targets**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999.

STRASSER, H.; VEY, A.; BUTT, T. M. Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 6, p. 717–735, 2000.

SUNG, G.-H. et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, n. 1, p. 5–59, 2007.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275–277, 2006.

TAZI, H. et al. Biocontrol potential of nematophagous fungi against *Meloidogyne* spp. infecting tomato. **Organic Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 63–71, 2021.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)**. 1. ed. Manaus: EDUA, 2011. v. 1

TRAGER, W. Cell size in relation to the growth and metamorphosis of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 76, n. 3, p. 467–489, 1937.

TSUNODA, T. et al. Effect of body size and sugar meals on oviposition of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 35, n. 1, p. 56–60, 2010.

- VALERO-JIMÉNEZ, C. A. et al. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 41–49, 2016.
- VALLE, D. et al. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, n. 8, p. 701–708, 1999.
- VALLE, D. et al. **Aedes de A a Z**. 1. ed. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2021.
- VALLE, D.; PIMENTA, D.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.
- VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. DA. **Dengue: teorias e práticas**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2015.
- VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, v. 1, n. 1, p. 311–346, 2001.
- VONTAS, J. et al. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Special Issue: Molecular Approaches to Pest Control, Toxicology and Resistance. v. 104, n. 2, p. 126–131, 2012.
- VU, V. H.; HONG, S. I.; KIM, K. Selection of Entomopathogenic Fungi for Aphid Control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 498–505, 2007.
- VYAS, H.; SHARMA, M. K.; BHARGAVA, S. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* against Reniform Nematode, *Rotylenchulus reniformis* on Brinjal. **Indian Journal of Nematology**, v. 41, n. 2, p. 212–214, 2011.
- WANG, C.; ST LEGER, R. J. The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 5, p. 808–816, 2007.
- WANG, C.; WANG, S. Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. **Annual Review of Entomology**, v. 62, n. 1, p. 73–90, 2017.
- WANG, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Affecting Factors of Germination and Appressoria Formation of *Paecilomyces Farinosus*. **Journal of Shanxi Agricultural Sciences**, v. 37, n. 4, p. 66–69, 2009.

WHO. **Ethical issues associated with vector-borne diseases: report of a WHO scoping meeting**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WHO. **Yellow fever**World Health Organization, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 20 jul. 2021

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

Acesso em: 20 jul. 2021

YING, S.-H.; FENG, M.-G. A conidial protein (CP15) of *Beauveria bassiana* contributes to the conidial tolerance of the entomopathogenic fungus to thermal and oxidative stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1711–1720, 2011.

YOUSSEF, M. M. A.; EL-NAGDI, W. M. A.; LOTFY, D. E. M. Evaluation of the fungal activity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* as biocontrol agents against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on cowpea. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 44, n. 1, p. 112, 2020.

ZARA, A. L. DE S. A. et al. *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.

ZHANG, L.; SHI, W.-B.; FENG, M.-G. Histopathological and molecular insights into the ovicidal activities of two entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, n. 1, p. 73–78, 2014.

ZHANG, W. et al. Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. **Cellular Signalling**, p. 110003, 2021.

ZHANG, Y. et al. 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**, v. 76, n. 7, p. 2262–2270, 2010.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly

*Paecilomyces fumosoroseus* ): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.

ZORRILLA, C. D. et al. Zika Virus Infection in Pregnancy: Maternal, Fetal, and Neonatal Considerations. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl\_10, p. S891–S896, 2017.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A — COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO TRABALHO

<b>Ágar extrato de malte (MEA)</b>	
Extrato de Malte	20 g
Peptona	1g
Glucose	20g
Ágar	20g
Água destilada	1L

<b>Ágar-água</b>	
Água	1000mL
Ágar	20g

<b>Ágar-leite-gelatina</b>	
*Leite	5%
gelatina	5%
Ágar	90%

<b>Meio mínimo suplementado</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2%
MgSO <sub>4</sub>	0,03%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4%
FeCl <sub>3</sub>	1,4%
Fragmento de ovos	0,5%

<b>Ágar-quitina</b>	
Fosfato de sódio	6g
Fosfato de potássio	3g
Cloreto de sódio	0,5g
Extrato de levedura	0,05g
Quitina coloidal	1%
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

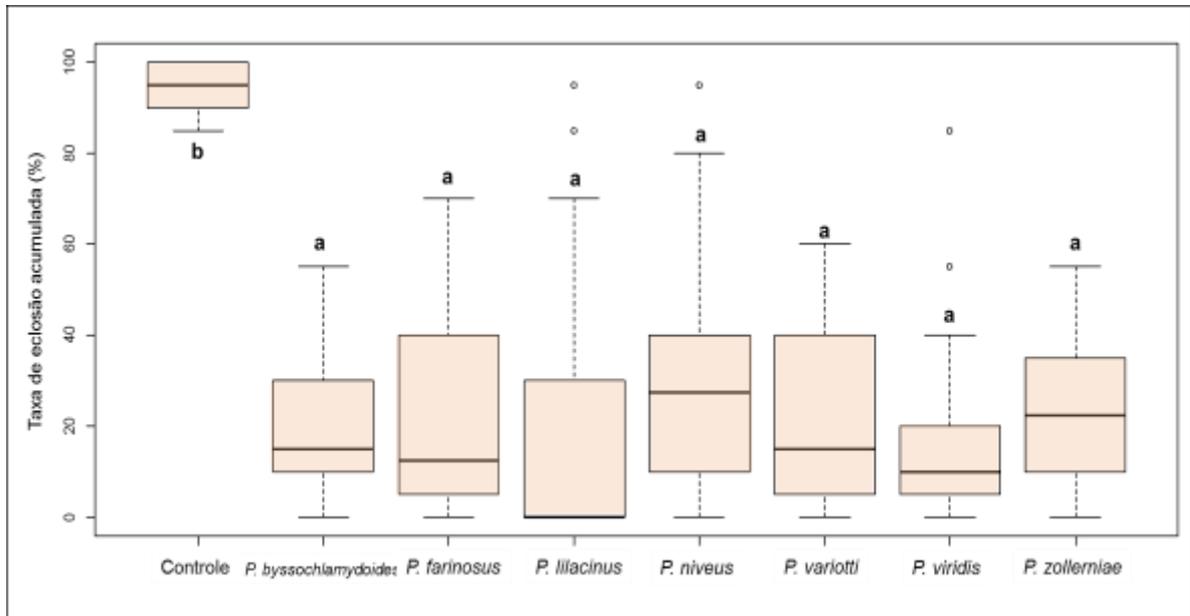
<b>Meio mínimo (MM)</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2%
MgSO <sub>4</sub>	0,03%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4%
FeCl <sub>3</sub>	1,4%

Observações:

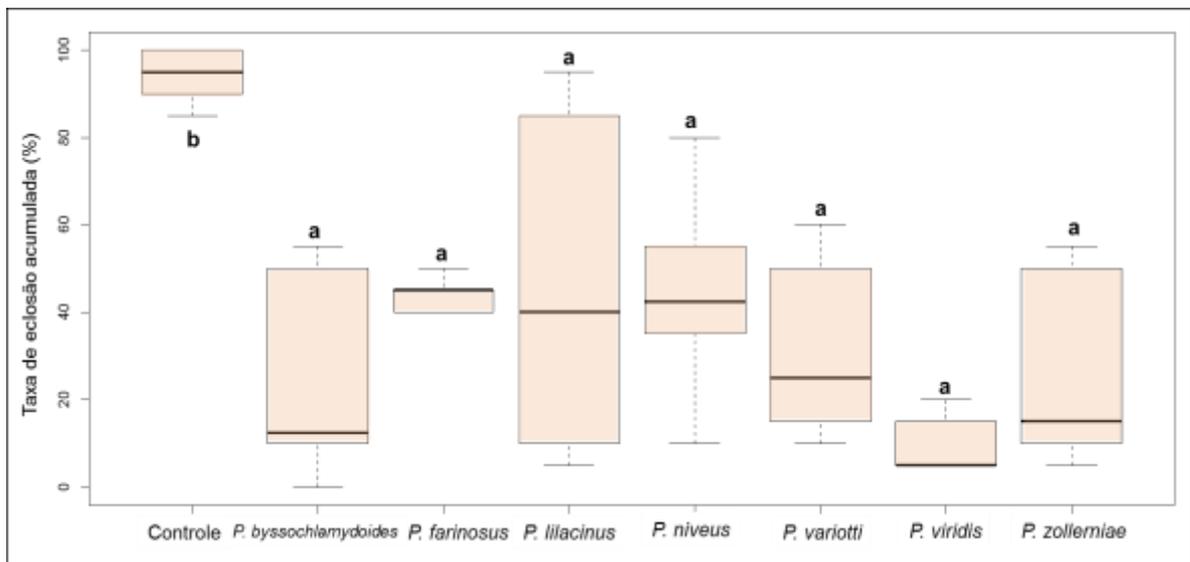
\*A solução de leite a 5% foi esterelizada em vapor fluente por 10 minutos;

Todos os meios de cultura foram esterelizados por vapor úmido durante 15 minutos.

## APÊNDICE B — DADOS COMPLEMENTARES DOS BIOENSAIOS



**Gráfico 15** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão acumulada considerando os ovos eclodidos durante e após o bioensaio em diferentes concentrações. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde a mediana, sendo que o símbolo ° representa valores *outliers*. As letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 16** — Diagrama de caixa (*boxplot*) da taxa de eclosão acumulada considerando os ovos eclodidos durante e após o bioensaio quando submetidos à concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL. A linha horizontal dentro de cada caixa corresponde a mediana e as letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).