



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –  
CITA

**FUNGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL  
PARA O CONTROLE DE LARVAS DE**  
*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

**GLEISON RAFAEL QUEIROZ MENDONÇA**

RIO BRANCO - AC  
OUTUBRO - 2021

**GLEISON RAFAEL QUEIROZ MENDONÇA**

**FUNGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL  
PARA O CONTROLE DE LARVAS DE**  
*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

**Orientadora:** Dra. Clarice Maia Carvalho

**Co-orientadora:** Dra. Leila Priscila Peters

RIO BRANCO - AC  
OUTUBRO – 2021

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

M539f Mendonça, Gleison Rafael Queiroz, 1995 -  
Fungos da região amazônica com potencial para o controle de larvas  
de *Aedes Aegypti L.* (Diptera: Culicidae) / Gleison Rafael Queiroz  
Mendonça; orientador: Prof. Dr. Clarice Maia Carvalho e co-orientadora:  
Dra. Leila Priscila Peter. – 2021.  
79 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de  
Pós- graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio  
Braco, 2021.

Inclui referências bibliográficas.

1. Controle Biológico. 2. Arboviroses. 3. *Metarhizium*. I. Carvalho,  
ClariceMaia (Orientador). II Peter, Leila Priscila (Coorientadora). III. Título.

CDD: 610.7

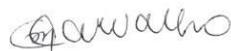
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E  
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

**FUNGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL  
PARA O CONTROLE DE LARVAS DE**

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

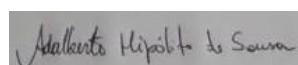
GLEISON RAFAEL QUEIROZ MENDONÇA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 29 de outubro de 2021



---

Dra. Clarice Maia Carvalho  
Universidade Federal do Acre



---

Dr. Adalberto Hipólito Sousa  
Universidade Federal do Acre



---

Dr. Lucas Martins Lopes  
Universidade Federal do Acre

À minha mãe, Maria Antonia da Silva  
Queiroz.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, por todo apoio até aqui. Isso não seria possível sem seus ensinamentos e esforços para me manter na Universidade. Todas as vitórias da minha vida serão sempre dedicadas a você. Obrigado por ter sempre acreditado e apostado em mim!

Ao meu amor, Anderson Pereira Evangelista, por ser minha base emocional, me ensinar sobre ser forte e sobre como encarar a vida com maestria. Sonhamos tanto com essa conquista, e hoje é um prazer vivê-la em realidade ao seu lado. Você é o protagonista da minha história.

À minha orientadora Clarice Maia Carvalho, pelas oportunidades, confiança e parceria desde outubro de 2014. Até aqui são sete anos de trabalho em equipe e o sentimento é somente gratidão. Você é a grande responsável pela minha paixão por pesquisa. Obrigado por tudo!

A todos os meus familiares e amigos, em especial, Gabriela Queiroz Mendonça, Gustavo Queiroz Mendonça, Emily Pereira e Matheus Barroso.

Aos meus amigos de mestrado Natália Andrade, Adevânia Amin e Dheme Rebouças.

A toda equipe LABMICRO, principalmente àqueles que me ajudaram com as coletas durante o mestrado: Fernanda Viana, Geyse Santos, Bruno Jhosef, Atilon Araújo, Laryssa Prado, Leila Peters e Thalya Rodrigues.

À Universidade Federal do Acre por disponibilizar recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

Ao Santander pela concessão de bolsa pelo Programa de Bolsas Ibero Americanas.

Emancipem-se da escravidão mental  
Ninguém além de nós mesmos pode libertar nossas mentes  
Não tenham medo da energia atômica  
Porque nenhum deles pode parar o tempo  
Redemption Song – Bob Marley

## RESUMO

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) é o principal transmissor dos quatro vírus de maior impacto na saúde humana, causadores da dengue, zika, chikungunya e febre amarela. A maneira mais eficaz de combater essas arboviroses é controlando o mosquito vetor, onde fungos entomopatogênicos são aplicáveis. Assim, esse estudo tem como objetivo desenvolver formulações com fungos entomopatogênicos para o controle de larvas de *Aedes aegypti*. O capítulo I é uma revisão sistemática dos estudos realizados entre os anos 2000-2020 com fungos entomopatogênicos nativos do Brasil para controlar o mosquito vetor *Ae. aegypti*. Nas plataformas Google Acadêmico, Science Direct, Pubmed e Scielo foram utilizados os descritores “entomopathogenic fungi; *Aedes aegypti*; Brazil”. Foram obtidos 2.361 artigos, e após analisados os critérios de inclusão, foram selecionados 30 artigos. *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os fungos mais estudados contra *Ae. aegypti* no Brasil, citado em 36,6% e 12,2% dos estudos, respectivamente. *Ae. aegypti* adulto é o estágio de desenvolvimento mais avaliado, e os adjuvantes mais frequentemente citados para elaboração de formulações são óleos mineral e vegetais. Em associação com *M. anisopliae*, o único agente químico avaliado é Imidacloprida, eficaz para controlar o adulto de *Ae. aegypti*. Este estudo expõe as lacunas que constantemente precisam ser preenchidas para o desenvolvimento de novos bioproductos para o controle de *Ae. aegypti*. O capítulo II é um estudo experimental que selecionou fungos com potencial entomopatogênico contra larvas de *Ae. aegypti* e desenvolveu formulações que otimizou a ação de controle em condição semi-campo. 23 estirpes fúngicas isoladas de solos da Amazônia foram submetidas ao seleção inicial. Foram depositadas 20 larvas de *Ae. aegypti* em erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL da suspensão conidial na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL durante a seleção inicial e  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  conídios/mL durante a determinação da CL50. Foi avaliada a compatibilidade entre os fungos e adjuvantes óleo mineral e óleos vegetais nas concentrações 0,1, 0,5 e 1%. Foi avaliado o potencial entomopatogênico das formulações fúngicas que consistiu em suspensão conidial, na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL, acrescido de óleo mineral ou vegetal a 0,1% contra 20 larvas. Os tratamentos foram mantidos em laboratório e semi-campo durante 5 dias. *Beauveria* sp. (4.458) (CL50 =  $8,66 \times 10^3$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) (CL50 =  $2,37 \times 10^4$ ) e *Metarhizium anisopliae* (4.910) (CL50 =  $2,55 \times 10^4$ ) foram significativamente mais efetivos no controle larval de *Ae. aegypti*. O óleo mineral foi melhor compatível em todos os tratamentos avaliados. *Metarhizium anisopliae* (4.910) formulado com óleo mineral elevou a mortalidade larval a 100% no 4º dia em laboratório e no 5º dia em semi-campo. As formulações fúngicas desenvolvidas nesse estudo representam uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de estratégias potentes de controle de *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** Controle Biológico. Arboviroses. *Metarhizium*. *Beauveria*.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is the main transmitter of the four viruses with the greatest impact on human health, causing dengue, zika, chikungunya and yellow fever. The most effective way to combat these arboviruses is to control the mosquito vector, where entomopathogenic fungi are applicable. Thus, this study aims to develop formulations with entomopathogenic fungi for the control of *Ae. aegypti* larvae. Chapter I is a systematic review of studies carried out between the years 2000-2020 with entomopathogenic fungi native to Brazil to control the mosquito vector *Ae. aegypti*. On the Google Academic, Science Direct, Pubmed and Scielo platforms, the descriptors “entomopathogenic fungi; *Aedes aegypti*; Brazil”. 2,361 articles were obtained, and after analyzing the inclusion criteria, 30 articles were selected. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* are the most studied fungi against *Ae. aegypti* in Brazil, cited in 36.6% and 12.2% of the studies, respectively. *Ae. aegypti* adult is the most evaluated stage of development, and the most frequently cited adjuvants for formulating are mineral and vegetable oils. In association with *M. anisopliae*, the only chemical agent evaluated is Imidacloprid, effective to control the adult of *Ae. aegypti*. This study exposes the gaps that constantly need to be filled for the development of new bioproducts for the control of *Ae. aegypti*. Chapter II is an experimental study that selected fungi with entomopathogenic potential against *Ae. aegypti* and developed formulations that optimized the control action in semi-field condition. 23 fungal strains isolated from Amazonian soils were submitted to initial selection. Twenty larvae of *Ae. aegypti* in 125 mL erlenmeyer flasks, containing 20 mL of the conidial suspension at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia/mL during the initial selection and  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  conidia/mL during the determination of LC50. The compatibility between fungi and mineral oil adjuvants and vegetable oils at concentrations 0.1, 0.5 and 1% was evaluated. The entomopathogenic potential of the fungal formulations was evaluated, which consisted of a conidial suspension, at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia/mL, plus 0.1% mineral or vegetable oil against 20 larvae. Treatments were maintained in laboratory and semi-field for 5 days. *Beauveria* sp. (4.458) (LC50 =  $8,66 \times 10^3$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) (LC50 =  $2,37 \times 10^4$ ) and *Metarhizium anisopliae* (4.910) (LC50 =  $2,55 \times 10^4$ ) were significantly more effective in controlling *Ae. aegypti*. Mineral oil was better compatible in all evaluated treatments. *Metarhizium anisopliae* (4.910) formulated with mineral oil increased larval mortality to 100% on the 4th day in the laboratory and on the 5th day in semi-field. The fungal formulations developed in this study represent a promising tool for the development of potent *Ae. aegypti* control strategies.

**Key-words:** Biological Control. Arboviruses. *Metarhizium*. *Beauveria*.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ciclo de vida do mosquito vetor <i>Aedes aegypti</i> ..... <b>CAPÍTULO I - ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FROM BRAZIL FOR CONTROL OF <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae): A SYSTEMATIC REVIEW</b>	17
Figure 1. Study selection process.....	38
Figure 2. Frequency of entomopathogenic fungi isolated in Brazil against <i>Ae. aegypti</i> according to their stage of development (egg, larvae and adulthood) in studies published between 2000 and 2020.....	41
Figure 3. Infection mechanisms developed by entomopathogenic fungi in <i>Aedes aegypti</i> . <b>a.</b> Entomopathogen conidia attach to the cuticle of the larva or adulthood mosquito, penetrate the exoskeleton, and cross the integument to reach the hemocele. <b>b.</b> Mycelia and spores of entomopathogens ingested by larvae reach the intestine, causing mosquito mortality. Conidia germinate and penetrate through the midgut epithelium to restart the infective cycle..... <b>CAPÍTULO II - FORMULAÇÕES COM FUNGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae)</b>	45
Figura 1. Taxas de mortalidade larval de <i>Aedes aegypti</i> contra fungos dos gêneros <i>Beauveria</i> e <i>Metarhizium</i> com potencial entomopatogênico da Amazônia.....	62
Figura 2. Árvore filogenética baseada em sequências da região ITS do DNAr, as quais foram alinhadas pelo programa ClustalW usando o programa MEGA v. 11 dos fungos <b>a.</b> <i>Beauveria</i> sp. (4.458), <b>b.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.420) e <b>b.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.910).....	64
Figura 3. Curvas de sobrevivência dos fungos entomopatogênicos nas concentrações $1 \times 10^4$ , $1 \times 10^5$ , $1 \times 10^6$ e $1 \times 10^7$ conídios mL <sup>-1</sup> . <b>a.</b> <i>Beauveria</i> sp. (4.458); <b>b.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.420); <b>c.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.910) .....	66
Figura 4. Avaliação da compatibilidade dos conídios fúngicos com os óleos vegetais das espécies amazônicas <i>Carapa guianensis</i> (andiroba), <i>Copaifera multijulga</i> (copaíba), <i>Bertholletia excelsa</i> (castanha) e óleo mineral nas concentrações 0,1%, 0,5% e 1%. <b>a.</b> <i>Beauveria</i> sp. (4.458), <b>b.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.420), <b>c.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.910) .....	68
Figura 5. Avaliação da entomopatogenicidade de formulações fúngicas contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> em condição laboratório e semi-campo. <b>a.</b> <i>Beauveria</i> sp. (4.458) em laboratório; <b>b.</b> <i>Beauveria</i> sp. (4.458) em semi-campo; <b>c.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.420) em laboratório; <b>d.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.420) em semi-campo; <b>e.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.910) em laboratório; <b>f.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.910) em semi-campo.....	69

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.	
<b>CAPÍTULO I - ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FROM BRAZIL FOR CONTROL OF <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae): A SYSTEMATIC REVIEW</b>		
Tabela 1.	List of articles selected from the pre-defined inclusion criteria, organized according to the study objective, author, year of publication and database from which it was obtained.....	38
Tabela 2.	Fungal strains isolated in Brazil evaluated for entomopathogenic activity against different stages of development of <i>Ae. aegypti</i> in studies published between 2000 and 2020.....	39
Tabela 3.	Formulations of fungal strains isolated in Brazil that were evaluated for potential entomopathogenic activity against different stages of development of <i>Ae. aegypti</i> in studies published between 2000 and 2020.....	41
Tabela 4.	Fungal strains isolated in Brazil that were evaluated for potential entomopathogenic activity associated with chemicals against the adulthood mosquito of <i>Ae. aegypti</i> in studies published between 2000 and 2020.....	42
<b>CAPÍTULO II - FORMULAÇÕES COM FUNGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae)</b>		
Tabela 1.	Taxa de mortalidade larval de <i>Ae. aegypti</i> submetidas aos conídios fúngicos.....	61
Tabela 2.	Correspondência máxima de identidade de nucleotídeos de fungos nativos da Amazônia com potencial entomopatogênico contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> com base em sequências ITS usando análise BLASTn.....	63
Tabela 3.	Concentração-resposta dos fungos <i>Beauveria</i> sp. (4.458), <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.420) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (4.910) contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
bp	Par de base
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CIA	Clorofórmio Álcool Isoamílico
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DENV	Vírus da dengue
DL	Dose letal
df	Graus de liberdade
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Erro Padrão
IC	Intervalo de Confiança
ITS	Internal Transcribed Spacer
M	Molar
Mg	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
N	Número de larvas
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
ppm	Partes por milhão
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rpm	Rotações por minuto
SNK	Student Newman Keuls
TBE	Tris/Borato/EDTA
TL	Tempo letal
Tris HCL	Tris hydrochloride
U	Unidade
YFV	Febre Amarela
ZIKV	Zika vírus
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µM	Micromolar

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
1. O mosquito vetor <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) ..	16
2. Arboviroses transmitidas pelo mosquito vetor <i>Aedes aegypti</i> .....	20
3. Controle químico de <i>Aedes aegypti</i> .....	22
4. Fungos entomopatogênicos como alternativa para controlar <i>Aedes aegypti</i>	25
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO I - ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FROM BRAZIL FOR CONTROL OF <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae): A SYSTEMATIC REVIEW .....</b>	<b>35</b>
1. INTRODUCTION.....	36
2. METHOD .....	37
3. RESULTS .....	37
4. DISCUSSION .....	42
5. CONCLUSIONS .....	47
ACKNOWLEDGEMENT .....	47
REFERENCES .....	47
<b>CAPÍTULO II - FORMULAÇÕES COM FUNGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i> L. (Diptera: Culicidae) .....</b>	<b>52</b>
1. INTRODUÇÃO .....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	55
Manutenção dos fungos e preparação das suspensões de conídios .....	55
Ensaio de virulência contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	55
Caracterização molecular dos fungos entomopatogênicos a larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	56
Avaliação da compatibilidade entre conídios fúngicos e óleos vegetais e mineral.....	58
Avaliação da virulência das formulações fúngicas contra <i>Ae. aegypti</i> em laboratório e semi campo.....	59
Análise estatística.....	60
3. RESULTADOS.....	60
4. DISCUSSÃO.....	71
5. CONCLUSÃO.....	74
AGRADECIMENTOS.....	75
REFERÊNCIAS .....	75
CONCLUSÕES GERAIS.....	79

## INTRODUÇÃO GERAL

O controle de vetores de doenças em humanos tem representado um dos maiores desafios de saúde pública no Brasil e no mundo nas últimas décadas (SALEEM; LOBANOVA et al., 2020). Mundialmente, esses vetores são responsáveis por cerca de 17% das doenças infecciosas e a sua prevalência tende a aumentar (DUGUMA et al., 2020). A rápida urbanização e má gestão da água são aspectos primordiais para a ocorrência e estabelecimento de *Aedes aegypti* no Brasil (BRASIL et al., 2019).

Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) são vetores de arboviroses, representando grande problemática para a saúde pública (RAMIREZ et al., 2019). As fêmeas de *Ae. aegypti* precisam se alimentar a partir do sangue de vertebrados, onde encontram as proteínas necessárias para o desenvolvimento de seus óvulos (SHAW et al., 2018). Essa característica torna *Ae. aegypti* particularmente capaz de transferir diferentes vírus ao homem (KWEKA et al., 2018).

Dentre as principais arboviroses que atualmente afetam a saúde humana, destacam-se dengue, chikungunya, zika e febre amarela (APONTE et al., 2019). Dengue (DENV) é uma doença infecciosa aguda, sendo uma das mais importantes arboviroses (SAEED; ASIF, 2020). Cerca de 2,17 bilhões de pessoas estão em risco de serem infectadas por zika vírus (ZIKV), que tem ganhado atenção mundial devido à sua associação com distúrbios neurológicos congênitos, como a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré (NIKOOKAR et al., 2020). Chikungunya (CHIKV) foi contraída por até 1,3 bilhões de pessoas, e entre 2013 e 2015 infectou 1,4 milhões de pessoas e ocasionou a morte de 191 mil (BASHYAM et al., 2019). Anualmente, é estimado que a febre

amarela (YFV) afete 200 mil pessoas, e ocacione a morte de 30 mil pessoas no mundo (RAGAVENDRAN et al., 2017).

Até então a maneira mais eficiente de combater essas arboviroses é controlando o mosquito vetor (SWALE et al., 2019). Normalmente, o controle de *Ae. aegypti* é obtido com o uso de organofosforados sintéticos e inseticidas piretróides, compostos tóxicos ao meio ambiente (SMITH et al., 2016). O aumento na frequência e dosagem dos inseticidas utilizados resulta em resistência por parte do mosquito (ZARA et al., 2016). Além disso, toxicidade sobre organismos não-alvo, comportamento de oviposição e resistência desses ovos à dessecação, são características que ampliam a busca por novos componentes naturais ativos contra *Ae. aegypti* com menor toxicidade e maior efetividade (GARCIA et al., 2018).

Com isso, a busca por novas estratégias eficazes para controle do vetor *Ae. aegypti* deve ser constante (RAGAVENDRAN et al., 2017). Uma alternativa é o uso do controle biológico com bioproductos desenvolvidos a partir de organismos entomopatogênicos, como fungos, bactérias, nematoides ou baculovírus (TAWIDIAN et al., 2019).

De acordo com a Associação Brasileira de Empresas de Controle Biológico (ABCBio), o mercado crescerá em torno de 15 a 20% nos próximos anos (FARIA, 2017). Avaliado em 2,86 bilhões de dólares em 2016, o mercado de biopesticidas está previsto a atingir, em termos mundiais, 6,60 bilhões de dólares até 2022, superando o crescimento do mercado de pesticidas químicos convencionais (ARTHURS et al., 2018).

Os fungos entomopatogênicos integram grande parte do mercado de biopesticidas (MASCARIN et al., 2019). Estes microrganismos são caracterizados como agentes substitutivos ou complementares ao uso de pesticidas químicos sintéticos em estratégias de manejo de vetores de doenças, devido sua capacidade de infectar insetos (FLORWEILER et al., 2019). São naturais, fáceis de formular, menos tóxicos, sem atividade

residual e fornecem chances limitadas de desenvolvimento de resistência por parte dos insetos (BUTT et al., 2016).

Diversos estudos têm sido conduzidos afim de viabilizar isolados fúngicos efetivos que infectam ovos, larvas e adultos de *Ae. aegypti* (MASCARIN et al., 2018). São relatados a atividade entomopatogênica e a proposição de formulações a partir de estirpes fúngicas das espécies *Beauveria bassiana* (RAGAVENDRAN et al., 2017), *Metarhizium anisopliae* (CAROLINO et al., 2014; LOBO et al., 2016; FLOR-WEILER et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019), *Paecilomyces* spp. (GOMES et al., 2016), *Isaria* spp. (RAMIREZ et al., 2018), entre diversos outros. Outra linha de pesquisa é como integrar estirpes fúngicas e dosagens de inseticidas químicos em campo, como forma de otimizar o controle e reduzir a deposição de produtos químicos no ambiente (PAULA et al., 2019).

O controle biológico de *Ae. aegypti* com um bioproduto desenvolvido a partir de fungos isolados de solos Amazônicos é apresentada como uma ferramenta biotecnológica promissora, porém pouco investigada. Assim, este estudo tem como objetivo selecionar fungos com potencial entomopatogênico contra larvas de *Ae. aegypti* e viabilizar formulações que otimizem a virulência dos fungos entomopatogênicos em condições semi campo no município de Rio Branco, Acre, Brasil.

## REVISÃO DA LITERATURA

### **1. O mosquito vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**

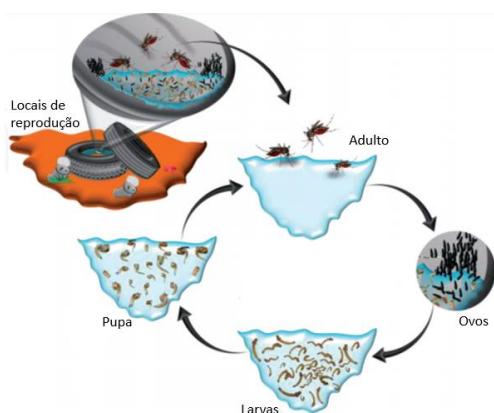
Os mosquitos atuam como um importante componente vetorial capazes de transmitir diversas doenças causadas por inúmeros patógenos e parasitas, que incluem vírus, fungos, bactérias, protozoários e nematoídes (SUESDEK et al., 2019). Biologicamente, isso ocorre porque na postura dos ovos, o sangue se torna um componente nutricional imprescindível, e por isso se alimentam de hospedeiros vertebrados (CARAGATA et al., 2019). Durante esse processo, patógenos já residentes em vertebrados encontram maneiras de serem transmitidos para os mosquitos e vice-versa (COMPTON et al., 2019).

Da enorme variedade de mosquitos já relatados, os representantes da família Culicidae desempenham papel crucial como vetores de transmissão de arboviroses (NARANG et al., 2020). Eles são encontrados em quase todo o planeta terra, ocupando regiões tropicais e subtropicais, onde o clima é favorável e eficiente para o seu desenvolvimento (SOUZA-NETO et al., 2019). Representante da família Culicidae, a espécie *Ae. aegypti* é um dos principais vetores de transmissão de diversas doenças de natureza infecciosa e transmissível, sendo destacáveis a dengue, chikungunya, zika e febre amarela (OLIVEIRA et al., 2020). As soluções para o enorme desafio de controlar esse mosquito podem ser melhoradas com o conhecimento de suas características biológicas, ecológicas e de sua competência como vetor.

A espécie *Ae. aegypti* foi descrita por Linnaeus em 1762, sendo a espécie do gênero *Aedes* mais comumente encontrada como vetor (ANGEL et al., 2020). Os primeiros registros de relatórios que mencionam a ocorrência de *Ae. aegypti* remontam ao ano de 1495 (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1976). Alguns registros mencionam que

essa espécie emergiu do ancestral silvestre *Aedes aegypti* formosus, comum na África subsaariana (SALGUEIRO et al., 2019). A expansão das atividades comerciais humanas facilitou a propagação e estabelecimento de *Ae. aegypti* em diversas partes do mundo (NARANG et al., 2020). É relatado que a região do deserto do Saara tenha sido o primeiro local de ocupação desta espécie, e evidências genéticas mostram que logo após *Ae. aegypti* começar a se desenvolver em pequenos corpos d'água da região do mediterrâneo, foi propagado para o novo mundo em meados dos anos 1900 (SORIA et al., 2016). Com a crescente globalização, a espécie pode ter evoluído de habitar apenas florestas para colonizar áreas urbanas (CDC, 2016).

Esses mosquitos possuem desenvolvimento indireto com quatro estágios bem definidos: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1) (CARVALHO; MOREIRA, 2017). O estágio larval pode ser dividido em quatro estágios caracterizados por seu tamanho e desenvolvimento (YADAV et al., 2020).



**Figura 1.** Ciclo de vida do mosquito vetor *Aedes aegypti*.  
Fonte: JORGE et al., 2019.

*Ae. aegypti* são mosquitos reprodutores internos, se reproduzindo normalmente em recipientes domésticos e peri-domésticos (CHANDRASEGARAN et al., 2020). Para oviposição, as fêmeas buscam por local úmido ou que formem pequenos corpos d'água

(SOUZA-NETO et al., 2019). São colocados cerca de 50 a 100 ovos por vez, que parecem brancos, mas mudam para pretos conforme entram em contato com o ar atmosférico após 2 horas (MUKTAR et al., 2016). Os ovos ovipositados com o auxílio de finos pelos sensoriais presentes na parte inferior do abdômen tem 1mm de comprimento, são macios e flexíveis, mas se tornam resistentes e à prova d'água com o tempo (FOSTER; WALKER, 2019). O embrião se desenvolve dentro dos ovos em 2 a 3 dias e sua viabilidade pode chegar a 1 ano (DEBBOUN et al., 2019).

Em seu primeiro ínstar, após emergir dos ovos e começarem a se contorcer na água, as larvas são brancas e possuem 2,5 mm de comprimento (KWEKA et al., 2018). Nessa fase, sua sobrevivência será garantida a partir do uso de oxigênio atmosférico para respiração, além de se alimentarem de partículas de água e microrganismos aquáticos como bactérias, diatomáceas, algas e detritos (CARVALHO; MOREIRA, 2017).

Quando precisam de ar, as larvas vão até a superfície da água e se alinham a 90°, de modo que os espiráculos, situados na parte posterior do abdômen, sejam mantidos na extremidade superior (JORGE et al., 2019). A larva cresce em tamanho em até quatro mudas, e a cada muda, características morfológicas são visivelmente alteradas (FOSTER; WALKER, 2019).

De 48 a 72 horas após atingir o quarto ínstar, as larvas param de se alimentar, e a cabeça, o tórax e os apêndices alongados se fundem para formar o cefalotórax (MAFRA-NETO et al., 2019). O abdômen termina em duas pás, que auxiliam na propulsão na água (NOUZOVA et al., 2019). As pupas tem formato de vírgula, se estendem sobre a superfície da água e são marrons, mas se tornam mais escuras devido à exposição contínua ao ar (MUKTAR et al., 2016).

O cefalotórax é formado quando uma bolha de ar é aprisionada entre os apêndices, o que ajuda a manter a capacidade de flutuar na superfície da água (CARLIN et al., 2019).

A pupa não se alimenta, e respira por meio das trombetas respiratórias (ANGEL et al., 2020). Alguns dos órgãos larvais, como o tubo digestivo, são destruídos durante a fase de desenvolvimento, enquanto outros órgãos, como o coração e o corpo gorduroso, permanecem intactos (JOSHI et al., 2020).

A pupa se posiciona na superfície da água e começa a consumir o ar em maior intensidade, o que leva ao aumento da pressão corporal interna, e resulta na abertura da cutícula (JORGE et al., 2019). A forma imatura do adulto emerge a partir da cutícula da pupa e permanece na superfície da água até obter energia suficiente para fazer pequenos vôos e residir em nichos adequados para nutrição e desenvolvimento (DEBBOUN et al., 2019).

O mosquito adulto é de cor preta, possui listras brancas e pretas nas patas e um corpo bem desenvolvido consistindo em cabeça, tórax e abdômen (CARVALHO; MOREIRA, 2017). A região da cabeça tem um par de olhos compostos, antenas e peças bucais hábeis (FOSTER; WALKER, 2019). A região do tórax é dividida em protórax, mesotórax e metatórax, possuindo asas e apêndices (NARANG et al., 2020). O abdômen é segmentado, sendo que o último segmento contém ovipositor em fêmeas e edeago nos machos (YADAV et al., 2020).

O adulto é aerodinamicamente estável e possui halteres, que auxiliam no controle sensorial e nos movimentos de vôo (KWEKA et al., 2018). São sexualmente diferenciados em machos e fêmeas, os quais se alimentam de néctar (JORGE et al., 2019). O ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti* consiste na busca por um hospedeiro, a ingestão de uma refeição de sangue, a digestão, maturação dos óvulos e postura dos ovos maduros após a busca de um local adequado (CARVALHO; MOREIRA, 2017).

As fêmeas se alimentam de sangue humano, em 99% dos casos, para obtenção de proteínas que as ajudam no desenvolvimento de ovos (SHAW; CATTERUCCIA, 2019).

Durante a ingestão da refeição sanguínea, o mosquito também injeta sua saliva no hospedeiro, sendo nesse momento que qualquer vírus presente no mosquito é liberado no sangue do hospedeiro (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2018). Se o mosquito está colhendo sangue de um hospedeiro humano infectado com qualquer doença viral, o vírus atinge o intestino do mosquito junto com o sangue (MAFRA-NETO; DEKKER, 2019). Se o mosquito estiver infectado, a saliva que entra no sangue humano pelas glândulas salivares carrega o vírus e infecta o hospedeiro (NOUZOVA et al., 2019).

Para a postura de ovos, a fêmea prefere recipientes ou pequenos nichos cheios de água e os deposita na superfície, um pouco acima da linha d'água, garantindo a entrega dos primeiros ínstares larvais nascidos na água (MUKTAR et al., 2016). Um adulto pode viver por até três ciclos gonotróficos, e a duração de cada ciclo é importante para determinar a frequência com que o mosquito interage com o hospedeiro, sendo uma medida indireta de estimativa da transmissão e aquisição da doença (SHAW; CATTERUCCIA, 2019).

## **2. Arboviroses transmitidas pelo mosquito vetor *Aedes aegypti***

Os vírus transmitidos por artrópodes, denominados arbovírus, além de exigirem replicação no artrópode, que na maioria dos casos são mosquitos-vetores, são capazes de ser transmitidos biologicamente para uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados (FOUET; KAMDEM, 2019). De início, esses arbovírus são patógenos zoonóticos originados em ciclos de transmissão enzoóticos, e envolve hospedeiros que servem como agentes de amplificação ou como reservatório do material genético viral (WEAVER, 2018).

*Aedes aegypti* é o principal vetor de transmissão de doenças como dengue, chikungunya, zika e febre amarela (BASHYAM et al., 2019). Estudos da biologia

evolutiva e genômica desses mosquitos indicam que esta espécie é o vetor mais adequado para a transmissão destas arboviroses (OLIVEIRA et al., 2020). O vetor vive abundantemente em habitats próximos às habitações humanas, se alimenta de sangue humano e tem facilidade em acumular patógenos advindos do hospedeiro humano e permite que ele se replique e se multiplique em suas glândulas salivares (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2018).

Duas famílias de arboviroses são de extrema importância por serem vetorizadas por *Ae. aegypti*: Flavivírus que causam a dengue, zika e febre amarela e Togavírus que causam a chikungunya (TYAGI; DHANASEKARAN, 2018).

O vírus da dengue está circulando em todo o mundo na forma de quatro sorotipos distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CARLIN; SHRESTA, 2019). Estudos relatam que esses sorotipos surgiram do ciclo silvestre que circula nas florestas do Sudeste Asiático (WILDER-SMITH et al., 2019). Embora já existam inúmeros tratamentos quimioterápicos e vacinas em teste, ainda não há um tratamento efetivo contra o vírus da dengue (SAEED; ASIF, 2020). É estimado que ofereça risco a 50% da população mundial, afete 79,6 milhões e cause a morte de 18,4 mil pessoas anualmente em 128 países (ALKHAIBARI et al., 2016). Entre janeiro e setembro de 2020 foram 931.903 notificações de provável infecção por dengue no Brasil (BRASIL, 2020).

O Zika vírus possui um material genético de fita simples, envelopado, icosaédrico, não segmentado (MARTINEZ et al., 2019). O diâmetro das entidades virais é de 40 nm, composto de envelope externo e núcleo denso interno (NIKOOKAR et al., 2020). O tamanho do genoma do ZIKV é de 10.617 nucleotídeos que sintetizam três proteínas de configuração como capsídeos, membranas e o envelope-154, que é responsável por causar virulência (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2018). Os sintomas da infecção pelo ZIKV são geralmente leves, como febre, erupção cutânea e artralgia (CARLIN; SHRESTA,

2019). No Brasil, foram 6.705 notificações de provável infecção por zika entre janeiro e setembro de 2020 (BRASIL, 2020).

O vírus da febre amarela recebe esse nome pois se refere a condições semelhantes à icterícia observadas em pacientes infectados (MERLE et al., 2018). É um vírus com envelope com um nucleocapsídeo e membrana como parte estrutural, enquanto sete proteínas formam as partes não estruturais (WILDER-SMITH et al., 2019). Entre Julho de 2019 e Janeiro de 2020, foram 327 notificações e 1 óbito confirmado por febre amarela no Brasil (BRASIL, 2020).

O vírus chikungunya (etimologia “ficar contorcido”) tem esse nome porque as pessoas infectadas andam encurvadas devido a fortes dores nas articulações (TYAGI; DHANASEKARAN, 2018). É amplamente difundido nos países da África, Sudeste Asiático e na América, incluindo o Brasil (BASHYAM et al., 2019). Foram registrados 71.698 casos de provável infecção por Chikungunya no Brasil entre janeiro e setembro de 2020 (BRASIL, 2020). A doença é caracterizada por febre súbita, erupções cutâneas, dores nas articulações e náuseas (MARTINEZ et al., 2019). Embora se saiba que os pacientes se recuperam, alguns podem continuar a ter dores musculares e sentir dificuldade para andar por meses e até anos (VASCONCELOS et al., 2018).

### **3. Controle químico de *Aedes aegypti***

As classes de inseticidas mais comumente utilizadas em programas de controle de mosquitos vetores são organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (TYAGI; DHANASEKARAN, 2018). O primeiro inseticida organoclorado sintético a ser comercializado, o diclorodifeniltricloroetano (DDT), foi fundamental na campanha global de erradicação da malária liderada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre 1955 e 1969 (MCGREGOR; CONNELLY, 2020).

Dos vários inseticidas produzidos para uso na agricultura, apenas alguns são permitidos pela OMS para o controle de mosquitos (NARANG et al., 2020). A principal razão é que a maioria desses inseticidas são altamente tóxicos para mamíferos e não são degradados facilmente no ambiente, levando à biomagnificação na cadeia alimentar (VIVEKANANDHAN et al., 2018).

Mais recentemente, os piretróides têm sido amplamente usados para o controle de *Ae. aegypti* pois são a única classe de inseticidas recomendados pela OMS para a impregnação de mosquiteiros inseticidas de longa duração (RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.; REYES-VILLANUEVA, 2018).

Inseticidas hábeis em controlar o vetor em sua fase larval na água ainda são incipientes (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2019). Os larvicidas comumente usados são o temefós pertencente à classe dos organofosforados, além do piriproxifeno, um regulador do crescimento de insetos (MARTINEZ et al., 2019). Nessa perspectiva, há uma grande lacuna que precisa ser preenchida com moléculas de novo produtos químicos ou com outras formas de controle, incluindo agentes de controle biológico (MASCARIN et al., 2019).

Outro fator que fomenta a busca por agentes biocontroladores que possam integrar métodos de controle com produtos químicos já usuais, é a resistência a inseticidas, alcançada quando o inseto desenvolve capacidade de tolerar doses de um tóxico que se mostraria letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie (WHO, 1957). Essa capacidade de sobreviver é resultado da exposição repetida a um determinado inseticida por várias gerações (RAMKUMAR; SHIVAKUMAR, 2015). A resistência é um fenômeno biológico multidimensional que depende da interação de múltiplas influências para o seu desenvolvimento (KWEKA et al., 2018).

A resistência a inseticidas é herdada geneticamente e passada para os descendentes (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2019). Essa herança é o resultado de mutação ou duplicação gênica resultando em alterações na fisiologia e no comportamento do indivíduo, promovendo assim a capacidade de sobrevivência (LABBÉ et al., 2011). Os fenótipos de resistência aumentam rapidamente na população, o que acaba resultando no desenvolvimento de resistência a um inseticida químico específico (RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.; REYES-VILLANUEVA, 2018).

O nível de resistência nas populações de insetos depende da quantidade e frequência de uso dos inseticidas e das características inerentes das espécies de insetos selecionadas (CARRASCO et al., 2019). Os mosquitos de *Ae. aegypti* são dotados de todos os atributos adequados para o rápido desenvolvimento de resistência, incluindo alto potencial reprodutivo e ciclos de vida curtos, produzindo várias gerações por temporada com progênie abundante (VIVEKANANDHAN et al., 2018).

Existem diferentes maneiras de desenvolver resistência aos inseticidas sintéticos. O uso contínuo de inseticidas químicos para o controlar mosquitos vetores resulta em metabolismo enzimático aprimorado, insensibilidade no local-alvo, modificação comportamental e penetração ou absorção reduzida (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2019). Os insetos podem desenvolver mais de um dos mecanismos ao mesmo tempo ou o mecanismo atua em diferentes grupos de inseticidas, resultando em resistência cruzada (ZHU et al., 2020).

A resistência metabólica é o mecanismo de resistência mais comum e ocorre devido a mudanças no sistema enzimático de um mosquito que resulta em uma desintoxicação mais rápida do inseticida que o normal, evitando que o inseticida atinja o local de ação pretendido (VONTAS et al., 2020). Nos mosquitos, três sistemas

enzimáticos são importantes: as esterases, as monooxigenases e as glutationa S transferases (MCGREGOR; CONNELLY, 2020).

A resistência do local-alvo ocorre a partir da insensibilidade de um local ativo ao qual um inseticida normalmente se ligaria e atuaria (KWEKA et al., 2018). Essa insensibilidade é ocasionada por alterações na estrutura da proteína do local alvo, o que leva a uma menor afinidade ou menor ação sobre a molécula (ZHU et al., 2020). Isso cancela ou atenua a intensidade na qual os mosquitos seriam afetados pelo inseticida, em comparação com os insetos suscetíveis (LABBÉ, et al., 2011).

A resistência comportamental descreve qualquer modificação no comportamento do inseto que o ajude a evitar os efeitos letais dos inseticidas (CARRASCO et al., 2019). Uma resposta comportamental pode ser dependente ou independente de um estímulo, por exemplo, se os mosquitos evitam um local tratado devido à detecção de um inseticida, ocorre mudanças de comportamento dependente de um estímulo (VIVEKANANDHAN et al., 2018).

A resistência cruzada ocorre quando um mecanismo de resistência, que permite aos insetos resistir a um inseticida, também confere resistência a compostos de uma mesma classe, podendo ocorrer entre classes químicas (KWEKA et al., 2018). O fenômeno da resistência cruzada é relativamente frequente em populações de vetores, caso de *Ae. aegypti*.

#### **4. Fungos entomopatogênicos como alternativa para controlar *Aedes aegypti***

Para atenuar os problemas associados aos agentes de controle sintéticos, são necessários agentes de biocontrole eficazes com alta especificidade para o vetor *Ae. aegypti* (RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.; REYES-VILLANUEVA, 2018). Assim, a aplicação

de fungos entomopatogênicos específicos para controlar *Ae. aegypti* é uma alternativa promissora e eficaz.

Estes fungos são considerados parasitas altamente particularizados, devido às inúmeras adaptações ecomorfológicas aos ciclos de vida de seu hospedeiro (MASCARIN et al., 2018). Em mosquitos adultos, o processo infectivo é iniciado pela penetração direta no tegumento do hospedeiro, através de esporos, que ao entrar em contato com a epicutícula, germinam, e então são capazes de crescer sobre as demais camadas da parede cuticular, através de mecanismos que combinam pressão mecânica com liberação de enzimas proteolíticas (LACEY, 2017). Após penetração, o fungo entomopatogênico é hábil em superar ou evitar diversas defesas imunológicas desenvolvidas evolutivamente pelo hospedeiro, para enfim obter fonte nutritiva e chegar ao final do ciclo, que consiste na proliferação dos esporos fúngicos para novos hospedeiros (BARRA-BUCAREI et al., 2019).

O processo infectivo em larvas ocorre principalmente pela ingestão de esporos durante a alimentação, resultando no acúmulo de esporos no intestino, que se torna fatal quando as endotoxinas são produzidas (PATTNAIK et al., 2018). Outras vias de infecção em larvas aquáticas são através da abertura espiracular ou região anal (HEGELS et al., 2014).

A capacidade dos fungos entomopatogênicos em controlar o vetor é também influenciada por fatores ambientais como temperatura, umidade, exposição à UV e pH (VIVEKANANDHAN et al., 2018). Esses fatores são considerados os principais obstáculos que afetam o processo infectivo desenvolvido por esses microrganismos, comprometendo a viabilidade, a persistência e a virulência dos fungos entomopatogênicos (TAWIDIAN et al., 2019). A virulência dos fungos

entomopatogênicos é, também, diretamente influenciada pela composição genética dos isolados específicos (SHEN et al., 2020).

Dentre os fatores abióticos, uma umidade ideal é necessária para a infecção por entomopatógenos fúngicos, ao passo que em uma umidade mais alta o ambiente torna-se crítico para a esporulação, germinação e invasão do hospedeiro (PATTNAIK et al., 2018). No caso da temperatura, o ideal para o crescimento do fungo não é necessariamente a mesma para o desenvolvimento da doença (LACEY et al., 2017). Geralmente, a temperatura ótima para a infecção efetiva para o hospedeiro está entre 20° C e 30° C (TAWIDIAN et al., 2019). Mudanças de temperatura podem afetar diretamente o desenvolvimento da doença fúngica, mas não necessariamente estar envolvida na inatividade dos fungos (AMARESAN et al., 2020). Além disso, se a temperatura afeta a germinação dos conídios, isso influencia diretamente a concentração de unidades infectantes (VIVEKANANDHAN et al., 2018).

Entre a variedade de espécies de fungos entomopatogênicos usados no controle do mosquito vetor, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os mais frequentemente explorados como agentes de biocontrole (SHEN et al., 2020). Esses fungos são relatados como saprófitas no solo e em plantas, onde se comportam como endófitos ou entomopatógenos, o que pode afetar uma ampla gama de hospedeiros (BOOMSMA et al., 2014). A compreensão do ciclo de vida do agente biológico, além de seus mecanismos e modos de ação no inseto vetor é necessário para o desenvolvimento de formulações entomopatogênicas eficazes (TYAGI; DHANASEKARAN, 2018).

A ampla aceitação e uso de biopesticidas à base de fungos depende de melhorias no desenvolvimento de formulações que possam aumentar a virulência, estender a viabilidade do patógeno e melhorar a eficiência da aplicação, com persistência prolongada no campo (AMARESAN et al., 2020).

As formulações à base de óleo são promissoras para o controle de algumas pragas e vetores de doenças (PATTNAIK et al., 2018). O óleo reduz a dependência das condições saturadas normalmente necessárias para infecções bem-sucedidas, no entanto, ainda é necessário compreender o modo de ação do óleo para facilitar a patogenicidade em campo (TAWIDIAN et al., 2019). É possível que o óleo libere nutrientes ou compostos fungistáticos diluídos na epicutícula que poderiam estimular ou inibir a germinação e infecção (IBRAHIM et al., 2019).

Diversos estudos abordam a possibilidade da utilização de adjuvantes oleosos de origem mineral e vegetal (HURLE et al., 2019). Considerando que os óleos vegetais são biodegradáveis, o óleo mineral em uma formulação fúngica provavelmente aumentará o efeito residual pós-aplicação (FALVO et al., 2020). No entanto, poucos estudos abordam a eficácia de formulações com fungos nativos do Brasil e adjuvantes oleosos de origem mineral ou vegetal contra larvas de *Aedes aegypti*.

## OBJETIVO

### Geral

Desenvolver formulações com fungos entomopatogênicos para o controle de larvas de *Aedes aegypti*.

### Específicos

- ✓ Realizar uma revisão sistemática dos estudos publicados entre os anos 2000 e 2020 que avaliem o potencial entomopatogênico de fungos nativos do Brasil contra *Aedes aegypti*;
- ✓ Avaliar a virulência de isolados fúngicos de solos Amazônicos contra larvas de *Aedes aegypti*;
- ✓ Avaliar a compatibilidade de fungos virulentos com adjuvantes para formulações oleosas;
- ✓ Avaliar a virulência de diferentes concentrações das formulações fúngicas contra larvas de *Aedes aegypti* em laboratório e semi - campo;

## REFERÊNCIAS

- AMARESAN, N. et al. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi**. Academic Press, 2020. 912p.
- ANGEL, B. et al. *Aedes* Mosquitoes: The Universal Vector. In: **Small Bite, Big Threat: Deadly Infections Transmitted by Aedes Mosquitoes**, p. 1-19, 2020.
- APONTE, A. et al. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* from Colombia. **Acta Tropica**, v. 191, n. 1, p. 146-154, 2019.
- ARTHURS, S.; DARA, S. K. Global status of microbial control programs and practices. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, n. 3, p. 1-2, 2019.
- BASHYAM, S. et al. Chikungunya infection—past to future. **Current Medicine Research and Practice**, v. 9, n. 2, p. 58-64, 2019.
- BITENCOURT, R. O. B. et al. In vitro Control of *Aedes aegypti* larvae using *Beauveria bassiana*. **International Journal of Bioengineering and Life Sciences**, v. 12, n. 10, p. 400-404, 2018.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 15. **Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 51, n. 16, 2020.
- BRINKER, P. et al. Host, symbionts, and the microbiome: the missing tripartite interaction. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 480-488, 2019.
- BUTT, T. M. et al. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. In: **Advances in Genetics**. Academic Press, p. 307-364, 2016.
- CARAGATA, E. P.; TIKHE, C. V.; DIMOPOULOS, G. Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 37, n. 1, p. 26-36, 2019.
- CARLIN, A. F.; SHRESTA, S. Genome-wide approaches to unravelling host–virus interactions in Dengue and Zika infections. **Current Opinion in Virology**, v. 34, n. 1, p. 29-38, 2019.
- CAROLINO, A.T. et al. Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2014.
- CARRASCO, D. et al. Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. **Current Opinion in Insect Science**, v. 34, n. 1, p. 48-54, 2019.
- CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species? **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.
- CDC. **Dengue and chikungunya in our backyard: preventing Aedes mosquito-borne disease**. 2015. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/31184>. Acesso em: 03 de Jan 2021.

- CHANDRASEGARAN, K. et al. Linking mosquito ecology, traits, behavior, and disease transmission. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 393-403, 2020.
- CLOUDSLEY-THOMPSON J. L. **Insects and history**, St Martins Press, New York, 1976. 242 p.
- COMPTON, A.; SHARAKHOV, I. V.; TU, Z. Recent Advances and Future Perspectives in Vector-omics. **Current Opinion in Insect Science**, v. 40, n. 1, p. 94-103, 2020.
- DE OLIVEIRA, M. A. S. et al. Repellent activity of essential oils against culicids: A review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 18, n. 1, p. 100328, 2020.
- DEBBOUN, M.; NAVA, M. R.; RUEDA, L. (Ed.). **Mosquitoes, Communities, and Public Health in Texas**. Academic Press, 2019. 408 p.
- DUGUMA, D.; RUEDA, L. M.; DEBBOUN, M. Mosquito-Borne Diseases. In: **Mosquitoes, Communities, and Public Health in Texas**. Academic Press, 2020. p. 319-337.
- FALVO, M. L. et al. Adulticidal Activity of *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) Native Strains From Argentina Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 2, p. 636-640, 2020.
- FARIA, P. Biocontrol in Brazil: opportunities and challenges. AgroPages: **Biopesticide Supplement**. Disponível em: <http://www.agropages.com/magazine/detail-8-179.html>. Acessado em: Out. 2020.
- FLOR-WEILER, L. B. et al. Evaluation of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia in controlling eggs of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 68-82, 2019.
- FOSTER, W. A.; WALKER, E. D. Mosquitoes (Culicidae). In: **Medical and veterinary entomology**. Academic press, 2019. p. 261-325.
- FOUET, C.; KAMDEM, C. Integrated mosquito management: is precision control a luxury or necessity?. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 85-95, 2019.
- GUPTA, R. C. et al. Organophosphates and carbamates. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. Academic Press, 2017. p. 609-631.
- JORGE, M. R. et al. The Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus): The Breeding Sites. In: **Life Cycle and Development of Diptera**. IntechOpen, 2019.
- JOSHI, V. et al. Viral Pathogens: A General Account. **Small Bite, Big Threat: Deadly Infections Transmitted by Aedes Mosquitoes**, CRC Press, p. 81-107, 2020.
- KWEKA, E. J. et al. Ecology of *Aedes* mosquitoes, the major vectors of Arboviruses in human population. In: **Dengue Fever-A resilient threat in the face of innovation**. Intech Open, p. 39-56, 2018.
- LABBÉ, P. et al. Evolution of resistance to insecticide in disease vectors. In: **Genetics and evolution of infectious disease**. Elsevier, p. 363-409, 2011.

- LACEY, L. A. Microbial control of medically important mosquitoes in tropical climates. In: **Microbial Control of Insect and Mite Pests**. Academic Press, p. 409-430, 2017.
- LOBO, L.S. et al. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science Technology**, v. 26, n. 3, p. 386-401, 2016.
- MAFRA-NETO, A.; DEKKER, T. Novel odor-based strategies for integrated management of vectors of disease. **Current Opinion in Insect Science**, v. 34, n. 1, p. 105-111, 2019.
- MARTINEZ, J. D. et al. Going viral 2019: Zika, chikungunya, and dengue. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 1, p. 95-105, 2019.
- MERLE, H. et al. Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. **Journal Francais d'ophtalmologie**, v. 41, n. 6, p. e235-e243, 2018.
- MUKTAR, Y. et al. *Aedes aegypti* as a Vector of Flavivirus. **Journal Tropical Disease**, v. 4, n. 223, p. 2-22, 2016.
- NARANG, J.; KHANUJA, M. **Small Bite, Big Threat: Deadly Infections Transmitted by Aedes Mosquitoes**. CRC Press, 2020. 286p.
- NICOLETTI, M. Past, present, and future of insect-borne diseases. In: **Insect-Borne Diseases in the 21st Century**. Academic Press, p. 1-38, 2020.
- NIKOOKAR, S. H. et al. Zika; a continuous global threat to public health. **Environmental Research**, p. 109868, 2020.
- NOUZOVA, M. et al. Mosquito adaptations to hematophagia impact pathogen transmission. **Current Opinion in Insect Science**, v. 34, n.1, p. 21-26, 2019.
- OLIVEIRA, J. H. et al. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **Developmental & Comparative Immunology**, v. 103, n. 1, p. 103514, 2020.
- PATTERSON, E. I. et al. Exploiting insect-specific viruses as a novel strategy to control vector-borne disease. **Current Opinion in Insect Science**, v. 39, n. 1, p. 50-56, 2020.
- PATTNAIK, S. et al. Entomopathogenic Fungi-Mediated Biocontrol Mechanisms against Mosquito Vectors. In: **Microbial Control of Vector-Borne Diseases**. CRC Press, p. 19-26, 2018.
- PAULA, A. R. et al. Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 163, p. 1-9, 2019.
- RAGAVENDRAN, C. et al. *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **RSC Advances**, v. 7, n. 7, p. 3838-3851, 2017.
- 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. 9896, 2018.

- RAMIREZ, J. L. et al. The *Aedes aegypti* IMD pathway is a critical component of the mosquito antifungal immune response. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2019.
- RODRIGUES, J. et al. Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* sl IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on post mortem conidiogenesis. **Acta Tropica**, v. 193, n. 1, p. 192-198, 2019.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.; REYES-VILLANUEVA, F. Autodissemination. In: **Microbial Control of Vector-Borne Diseases**. CRC Press, p. 19-26, 2018.
- SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. Exome-wide association of deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* from Mexico. **Insect Molecular Biology**, v. 28, n. 5, p. 591-604, 2019.
- SAEED, O.; ASIF, A. Dengue virus disease; the origins. In: **Dengue Virus Disease**. Academic Press, 2020. p. 9-16.
- SHAW, W. R.; CATTERUCCIA, F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 2019.
- SHEN, D.; NYAWIRA, K. T.; XIA, A. New discoveries and applications of mosquito fungal pathogens. **Current Opinion in Insect Science**, v. 40, n. 1, p. 111-116, 2020.
- SMITH, L. B. et al. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, n. 1, p. 1-12, 2016.
- SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, n. 1, p. 191-209, 2019.
- SUESDEK, L. Microevolution of medically important mosquitoes—A review. **Acta Tropica**, v. 191, n. 1, p. 162-171, 2019.
- SWALE, D. R. Perspectives on new strategies for the identification and development of insecticide targets. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 161, n. 1, p. 23-32, 2019.
- TAWIDIAN, P.; RHODES, V. L.; MICHEL, K. Mosquito-fungus interactions and antifungal immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 111, p. 103182, 2019.
- VASCONCELOS, P. F. C; POWERS, A. M.; HILLS, S. The emergence of Chikungunya and Zika Viruses in the Americas. In: **Chikungunya and Zika Viruses**. Academic Press, p. 215-235. 2018.
- VIVEKANANDHAN, P. et al. Bioprospecting of Novel Fungal Secondary Metabolites for Mosquito Control. In: **Microbial Control of Vector-Borne Diseases**. CRC Press, p. 61-89, 2018.
- VIVEKANANDHAN, P. et al. Larvicidal toxicity of *Metarhizium anisopliae* metabolites against three mosquito species and non-targeting organisms. **Plos one**, v. 15, n. 5, p. e0232172, 2020.

- VONTAS, J.; KATSAVOU, E.; MAVRIDIS, K. Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 170, p. 104666, 2020.
- WEAVER, S. C. Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: a challenge for the global virology community. **Antiviral Research**, v. 156, n. 1, p. 80-84, 2018.
- YADAV, N. et al. Chikungunya Fever: Emergence and Reality. In: **Small Bite, Big Threat: Deadly Infections Transmitted by Aedes Mosquitoes**. CRC Press, p. 80-109, 2020.
- ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 1, p. 391-404, 2016.
- ZHU, Q. et al. Synthesis, insecticidal activity, resistance, photodegradation and toxicity of pyrethroids (A review). **Chemosphere**, v. 254, n. 1, p. 126779, 2020.

## CAPÍTULO I - ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FROM BRAZIL FOR CONTROL OF *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): A SYSTEMATIC REVIEW

Artigo submetido a revista Acta Tropica – Qualis A2 na área interdisciplinar

Gleison Rafael Queiroz Mendonça<sup>1</sup>, Leila Priscila Peters<sup>1,2</sup>, Clarice Maia Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil

### ABSTRACT

The control of disease vectors in humans is one of the greatest challenges faced by Brazilian public health policies. *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) transmits pathogens that cause diseases such as dengue, chikungunya, zika, and yellow fever. Several studies aim at the application of entomopathogenic fungi to control *Ae. aegypti*. However, there is little information gathered on studies that assess the entomopathogenicity of fungi native to Brazil. Thus, a bibliographic survey was carried out for a systematic review of studies conducted between 2000 and 2020 with entomopathogenic fungi isolated in Brazil to control the mosquito vector *Ae. aegypti*. The searches were performed in the Google Scholar, Science Direct, Pubmed and Scielo databases. The following descriptors were used: entomopathogenic fungi; *Aedes aegypti*; Brazil. The inclusion criteria were studies on the activity of fungi isolated in Brazil against *Ae. aegypti* between 2000 and 2020; studies that did not use fungi isolated in Brazil or that did not specify the origin of the fungi were excluded. A total of 2,361 articles were retrieved; after application of the inclusion and exclusion criteria, 30 articles were selected. *Metarhizium anisopliae* is the most studied fungus against *Ae. aegypti* in Brazil. It was cited in 36.6% of the studies, followed by *Beauveria bassiana* (12.2%). Adulthood is the most frequently assessed stage of development for *Ae. aegypti*, and mineral and vegetable oils are the most frequently cited adjuvants in formulations. In association with *Metarhizium anisopliae*, the only chemical agent assessed was Imidacloprid, which is effective at controlling adult specimens of *Ae. aegypti*. This study brings a scenario of studies using fungi native to Brazil for the control of *Ae. aegypti* and exposes the gaps that need to be filled for the development of new bioproducts.

**Keywords:** Arboviruses. *Metarhizium anisopliae*. *Beauveria bassiana*.

## 1. INTRODUCTION

Vector mosquitoes, which is the case of *Aedes aegypti*, are capable of transmitting several disease-causing pathogens to humans, including the ones that cause dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), zika (ZIKV) and yellow fever (YFV), creating serious public health problems in Brazil (CARAGATA et al., 2019; BRASIL, 2020).

Technologies aimed at developing vaccines to control the transmission of these arboviruses are still incipient. Therefore, the more common form of combat is to control the vector mosquito *Ae. aegypti* (TYAGI; DHANASEKARAN, 2018). Conventionally, breeding sites are eliminated and chemical and/or biological insecticides are applied in places of proliferation of *Ae. aegypti* (RODRÍGUEZ-PÉREZ; REYES VILLANUEVA, 2018).

Chemical insecticides, such as the organophosphate adulticide Malathion and the larvicide Piriproxifen, are the main current control measures for the vector mosquito in Brazil (BRASIL, 2019). However, the use of these chemical agents has already been found to be ineffective in several regions of the country, owing to increased resistance of larvae and mosquitoes against the active ingredient of various chemicals, such as organophosphates and pyrethroids (GOMES et al., 2015). In addition, these products can damage the environment and harm humans, as emphasized in several studies (VIVEKANANDHAN, 2018).

The use of entomopathogenic fungi to control *Ae. aegypti* in Brazil is a technology that can help reduce the spread of these arboviruses, including strains of generalist fungal entomopathogens isolated in Brazil, such as *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, which are widely studied (MASCARIN et al., 2019). The search for a fungal strain to control *Ae. aegypti* involves several steps, which are developed into studies, with different approaches, from the evaluation of the resistance of these fungi (when under

conditions of abiotic stress) to the analysis of effective control when these strains are associated with additives, in the case of formulations, or even with chemicals currently used to control *Ae. aegypti* (RODRIGUES et al., 2019).

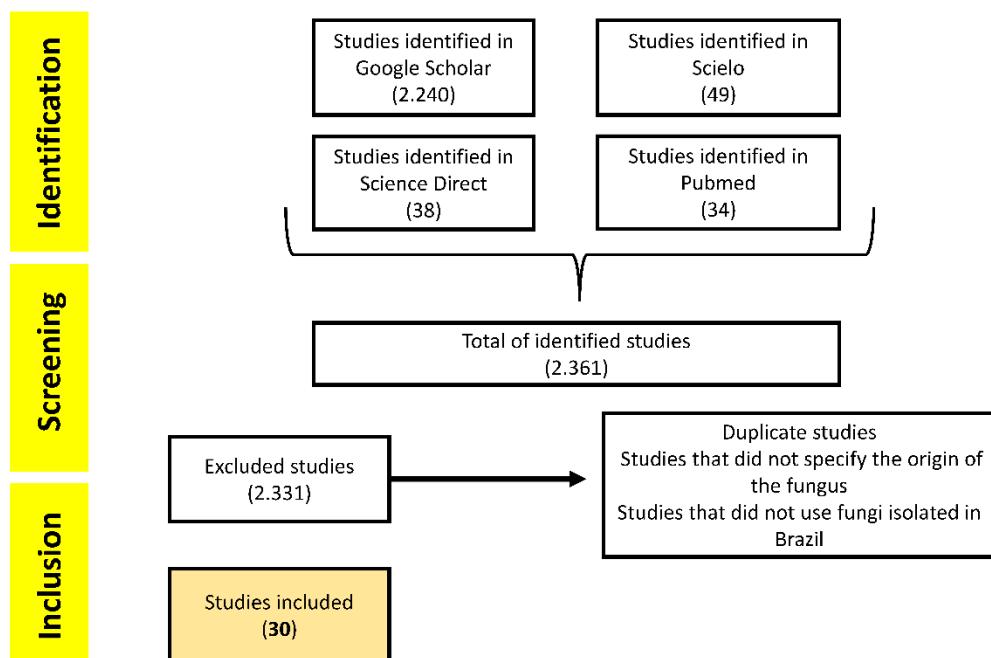
Although a wide range of entomopathogenic fungi has already reported in Brazil, there is little information on promising strains isolated in Brazil that can be developed as a biological product for control of *Ae. aegypti*. Thus, the objective of this study is to gather and update information available on the potential use of entomopathogenic fungi isolated in Brazil to control the vector mosquito *Aedes aegypti*.

## 2. METHOD

This study is a systematic review of studies carried out with fungi isolated in Brazil for the control of the mosquito vector *Aedes aegypti*. The theoretical framework was obtained from the following data platforms: Google Scholar, Science Direct, Pubmed and Scielo. For selection of articles, the following descriptors were used: Entomopathogenic fungi; *Aedes aegypti*; Brazil. The decisive inclusion criterion was studies of the activity of fungi isolated in Brazil against *Ae. aegypti* between the years 2000 to 2020. The exclusion criteria were duplicate articles and studies that did not specify the origin of the fungus or that did not use fungi isolated in Brazil.

## 3. RESULTS

A total of 2.361 articles were obtained from the descriptors Entomopathogenic fungi; *Aedes aegypti*; Brazil. There were 2.240 articles in Google Scholar, 49 articles in Scielo, 38 in Science Direct and 34 articles in Pubmed (Figure 1).



**Figure 1.** Study selection process.

By analyzing the title, abstract and material and methods of the articles, 30 articles were selected for meeting the inclusion criteria (Table 1).

**Table 1.** List of articles selected from the pre-defined inclusion criteria, organized according to the study objective, author, year of publication and database from which it was obtained.

Objective	Author	Year of publication	Data base
in vitro entomopathogenicity (25,8%)	SILVA et al. DE PAULA et al. PEREIRA et al. LELES et al. MONTALVA et al. CAROLINO et al. MONTALVA et al.	2004 2008 2009a 2010 2016 2019 2019	Google Scholar Google Scholar Google Scholar Pubmed Science Direct Google Scholar Science Direct
fungal formulations (22,6%)	LELES et al. SOUSA et al. GOMES et al. LOBO et al. BITENCOURT et al. PAULA et al. RODRIGUES et al.	2012 2013 2015 2016 2018 2019 2019	Springer Pubmed Pubmed Google Scholar Google Scholar Pubmed Science Direct
fungal resistance to abiotic factors (12,9%)	LUZ et al. SANTOS et al. FALVO et al. FALVO et al.	2008 2009 2016 2018	Google Scholar Science Direct Pubmed Google Scholar

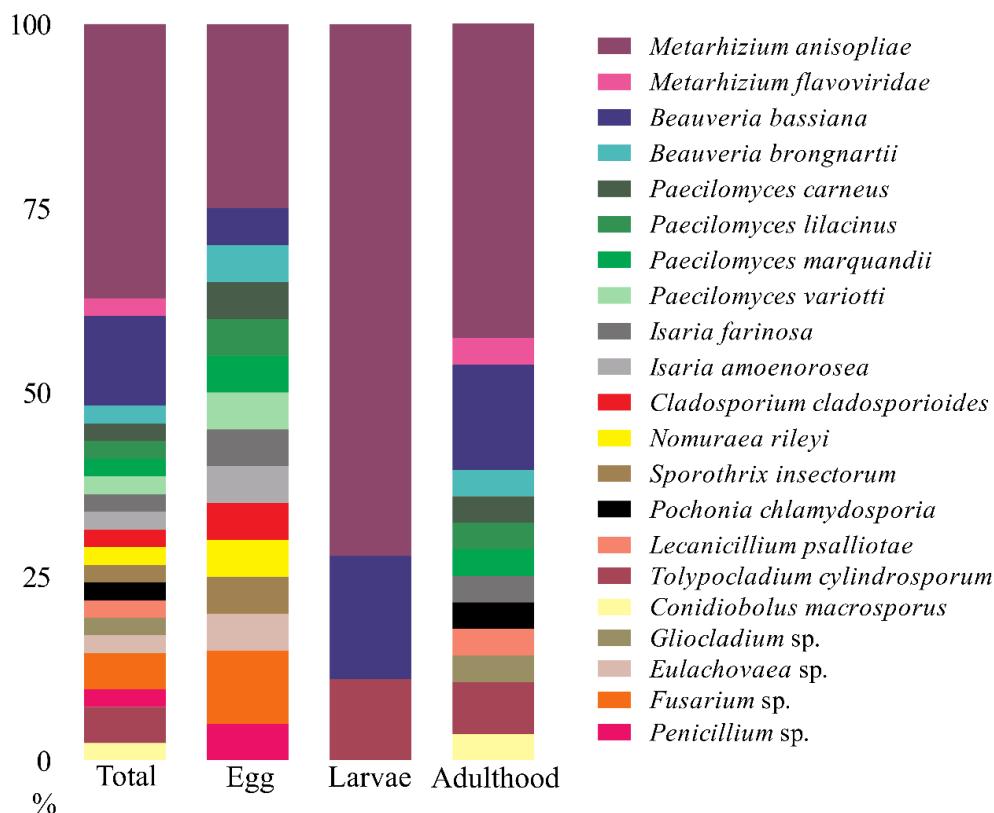
fungal epizootic in <i>Ae. aegypti</i> (9,7%)	PEREIRA et al. PEREIRA et al. ROCHA et al.	2005 2009b 2009	Google Scholar Google Scholar Google Scholar
integration between fungus and some usual chemical product (9,7%)	PAULA et al. PAULA et al. PAULA et al.	2011a 2013a 2013b	Pubmed Pubmed Pubmed
fungi under field conditions (6,4%)	CAROLINO et al. PAULA et al.	2014 2018	Pubmed Pubmed
<i>Ae. aegypti</i> subjected to different nutritional conditions (6,4%)	PAULA et al. CABRAL et al.	2011b 2020	Pubmed Pubmed
insecticidal activity of fungal extracts (6,4%)	BUCKER et al. DANIEL et al.	2013 2017	Google Scholar Google Scholar

From the works analyzed, 41 fungi isolated in Brazil have entomopathogenic activity against *Ae. aegypti* evaluated, among the main ones, are representatives of the species *Metarhizium anisopliae* (36.6%) and *Beauveria bassiana* (12.2%) (Figure 2).

**Table 2.** Fungal strains isolated in Brazil evaluated for entomopathogenic activity against different stages of development of *Ae. aegypti* in studies published between 2000 and 2020.

Fungal strain	Life stage	Mortality	Author
<i>Metarhizium anisopliae</i> IP 46	Egg	98,7%	LUZ et al., 2008
	Egg	LC50 2.8x10 <sup>2</sup> conidia	SANTOS et al., 2009
	Adulthood	100%	LELES et al., 2010
	Egg	47,8% - 74,7%	LELES et al., 2012
	Adulthood	43,8% - 70,8%	FALVO et al., 2016
	Larvae	60% - 90%	FALVO et al., 2018
	Adulthood	LT 50 11,7 days	RODRIGUES et al., 2019
<i>Metarhizium anisopliae</i> ESALQ 818	Adulthood	78,67%	DE PAULA et al., 2008
	Larvae	88%	PEREIRA et al., 2009
	Adulthood	55 - 57,8%	PAULA et al., 2011
	Adulthood	56%	PAULA et al., 2013
	Adulthood	30 - 71,2%	CAROLINO et al., 2014
	Larvae	26,7 - 75,6%	GOMES et al., 2015
	Adulthood	52 - 68%	PAULA et al., 2018
<i>Metarhizium anisopliae</i> IP23	Larvae	100 %	SILVA et al., 2004
<i>Metarhizium anisopliae</i> IP 84	Larvae	100 %	SILVA et al., 2004
<i>Metarhizium anisopliae</i> IP 117	Larvae	100 %	SILVA et al., 2004
<i>Metarhizium anisopliae</i> IP 123	Egg	88,7%	LUZ et al., 2013
<i>Metarhizium anisopliae</i> CG 423	Egg	18,7%	LUZ et al., 2013
<i>Metarhizium anisopliae</i> CG144	Adulthood	40%	DE PAULA et al., 2008
	Larvae	90%	PEREIRA et al., 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i> LPP133	Adulthood	89,33%	DE PAULA et al., 2008

	Adulthood	8%	PEREIRA et al., 2009
	Larvae	48,9 - 76,7%	PAULA et al., 2011
<i>Metarhizium anisopliae</i> LPP45	Adulthood	88,67%	DE PAULA et al., 2008
	Larvae	14%	PEREIRA et al., 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i> LPP 96	Larvae	22%	PEREIRA et al., 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i> LPP 137	Larvae	20%	PEREIRA et al., 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i> LPP 87	Larvae	20%	PEREIRA et al., 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i> LPP 128	Larvae	14%	PEREIRA et al., 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i> LEF 2000	Pupa	Conidia 42,5% Blastospores 100%	CAROLINO et al., 2019
<i>Metarhizium flavoviridae</i> ARSEF 2948	Adulthood	40 %	LELES et al., 2010
	Adulthood	30%	DE PAULA et al., 2008
<i>Beauveria bassiana</i> CG 24	Adulthood	82,7%	PEREIRA et al., 2009
	Larvae	48% – 64%	PAULA et al., 2018
<i>Beauveria bassiana</i> CG 494	Adulthood	70,67%	DE PAULA et al., 2008
	Larvae	6%	PEREIRA et al., 2009
<i>Beauveria bassiana</i> CG 479	Larvae	Blastospores 42% Conidia 57,44%	BITENCOURT et al., 2018
<i>Beauveria bassiana</i> IP3A	Egg	71,2 %	LUZ et al., 2013
<i>Beauveria bassiana</i> LPP27	Adulthood	26%	DE PAULA et al., 2008
<i>Beauveria brongniartii</i> CG619	Adulthood	80 %	LELES et al., 2010
	Egg	18,7%	LUZ et al., 2013
<i>Paecilomyces carneus</i> CG525	Adulthood	100 %	LELES et al., 2010
	Egg	97,5%	LUZ et al., 2013
<i>Paecilomyces lilacinus</i> CG362	Adulthood	100 %	LELES et al., 2010
	Egg	78,7	LUZ et al., 2013
<i>Paecilomyces marquandii</i> CG 190	Adulthood	64 %	LELES et al., 2010
	Egg	94,9%	LUZ et al., 2013
<i>Paecilomyces variotti</i> CG503	Egg	12,5 %	LUZ et al., 2013
<i>Isaria farinosa</i> CG195	Adulthood	92,5 %	LELES et al., 2010
	Egg	98,7%	LUZ et al., 2013
<i>Isaria amoenorosea</i> CG75	Egg	98,7%	LUZ et al., 2013
<i>Cladosporium cladosporioides</i> CG635	Egg	18,7%	LUZ et al., 2013
<i>Nomuraea rileyi</i> CG 381	Egg	13,7%	LUZ et al., 2013
<i>Sporothrix insectorum</i> CG826	Egg	12,5%	LUZ et al., 2013
<i>Pochonia chlamydosporia</i> IP315	Adulthood	85 %	LELES et al., 2010
<i>Lecanicillium psalliotae</i> IP301	Adulthood	100 %	LELES et al., 2010
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> IP 419	Larvae and Adulthood	Larvae 75 - 100% Adult 27,5 - 95%	MONTALVA et al., 2019
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> IP 425	Larvae and Adulthood	Larvae 22,5 - 82,5 % Adult 17,5 - 87,5%	MONTALVA et al., 2019
<i>Conidiobolus macrosporus</i> ARSEF12830	Adulthood	100%	MONTALVA et al., 2016
<i>Gliocladium</i> sp. IP290	Adulthood	70 %	LELES et al., 2010
<i>Eulachovaea</i> sp. IP218	Egg	27,5%	LUZ et al., 2013
<i>Fusarium</i> sp. IP2	Egg	11,2%	LUZ et al., 2013
<i>Fusarium</i> sp. IP4	Egg	1,2%	LUZ et al., 2013
<i>Penicillium</i> sp. IP 182	Egg	80%	LUZ et al., 2013



**Figure 2.** Frequency of entomopathogenic fungi isolated in Brazil against *Ae. aegypti* according to their stage of development (egg, larvae and adulthood) in studies published between 2000 and 2020.

Among the studies evaluated, only six studies (20%) evaluated the entomopathogenic activity of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* with adjuvants in eggs, larvae and adulthoods of *Ae. aegypti* (Table 3).

**Table 3.** Formulations of fungal strains isolated in Brazil that were evaluated for potential entomopathogenic activity against different stages of development of *Ae. aegypti* in studies published between 2000 and 2020.

Fungal strain	Life stage	Adjuvant	Conidia concentration	Mortality	Author
<i>Metarhizium anisopliae</i> IP46	Egg	Mineral oil	3,3 x 10 <sup>3</sup> /10 <sup>4</sup> /10 <sup>5</sup>	CL50 4,8x10 <sup>3</sup> conidia	SOUSA et al., 2013
	Egg	Vegetable oil (graxol - 1 µL)	1x10 <sup>6</sup>	64 - 100%	LOBO et al., 2016
	Adulthood	Mineral oil 0.25 µL			
		Vegetable oil 0.25 µL  Diatomaceous earth 0.6 mg	3.3x10 <sup>6</sup>	LT50 10,2 days	RODRIGUES et al., 2019
	Larvae	Neem oil (0,001%)	1x10 <sup>7</sup> and 1x10 <sup>8</sup>	63,4 - 87,8 %	GOMES et al., 2015

<i>Metarhizium anisopliae</i> ESALQ 818	Larvae	Neem oil (0,01%)	1x10 <sup>9</sup>	83 - 87%	PAULA et al., 2019
<i>Beauveria bassiana</i> CG 479	Larvae	Conidia/Blastospores + Mineral oil (1, 0,5 and 0,1%)	1x10 <sup>7</sup>	83,78 - 91,44%	BITENCOURT et al., 2018

Of the studies with fungi isolated in Brazil, only three (10%) evaluated the entomopathogenic efficacy against *Ae. aegypti* in integration with chemical additives, being tested two strains of *Metarhizium anisopliae* associated with Imidacloprid against the adulthood mosquito (Table 4).

**Table 4.** Fungal strains isolated in Brazil that were evaluated for potential entomopathogenic activity associated with chemicals against the adulthood mosquito of *Ae. aegypti* in studies published between 2000 and 2020.

Fungal strain	Chemical additive	Conidia concentration	Mortality	Author
<i>Metarhizium anisopliae</i> LPP133	Imidacloprid 0,1, 1, 10, 50 and 100 ppm	1x10 <sup>9</sup>	55,6% - 92,3%	PAULA et al., 2011
<i>Metarhizium anisopliae</i> ESALQ 818	Imidacloprid 0,1 ppm	1x10 <sup>9</sup>	56,7% - 61,7%	PAULA et al., 2013a
	Imidacloprid 0,1 ppm	1x10 <sup>9</sup>	69% - 88%	PAULA et al., 2013b

#### 4. DISCUSSION

Of the isolated natives of Brazil, 41 fungal strains were evaluated for entomopathogenic potential against the vector mosquito *Aedes aegypti*. The species *Metarhizium anisopliae* stands out among the others, and its entomopathogenic action has been analyzed at different stages of development of *Ae. aegypti*. Only with the strain *M. anisopliae* IP 46, seven studies reported promising activity against eggs, larvae and adults of *Ae. aegypti* (LUZ et al., 2008; SANTOS et al., 2009; LELES et al., 2010; LELES et al., 2012; FALVO et al., 2016; FALVO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019).

*M. anisopliae* produces a group of cyclic depsipeptides known as destruxins (DTXs), a class of hexadepsipeptides produced by different soil fungi, and most of the 35+ characterized as toxic to insect pests have been described from this species (RAVINDRAN et al., 2016). DTXs are the only toxic compounds ever reported to be present in insect cadavers in sufficient quantities to cause host death (NOWAK et al., 2020).

*Beauveria bassiana* isolates also integrate much of the evidence of entomopathogenicity against eggs, larvae and adults of *Ae. aegypti* (DE PAULA et al., 2008; PEREIRA et al., 2009; LUZ et al., 2013; BITENCOURT et al., 2018; PAULA et al., 2018). *B. bassiana* fungi have a set of genes that enable them to act by oral toxicity. At least thirteen heat-labile bacteria-like enterotoxins, eight Cry-like delta enterotoxins and three bacteria-like zeta toxin proteins have been reported for the species, while other entomopathogenic fungi have one or none. This finding suggests that *B. bassiana* could have greater oral toxicity than other entomopathogenic fungi (MANNINO et al., 2019).

Entomopathogenic fungi have been more frequently used to control the adult stage of *Ae. aegypti*, compared to the other life stages of the vector. This approach usually involves the use of surfaces impregnated with fungi to which the mosquitoes are attracted, and after a brief contact with the fungal inoculum, they become infected and die (FALVO et al., 2020). Black cloths impregnated with *M. anisopliae* have been shown to significantly reduce the survival rates of *Ae. aegypti* under simulated field conditions (PAULA et al., 2019).

When compared to the entomopathogenicity of two strains of *Tolyphocladium cylindrosporum* against larvae and adults of *Ae. aegypti*, it was found that larvae are more susceptible, in comparison to adults, to the effect of the application of this entomopathogen. *T. cylindrosporum* has been often reported as a pathogen against the

larval stage of aquatic mosquitoes (ROCHA et al., 2015). A probable cause could be the capacity of conidial dissemination in breeding sites, resulting in the infection of other larvae and females (MONTALVA et al., 2019).

Six studies evaluated the synergistic effect between isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* with different mineral and/or vegetable oils against eggs, larvae and adults of *Ae. aegypti* (SOUSA et al., 2013; GOMES et al., 2015; LOBO et al., 2016; BITENCOURT et al., 2018; PAULA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019).

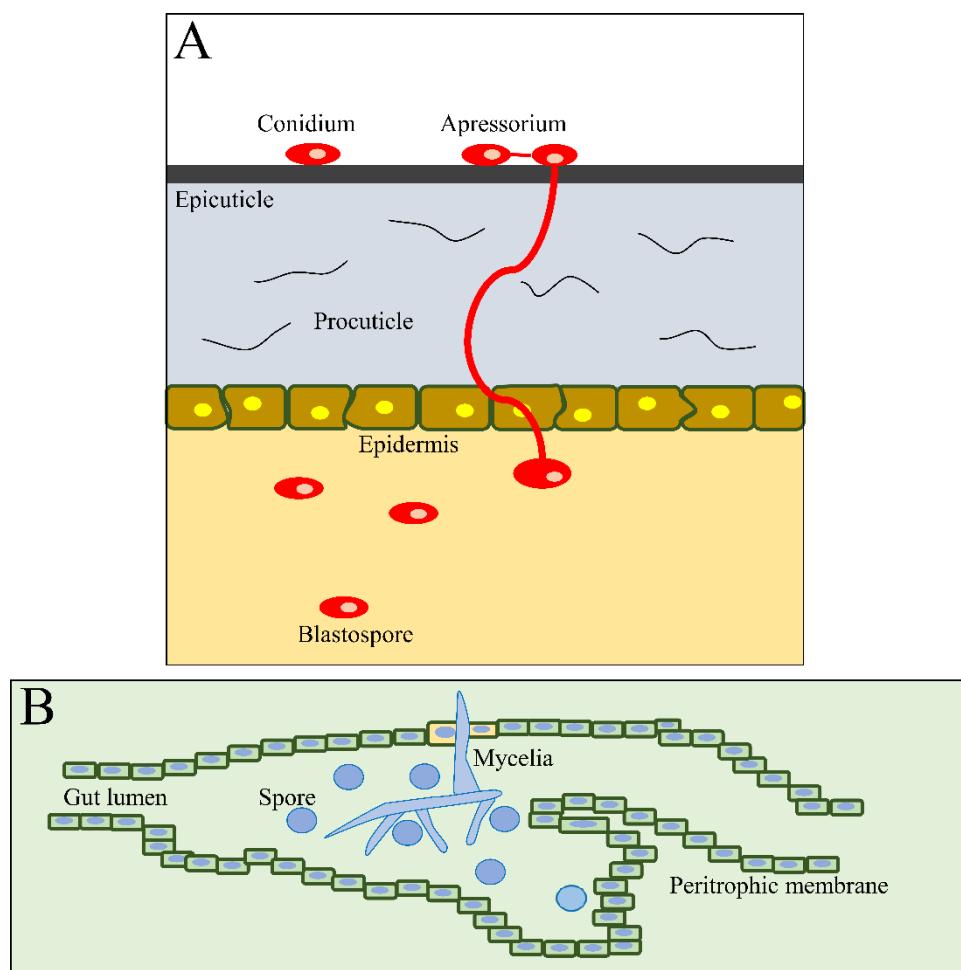
The selection of virulent isolates is crucial for development of bioproducts (TYAGI; DHANASEKARAN, 2018). However, the screening of different types of formulations is also necessary to optimize fungal performance, in addition to minimizing the negative effects caused by abiotic factors (BITENCOURT et al., 2018).

The use of oils associated with entomopathogenic fungi are often applicable for control of vector mosquitoes (LOBO et al., 2016; BITENCOURT et al., 2018). Conidia of *M. anisopliae* formulated in pure mineral oil or associated with water causes conidial adhesion in greater numbers and more homogeneously than in oil-free formulations (RODRIGUES et al., 2019). In addition, oil-formulated propagules develop faster in the cuticle than unformulated conidia (MANNINO et al., 2019). Oils also protect the propagules after application or after adhesion to the cuticle against harmful abiotic stresses (PAULA et al., 2019).

By analyzing the entomopathogenicity of the fungus *M. anisopliae* IP 46 against adults of *Ae. aegypti*, a shorter lethal time to kill 50% of mosquitoes (10.2 days) was found in treatments formulated with mineral oil and vegetable oil, compared to treatment with oil-free formulations (11.7 days) (RODRIGUES et al., 2019).

Conidia of *M. anisopliae* float in water because they have a hydrophobic surface (VIVEKANANDHAN et al., 2020). Thus, when the larvae open their perispiracular

valves for air intake, the conidia reach the insect's surface and attach to the tip of the siphon, so the hyphae grow in the trachea and can kill the insect by asphyxia (MANNINO et al., 2019). If the same conidia are offered with a non-ionic detergent that deposits the spores on the bottom of the container, the larvae can eat them (BUTT et al., 2013). Conidia can also be found in the intestine and kill the insect by secreting toxins, but they do not invade the rest of the host (LACEY et al., 2017).



**Figure 3.** Infection mechanisms developed by entomopathogenic fungi in *Aedes aegypti*. **A.** Entomopathogen conidia attach to the cuticle of the larva or adulthood mosquito, penetrate the exoskeleton, and cross the integument to reach the hemocele. **B.** Mycelia and spores of entomopathogens ingested by larvae reach the intestine, causing mosquito mortality. Conidia germinate and penetrate through the midgut epithelium to restart the infective cycle.

Formulations with diatomaceous earth, which is known to cause abrasive damage to cuticular surfaces, have also been evaluated against *Ae. aegypti* associated with fungi

isolated in Brazil (RODRIGUES et al., 2019). Pioneering studies have reported the efficacy of controlling entomopathogenic fungi associated with diatomaceous earth against triatomine vectors (LUZ et al., 2012).

Two studies (6.6%) compared entomopathogenic efficacy of the strains according to the infective structure being used (BITENCOURT et al., 2018; CAROLINO et al., 2019). Blastopores have morphological characteristics that differentiate them from aerial conidia and make them more effective in water, which is an environment where *Ae. aegypti* is present during most of its life cycle (ALKHAIBARI et al., 2016). This propagule is a hydrophilic structure with a thin cell wall, which makes them less hydrophobic but not necessarily less resistant to adverse environmental conditions in comparison to conidia (BITENCOURT et al., 2018).

The application of entomopathogenic fungi together with chemical insecticides covers different modes of action; applied in combination or at different times, it has become a necessary method (LITWIN et al., 2020). For control of *Ae. aegypti*, findings were reported only from studies that had checked the effectiveness of controlling adults using the fungal species *M. anisopliae* associated with Imidacloprid (PAULA et al., 2011; PAULA et al., 2013).

The association of the fungus *M. anisopliae* LPP133 with Imidacloprid increased adult mortality of *Ae. aegypti* at rates that ranged between 55.6 and 92.3%, compared to treatment without the chemical, which ranged between 48.9 and 76.7% (PAULA et al., 2011). This practice allows the reduction of the application concentrations of chemical insecticides as well as the time of action of the entomopathogen, thus attenuating factors that may limit the acceptance of these control methods.

## 5. CONCLUSIONS

Of the entomopathogenic fungi isolated in Brazil, *Metarhizium anisopliae* is the most studied against *Ae. aegypti*. The adult stage of *Ae. aegypti* is the most evaluated stage of development regarding the entomopathogenicity of fungi isolated in Brazil. The most frequently cited adjuvants for formulations with entomopathogenic fungi isolated in Brazil against *Ae. aegypti* are mineral and vegetable oils. Imidacloprid is the only chemical agent ever evaluated in association with *M. anisopliae* to control the adult of *Ae. aegypti*. The evaluation of the entomopathogenicity of new fungi native to Brazil against eggs, larvae and adults, as well as the effective association between fungi and vegetable oils of native species, in addition to integrating different species of fungi and other chemical products not yet investigated, are gaps to be considered completed to obtain new bioproducts effective in the control of *Ae. aegypti*.

## ACKNOWLEDGEMENT

We thank CAPES for granting the postgraduate scholarship

## REFERENCES

- 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. 1-19, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005715>
- BITENCOURT, R. O. B. et al. In vitro Control of *Aedes aegypti* larvae using *Beauveria bassiana*. **International Journal of Bioengineering and Life Sciences**, v. 12, n. 10, p. 400-404, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 34, 2020. Available in: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/September/11/Boletim-epidemiologico-SVS-36.pdf>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 52, 2019. Available in:

<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1.pdf>

BUCKER, A. et al. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 411-419, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0063-2013>

BUTT, T. M. et al. *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. 1-11, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081686>

CABRAL, S. et al. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) immune responses with different feeding regimes following infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Insects**, v. 11, n. 2, p. 95-110, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11020095>

CARAGATA, E. P. et al. Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. **Current opinion in virology**, v. 37, p. 26-36, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.05.005>

CAROLINO, A. T. et al. *Aedes aegypti* pupae are highly susceptible to infection by *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 1629-1634, 2019. DOI: <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.36>

CAROLINO, A. T. et al. Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 198-205, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-198>

DANIEL, J. F. S. et al. Larvicidal activity of *Beauveria bassiana* extracts against *Aedes aegypti* and identification of Beauvericins. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 28, n. 6, p. 1003-1013, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160253>

DE PAULA, A. R. et al. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 10, p. 1017-1025, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150802509199>

FALVO, M. L. et al. Adulticidal Activity of *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) Native Strains From Argentina Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 2, p. 636-640, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz201>

FALVO, M. L. et al. Effect of UV-B irradiation on water-suspended *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) conidia and their larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 55, n. 5, p. 1330-1333, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjy071>

FALVO, M. L. et al. UV-B radiation reduces in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* sl but does not affect virulence in fungus-treated *Aedes aegypti* adults and development on dead mosquitoes. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1710-1717, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13309>

GOMES, S. A. et al. Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 669, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1280-9>

LACEY, L. A. Entomopathogens used as microbial control agents. In: **Microbial control of insect and mite pests**. Academic Press, p. 3-12. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00001-9>

LELES, R. N. et al. Effects of *Metarhizium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. **Parasitology research**, v. 110, n. 4, p. 1579-1582, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2666-z>

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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1991-y>

LITWIN, A. et al. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 1, p. 23-42, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>

LOBO, L. S.; RODRIGUES, J.; LUZ, C. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 386-401, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1123220>

LUZ, C. et al. Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. **Acta tropica**, v. 122, n. 1, p. 29-35, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.11.014>

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, n. 2, p. 214-215, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000200016>

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. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.799>

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. 33-42, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof5020033>

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 165, p. 46-53, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

MONTALVA, C. et al. Characterization of *Tolypocladium cylindrosporum* (Hypocreales, Ophiocordycipitaceae) isolates from Brazil and their efficacy against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 1, p. 266-276, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14093>

MONTALVA, C. et al. *Conidiobolus macrosporus* (Entomophthorales), a mosquito pathogen in Central Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 139, p. 102-108, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.003>

NOWAK, M. et al. Acetamiprid Affects Destruxins Production but Its Accumulation in *Metarhizium* sp. Spores Increases Infection Ability of Fungi. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 587, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12090587>

PAULA, A. R. et al. Efficiency of fungus-impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 2, p. 157-163, 2013b. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12090>

PAULA, A. R. et al. Improving the delivery and efficiency of fungus-impregnated cloths for control of adult *Aedes aegypti* using a synthetic attractive lure. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2871-z>

PAULA, A. R. et al. Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 163, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3415-x>

PAULA, A. R. et al. Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2011b. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-91>

PAULA, A. R. et al. Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 256, 2013a. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-256>

PAULA, A. R. et al. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 8, 2011a. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-8>

PEREIRA, C. R. et al. The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, n. 8, p. 881-886, 2009a. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150903147659>

PEREIRA, E. S. et al. Filamentous fungi associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in municipalities of the Brazilian Amazon. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 352-359, 2009b. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000300009>

PEREIRA, E. S. et al. Trichomycete fungi (Zygomycota) associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in natural and artificial habitats in Manaus, AM Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 325-329, 2005.

RAVINDRAN, K. et al. Determination and characterization of destruxin production in *Metarhizium anisopliae* Tk6 and formulations for *Aedes aegypti* mosquitoes control at the field level. **Toxicon**, v. 120, p. 89-96, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.016>

ROCHA, L. F. N. et al. Efficacy of *Tolypocladium cylindrosporum* against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 5, p. 1412-1419, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12945>

ROCHA, L. F. N. et al. Occurrence of invertebrate-pathogenic fungi in a Cerrado ecosystem in Central Brazil. **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, n. 5, p. 547-553, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150902789337>

RODRIGUES, J. et al. Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* sl IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on post mortem conidiogenesis. **Acta tropica**, v. 193, p. 192-198, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.002>

RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A.; REYES-VILLANUEVA, F. Autodissemination. **Microbial Control of Vector-Borne Diseases**, Chapter 2, 2018. 8p.

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, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.01.018>

SILVA, R. O. et al. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. **Revista de Patología Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 33, n. 2, p. 207-216, 2004. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v33i2.3446>

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. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12097>

TYAGI, B. K.; DHANASEKARAN, D. (Ed.). **Microbial Control of Vector-Borne Diseases**. CRC Press, 2018. 449p.

VIVEKANANDHAN, P. et al. Larvicidal toxicity of *Metarhizium anisopliae* metabolites against three mosquito species and non-targeting organisms. **Plos one**, v. 15, n. 5, p. e0232172, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232172>

## CAPÍTULO II - FORMULAÇÕES COM FUNGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)

Gleison Rafael Queiroz Mendonça<sup>1</sup>, Leila Priscila Peters<sup>1,2</sup>, Clarice Maia Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil

### RESUMO

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) é o principal transmissor de patógenos causadores de doenças ao homem, incluindo a dengue, chikungunya, zika e febre amarela. Este estudo tem como objetivo selecionar fungos com potencial entomopatogênico contra larvas de *Ae. aegypti* e desenvolver formulações que otimizem a ação de controle dos fungos entomopatogênicos na condição semi campo. Para tanto, 23 estirpes fúngicas nativas da Amazônia foram inoculadas em meio de cultivo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) durante 14 dias e posteriormente transferidos por raspagem para tubos contendo solução NaCl 0,9%. Para a obtenção das larvas, foram coletados ovos provenientes de armadilhas em ambientes peridomésticos durante 7 dias. Foram depositadas 20 larvas de *Ae. aegypti* em erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL da suspensão conidial na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL para seleção inicial e  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  conídios/mL para determinação da CL50. A mortalidade foi verificada a cada 24 h durante por 5 dias. Os três fungos com melhores taxas de virulência foram submetidos a identificação molecular. Foi avaliada a compatibilidade entre os fungos na concentração  $1 \times 10^6$  conídios/mL e adjuvantes oleosos que consistiram em óleo mineral e óleo vegetal (andiroba, castanha e copaíba) nas concentrações 0,1, 0,5 e 1%. Incubadas a 28 °C durante 24 h, foi avaliada a capacidade germinativa de 100 conídios por tratamento. Para avaliar o potencial entomopatogênico das formulações fúngicas, suspensões conidiais ( $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) foram acrescidos de óleo mineral e vegetal a 0,1%. Os tratamentos foram submetidos a condições de laboratório e semi campo e a mortalidade verificada a cada 24 h durante por 5 dias. *Beauveria* sp. (4.458) (CL50 =  $8,66 \times 10^3$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) (CL50 =  $2,37 \times 10^4$ ) e *M. anisopliae* (4.910) (CL50 =  $2,55 \times 10^4$ ) foram significativamente mais efetivos no controle larval de *Ae. aegypti*, em relação às demais morfoespécies fúngicas avaliadas. O óleo mineral foi melhor compatível em todos os tratamentos avaliados. *Beauveria* sp. (4.458) foi consideravelmente menos virulento quando submetido a condição semi-campo. *M. anisopliae* (4.910) formulado com óleo mineral elevou a mortalidade larval a 100% no 4º dia em laboratório e no 5º dia em semi-campo. As formulações fúngicas desenvolvidas a partir de isolados nativos da Amazônia representam uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de estratégias potentes de controle de *Ae. aegypti*.

**Palavras-chave:** Controle Biológico. Arboviroses. *Beauveria*. *Metarhizium*.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is the main transmitter of disease-causing pathogens to human, including dengue, chikungunya, Zika, and yellow fever. This study aims to select fungi with entomopathogenic potential against *Ae. aegypti* and develop formulations that optimize the control action of entomopathogenic fungi in semi-field conditions. Therefore, 23 fungal strains native to the Amazon were inoculated in Potato-Dextrose-Agar (BDA) culture medium for 14 days and then transferred by scraping to tubes containing 0.9% NaCl solution. To obtain the larvae, eggs were collected from traps in peridomestic environments for 7 days. Twenty larvae of *Ae. aegypti* in 125 mL erlenmeyer flasks, containing 20 mL of conidial suspension at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia/mL for initial selection and  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  conidia/mL for determination of LC50. Mortality was checked every 24 h for 5 days. The three fungi with the best virulence rates were submitted to molecular identification. The compatibility between fungi at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia/mL and oily adjuvants consisting of mineral oil and vegetable oil (andiroba, castanha and copaiba) at concentrations of 0.1, 0.5 and 1% was evaluated. Incubated at 28 °C for 24 h, the germination capacity of 100 conidia per treatment was evaluated. To assess the entomopathogenic potential of fungal formulations, conidial suspensions ( $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>) were added with 0.1% mineral and vegetable oil. The treatments were subjected to laboratory and semi-field conditions and mortality was verified every 24 h for 5 days. *Beauveria* sp. (4.458) (LC50 =  $8,66 \times 10^3$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) (LC50 =  $2,37 \times 10^4$ ) and *M. anisopliae* (4.910) (LC50 =  $2,55 \times 10^4$ ) were significantly more effective in controlling *Ae. aegypti* larvae, in relation to the other evaluated fungal morphospecies. Mineral oil was better compatible in all evaluated treatments. *Beauveria* sp. (4.458) was considerably less virulent when subjected to the semi-field condition. *M. anisopliae* (4.910) formulated with mineral oil increased larval mortality to 100% on the 4th day in the laboratory and on the 5th day in semi-field. Fungal formulations developed from native Amazonian isolates represent a promising tool for the development of potent *Ae. aegypti*.

**Keywords:** Biological Control. Arboviruses. *Beauveria*. *Metarhizium*.

## INTRODUÇÃO

Entre as centenas de arboviroses já conhecidas, aproximadamente trinta são capazes de causar doença no homem (NICOLETTI et al., 2020). Dessa diversidade, apenas dengue, chikungunya, zika e febre amarela são responsáveis por quase a totalidade dos casos, e possuem como vetor o mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (CARAGATA et al., 2019).

Algumas características são essenciais para a efetividade de *Ae. aegypti* como vetor: fácil adaptação a ambientes urbanos, comum ocorrência em espaços domésticos e obtenção nutricional para reprodução a partir do sangue humano (WANG et al., 2018).

Entre janeiro e setembro de 2020 foram registradas aproximadamente 20.902 notificações de casos prováveis de dengue, chikungunya ou zika na Região Amazônica Brasileira (BRASIL, 2020), mostrando assim a importância deste vetor.

Na Amazônia, populações de *Ae. aegypti* persistem ao longo do ano, e nas estações chuvosas o número populacional de vetores é drasticamente elevado, o que resulta em surtos epidêmicos de doenças virais (RODRIGUES et al., 2019).

A maneira mais eficaz é controlar o vetor, e opções de inseticidas biológicos formulados a partir de fungos entomopatogênicos para o controle de *Ae. aegypti* tem se mostrado promissores, com o objetivo de substituir ou integrar-se aos produtos químicos usuais (LACEY et al., 2015).

A aplicação de entomopatógenos fúngicos no ambiente encontra cenários desafiadores e complexos de estresse biótico e abiótico (ORTIZ-URQUIZA et al., 2015). Luz solar, temperatura e umidade estão entre os fatores mais críticos capazes de afetar a persistência desses microrganismos (PÁRAMO et al., 2019).

Nessa perspectiva, a proposição de formulações a partir de agentes microbianos biocontroladores aos vetores de doenças humanas é destacada (FERNANDES et al., 2015). Componentes adjuvantes melhoram o efeito do patógeno na praga alvo, oferece maior proteção a radiação, fornece nutrientes para crescimento fúngico, favorece condições de armazenamento, maior praticidade na aplicação e maior adaptação ao ambiente natural, viabilizando a utilização do patógeno em campo (BUTT et al., 2016).

A Região Amazônica Brasileira tem destaque por sua complexidade ecossistêmica que possui uma grande diversidade de microrganismos entomopatogênicos com potencial biotecnológico, até então, pouco investigados para o controle de vetores de doenças.

Assim, este estudo tem como objetivo selecionar fungos amazônicos com potencial entomopatogênico contra larvas de *Ae. aegypti* e testar formulações que otimizem a ação de controle de fungos entomopatogênicos em condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Manutenção dos fungos e preparo das suspensões de conídios**

Foram reativadas 23 morfoespécies fúngicas com boa capacidade de produção de conídios armazenados na coleção de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre (UFAC). A reativação das amostras fúngicas armazenadas em óleo mineral e água destilada foi realizada por meio da inoculação dos fungos em meio Batata-Dextrose-Ágar-BDA (200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar em 1 L de água destilada) e incubação a temperatura ambiente durante 14 dias. Observado o crescimento micelial, os fungos foram transferidos para tubos com meio BDA e armazenados a temperatura ambiente (AYALA-ZERMEÑO et al., 2017).

Para avaliar a virulência contra *Ae. aegypti*, os fungos foram cultivados em meio BDA a 28 °C por 14 dias e posteriormente submetidos a remoção da superfície das colônias por raspagem e transferidos para tubos contendo solução de NaCl 0,9%, com agitação vigorosa em agitador elétrico e padronização da suspensão para a concentração de  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> em câmara de Neubauer (REMADEVI et al., 2010).

### **Ensaio de virulência contra larvas de *Ae. aegypti***

Para a obtenção das larvas de *Ae. aegypti* foram coletados ovos provenientes de armadilhas instaladas em imóveis, escolhidos aleatoriamente, nas áreas urbanas da Cidade de Rio Branco, Acre. As ovitrampas foram instaladas nas áreas extra-domicílio

em locais sombreados e próximos a outros criadouros do mosquito durante sete dias. As paletas foram recolhidas e depositadas em recipientes plásticos com água de torneira e ração de peixe para facilitar a eclosão das larvas (CARVALHO et al., 2004).

Foram depositadas 20 larvas de *Ae. aegypti* em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL da suspensão conidial em água destilada na concentração de  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>, constituindo o grupo de larvas expostas, e 20 mL da solução de água destilada esterilizada, correspondente ao grupo controle, sendo realizada 3 repetições. A mortalidade foi verificada a cada 24 h durante 5 dias (CARVALHO et al., 2004).

Os três fungos que apresentaram melhores taxas de virulência foram submetidos a novos ensaios biológicos seguindo as mesmas etapas metodológicas acima descritas, no entanto, em diferentes concentrações conidiais:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  conídios/mL a fim de obter uma variabilidade de mortalidade considerável para calcular a dose letal (CL50) (CARVALHO et al., 2017).

### **Caracterização molecular dos fungos entomopatogênicos a larvas de *Ae. aegypti***

O DNA genômico total dos fungos com potencial entomopatogênico foram extraídos usando o método de brometo de cetiltrimetilâmônio (CTAB) (DOYLE; DOYLE, 1987). O fungo foi crescido em meio de cultura BDA por 14 dias a 25 °C. Foi realizada a coleta de 50 mg de micélio do patógeno que posteriormente foi macerado com nitrogênio líquido em cadinho até formar um pó fino.

O tampão de extração CTAB 3% foi preparado utilizando NaCl, EDTA 0,5 M com pH 8,0 e TRIS-HCl 1,0 M com pH 8,0. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada e colocada em banho-maria à 64 °C durante uma hora, homogeneizando-a a cada 15 minutos. Para cada amostra, foram adicionados 0,5 mL de CIA (24:1; Clorofórmio:

Álcool Isoamílico), sendo agitada manualmente durante um minuto, seguindo-se da centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionando-se novamente 0,5 mL de CIA, homogeneizando e centrifugando a 8000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado para outro microtubo e foram adicionados 0,35 mL de isopropanol gelado (-20 °C). A amostra foi homogeneizada novamente e mantida a -20 °C por 1 hora.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. O pellet foi lavado com etanol 70% (70 mL de etanol 100% e 30 mL de água mili-Q), centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos e depois seco a temperatura ambiente. Por fim, o pellet foi ressuspensiondo em 50 µL de água mili-Q esterilizada, adicionando-se 2 µL de RNase (37 °C) na amostra.

Para avaliar a extração de DNA foi corrido em gel de agarose à 2%, sendo este fundido em 50 mL de TBE (Tampão Tris/Borato/EDTA). A solução tampão foi preparada utilizando 10,8 g de TRIS, 5,5 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) e 0,74 g/4 mL de EDTA 0,5 M com pH 8,0. O procedimento foi realizado em uma cuba de eletroforese, sendo utilizado o marcador molecular DNA 1kb Plus Ladder de 100 pb (Invitrogen). A corrida do DNA foi a 120 V, por 45 minutos. A visualização foi realizada em um fotodocumentador.

Os *primers* universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990) foram utilizados para amplificar a região ITS (Internal Transcribed Spacer). A reação do mix da PCR consistiu em torno de 40 ng de DNA; 0,5 µM de cada primer; 0,2 µM de dNTP; 1,25 U Taq DNA polimerase (Ludwig) e 2,5 µL do tampão. As ciclagens das reações de PCR foram realizadas da seguinte forma: desnaturação a 94 °C durante 3 min, seguida por 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min e uma extensão final a

72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%, por 1 hora. Foi utilizado DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen Life Technologies) como marcador molecular de pares de bases.

A purificação do produto amplificado via PCR da região do rDNA composta por ITS1-5,8S-ITS2 foi realizada com o Kit Easy Pure PCR Purification Kit de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado com o ITS1 e ITS4, utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) e as sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. As reações de seqüenciamento geralmente alcançam entre 500 e 600 bases com fidelidade de análise de 98,5%.

As seqüências foram verificadas e editadas usando o Bioedit 7.0.9.1 (HALL, 1999). Somente foram utilizadas as regiões das sequências consideradas de maior qualidade, sendo processadas para geração de novos arquivos FASTA. As sequências foram comparadas com outras sequências presentes no banco de dados GeneBank e UNITE. Após de identificação de espécies próximas e relacionadas aos isolados de interesse, seqüências de organismos tipo foram utilizadas para a análise filogenética. A árvore filogenética foi construída por meio do método de Neighbor Joining (JUKES; CANTOR, 1969), usando o programa MEGA 11.0.

### **Avaliação da compatibilidade entre conídios fúngicos e óleos vegetais e mineral**

Formulações foram preparadas com fungo entomopatogênico na concentração  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> acrescidos de óleo mineral e óleos vegetais das espécies amazônicas

andiroba (*Carapa guianensis*), castanha (*Bertholletia excelsa*) e copaíba (*Copaifera multijuga*) nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1%. Os óleos vegetais foram obtidos na RESEX Alto Tarauacá, localizada no município de Jordão, estado do Acre.

Para determinar os índices de germinação conidial, 10 µL de cada tratamento foram depositadas em três pontos equidistantes em placas de Petri contendo meio BDA. Estas placas foram incubadas a 28 °C durante 24 h, e então, depositada uma gota de azul de lactofenol para observação da viabilidade conidial em microscópio óptico (FRANCISCO et al., 2006). Foi avaliada a capacidade germinativa de 100 conídios fúngicos por tratamento.

### **Avaliação da virulência das formulações fúngicas contra *Ae. aegypti* em laboratório e semi campo**

Com os três fungos com maiores taxas de letalidade foram preparadas formulações compostas por suspensão conidial na concentração  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> acrescidos de óleo mineral ou óleo vegetal das espécies amazônicas andiroba, castanha e copaíba na proporção de 0,1% (CAMARGO, 2012).

Para avaliação da virulência das formulações fúngicas em condições de laboratório e semi-campo, 20 larvas de *Ae. aegypti* foram depositadas em erlenmeyers de 125 mL. Os tratamentos foram constituídos por 20 mL da formulação fúngica: (a) suspensão conidial aquosa, (b) suspensão conidial + óleo mineral 0,1%, (c) suspensão conidial + óleo vegetal 0,1%, (d) óleo mineral 0,1%, (e) óleo vegetal 0,1% e (f) controle solução NaCl 0,9%. Foram realizadas 3 repetições para cada tratamento em cada local. A sobrevivência foi avaliada a cada 24h por cinco dias. Os ensaios *in vitro* foram mantidos no Laboratório de Microbiologia como anteriormente descrito e para os ensaios

em semi-campo, os recipientes foram mantidos em ambiente peridomicílio sob sombreamento, semelhante aos locais característicos de coleta do mosquito.

### Análise estatística

Os dados dos ensaios biológicos foram analisados estatisticamente conforme a normalidade. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para dados paramétricos para a comparação entre as médias multivariadas. Para a avaliação dos dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido do Student-Newman-Keuls (SNK) para comparar as ordenações médias. Os dados de mortalidade larval foram submetidos à análise Kaplan-Meier com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. A determinação das concentrações letais necessárias para matar 50% das larvas (CL50) foram estimadas com auxílio do software SAS 9.4.

## RESULTADOS

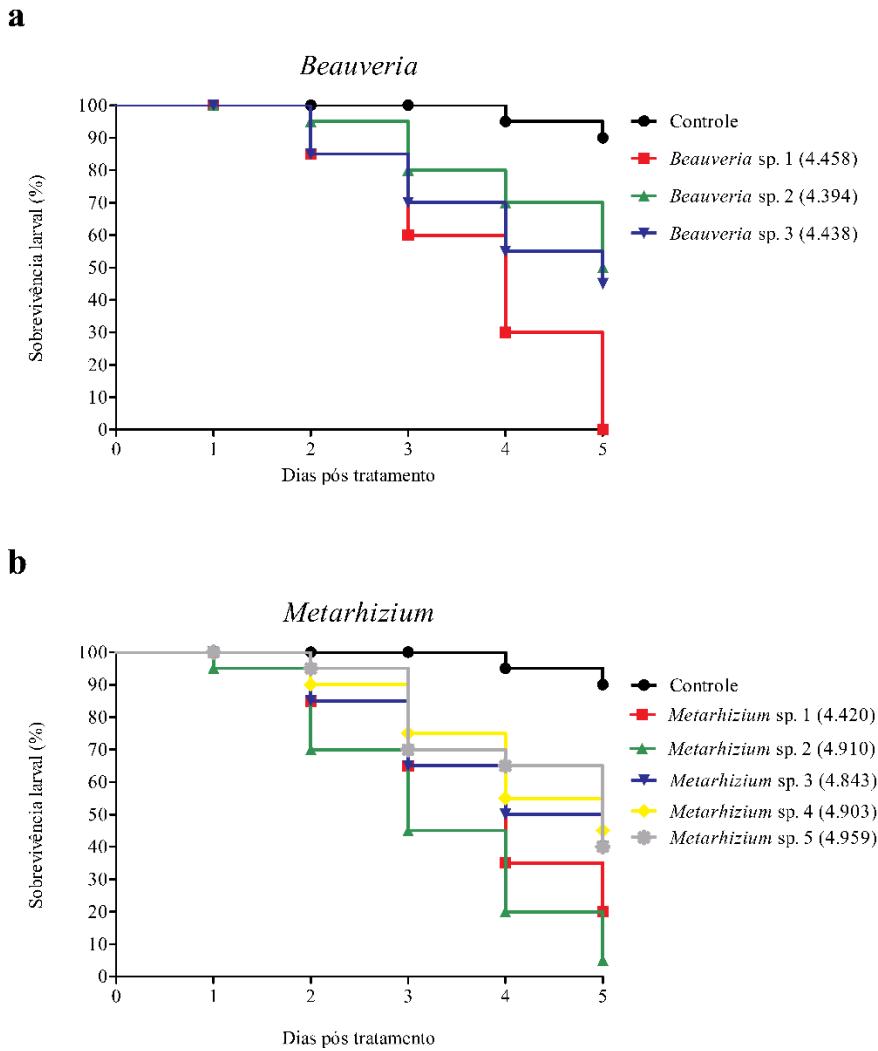
A entomopatogenicidade foi avaliada contra larvas de *Ae. aegypti* de 23 morfoespécies fúngicas da coleção de fungos com potencial entomopatogênico do laboratório de Microbiologia da UFAC na concentração  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>.

*Ae. aegypti* foi mais suscetível a *Beauveria* sp. (4.458), que elevou a taxa de mortalidade larval a 100% no 5º dia de experimento (Tabela 1). *Metarhizium* sp. 1 (4.420) e *Metarhizium* sp. 2 (4.910) causaram mortalidade significativamente superior em relação aos demais isolados do gênero *Metarhizium*, atingindo 80% e 95%, respectivamente, no 5º dia de experimento.

**Tabela 1.** Taxa de mortalidade larval de *Ae. aegypti* submetidas aos conídios fúngicos.

Fungo	Taxa de mortalidade (%) ± DP				
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
<i>Beauveria</i> sp. 1 (4.458)	0 ± 0 <sup>b</sup>	15 ± 5 <sup>b</sup>	41,6 ± 7,6 <sup>b</sup>	70 ± 5 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
<i>Beauveria</i> sp. 2 (4.394)	0 ± 0 <sup>b</sup>	7 ± 2,9 <sup>f</sup>	22 ± 2,9 <sup>g</sup>	32 ± 5 <sup>i</sup>	50 ± 5 <sup>f</sup>
<i>Beauveria</i> sp. 3 (4.438)	0 ± 0 <sup>b</sup>	15 ± 5 <sup>b</sup>	30 ± 0 <sup>e</sup>	43 ± 7,6 <sup>e</sup>	55 ± 5 <sup>e</sup>
<i>Beauveria</i> sp. 4 (4.798)	0 ± 0 <sup>b</sup>	3 ± 2,9 <sup>h</sup>	17 ± 2,9 <sup>i</sup>	32 ± 2,9 <sup>i</sup>	40 ± 0 <sup>h</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 1 (4.420)	0 ± 0 <sup>b</sup>	13 ± 2,9 <sup>c</sup>	35 ± 0 <sup>c</sup>	65 ± 0 <sup>c</sup>	80 ± 5 <sup>c</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 2 (4.910)	3 ± 2,9 <sup>a</sup>	27 ± 2,9 <sup>a</sup>	53 ± 5,8 <sup>a</sup>	80 ± 8,7 <sup>a</sup>	95 ± 5 <sup>b</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 3 (4.843)	0 ± 0 <sup>b</sup>	13 ± 7,6 <sup>c</sup>	32 ± 11,5 <sup>d</sup>	47 ± 5,8 <sup>d</sup>	55 ± 10 <sup>e</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 4 (4.903)	0 ± 0 <sup>b</sup>	8 ± 10,4 <sup>e</sup>	23 ± 15,2 <sup>f</sup>	43 ± 7,6 <sup>g</sup>	55 ± 15 <sup>e</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 5 (4.959)	0 ± 0 <sup>b</sup>	5 ± 8,7 <sup>g</sup>	30 ± 5 <sup>e</sup>	37 ± 5,8 <sup>f</sup>	60 ± 0 <sup>d</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 6 (4.887)	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>j</sup>	2 ± 2,9 <sup>n</sup>	8 ± 7,6 <sup>i</sup>	20 ± 5 <sup>l</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 7 (4.539)	0 ± 0 <sup>b</sup>	12 ± 2,9 <sup>d</sup>	23 ± 2,9 <sup>f</sup>	38 ± 2,9 <sup>r</sup>	45 ± 10 <sup>g</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 8 (4.892)	0 ± 0 <sup>b</sup>	3 ± 2,9 <sup>h</sup>	15 ± 5 <sup>j</sup>	32 ± 7,6 <sup>i</sup>	40 ± 10 <sup>h</sup>
<i>Metarhizium</i> sp. 9 (4.901)	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>j</sup>	2 ± 2,9 <sup>n</sup>	7 ± 2,9 <sup>r</sup>	10 ± 5 <sup>o</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 1 (4.748)	0 ± 0 <sup>b</sup>	3 ± 2,9 <sup>h</sup>	13 ± 5,8 <sup>k</sup>	32 ± 2,9 <sup>i</sup>	40 ± 0 <sup>h</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 2 (4.451)	0 ± 0 <sup>b</sup>	5 ± 0 <sup>g</sup>	23 ± 7,6 <sup>f</sup>	33 ± 2,9 <sup>h</sup>	40 ± 10 <sup>h</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 3 (4.493)	0 ± 0 <sup>b</sup>	2 ± 2,9 <sup>i</sup>	12 ± 5,8 <sup>l</sup>	17 ± 5,8 <sup>o</sup>	25 ± 5 <sup>k</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 4 (4.428)	0 ± 0 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>j</sup>	12 ± 5,8 <sup>l</sup>	18 ± 7,6 <sup>n</sup>	30 ± 0 <sup>j</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 5 (4.449)	0 ± 0 <sup>b</sup>	8 ± 2,9 <sup>e</sup>	18 ± 7,6 <sup>h</sup>	25 ± 5 <sup>k</sup>	30 ± 10 <sup>j</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 6 (4.455)	0 ± 0 <sup>b</sup>	13 ± 2,9 <sup>c</sup>	22 ± 2,9 <sup>g</sup>	33 ± 2,9 <sup>h</sup>	45 ± 5 <sup>g</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 7 (4.432)	0 ± 0 <sup>b</sup>	5 ± 0 <sup>g</sup>	15 ± 0 <sup>j</sup>	30 ± 0 <sup>j</sup>	35 ± 5 <sup>i</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 8 (4.490)	0 ± 0 <sup>b</sup>	5 ± 0 <sup>g</sup>	15 ± 5 <sup>j</sup>	22 ± 5,8 <sup>l</sup>	35 ± 0 <sup>i</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 9 (4.407)	0 ± 0 <sup>b</sup>	3 ± 2,9 <sup>h</sup>	12 ± 2,9 <sup>l</sup>	20 ± 8,7 <sup>m</sup>	30 ± 0 <sup>j</sup>
<i>Paecilomyces</i> sp. 10 (4.471)	0 ± 0 <sup>b</sup>	7 ± 2,9 <sup>f</sup>	8 ± 2,9 <sup>m</sup>	12 ± 2,9 <sup>p</sup>	15 ± 0 <sup>m</sup>
<b>Controle</b>	<b>0 ± 0<sup>b</sup></b>	<b>0 ± 0<sup>j</sup></b>	<b>2 ± 2,9<sup>n</sup></b>	<b>5 ± 0<sup>s</sup></b>	<b>12 ± 5<sup>n</sup></b>

As oito morfoespécies fúngicas com taxas de mortalidade acima de 50% foram representantes dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*. Os dados de virulência desses fungos contra larvas de *Ae. aegypti* na concentração  $1 \times 10^6$  conídios/mL foram submetidos a análise de Kaplan Meier (Figura 1). As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com os conídios fúngicos das três morfoespécies de *Beauveria* diferiram significativamente do tratamento controle ( $\chi^2 = 64,58$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,0001$ ). O mesmo foi observado para as morfoespécies do gênero *Metarhizium* ( $\chi^2 = 64,58$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 1.** Taxas de mortalidade larval de *Aedes aegypti* contra fungos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* com potencial entomopatogênico da Amazônia.

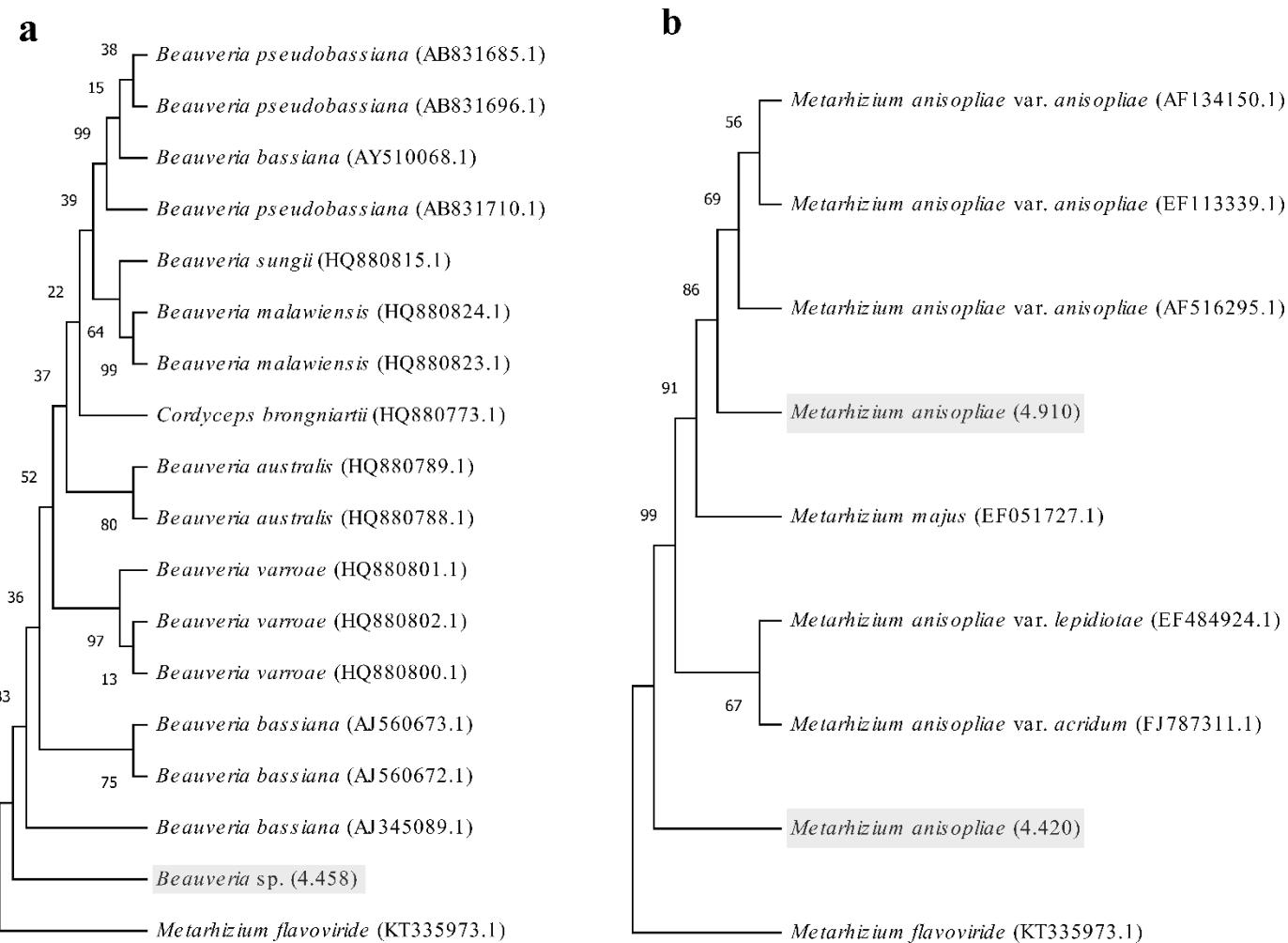
As três morfoespécies fúngicas que elevaram a mortalidade a uma taxa igual ou superior a 80% foram selecionadas para as próximas etapas do estudo, sendo estes *Beauveria* sp. 1 (4.458), *Metarhizium* sp. 1 (4.420) e *Metarhizium* sp. 2 (4.910). Essas três morfoespécies foram submetidas a identificação molecular (Tabela 3).

Os resultados das análises moleculares das sequências obtidas dos fungos 4.420 e 4.910, identificados morfológicamente como *Metarhizium*, permitiram confirmar que pertenciam à espécie *M. anisopliae* com índices de identidade de 99% (Tabela 3 e Figura

2b). Por outro lado, com os resultados da caracterização molecular do fungo 4.458 foi possível chegar somente à nível de gênero (*Beauveria* sp.) com 92% de identidade. Contudo, a análise filogética mostra que esse fungo é mais próximo da espécie *B. bassiana* (Figura 2a).

**Tabela 2.** Correspondência máxima de identidade de nucleotídeos de fungos nativos da Amazônia com potencial entomopatogênico contra larvas de *Aedes aegypti* com base em sequências ITS usando análise BLASTn.

Registro do fungo	Nº Sequência - UNITE	Espécie	Identidade (%)
<i>Beauveria</i> sp. 1 (4.458)	UDB0780969	<i>Beauveria</i> sp.	92%
<i>Metarhizium</i> sp. 1 (4.420)	MH104861	<i>Metarhizium anisopliae</i>	99%
<i>Metarhizium</i> sp. 2 (4.910)	KX809519	<i>Metarhizium anisopliae</i>	99%



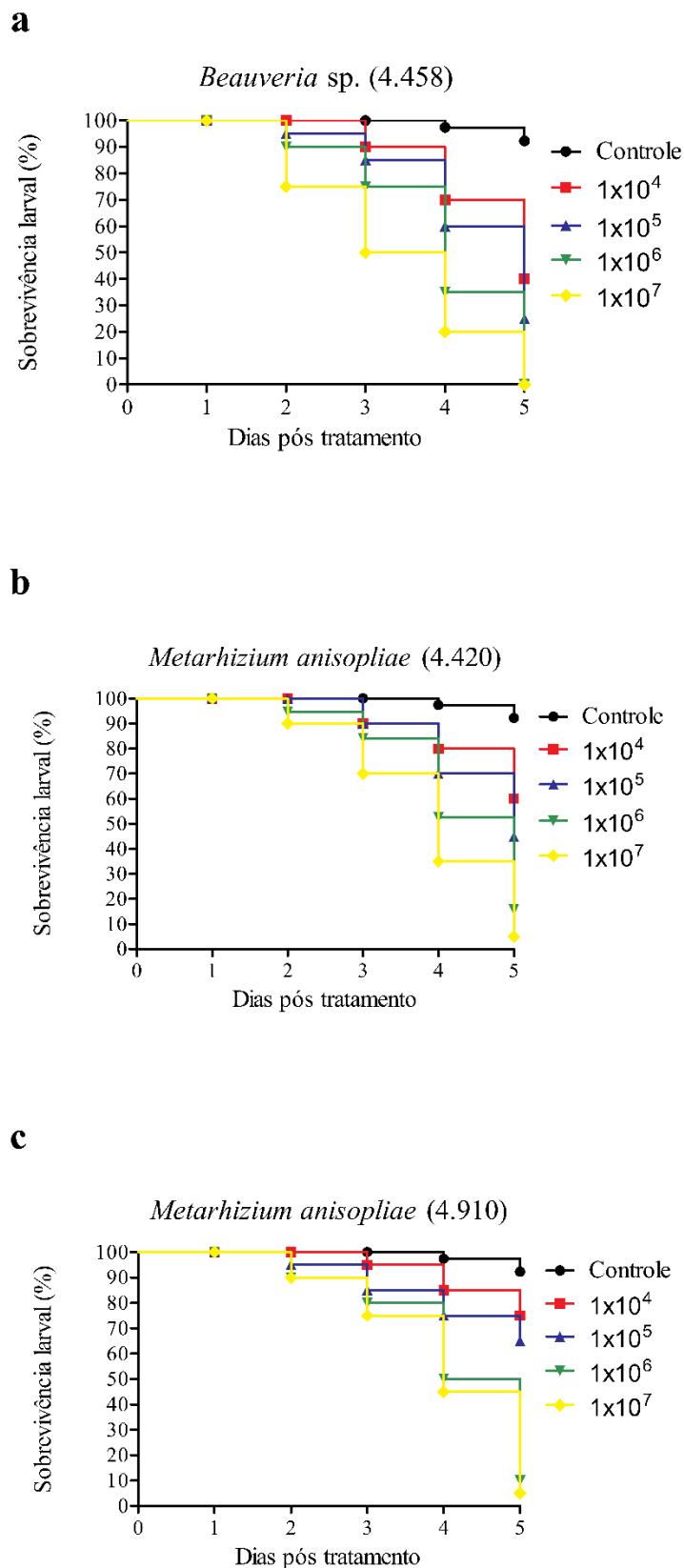
**Figura 2.** Árvore filogenética baseada em sequências da região ITS do DNAr, as quais foram alinhadas pelo programa ClustalW usando o programa MEGA v. 11 dos fungos **a.** *Beauveria* sp. (4.458), **b.** *Metarhizium anisopliae* (4.420) e **b.** *Metarhizium anisopliae* (4.910).

As três morfoespécies fúngicas com maiores taxas de mortalidade foram avaliadas quanto a virulência *in vitro* contra larvas de *Ae. aegypti* nas concentrações  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>. As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com os conídios fúngicos dos três isolados avaliados diferiram significativamente dos tratamentos controle, sendo (A) *Beauveria* sp. (4.458) ( $\chi^2 = 2,05$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,0001$ ), (B) *Metarhizium anisopliae* (4.420) ( $\chi^2 = 3,55$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,0001$ ) e (C) *Metarhizium anisopliae* (4.910) ( $\chi^2 = 3,68$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 3).

Os isolados fúngicos foram eficazes em elevar as taxas de mortalidade das larvas em todas as concentrações conidiais avaliadas. As larvas de *Ae. aegypti* foram mais suscetíveis ao isolado *Beauveria* sp. ( $CL_{50} = 8,66 \times 10^3$ ) em relação a *Metarhizium anisopliae* (4.420) ( $CL_{50} = 2,37 \times 10^4$ ) e *Metarhizium anisopliae* (4.910) ( $CL_{50} = 2,55 \times 10^4$ ) (Tabela 2).

**Tabela 3.** Concentração-resposta dos fungos *Beauveria* sp. 1 (4.458), *Metarhizium anisopliae* (4.420) e *Metarhizium anisopliae* (4.910) contra larvas de *Aedes aegypti*.

Fungo	N	Inclinação (+EP)	CL50 conídios/mL	CL95 conídios/mL	X <sup>2</sup> (df)
<i>Beauveria</i> sp. (4.458)	240	$0,65 \pm 0,69$	$8,66 \times 10^3$	$2,85 \times 10^6$	2,05 (4)
<i>Metarhizium anisopliae</i> (4.420)	240	$0,99 \pm 0,23$	$2,37 \times 10^4$	$5,26 \times 10^6$	3,55 (4)
<i>Metarhizium anisopliae</i> (4.910)	240	$0,88 \pm 0,62$	$2,55 \times 10^4$	$6,09 \times 10^6$	3,68 (4)



**Figura 3.** Curvas de sobrevivência dos fungos entomopatogênicos nas concentrações  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>. **a.** *Beauveria* sp. (4.458); **b.** *Metarhizium anisopliae* (4.420); **c.** *Metarhizium anisopliae* (4.910).

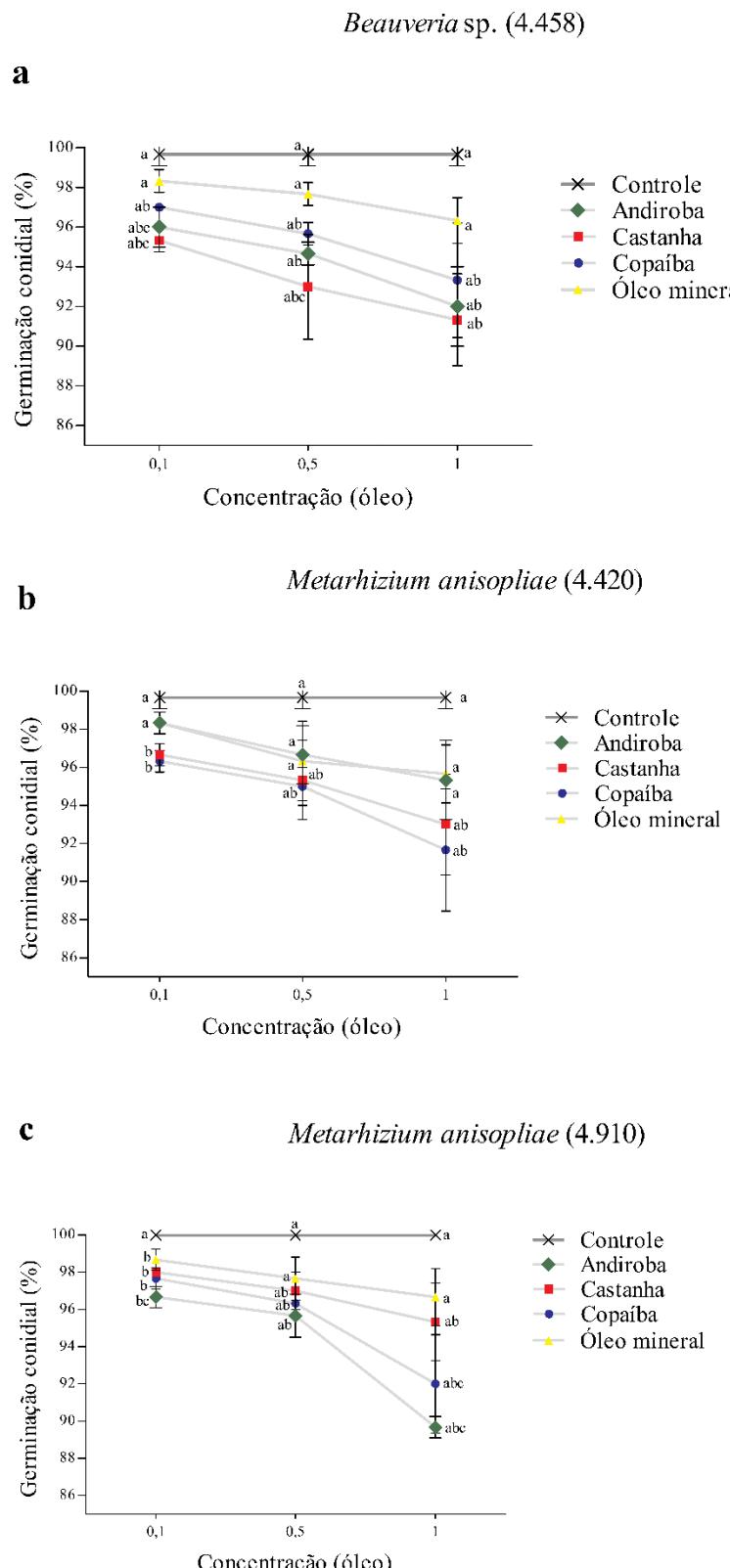
Foi avaliada a compatibilidade dos conídios de *Beauveria* sp. 1 (4.458), *Metarhizium anisopliae* (4.420) e *Metarhizium anisopliae* (4.910) com óleo mineral e óleos vegetais de andiroba, castanha e copaíba nas concentrações 0,1, 0,5 e 1 %.

Foram observadas diferenças significativas de compatibilidade entre os tipos de óleos utilizados (andiroba, castanha, copaíba ou mineral) e os conídios de *Beauveria* sp. (4.458) ( $P < 0,0001$ ;  $F_{4,10} = 25,89$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) ( $P = 0,0017$ ;  $F_{4,10} = 9,85$ ) e *Metarhizium anisopliae* (4.910) ( $P < 0,0001$ ;  $F_{4,10} = 24,13$ ) (Figura 4).

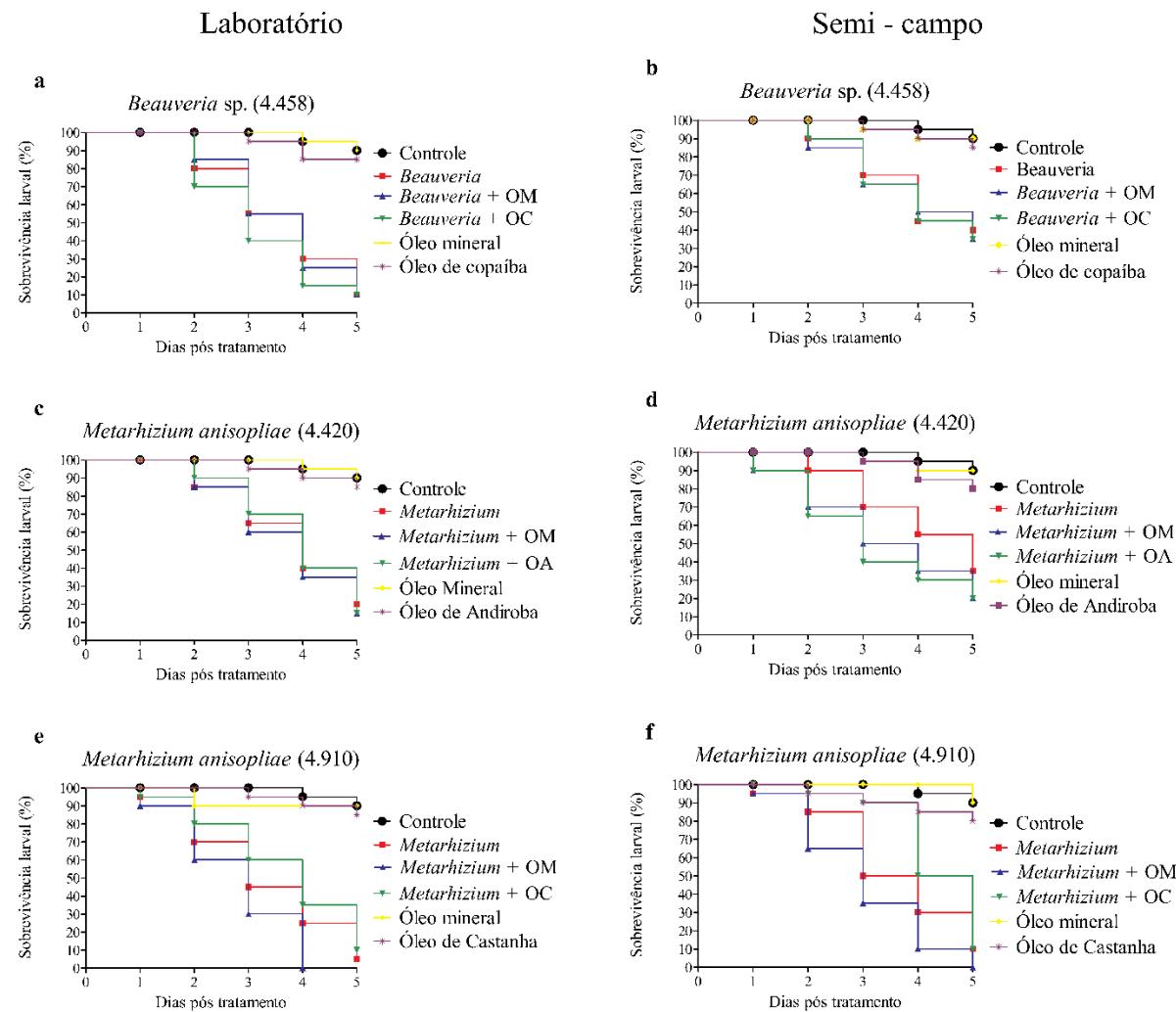
O óleo mineral foi mais compatível aos conídios dos três fungos avaliados. Compatível com *Beauveria* sp. 1 (4.458), as concentrações 0,1, 0,5 e 1% de óleo mineral obteve taxas germinativas de 98% ( $\pm 0,5$ ), 97% ( $\pm 0,5$ ) e 96% ( $\pm 1,15$ ), respectivamente. *M. anisopliae* (4.420) obteve taxas germinativas de 98,3% ( $\pm 0,5$ ), 96,3% ( $\pm 2,08$ ) e 95,6% ( $\pm 1,52$ ) quando combinadas com óleo mineral nas concentrações 0,1, 0,5 e 1%, respectivamente. *M. anisopliae* (4.910) foi compatível com óleo mineral nas concentrações 0,1, 0,5 e 1%, com taxas germinativas de 98% ( $\pm 0,5$ ), 97% ( $\pm 1,15$ ) e 96% ( $\pm 1,5$ ), respectivamente.

Quando comparada a compatibilidade entre os fungos e os óleos vegetais, *Beauveria* sp. (4.458) foi melhor compatível com copaíba, com taxa germinativa de 97% ( $\pm 0$ ) na concentração 0,1%, 95% ( $\pm 0,5$ ) na concentração 0,5% e 93% ( $\pm 2,9$ ) na concentração a 1%. *M. anisopliae* (4.420) foi compatível com andiroba obtendo taxas germinativas de 98% ( $\pm 0,5$ ) a 0,1%, 96% ( $\pm 1,5$ ) a 0,5% e 95% ( $\pm 2,08$ ) a 1%. *M. anisopliae* (4.910) foi mais compatível com castanha com taxas germinativas de 98% ( $\pm 0$ ) a 0,1%, 97% ( $\pm 1,0$ ) a 0,5% e 95% ( $\pm 2,08$ ) a 1%.

As concentrações dos óleos utilizados (0,1%, 0,5% e 1%) também apresentaram diferenças significativas nos tratamentos dos fungos *Beauveria* sp. (4.458) ( $P < 0,0001$ ;  $F_{2,20} = 15,72$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) ( $P < 0,0001$ ;  $F_{2,20} = 15,70$ ) e *Metarhizium anisopliae* (4.910) ( $P < 0,0001$ ;  $F_{2,20} = 52,94$ ). Foi observado que 0,1% de óleo mineral e vegetal causaram menor influência nas taxas germinativas dos conídios, que foram decrescendo conforme aumentadas as concentrações para 0,5% e 1%.



**Figura 4.** Avaliação da compatibilidade dos conídios fúngicos com os óleos vegetais das espécies amazônicas *Carapa guianensis* (andiroba), *Copaifera multijulga* (copaíba), *Bertholletia excelsa* (castanha) e óleo mineral nas concentrações 0,1%, 0,5% e 1%. **a.** *Beauveria* sp. (4.458), **b.** *Metarhizium anisopliae* (4.420), **c.** *Metarhizium anisopliae* (4.910).



**Figura 5.** Avaliação da entomopatogenicidade de formulações fúngicas contra larvas de *Ae. aegypti* em condição laboratório e semi-campo. **a.** *Beauveria* sp. (4.458) em laboratório; **b.** *Beauveria* sp. (4.458) em semi-campo; **c.** *Metarhizium anisopliae* (4.420) em laboratório; **d.** *Metarhizium anisopliae* (4.420) em semi-campo; **e.** *Metarhizium anisopliae* (4.910) em laboratório; **f.** *Metarhizium anisopliae* (4.910) em semi-campo. OM (Óleo mineral); OCop (Óleo de copaíba); OAnd (Óleo de andiroba); Ocas (Óleo de castanha).

Foi avaliada a entomopatogenicidade de formulações aquosas e oleosas de três morfoespécies fúngicas nativas da Amazônia expostas as condições de laboratório e semi-campo (Figura 5). As formulações de *Beauveria* sp. 1 (4.458) foram suscetíveis a condição semi-campo, com taxas de mortalidade que diferiram significativamente das formulações mantidas em laboratório ( $P < 0,0001$ ;  $F_{1,12} = 69,82$ ). A suspensão aquosa de *Beauveria* sp. (4.458) foi menos efetiva quando exposta a condição semi-campo, obtendo taxas de mortalidade de 60%, enquanto em laboratório elevou a mortalidade larval em até 90%. Também houveram diferenças significativas entre as formulações desse fungo e os tratamentos controle ( $P < 0,0001$ ;  $F_{5,12} = 159,23$ ).

As formulações das estirpes *M. anisopliae* (4.420) ( $P = 0,1152$ ;  $F_{1,12} = 2,88$ ) e *M. anisopliae* (4.910) ( $P = 0,6818$ ;  $F_{1,12} = 0,18$ ) não apresentaram diferenças significativas nas taxas de mortalidade larval quando relacionadas as condições de exposição dos tratamentos, no entanto, houveram diferenças significativas quando relacionadas as formulações de *M. anisopliae* (4.420) ( $P = < 0,0001$ ;  $F_{5,12} = 104,86$ ) e *M. anisopliae* (4.910) ( $P = < 0,0001$ ;  $F_{5,12} = 1184,28$ ) e os tratamentos controle.

*Metarhizium anisopliae* (4.420), quando formulado com adjuvantes oleosos, foi hábil em manter a virulência contra *Ae. aegypti* em condição semi-campo, com taxas de mortalidade de 80%. As larvas de *Aedes aegypti* foram mais sensíveis as formulações do fungo *Metarhizium anisopliae* (4.910), que elevou a 100% a taxa de mortalidade nos tratamentos com óleo mineral no 4º dia em laboratório e 5º dia em semi-campo. As formulações aquosas e com óleo de castanha também foram hábeis em manter a taxa de mortalidade acima dos 90%, em ambas condições de exposição.

## DISCUSSÃO

Este estudo confirma a entomopatogenicidade de estirpes fúngicas nativas da Região Amazônica Brasileira contra larvas de *Ae. aegypti*, onde *Beauveria* sp. (4.458), *Metarhizium anisopliae* (4.420) e *Metarhizium anisopliae* (4.910) foram capazes de elevar significativamente a taxa de mortalidade larval *in vitro*.

O gênero *Beauveria* é bastante estudado para o controle biológico de vetores de doenças (BITENCOURT et al., 2018). Suspensões aquosas do isolado *Beauveria* sp. (4.458) tiveram as maiores taxas de virulência contra larvas de *Ae. aegypti*. Fungos do gênero *Beauveria* não são tóxicos para mamíferos, e não é esperado que seu uso tenha efeitos deletérios a saúde humana ou ao ambiente (REGAVENDRAN et al., 2017).

Conídios de *B. bassiana* são eficazes em matar larvas e adultos de mosquitos quando aplicados nos criadouros (DANIEL et al., 2017). Os esporos entram em contato com o exoesqueleto do inseto, desenvolvem hifas que secretam enzimas, e que dissolvem a cutícula (LACEY et al., 2017). Essas hifas fúngicas se alimentam do tecido do corpo, produzem toxinas e se reproduzem, e quando em condições de umidade favoráveis, se multiplicam e liberam mais esporos no ambiente para repetir o ciclo (MASCARIN et al., 2018).

*B. bassiana* produz diversas micotoxinas, como beauvericinas, bassianolídeos, beauveriolídeos, tenelinas, bassianinas, piridoverolidicinas, oosporeinas e bassiacridinas (DANIEL et al., 2017). A beauvericina é um ciclodepsipeptídeo ionofórico detectado em vários fungos, principalmente em *Beauveria* e *Paecilomyces* (ISAKA et al., 2005). Essa micotoxina forma complexos com cátions, o que resulta numa permeabilidade aumentada a membranas naturais e artificiais (TOMAN et al., 2011), além de induzir a morte celular programada semelhante a apoptose (WAETJEN et al., 2014).

Os fungos do gênero *Metarhizium* são vastamente avaliados quanto ao potencial controle de mosquitos vetores de doenças humanas. Esses entomopatógenos fúngicos infectam seus hospedeiros através da cutícula e se desenvolvem na hemolinfa e nos órgãos internos (THOMAS, 2018). A dinâmica da invasão é determinada pela virulência específica do fungo, um alto inóculo inicial de conídios e alta umidade que favorece o desenvolvimento extracuticular do entomopatógeno (VIVEKANANDHAN et al., 2020).

*Metarhizium* possui uma matriz de inseticidas e outros metabólitos secundários bioativos, dentre os quais destacam-se as destruxinas (SHOUKAT et al., 2019). Esses metabólitos desempenham um papel importante para enfraquecer a defesa imunológica do hospedeiro, danificando o sistema muscular e os túbulos de Malpighi, o que leva a dificuldades de alimentação e mobilidade (AMARESAN et al., 2016).

Diversas vias biossintéticas foram descobertas por sequências do genoma de *Metarhizium* (DONZELLI; KRASNOFF, 2016), e incluem vias responsáveis por químicos conhecidos como citocalasinas e ovalicina, vias sem produtos ainda conhecidos em *Metarhizium* mas presentes em outros fungos, como alcalóides de Ergot, dicetopiperazina e lactonas de ácido resorcílico, além de vias que são tão únicas que suas moléculas produzidas ainda não são caracterizadas (WANG et al., 2018). Essas vias sinalizam que a capacidade de *Metarhizium* produzir metabólitos secundários é muito maior do que sua química conhecida, assim, estirpes de *Metarhizium* nativas da região Amazônica possivelmente são fonte de novas moléculas ainda não conhecidas.

A seleção de estirpes virulentas é fundamental no processo de desenvolvimento de um biopesticida, no entanto, a triagem de diferentes tipos de formulações também é essencial para otimizar o desempenho do fungo e minimizar os efeitos negativos causados por fatores abióticos (BITENCOURT et al., 2018).

Foi observado que a germinação conidial dos fungos avaliados foi superior quando menor a concentração de óleo vegetal/mineral, sendo que a formulação com 0,1% de óleo vegetal/mineral se sobressaiu em relação às formulações com 0,5 e 1% de óleo vegetal/mineral. Alguns estudos já avaliaram as taxas de mortalidade de *Ae. aegypti* quando submetido a formulações fúngicas com óleo vegetal e mineral (DE PAULA et al., 2008; MNYONE et al., 2011; CAROLINO et al., 2014; LOBO et al., 2016).

*Beauveria* sp. (4.458) foi sensível a condição semi-campo, causando a mortalidade de 65% das larvas de *Ae. aegypti* quando formulados com óleo mineral e vegetal. Essa estirpe apresentou as melhores taxas de virulência em laboratório quando comparada a *M. anisopliae* (4.420) e *M. anisopliae* (4.910), no entanto, quando submetida a condição semi-campo, foi consideravelmente menos eficaz. Diversos atributos biológicos devem ser avaliados e combinados para desenvolver um bioproduto, assim, as conclusões quanto a efetividade de uma estirpe não pode ser baseada somente na virulência sob condições controladas (MICHEREFF FILHO et al., 2021).

Altas temperaturas e radiação solar UV são os principais fatores que limitam fungos entomopatogênicos em ambientes expostos a luz solar no controle de *Ae. aegypti* (DARBRO et al., 2012). Ao avaliar a persistência dos conídios de *B. bassiana* em artrópodes não-alvo após aplicação em agroecossistemas de pastagem e alfafa, foi observado que mais de 90% dos conídios depositados eram inviáveis após dois dias de aplicação (GOETTEL et al., 2021).

Os adjuvantes oleosos foram hábeis em manter a virulência de *M. anisopliae* (4.420) e *M. anisopliae* (4.910) contra *Ae. aegypti* em condição semi-campo. Considerando que os óleos vegetais são biodegradáveis e ecológicos, a aplicação do óleo mineral em uma formulação fúngica provavelmente aumentaria o efeito residual pós-aplicação de um bioinseticida devido a uma desintegração mais lenta pela atividade

microbiana, se comparado ao óleo vegetal (RODRIGUES et al., 2019). Assim, a aplicação de óleo mineral em baixas concentrações e em uma região focal, sugere um impacto ambiental menos prejudicial, pois o recipiente de aplicação do bioinseticida pode ser descartado sob condições controladas (LOBO et al., 2016).

Fungos do gênero *Metarhizium* produzem grandes quantidades de novos conídios no ambiente após efetivo controle, independentemente das concentrações conidiais ou formulações testadas (CHOI et al., 2020). Essa característica torna esta cepa altamente interessante para aplicações em novos criadouros em regiões de difícil acesso pelos agentes de saúde, caso comum na região amazônica (RODRIGUES et al., 2019).

A formulação do fungo *M. anisopliae* (4.910) com óleo mineral 0,1% representa uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de estratégias potentes de controle deste importante vetor.

## CONCLUSÕES

As estirpes fúngicas nativas da Amazônia *Beauveria* sp. (4.458) ( $CL_{50} = 8,66 \times 10^3$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) ( $CL_{50} = 2,37 \times 10^4$ ) e *M. anisopliae* (4.910) ( $CL_{50} = 2,55 \times 10^4$ ) elevaram significativamente a mortalidade larval de *Ae. aegypti* *in vitro*.

Os conídios de *Beauveria* sp. (4.458), *M. anisopliae* (4.420) e *M. anisopliae* (4.910) foram melhor compatíveis com óleo mineral na concentração 0,1%.

A formulação *M. anisopliae* (4.910) acrescido de óleo mineral 0,1% causou a mortalidade de 100% das larvas de *Ae. aegypti* no 4º dia em laboratório e no 5º dia em semi-campo.

## AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação. Ao Santander pela concessão de bolsa pelo programa Bolsas Ibero Americanas 2020.

## REFERÊNCIAS

- AMERASAN D. et al. Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Metarhizium anisopliae* against the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae). **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 1, p. 249–256, 2016.
- AYALA-ZERMEÑO, M. A. et al. Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, v. 121, n. 11, p. 920-928, 2017.
- BITENCOURT, R. O. B. et al. In vitro Control of *Aedes aegypti* larvae using *Beauveria bassiana*. **International Journal of Bioengineering and Life Sciences**, v. 12, n. 10, p. 400-404, 2018.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 15. **Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 51, n. 16, 2020.
- BUTT, T. M. et al. Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. In: **Advances in genetics**. Academic Press, p. 307-364. 2016.
- CAMARGO, M. G. et al. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1-2, p. 140-147, 2012.
- CARAGATA, E. P.; TIKHE, C. V.; DIMOPOULOS, G. Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 37, n. 1, p. 26-36, 2019.
- CAROLINO, A. T. et al. Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 198-205, 2014.
- CARVALHO, J. R. et al. **Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos**. 2017. 208p.
- CARVALHO, M. D. S. L. D. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.

- CHOI, C. J. et al. An effective entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 2, p. 585-590, 2020.
- DANIEL, J. F. S et al. Larvicidal activity of *Beauveria bassiana* extracts against *Aedes aegypti* and identification of Beauvericins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1003-1013, 2017.
- DARBRO, J. M. et al. Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 656, 2012.
- DE PAULA, A. R. et al. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 10, p. 1017-1025, 2008.
- DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B. Molecular genetics of secondary chemistry in *Metarhizium* fungi. In: **Advances in Genetics**. Academic Press, v. 94, n. 1, p. 365-436. 2016.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. 1987.
- FALVO, M. L. et al. Adulcidal Activity of *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) Native Strains From Argentina Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 2, p. 636-640, 2020.
- FERNANDES, É. K. K. et al. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 427-440, 2015.
- FRANCISCO, E. A. et al. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1309-1312, 2006.
- GOETTEL, M. S. et al. Measurement of internal *Beauveria bassiana* to ascertain non-target impacts on arthropods in field environments. **Biocontrol Science and Technology**, v. 31, n. 8, p. 1-16, 2021.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic Acids Symp. Ser.** 1999. p. 95-98.
- ISAKA, M. et al. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. **Accounts of Chemical Research**, v. 38, n. 10, p. 813-823, 2005.
- JUKES, T. H; CANTOR, A. Evolution of protein molecules. **Mammalian protein metabolism**, v. 3, p. 21-132, 1969.
- LACEY, L. A. G. D. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, n. 1, p. 1-41, 2015.

- LACEY, L. A. Microbial control of medically important mosquitoes in tropical climates. In: **Microbial Control of Insect and Mite Pests**. Academic Press, p. 409-430, 2017.
- LOBO, L. S. et al. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 386-401, 2016.
- MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 165, n. 1, p. 46-53, 2018.
- MICHEREFF FILHO, M. et al. Micoinseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 769-779, 2021.
- MNYONE, L. L. et al. Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. **Parasitology Research**, v. 108, n. 2, p. 317-322, 2011.
- NICOLETTI, M. Three scenarios in insect-borne diseases. In: **Insect-Borne Diseases in the 21st Century**. CRC Press, p. 1-99, 2020.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 239-249, 2015.
- PÁRAMO, M. E. R. et al. Effect of ultraviolet-A radiation on the production of *Leptolegnia chapmanii* (Saprolegniales: Saprolegniaceae) zoospores on dead *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and their larvicidal activity. **Journal of invertebrate pathology**, v. 130, n. 1, p. 133-135, 2015.
- PAULA, A. R. et al. Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 163, 2019.
- RAGAVENDRAN, C. et al. *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **RSC Advances**, v. 7, n. 7, p. 3838-3851, 2017.
- REMADEVI, O. et al. *Metarhizium* based mycoinsecticides for forest pest management. **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. 2, p. 470-473, 2010.
- RODRIGUES, J. et al. Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* sl IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on post mortem conidiogenesis. **Acta Tropica**, v. 193, n. 1, p. 192-198, 2019.
- SHOUKAT, R. F. et al. Pathogenicity and Transgenerational Effects of *Metarhizium anisopliae* on the Demographic Parameters of *Aedes albopictus* (Culicidae: Diptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 3, p. 677-685, 2020.

THOMAS, M. B. Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 61-69, 2018.

TOMAN, P. et al. On the complexation of the sodium cation with beauvericin: experimental and theoretical study. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 142, n. 8, p. 779-782, 2011.

VIVEKANANDHAN, P. et al. Larvicidal toxicity of *Metarhizium anisopliae* metabolites against three mosquito species and non-targeting organisms. **Plos one**, v. 15, n. 5, p. e0232172, 2020.

WANG, Y. et al. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 83, n. 1, p. 12-21, 2018.

WATJEN, W. et al. The mycotoxin beauvericin induces apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by an inhibition of NF-κB-activity and modulation of MAP-kinases. **Toxicology letters**, v. 231, n. 1, p. 9-16, 2014.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

## CONCLUSÕES GERAIS

Avaliar a entomopatogenicidade de novos fungos nativos do Brasil contra diferentes estágios de vida de *Ae. aegypti*, bem como propor formulações a partir da associação de fungos com óleos mineral ou vegetais, que sejam viáveis quando integrados com produtos químicos, são lacunas a serem consideradas preenchidas por pesquisadores brasileiros para obtenção de novos bioproductos eficazes no controle de *Ae. aegypti*.

As estirpes fúngicas nativas da Amazônia *Beauveria* sp. (4.458) ( $DL_{50} = 8,66 \times 10^3$ ), *Metarhizium anisopliae* (4.420) ( $DL_{50} = 2,37 \times 10^4$ ) e *M. anisopliae* (4.910) ( $DL_{50} = 2,55 \times 10^4$ ) elevaram significativamente a mortalidade larval de *Ae. aegypti in vitro*.

Os conídios de *Beauveria* sp. (4.458), *M. anisopliae* (4.420) e *M. anisopliae* (4.910) foram melhor compatíveis com óleo mineral na concentração 0,1%.

A formulação *M. anisopliae* (4.910) acrescido de óleo mineral 0,1% representa uma ferramenta promissora para o controle larval de *Ae. aegypti*.