



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO**

JOÃO ANTÔNIO RANGEL MACHADO

**Desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de
Periplaneta americana durante a invasão**

Goiânia

2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	João Antônio Rangel Machado		
E-mail:	joaoarm@globo.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor	-		
Agência de fomento:	-	Sigla:	-
País:	-	UF:	-
CNPJ:	-		
Título:	Desenvolvimento de <i>Metarhizium anisopliae</i> em ninfas de <i>Periplaneta americana</i> durante a invasão		
Palavras-chave:	<i>Metarhizium anisopliae</i> , ninfas, <i>Periplaneta americana</i> , controle biológico		
Título em outra língua:	Development of <i>Metarhizium anisopliae</i> in <i>Periplaneta americana</i> nymphs during the invasion		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Metarhizium anisopliae</i> , nymphs, <i>Periplaneta americana</i> , biological control		
Área de concentração:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	27/03/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Orientador (a):	Wolf Chiristian Luz		
E-mail:	wchrisluz@hotmail.com		
Co-orientador (a):*	Evertton Kort Kamp Fernandes		
E-mail:	everttonkort@yahoo.com.br		

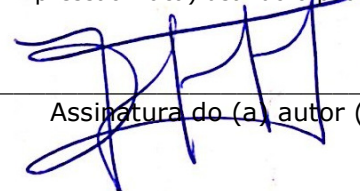
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 25 / 05 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

JOÃO ANTÔNIO RANGEL MACHADO

**Desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de
Periplaneta americana durante a invasão**

Dissertação de Mestrado desenvolvida no
Laboratório de Patologia de Invertebrados,
Instituto de Patologia e Saúde Pública,
Universidade Federal de Goiás, Programa de
Pós-graduação Biologia da Relação Parasito-
Hospedeiro.

Área de concentração: Parasitologia
Orientador: Prof. Dr. Wolf Christian Luz,
IPTSP,UFG, Goiânia.

Goiânia

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Rangel Machado, João Antônio
Desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* em ninfas de
Periplaneta americana durante a invasão [manuscrito] / João Antônio
Rangel Machado. - 2015.
LXI, 61 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Wolf Christian Luz; co-orientador Dr. Everton
Kort Kamp Fernandes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2015.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras.

1. *Metarhizium anisopliae*. 2. Ninfas. 3. *Periplaneta americana*. 4.
controle biológico. I. Luz, Wolf Christian, orient. II. Kort Kamp
Fernandes, Everton , co-orient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Norberto Machado e Liliana Cesário, irmãos Miguel Machado e Norllyana Machado, pela confiança depositada. Aos meus amigos, Fabian Ariel Lopez Garcia, Flúvia Vieira e Daniel Vieira que sempre me apoiaram e escutaram quando mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wolf Christian Luz, meu orientador, por sua paciência.

Aos meus colegas do Laboratório de Patologia de Invertebrados (LPI), em especial a Juscelino Rodrigues Filho, Rayssa Fátima Hubner Campos e Alaine Maria Lopes Catão pela disposição em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes pelo tempo dedicado a me ouvir e corrigir sempre que possível.

A Prof. Dra. Claudia Lopez Lastra, Alejandra Gutierrez e Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE)/Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina.

Ao apoio financeiro durante os 5 meses de 2013 (Julho a Novembro) concedido pela CAPES no projeto Mercosul PCPP 06/2011.

A Dra. Tatiane Oliveira dos Santos e LabMic – Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução - UFG.

A Profa. Dra. Solange Xavier pela participação na banca de qualificação com considerações pertinentes a conclusão desse trabalho.

A Profa. Dra. Walquíria Arruda pelo empenho e ajuda prestados para que fosse possível realizar parte desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Walmirton Bezerra D' Alessandro por haver participado da banca de defesa.

RESUMO

A susceptibilidade de baratas à infecção com fungos entomopatogênicos parece ser ligada a espécie hospedeira e estágio/estádio. A resistência elevada de ninfas mais velhas de *Periplaneta americana*, uma espécie sinantrópica em regiões tropicais e subtropicais, para *Metarhizium anisopliae* ainda está pouco entendida e pode ser ligada a mecanismos comportamentais, mecânicos e fisiológicos. Ninfas de quarto e quinto ínstar (N4 ou N5) tratadas topicamente com conídios removeram mecanicamente parte dos conídios da cutícula com as antenas e patas imediatamente após tratamento e nos próximos dias. Um número reduzido ($< 5\%$) dos conídios na cutícula germinou nas primeiras 24 horas, e a germinação quantitativa dos conídios restantes chegou até 80% nos próximos 7 dias. Na maioria das ninfas tratadas, o fungo não conseguiu chegar na hemolinfa durante os 10 dias do teste, e nas outras, o número de corpos hifais variou entre 500 e 8×10^7 por μl de hemolinfa. Poucas ninfas (30%) morreram até 10 dias após inoculação, e *M. anisopliae* desenvolveu em 50% dos cadáveres. Os resultados confirmaram a grande resistência de ninfas mais velhas de *P. americana* para *M. anisopliae* e ressaltaram a importância das fases iniciais da infecção durante o contato e invasão do inseto pelo fungo. Padrões de comportamento subsocial e fatores fisiológicos específicos na cutícula, não esclarecidos nesse estudo, são questões chave de resistência e precisam ser considerados no desenvolvimento de micoinseticidas para controle de *P. americana* e de outras baratas.

ABSTRACT

The susceptibility of cockroaches to infection with pathogenic fungi can be associated to the host species and their stage/instar. The high resistance of elder nymphs of *Periplaneta americana*, a synanthropic species in tropical and subtropical regions, against *Metarhizium anisopliae* is still poorly understood and can be connected to behavioral, physiological and mechanical mechanisms. Fourth and fifth instar nymphs (N4 or N5), treated topically with conidia, removed mechanically part of the conidia from the cuticle, antennae and legs, immediately after treatment and in the following days. A small number (< 5%) of the conidia on the cuticle germinated in the first 24 hours, and quantitative germination of the remaining conidia reached 80% within the next 7 days. In most of the treated nymphs, the fungus failed to reach the hemolymph during the 10 days of the test, and in the others, the number of hyphal bodies ranged from 500 to 8×10^7 per μL hemolymph. Few nymphs (30%) died within 10 days after inoculation, and *M. anisopliae* developed in 50% of the cadavers. The results confirmed the high resistance of elder *P. americana* nymphs to *M. anisopliae* and highlighted the importance of the early stages of the infection during the contact and insect invasion by the fungus. Subsocial behavior patterns and specific physiological factors in the cuticle, not elucidated in this study, are resistance key issues and need to be considered when developing mycoinsecticides for *P. americana* and other cockroach control.

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

- Figura 1 - Cladograma enfatizando a filogenia da ordem Blattodea (Vermelho).
Adaptado de: Beccaloni & Eades (2015). 16
- Figura 2 – Porção final do abdômen de *Periplaneta americana*. Macho (A) com dois cercis (a) e dois estilos (b). Fêmea (B) que apresenta apenas dois cercis (c). Fonte: Hubner-Campos (2012) (Adaptada). 17
- Figura 3 - Imagem de *Prosoplecta* sp., mimetizando a coloração de um besouro joaninha. Fonte: Becalloni (2013). 19
- Figura 4 - Ooteca de *Periplaneta americana* (A), ninfas após eclosão (B). Fonte: Hubner-Campos (2012) (Adaptada). 22
- Figura 5 - Vista lateral de adulto de *Periplaneta americana* (A); imagem microscópica da antena multisegmentada com pelos sensoriais (B) aumento de 170 vezes. 23
- Figura 6 – Cutícula de *Periplaneta americana*, composta pela procutícula e epicutícula, ambas compostas de outras camadas que formam a estrutura cuticular. Fonte: Mills (1982) (modificado). 24
- Figura 7 - Ninfas de *Periplaneta americana* em processo de ecdise. Ninfas com fissura medial na região dorsal, no início do processo de ecdise (A), fase mais avançada do processo de muda em que a ninfa já está com a exúvia quase toda retirada (B), ninfa após ecdise, com coloração esbranquiçada (C). Fonte: Huber-Campos (2012). 26

- Figura 8 - Ação de *Metarhizium* sp. em inseto hospedeiro. (Fonte: Mascarin & Pauli 2010). 35
- Figura 9 - Caixa de criação de ninfas de *Periplaneta americana*. Exterior da caixa mostrando o tecido utilizado na vedação (seta preta), bandeja de papelão (seta azul) (A). Interior da caixa (vista de cima): placa com ração (seta vermelha) e bebedouro com algodão umedecido (seta amarela) (B). 39
- Figura 10 - Preparo da suspensão fúngica, raspando conídios de *Metarhizium anisopliae* do meio de cultura (A), suspendendo-os em solução 0,1% de Tween 80® (B), agitação em Vórtex (C) e filtragem da suspensão por algodão hidrófilo (D). 41
- Figura 11 - Aplicação de 15 µL de formulado fúngico na região dorsal do tórax e abdome de cada ninfa de *Periplaneta americana*, com o auxílio de uma pipeta semiautomática. 42
- Figura 12 - Retirada de hemolinfa. (A) Anatomia de parte da pata seccionada Fonte: <http://www.osaka.com.br/anatomia-barata.php> (B) secção realizada com tesoura no terceiro par de patas. (C) formação de gota de hemolinfa (D) com auxílio de uma pipeta semiautomática, retirada de 20 µl de hemolinfa. 46
- Figura 13 – Número acumulado de ninfas (%) e erro padrão das médias, de ninfas de *Periplaneta americana*, tratadas topicamente com suspensão de conídios de *Metarhizium anisopliae* em óleo-água, até 10 dias pós inoculação. 48
- Figura 14 – Parte da cutícula de ninfa de *Periplaneta americana* após a aplicação de conídios de *Metarhizium anisopliae* IP 46, fixada 24 h após inoculação

tópica (A), poucos conídios germinados (setas); fixada 168 h após inoculação tópica (B) com conídios apresentando tubo germinativo e hifas curtas (setas). Segmento da antena de ninfa, uma 20 min após inoculação(C) mostrando amontoados de conídios, e outra 168 h após inoculação (D) com poucos conídios não germinados. Exúvia de uma ninfa, fixada 72 horas após inoculação tópica (E) com conídios germinados e presença de hifas longas (setas). Cadáver de ninfa, 168 horas após inoculação tópica (F) com micélio e novos conídios. 49

Figura 15 - Mortalidade acumulada (%) e erro padrão das médias, até 10 dias após inoculação, de ninfas de *Periplaneta americana*, tratadas topicamente com conídios de *Metarhizium anisopliae* em óleo-agua. 50

Figura 16 - Média ($\pm$ erro padrão da média) da concentração de corpos hifais/ μ l de hemolinfa, encontrados em ninfas de *Periplaneta americana*, quarto e quinto instar, sacrificadas diariamente, que foram tratadas previamente com conídios de *Metarhizium anisopliae*, ($1,5 \times 10^7$ conídios/ninfa) e incubados a 25° C e umidade relativa próxima da saturação (A), e unidades formadoras de colônia (UFC)(B) por microlitro de hemolinfa, 10 dias pós inoculação..... 51

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Por cento
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
ARSEF	Agricultural Research Service entomopathogenic fungal
BDA	batata, dextrose, ágar
cm	Centímetro
CO₂	dióxido de carbono
d-	dextrogiro
DDT	diclorodifeniltricloroetano
EUA	Estados Unidos da América
h	Hora
IgE	imunoglobulina E
M	Molar
min	Minuto
mm	Milímetro
°C	graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico
pi	<i>post inoculationem</i>
RPM	rotações por minuto
SDAL	Sabouraud, dextrose, ágar, levedura
seg	Segundos
UFC	unidades formadoras de colônia
UR	umidade relativa
USDA	United States Department of Agriculture
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão da literatura	16
2.1. Generalidades sobre as baratas	16
2.1.1. Origem e sistemática	16
2.1.2. Morfologia	17
2.1.3. Reprodução	18
2.1.4. Comportamento	18
2.1.5. Importância médica.....	20
2.1.6. Outras funções de baratas.....	21
2.2. <i>Periplaneta americana</i>	21
2.2.1. Morfologia	21
2.2.2. Ciclo biológico.....	24
2.2.3. Importância e comportamento	27
2.3. Métodos para controle de baratas.....	28
2.3.1. Medidas de higiene.....	28
2.3.2. Inseticidas químicos.....	29
2.3.3. Inseticidas botânicos.....	30
2.3.4. Controle biológico	31
2.3.4.1. Fungos entomopatogênicos	32
2.3.4.1.1. Ciclo biológico de fungos entomopatogênicos	33
2.3.4.2. Fungos no controle de baratas	35
3. Justificativa.....	37
4. Objetivos	38
4.1. Geral	38

4.2. Específicos	38
5. Materiais e métodos	39
5.1. Origem, criação das baratas	39
5.3. Origem, cultivo, preparo do fungo e formulado	40
5.5. Aplicação de conídios, secos ou formulados em óleo-água em ninfas	42
5.6. Avaliação do comportamento e muda	43
5.7. Análise da presença e do desenvolvimento de conídios e de micélio sobre a cutícula	43
5.10. Análise estatística dos resultados	46
6. Resultados	47
6.1. Comportamento pós-tratamento e muda de ninfas	47
6.2. Desenvolvimento de <i>M. anisopliae</i> na cutícula de <i>P. americana</i>	48
6.3. Mortalidade de ninfas	50
6.4. Número de corpos hifais na hemolinfa	51
7. Discussão	52
7.1. Comportamento e muda pós inoculação	52
7.2. Desenvolvimento de conídios sobre a cutícula de ninfas	53
7.3. Presença de <i>M. anisopliae</i> na hemolinfa de ninfas	53
8. Conclusão e considerações finais	55
9. Referências bibliográficas	56

1. INTRODUÇÃO

Periplaneta americana é uma espécie de barata com distribuição cosmopolita. É considerada praga sinantrópica porque apresenta relação direta com o homem, invadindo áreas peridomiciliares, como jardins e arredores de residências, áreas domiciliares, principalmente cozinha, sistema de esgoto, banheiros e áreas hospitalares (Vianna et al. 2001). A importância médica dessa praga está diretamente relacionada com seu potencial como vetor mecânico, associada à transmissão de bactérias, fungos, helmintos e disseminação de substâncias alérgicas (Arruda et al. 2001).

Atualmente, o controle dessa praga é realizado principalmente através de substâncias químicas, que além de serem responsáveis pela intoxicação de humanos e animais domésticos, induzem resistência em baratas e perdem a atividade inseticida (Dong et al. 1996, Sardul et al. 2012).

Medidas de controle biológico oferecem mais segurança que compostos químicos, e o potencial de fungos entomopatogênicos para controle de baratas vem sendo estudado por algum tempo. Ainda que a maioria dos micoinseticidas comercializados existentes no mercado são voltados apenas para o controle de pragas agrícolas (Hajek 2004) *Metarhizium anisopliae* é uma das espécies mais estudada e utilizada para controle biológico de pragas em geral (Faria & Wraight 2007, Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez 2011).

Uma vez em contato com a cutícula, conídios de *M. anisopliae* começam a germinar e formam tubo germinativo e hifas. Enzimas são liberadas pelas estruturas fúngicas e auxiliam no processo de penetração (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez 2011, Khan et al. 2012); o fungo atravessa a cutícula e o epitélio

e chega à hemocele. A cutícula de um inseto é composta por uma série de camadas que podem apresentar substâncias que diminuem ou impedem o desenvolvimento fúngico (Humber 2011). Entretanto, para que o fungo complete a infecção, todas as camadas devem ser atravessadas.

Uma vez que o fungo atinge a hemocele, passa por um processo de desfragmentação hifal, originando corpos hifais que se distribuem por meio da hemolinfa por todo corpo do inseto. Corpos hifais utilizam nutrientes presentes na hemolinfa para seu desenvolvimento e podem produzir toxinas, que causam intoxicação, levando o inseto à morte (Rodriguez & Arredondo 2007, Augustyniuk-Kam & Kram 2012). No cadáver, hifas emergem através da cutícula, e ocorre a conidiogênese.

Ainda existam poucos relatos na literatura em relação à atividade de fungos entomopatogênicos em diferentes estágios de *P. americana*, especialmente em estádios ninfais (Hubner-Campos et al. 2013). Os poucos dados disponíveis mostram que essa espécie apresenta maior resistência à infecção fúngica comparado com outras espécies de baratas (Quesada-Morada et al. 2004, Lopes & Alves 2011). Os mecanismos envolvidos nessa resistência ainda não são bem esclarecidos. *P. americana* como outras baratas é um inseto subsocial (Tallamy & Wood 1986, Entomologia UFV 2015), fazendo autolimpeza (“grooming”) com as antenas e patas em regiões definidas do corpo, para remover sujeiras ou provavelmente também patógenos, como fungos entomopatogênicos.

A expansão do conhecimento sobre o desenvolvimento de *M. anisopliae* em ninfas de *P. americana* e os mecanismos de defesa dessa espécie irão contribuir para o controle mais eficiente dessa praga com um micoinseticida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Generalidades sobre as baratas

2.1.1. Origem e sistemática

A origem exata das primeiras baratas é desconhecida. Os primeiros fósseis, encontrados em materiais rochosos, datam de 300 milhões de anos (Copeland 2003).

Baratas pertencem a ordem dos blatódeos (Insecta: Blattodea) (Figura 1), sendo mais de 4000 espécies (Bell et al. 2007), com um terço distribuído no globo terrestre por zonas neotropicais. Uma parte vive em áreas peridomiciliares, em contato com o homem. A maioria possui hábitos silvestres e diurnos. Apenas 1% tem o status de praga (Vianna et al. 2000).

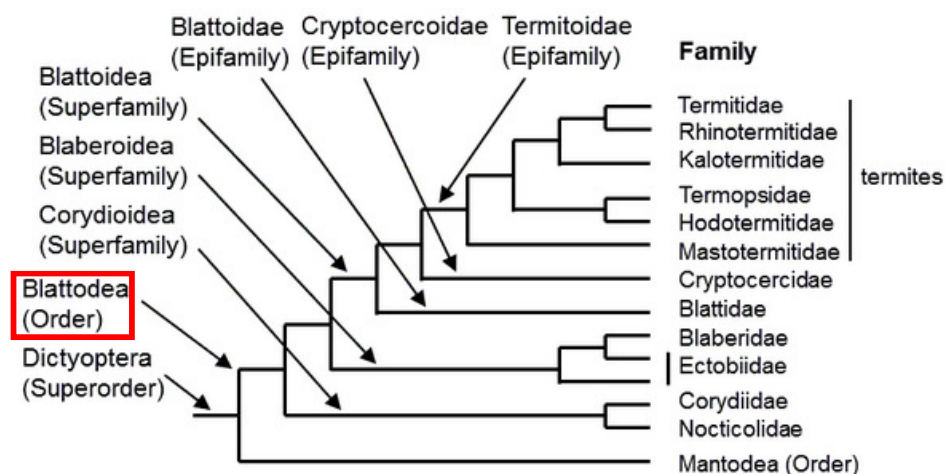


Figura 1 - Cladograma enfatizando a filogenia da ordem Blattodea (Vermelho). Adaptado de: Beccaloni & Eades (2015).

2.1.2. Morfologia

As baratas são insetos de corpo achatado e ovalado, com a presença de um pronoto, que possui cores diferenciadas de acordo com a espécie, tem forma de escudo e protege a cabeça (Becalloni 2013). Algumas espécies não são aladas, outras, como *P. americana* apresentam asas somente quando atingem o estágio adulto (Bell et al. 2007, Becalloni 2013). Todas as espécies apresentam dimorfismo sexual. O macho de *Blaberus giganteus* possui um maior número de segmentos abdominais que a fêmea (Kunkel 2012). Em *P. americana*, ao final do último segmento abdominal, o macho apresenta dois cercis, que captam a vibração do ar, e dois estilos, que desempenham função tátil durante a cópula, enquanto a fêmea apresenta apenas dois cercis (Figura 2) (Bell et al. 2007). Nas baratas da espécie *Lucihormetica fenestrada*, o macho apresenta, na região do pronoto tubérculos amarelos luminescentes (Becalloni 2013), possivelmente essa é uma característica que contribui no cortejo da fêmea.

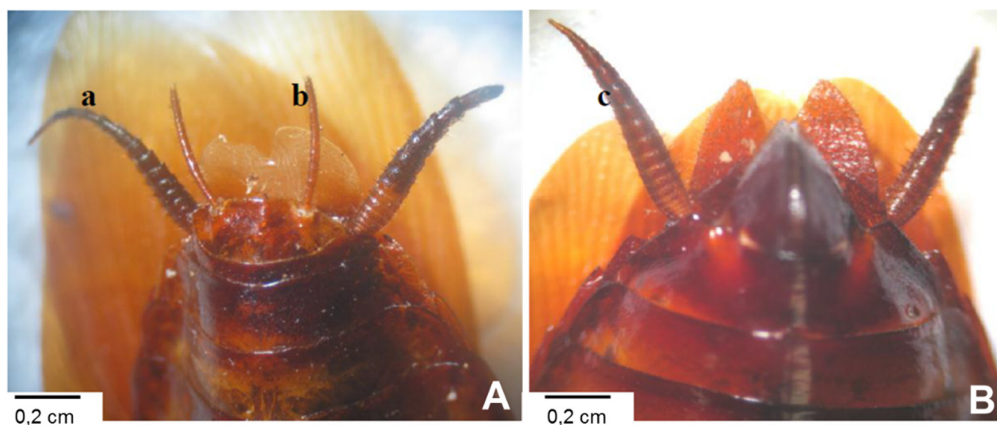


Figura 2 – Porção final do abdômen de *Periplaneta americana*. Macho (A) com dois cercis (a) e dois estilos (b). Fêmea (B) que apresenta apenas dois cercis (c). Fonte: Hubner-Campos (2012) (Adaptada).

2.1.3. Reprodução

Baratas apresentam comportamentos distintos de acasalamento, de acordo com a espécie (Bell et al. 2007). *Neopolyphaga miniscula* e *Cryptocercus punctulatus* são monogâmicas, uma vez que as fêmeas copulam somente com um macho, e a copula pode ser única ou haver múltiplas (Bell et al. 2007). Já *Blattella germanica* e *P. americana* são poligâmicas, pois uma fêmea copula com vários machos (Bell et al. 1982, Bell et al. 2007).

Os blatódeos são diversos em sua reprodução. Espécies como *B. germanica*, *P. americana* e *Blatta orientales* produzem uma estrutura dura em volta dos ovos, chamada de ooteca (Cameron 1961, Bell et al. 2007), que são liberadas no solo ou acopladas ao corpo da fêmea. Em contrapartida, *Diplotera punctata* possui somente uma membrana que envolve os ovos, os quais são carregados em uma bolsa junto ao corpo da fêmea (Bell et al. 2007, Becalloni 2013).

2.1.4. Comportamento

As baratas são insetos onívoros, ou seja, chegam a comer qualquer tipo de alimento. Após eclosão, as ninfas de primeiro estágio se alimentam de material fecal dos adultos para aquisição de simbioses (Bell et al. 2007). São atraídas por odores adocicados e possuem preferência por alimentos ricos em açúcares (Bell et al. 2007). Na ausência desses, comem qualquer material (Parry 2007).

Esses insetos apresentam mecanismos de sobrevivência e proteção contra predadores, tais como: a camuflagem, esconderijo e a produção de substâncias químicas (Becalloni 2013). Algumas espécies silvestres são de diferentes colorações, outras podem mimetizar cores de outros insetos de forma a se camuflar para iludir predadores. *Prosoplecta* sp., consegue mimetizar a coloração do besouro joaninha (Figura 3) (Becalloni 2013).



Figura 3 - Imagem de *Prosoplecta* sp., mimetizando a coloração de um besouro joaninha. Fonte: Becalloni (2013).

Embora se afirme que as baratas sejam resistentes à radiação nuclear, pois sobreviveram a uma guerra, elas são meramente menos sensíveis que o homem (Kruszelnicki 2006). A radiação destrói células durante o processo de divisão celular e esse fato acontece mais acentuadamente durante o processo de muda (Kunkel 2012).

2.1.5. Importância médica

Baratas estão associadas a casos de alergias e asma, principalmente em infantes, devido a substâncias imunógenas (antígenos) presentes em restos de exúvias, saliva, secreções corporais utilizadas para demarcar território, em fezes, deixadas por esses insetos quando invadem habitações humanas (Salehzadeh et al. 2007) em busca de abrigo e alimentação. Vários antígenos associados a baratas, principalmente ligadas a *P. americana* e *B. germanica*, já foram isolados e caracterizados molecularmente (Arruda 2001). Quando o organismo humano entra em contato com esses antígenos, principalmente por meio da respiração, processos alérgicos são desencadeados, aumentando em grande quantidade a liberação de anticorpos da classe IgE, causando sintomas, como coriza, irritação, coceira e vermelhidão (Arlian 2002, Rust 2008). A intensidade da reação está diretamente ligada ao grau e tempo de exposição a esse antígeno.

Além disso, baratas são importantes vetores mecânicos de bactérias, fungo, helmintos e vírus (Bell et al. 2007) causadores de enfermidades. Por serem encontradas em áreas de preparo e manipulação de alimentos; em ambientes hospitalares, em contato com secreções de humanos doentes; podem transmitir bactérias para alimentos, constituindo uma via de contaminação. Bactérias, como: *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp e *Klebsiella pneumoniae* já foram isoladas da superfície de baratas (Pai et al. 2004, Salehzadeh et al. 2007, Nasirian 2010).

Para tratamento de doenças, em alguns lugares do mundo, como: Austrália, Brasil, e também em algumas partes da Ásia e Europa, esses insetos são triturados, cozidos, secos ou fritos em óleo e incorporado a preparações para tratar asma, úlcera, edema e indigestão (Copeland 2003).

2.1.6. Outras funções de baratas

Apesar de serem vistos com repugnância, as baratas têm seu papel importante na cadeia alimentar (Kruszelnicki 2006), na decomposição, fixação de nitrogênio e produção de metano, realizados através de microrganismos celulolíticos e metanógenos presentes em seu intestino grosso, que influenciam os ciclos biogeoquímicos (Bell et al. 2007).

Na culinária asiática como fonte alimentar de ácidos graxos e proteínas para humanos (Copeland 2003).

2.2. *Periplaneta americana*

2.2.1. Morfologia

P. americana pertencente à família Blattidae (Kunkel 2012,). Possui desenvolvimento hemimetabólico, com fases de ovo em ooteca, ninfa e adulto (Roth 1982).

A ooteca é uma estrutura em forma de bolsa, formada principalmente por oxalato de cálcio, proteínas e lipídeos (Figura 4A). Esses elementos lhe

conferem dureza e impermeabilidade (Roth 1982). Envolve de 12 a 18 ovos e mede cerca de 8 mm de largura e 5 mm de comprimento (Vianna et al. 2000, Barbara 2014). Danos à ooteca inviabilizam o desenvolvimento e eclosão das ninfas (Maya et al. 2002).

Ninfas de primeiro instar (N1) (Figura 4B), após eclosão, têm tamanho pequeno (cerca de 3 mm) e coloração esbranquiçada (Bell et al. 2007); entretanto após algumas horas a cutícula muda de coloração para cinza amarronzada. Esse processo ocorre após cada muda de estágio (Cameron et al. 1961). Todos os estádios ninfaís são parecidos morfologicamente aos adultos, a não ser pelos órgãos sexuais imaturos e ausência de asas (Cameron et al. 1961, Roth 1982).

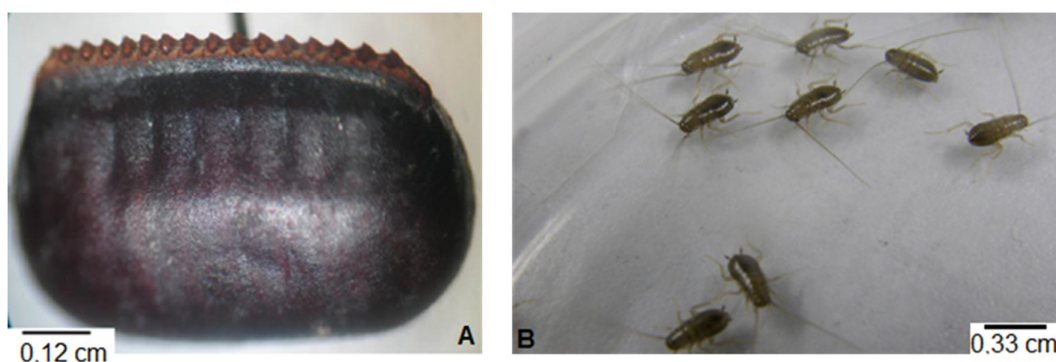


Figura 4 - Ooteca de *Periplaneta americana* (A), ninfas após eclosão (B). Fonte: Hubner-Campos (2012) (Adaptada)

Os Adultos medem de 30 a 50 mm de comprimento (Goddard 2002), possuem uma coloração amarronzada, com uma faixa amarela na região do pronoto (Bell et al. 2007). Têm a cabeça do tipo hipognata (Cameron et al. 1961), ou seja, os apêndices bucais estão voltados para baixo, e o crânio é alinhado com o tronco e protegido por uma estrutura dura do exoesqueleto (Figura 5A). Um par de antenas segmentadas, filiformes, responsáveis pela função tátil, e

também olfativa (Figura 5B), está presente na região próxima aos olhos (Cameron et al. 1961). As peças bucais realizam a mastigação de alimentos (Bell et al. 2007).

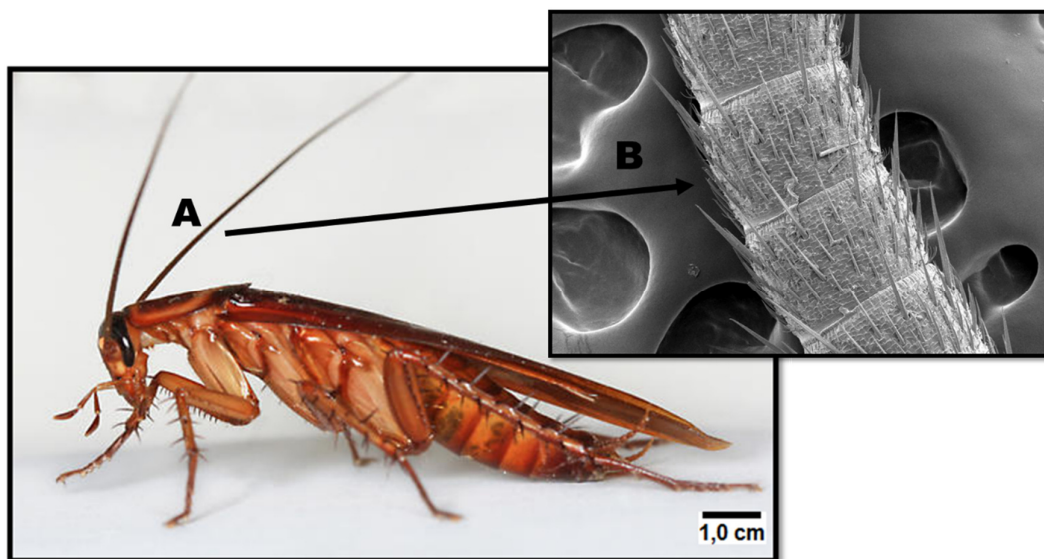


Figura 5 - Vista lateral de adulto de *Periplaneta americana* (A); imagem microscópica da antena multissegmentada com pelos sensoriais (B) aumento de 170 vezes.

Assim como outros insetos, *P. americana* apresenta a cutícula dura. Essa funciona como barreira e proteção, prevenindo contra a perda de água com consequente desidratação. Tem coloração escurecida, a qual permite que ela se esconda nos arredores, evitando ataque de predadores. A cutícula também proporciona rigidez e suporte para o corpo, com pontos de fixação para os músculos (Cameron et al. 1961, Mills 1982).

A cutícula é constituída pela procutícula, mais interna, formada pela exocutícula e endocutícula, e a epicutícula formada por duas camadas, uma de cera e outra de cimento. A epiderme, na base da procutícula sustenta e secreta cutícula (Dennel & Malek 1954, Mills 1982) (Figura 6). Os lipídeos na epicutícula

são liberados por meio de canais de poros, formados por filamentos advindos da camada de cera e impedem a impregnação de substâncias (Mills 1982).

As substâncias químicas que compõe a cutícula das baratas, pode variar de acordo com a espécie (Gutierrez et al. 2015).

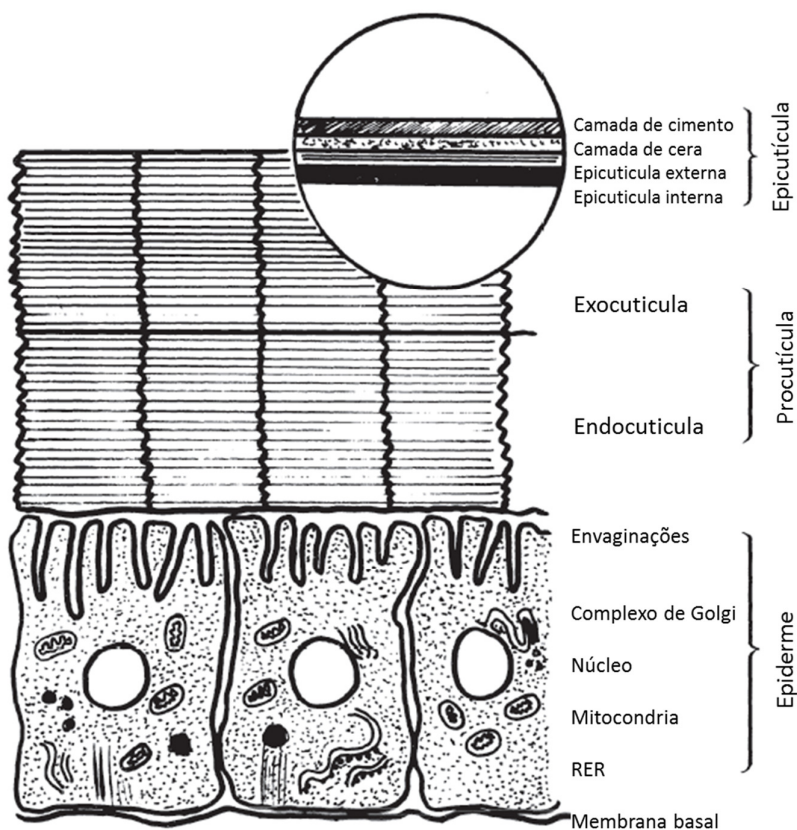


Figura 6 – Cutícula de *Periplaneta americana*, composta pela procutícula e epicutícula, ambas compostas de outras camadas que formam a estrutura cuticular. Fonte: Mills (1982) (modificado).

2.2.2. Ciclo biológico

As N1 de *P. americana* eclodem em torno de 38 a 49 dias, após liberação da ooteca pela fêmea, em temperaturas em torno de 30° C e umidade $\geq 80\%$ (Vianna et al. 2000, 2001).

As ninfas necessitam, para alcançar a fase adulta, em média de 5 a 15 meses (Bell et al. 2007). A primeira ecdise normalmente acontece um mês após a eclosão (Cameron et al. 1961). Caso haja necessidade reprodutiva para aumento da colônia, presença de predadores e temperaturas acima de 28° C, as ninfas podem passar a adultos em um menor prazo de tempo que o período comum, como estratégia de sobrevivência (Vianna et al. 2001).

À medida que as ninfas iniciam o processo de ecdise uma nova cutícula é formada pela epiderme. As células da epiderme iniciam o processo de divisão celular. Assim, uma nova membrana, que posteriormente originará a nova cutícula, está formada abaixo da endocutícula (Bell et al. 1982). Após a formação do novo exoesqueleto, forma-se uma fissura mediana dorsal (Figura 7A), em que se abre uma fenda por onde a ninfa, com o novo exoesqueleto (Figura 7B), sai e deixa os restos da anterior, chamado de exúvia (Figura 7C). Esse processo demanda grande quantidade de reações metabólicas e alto aporte energético (Cameron et al. 1962).

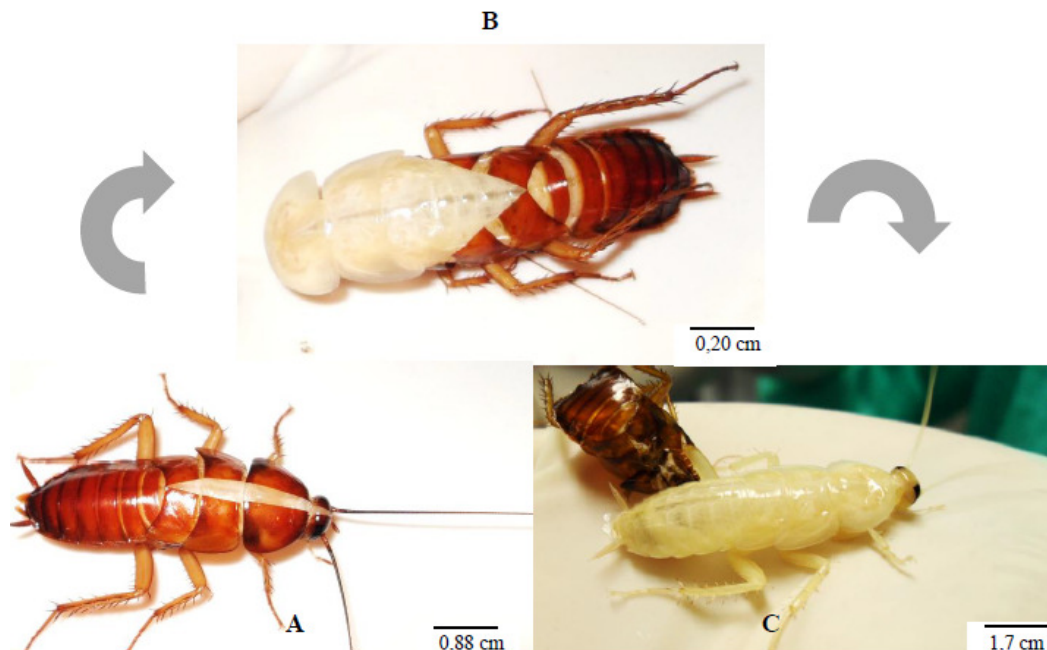


Figura 7 - Ninfa de *Periplaneta americana* em processo de ecdise. Ninfa com fissura medial na região dorsal, no início do processo de ecdise (A), fase mais avançada do processo de muda em que a ninfa já está com a exúvia quase toda retirada (B), ninfa após ecdise, com coloração esbranquiçada (C). Fonte: Huber-Campos (2012).

Após a de ecdise, uma série de reações químicas acontece, seguido por desidratação, que irá dar à cutícula sua dureza e coloração escurecida (Dennel & Malek 1954, Cameron et al. 1962, Mills 1982). Esse processo de ecdise acontece a cada mudança de estágio até o adulto e pode variar, geralmente, de 11 a 13 estádios para machos e de 9 a 13 para fêmeas (Vianna et al. 2001).

Depois que a barata alcança a fase adulta, o macho copula com a fêmea. Essa deposita uma ooteca até uma semana depois (Roth 1982). No seu auge reprodutivo, uma fêmea pode chegar a colocar duas ootecas por semana (Vianna et al. 2000), totalizando até 27 ootecas/ano, levando em consideração que uma fêmea apresenta longevidade média de 392 dias (Vianna et al. 2000, 2001).

2.2.3. Importância e comportamento

P. americana é considerada sinantrópica, pois apresenta relação direta com o homem, vive em áreas peridomiciliares, como jardins, contêineres para lixo e em raízes de árvores. Em caso de escassez de alimentos, invade as habitações humanas e se aloja em áreas domiciliares, tais como: cozinha e banheiro, armários, frestas de paredes, encanamento, caixas de água, ralos, caixas de gordura, em busca de fontes de alimentos e abrigo contra predadores (Rust 2008).

No ambiente hospitalar a barata também encontra condições favoráveis de temperatura e umidade para sobrevivência (Vianna et al. 2000). Entretanto, devido a sua característica de vetor mecânico, as baratas, em ambientes hospitalares, atuam como agentes disseminadores de doenças nosocomiais (Pai et al. 2004, Salehzadeh et al. 2007)

Geralmente as baratas invadem o ambiente domiciliar, pois são atraídas pela disponibilidade de alimento. Na falta de fontes alimentares de sua preferência, *P. americana* pode se alimentar de qualquer tipo de material, como papel, papelão, materiais sintéticos, mas também, cola, restos de sua própria ecdise, animais mortos, restos de pele e sangue seco (Roth 1982).

Para se alimentar, *P. americana* libera um líquido por meio das glândulas bucais sobre o alimento. Esse promove o amolecimento para posterior ingestão, processo denominado de digestão extracorpórea (Vargas 1995). Após a deglutição um pouco do conteúdo gastrointestinal é regurgitado e, por esse processo promovem a passagem de simbiossomas para a prole, disseminam

alérgenos no ambiente com consequente marcação do território com odor característico e disseminam alérgenos no ambiente (Arruda et al. 2001, Bell et al. 2007).

Destaca-se também que, quando atraída por odor de restos de alimentos, *P. americana* pode se aproximar do rosto de pessoas durante a noite, enquanto dormem, roer regiões dos lábios ou próximas à boca, ocasionando lesões vesiculosas, essas são chamadas de *herpes blattae* (Miranda & Silva 2008).

Esses blatódeos também possuem comportamento gregário, ou seja, indivíduos mais jovens estão geralmente associados a adultos, e machos associados a fêmeas, devido a feromônios produzidos (Rust et al. 1976, Bell & Tobin 1981, Bell et al. 2007, Ponce et al. 2005). Esse processo também contribui para sobrevivência.

2.3. Métodos para controle de baratas

2.3.1. Medidas de higiene

A presença de baratas está associada a higiene precária em ambientes domiciliares, peridomiciliares, profissionais e hospitalares, nos quais esses insetos são atraídos devido à presença de fontes alimentares nesses locais (Rivault & Cloarec 1995).

Uma série de medidas que visam a melhor higiene são utilizadas para conter as infestações domésticas de baratas. Isso é realizado por meio do melhor

acondicionamento de resíduos orgânicos, de maneira a limitar a liberação de odores.

Usar telas, tampas em ralos de pia ou saída externa de água, vedação de caixas de gordura e fossas, são medidas empregadas para conter a disseminação de baratas, pois áreas vedadas dificultam o acesso desse inseto (Miller & Koehler 2014).

2.3.2. Inseticidas químicos

Até recentemente, a utilização de produtos químicos é a medida de controle mais empregada para batatas no Brasil (Pereira 2007). Dentre os produtos utilizados estão os piretróides (permetrina, cipermetrina, deltametrina, ciflutrina), carbamatos (propoxur, ficam, carbaryl, bendiocarb), fenilpiridazóis (fipronil), e excepcionalmente organoclorados (diclorodifeniltricloroetano - DDT) e organofosforados (dizinon, actillic, malathion) (Gammon et al. 1981, Nasirian 2010). O DDT tem uso restrito apenas em campanhas de saúde pública (Brasil 1985).

A maioria dessas substâncias químicas utilizadas, como os piretróides, atuam sobre o sistema nervoso do inseto, impedindo a transmissão do impulso nervoso e causam paralisia e morte (Gammon et al. 1981).

A preocupação maior consiste na questão tempo de permanência dessas substâncias químicas no meio ambiente e a intoxicação de pessoas e animais domésticos. Segundo o Ministério da Saúde, esses constituem, depois de medicamentos, a principal causa de intoxicações no país (Ortiz 2011).

Outro fator relevante, que deve ser considerado, é que a utilização dessas substâncias para controle de baratas, está relacionada a resistência desses insetos (Rivault & Cloarec 1995). A resistência está ligada, muitas vezes, à forma incorreta na aplicação de inseticidas (Rivault & Cloarec 1995), mecanismos genéticos ligados a alterações celulares que alteram a permeabilidade a essas substâncias na barata (Dong 1996) e alterações metabólicas desses agentes químicos, que reduzam seu potencial tóxico nesses insetos (Scott et al. 1990, Nasirian 2010).

2.3.3. Inseticidas botânicos

A utilização de derivados vegetais ou inseticidas botânicos é uma prática milenar, muito utilizada na agricultura no controle de insetos. Tais substâncias, em geral, são óleos essenciais extraídos de espécimes vegetais e constituem uma alternativa para substituir compostos químicos sintéticos (Isman 2006).

Em alguns insetos esses compostos atuam similarmente aos sintéticos, atingindo o sistema nervoso central, porém, no que diz respeito a baratas, esses agentes são pouco investigados (Isman 2006). Esses agentes incluem, o óleo essencial de cravo, citronela, canela, eucalipto, cedro, tomilho, flores de gerânio e capim-limão, bem como ingredientes presentes no óleo de amendoim, em folhas de pandano, hortelã, em substâncias como *d*-limonene presente em cascas de frutas cítricas, como limão e laranja (Isman 2006, Phillips et al. 2010, Li & Ho 2014).

Relacionado às baratas, alguns desses óleos essenciais de vegetais, como canela, tomilho e cravo, apresentaram toxicidade quando aplicados topicamente em *B. germanica*, adultos e ninfas de tamanho grande e médio (Phillips et al. 2010). Para *P. americana*, as substâncias extraídas de folhas de pandano, repelem esses insetos de armários e gavetas (Li & Ho 2014).

A utilização dessas substâncias, em relação aos químicos, tem como vantagem a baixa toxicidade, sendo que muitas vezes são de odor muito agradável, apresentando maior segurança em sua aplicação doméstica. Apresenta também desvantagens, já que em sua maioria são voláteis e tem baixa persistência no ambiente (muitas vezes menos de 1 hora), limitando assim a sua eficiência (Isman 2006, Li & Ho 2014).

2.3.4. Controle biológico

O controle biológico é uma prática que utiliza inimigos naturais, como patógenos, predadores ou parasitoides no controle de pragas (Hajek 2004), tanto no contexto da agricultura, quanto médico e veterinário. Dentre esses inimigos naturais estão os fungos entomopatogênicos, os quais constituem uma alternativa devido a sua ampla gama de hospedeiros (Khan et al. 2012, Sardul et al. 2012).

O controle biológico representa uma alternativa eficaz para o combate de insetos pragas (Sardul et al. 2012). Embora inseticidas químicos sejam mais utilizados, por apresentar uma resposta mais rápida, esses são caros, fornecem

somente um controle temporário, além de afetar organismos não-alvo, e podem causar danos irreversíveis ao meio ambiente (Hajek 2004, Sardul et al. 2012).

Como vantagens desse tipo de controle, apresenta a baixa toxicidade ao ser humano, em que esses agentes oferecem menor risco a saúde humana, menor risco de contaminação ambiental e regulação natural de espécies pragas (Rodriguez & Arredondo 2007)

2.3.4.1. Fungos entomopatogênicos

Fungos estão entre os primeiros patógenos a serem usados para controle biológico de insetos pragas (Veja & Kaya 2012). Constituem um grupo diverso de microrganismos, em que mais de 700 espécies, de 90 gêneros, patogênicos para insetos (Khan et al. 2012, Sardul et al. 2012). Heterotróficos, eucariontes, unicelulares ou hifais, se reproduzem de forma assexuada e/ou sexuada (Rodriguez & Arredondo 2007).

Dentre os fungos entomopatogênicos, as espécies ascomicéticas *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* são as mais estudadas (Faria & Wraight 2007) e utilizadas em medidas de controle biológico. Pelo menos 11 empresas oferecem, no mercado internacional, 16 produtos contendo *B. bassiana* ou *M. anisopliae* (Sardul et al. 2012).

2.3.4.1.1. Ciclo biológico de fungos entomopatogênicos

Fungos constituem um grupo particular dentre os patógenos de insetos, pois não precisam ser ingeridos para infectar. A infecção acontece por meio do contato de conídios com a cutícula do hospedeiro (Hajek 2004, Rodriguez & Arredondo 2007). O processo de infecção por um fungo ascomicético, em fase assexuada, ocorre basicamente em quatro etapas: adesão de conídios, germinação, penetração e colonização. Assim, o ciclo biológico de *M. anisopliae* e *B. bassiana* começa quando os conídios entram em contato com a superfície de um inseto susceptível (Sardul et al. 2012). Uma vez aderido na cutícula, em temperatura e umidade adequados, o conídio inicia o processo de germinação, com a formação de um tubo germinativo, apressório e hifas (Rodriguez & Arredondo 2007). Após a germinação, as hifas formadas podem crescer até penetrar a cutícula (Humber 2011). *M. anisopliae* forma um apressório, na região apical do tubo germinativo, que auxilia na adesão e penetração da cutícula (Hajek 2004, Rodriguez & Arredondo 2007).

A cutícula constitui uma barreira mecânica e fisiológica para impedir a infecção fúngica. Assim, para que o fungo, finalmente, atinja a hemocel é necessário atravessar as camadas da cutícula e da epiderme. Entretanto, substâncias como ácido oleico na epicutícula, além das reações de melanização alveolares, podem retardar ou inibir o crescimento fúngico (Hung & Boucias 1992, Humber 2011).

A penetração da cutícula pelas hifas é favorecida pela pressão exercida por elas, associada à produção de enzimas como proteases, quitinases, e

lipases (Hajek 2004, Rodriguez & Arredondo 2007, Khan et al. 2012). Após a penetração, que dura de seis a 12 horas, as hifas atingem a hemocela, e se distribuem na hemolinfa na forma de corpos hifais (Figura 8) (Rodriguez & Arredondo 2007, Khan et al 2007). No inseto são ativados vários mecanismos imunológicos, como fagocitose, encapsulação e efeitos citopáticos, como a produção de fenoxidase, que causa melanização (Hung & Boucias 1992, Humber 2011) constituindo mais um desafio para o desenvolvimento fúngico. O fungo escapa do sistema imune, por meio de toxinas produzidas pelos corpos hifais e utiliza nutrientes presentes na hemolinfa para seu crescimento.

Uma vez colonizado, o inseto morre por uma combinação de danos mecânicos produzidos pelo crescimento fúngico, desnutrição e por ação de metabólitos secundários com toxinas (Roberts & St. Leger 2004, Rodriguez & Arredondo 2007, Humber 2011, Sardul et al. 2012). No cadáver, o fungo coloniza todos os órgãos, como corpo gorduroso, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipoderme, sistema nervoso, músculos e traqueias. Em condições apropriadas de umidade e temperatura, hifas emergem na superfície da cutícula, e formam novos conídios (Figura 8) (Goettel & Lacey 1995, Humber 2011). Esses conídios são disseminados no meio ambiente, podendo contaminar e infectar novos hospedeiros (Sardul et al 2012).

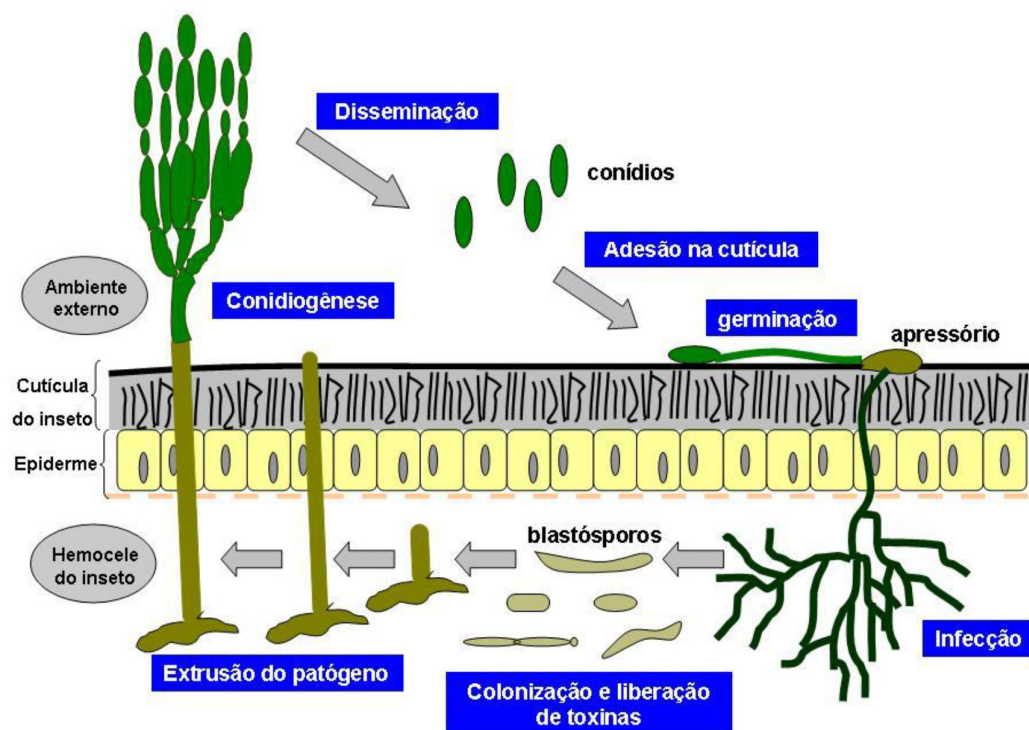


Figura 8 - Ação de *Metarhizium* sp. em inseto hospedeiro. (Fonte: Mascarin & Pauli 2010).

2.3.4.2. Fungos no controle de baratas

Os fungos se tornaram alvo de estudo para desenvolvimento de alternativas no controle de baratas devido ao aumento considerável dessas pragas em áreas urbanas e da resistência associada a inseticidas químicos (Rivault & Cloarec 1995, Vianna et al. 2001, Nasirian 2010). Alguns estudos associam o uso de *M. anisopliae* (Quesada-Moraga et al. 2004, Lopes & Alves 2011, Gutierrez et al. 2015) e no controle de ninfas e adultos de *B. germanica*, *Blattica dubia* e *Blatta orientales*; *Aspergillus flavus* também já foi aplicado no controle de *B. germanica* (Kulshrestha & Pathak 1997). Com respeito a *P. americana*, existem poucos estudos sobre a atividade de *B. bassiana* em adultos

(Murali-Mohan et al. 1999), e *M. anisopliae* em ootecas, ninfas de primeiro estágio e adultos (Hubner-Campos et al. 2013).

Esses estudos indicam uma resistência elevada de *P. americana* à infecção com esses fungos. Ainda não se conhecem os mecanismos que contribuem para essa resistência. Isso poderia ser atribuído ao comportamento de autolimpeza desses insetos, ecdises e até mesmo substâncias na superfície da cutícula com ação fungicida e fungistática.

3. JUSTIFICATIVA

P. americana é uma praga que contamina ambientes domésticos e hospitalares. Está associado à disseminação de doenças, pois atua como vetor mecânico para microrganismos patogênicos, e dispersam substâncias alérgicas, colocando em risco a saúde humana.

As medidas atualmente utilizadas para o controle dessa praga são paliativas, visto que são utilizados inseticidas químicos, que além de não realizarem o controle com eficiência, estão relacionados com a resistência por esse inseto.

Como *M. anisopliae* demonstra atividade no controle de variadas espécies de insetos, principalmente em ninfas recém-eclodidas e adultos de *P. americana*, há a necessidade de melhor compreensão da interação, acerca da susceptibilidade e/ou resistência desse inseto ao fungo.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

- Contribuir para o conhecimento acerca do desenvolvimento de *M. anisopliae* em *P. americana*.

4.2. Específicos

- Estudar o comportamento e a sobrevivência de ninfas (N4/N5) tratadas
- Estudar o desenvolvimento fúngico sobre a cutícula dessas ninfas
- Avaliar a presença quantitativa de corpos hifais na hemolinfa após inoculação tópica

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Origem, criação das baratas

P. americana foi criada em condições de laboratório ($25 \pm 5^\circ\text{C}$, $75 \pm 10\%$ umidade relativa - UR e fotofase natural) em caixas plásticas (30 x 30 x 30 cm) (Figura 9A). Essas caixas continham no seu interior bandejas de papelão sobrepostas (utilizadas para transporte de ovos de galinhas), destinadas a esconderijo e sítio de postura de ootecas (Figura 9B). As baratas foram alimentadas com ração comercial pelitizada para gatos (Whiskas®, Mars Brasil Incorporated, Indústria e Comércio Ltda., Guararema, SP, Brasil), ofertada em placa de Petri (10 x 2 cm). Água foi fornecida *ad libitum* por meio de bebedouro para roedores. Semanalmente a placa e o bebedouro foram limpos e reabastecidos. Exúvias, fezes e espécimes mortos foram removidos (Hubner-Campos et al. 2013).

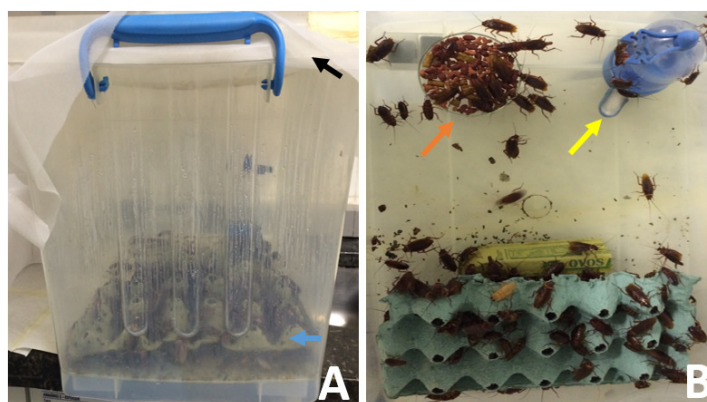


Figura 9 - Caixa de criação de ninfas de *Periplaneta americana*. Exterior da caixa mostrando o tecido utilizado na vedação (seta preta), bandeja de papelão (seta azul) (A). Interior da caixa (vista de cima): placa com ração (seta vermelha) e bebedouro com algodão umedecido (seta amarela) (B).

5.2. Preparo das ninfas

Para análise do desenvolvimento de conídios sobre a cutícula (ver 5.7.), foram colocadas ninfas de quarto ou quinto estágio (N4 ou N5) com 24 a 72 h sem alimentação e sedadas com CO₂, para diminuir a movimentação, em placas de Petri (10 x 2 cm) com papel filtro estéril em grupos de dois indivíduos/placa.

Para análise da sobrevivência das ninfas e detecção quantitativa de corpos hifais de *M. anisopliae* na hemolinfa (ver 5.8. e 5.9.), foram utilizadas dez ninfas, preparadas como descrito anteriormente, e divididas em grupos de cinco indivíduos/placa.

5.3. Origem, cultivo, preparo do fungo e formulado

M. anisopliae IP 46 foi coletado no Parque Nacional das Emas no estado de Goiás, Brasil, isolado em 2001 de amostra de solo e caracterizado morfológica e molecularmente (Rocha et al. 2012). A linhagem foi depositada no Banco de Germoplasma da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil e na Coleção de Fungos Entomopatogênicos do USDA, ARSEF, Ithaca, EUA.

O fungo foi cultivado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA - Difco, TM, Sparks, MD, USA) em placas de Petri (10 x 2 cm) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR, 12 h de fotofase por 10 a 15 dias.

Os conídios foram preparados secos ou suspensos em óleo-água. Para a secagem, os conídios foram raspados com espátula estéril do cultivo (BDA) e

colocados em uma placa de Petri (9 x 1,5 cm) esterilizada e essa foi posteriormente incubada em um dessecador com sílica gel 3 dias a 4° C.

No preparo da suspensão óleo-água, os conídios foram raspados como mencionado anteriormente (Figura 10A), e inicialmente suspensos em solução aquosa de Tween 80 a 0,1% (Figura 10B). A suspensão foi agitada com Vórtex (Figura 10C) e filtrada em algodão hidrófilo (Figura 10D), e os conídios quantificados com câmara de Neubauer. Os conídios suspensos foram formulados em água com 10% de óleo vegetal emulsionável (Graxol®, Agrária Indústria e Comércio Ltda., Jardinópolis, SP, Brasil) na concentração final de 10^9 conídios/ml.

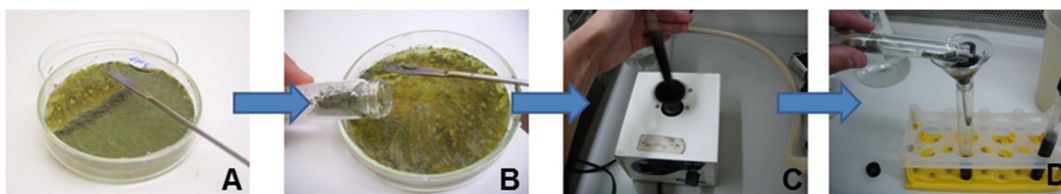


Figura 10 - Preparo da suspensão fúngica, raspando conídios de *Metarhizium anisopliae* do meio de cultura (A), suspendendo-os em solução 0,1% de Tween 80® (B), agitação em Vórtex (C) e filtragem da suspensão por algodão hidrófilo (D).

5.4. Avaliação da viabilidade dos conídios

No início de cada teste (com conídios secos ou suspensos em óleo-água) a viabilidade dos conídios foi verificada pela inoculação de 100 µl de conídios suspensos em água e Tween 80 (10^6 conídios/ml) sobre meio SDAL (Sabouraud, Dextrose, Agar com extrato de levedura a 1%) em placas de Petri. Entre 18 – 24 h de incubação do meio inoculado a 25° C e 12 h de fotofase foi quantificada a germinação, examinando - se 100 conídios em quatro áreas diferentes do meio.

Conídios foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo for superior ao diâmetro do conídio (Luz & Fargues 1997).

5.5. Aplicação de conídios, secos ou formulados em óleo-água em ninfas

Para aplicação de conídios secos foram coletados conídios com auxílio de um pincel N° 0 (Acrilex, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) e inoculados sobre a superfície dorsal do abdômen das ninfas sedadas, na forma de pincelada. Após inoculação as ninfas foram acondicionadas a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e $> 98\%$ UR e 12 h de fotofase. Durante esse período, as ninfas foram alimentadas com ração (5 g) e água através de algodão molhado (0,1 ml); trocadas a cada 3 dias.

Para aplicação tópica da suspensão, foram aplicados 15 μL de formulado fúngico, com ajuda de uma micropipeta semiautomática, sobre a região dorsal do tórax e abdome de cada ninfa sedada, resultando numa dose final de $1,5 \times 10^7$ conídios/ninfa (Figura 11). As ninfas do grupo controle foram tratadas com óleo-água sem conídios. Todas as ninfas tratadas, foram incubadas e alimentadas como descrito anteriormente.



Figura 11 - Aplicação de 15 μL de formulado fúngico na região dorsal do tórax e abdome de cada ninfa de *Periplaneta americana*, com o auxílio de uma pipeta semiautomática.

5.6. Avaliação do comportamento e muda

As ninfas tratadas topicamente com formulado foram examinadas após 20 min depois da inoculação. Diariamente, do segundo ao décimo dia *post inoculationem* (*pi*), um toque mecânico foi realizado em cada placa, e a atividade locomotora das ninfas foi analisada por 5 min. A muda de ninfas foi avaliada, e exúvias removidas das placas.

5.7. Análise da presença e do desenvolvimento de conídios e de micélio sobre a cutícula

Um par de antenas de duas ninfas vivas foi seccionado com auxílio de uma tesoura comum nos 20 min e 168 h *pi* para avaliação da presença de conídios na antena. Além disso, em 24, 48, 72 e 168 h *pi*, uma ninfa viva em cada tempo foi retirada da placa, sacrificada (após sedação com CO₂), e uma parte do abdômen da região dorsal, com tamanho de 1,5 x 1,5 cm retirada com bisturi cirúrgico.

As exúvias de ninfas que mudaram durante o teste foram retiradas da placa, e preparadas partes com auxílio do bisturi como mencionado para posterior fixação. Ninfas mortas supostamente pela infecção foram transferidas para câmara úmida, incubadas por 4 dias, e depois preparadas partes do abdômen da região dorsal para posterior fixação.

Todas as amostras preparadas foram transferidas para um fixador (2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2) e fixadas *overnight* a 4 °C. Depois foram desidratadas em série gradual de etanol (30%; 50%; 70%; 90%, 100% e 100% por 15 min cada). Em seguida foram transferidas para um aparelho de ponto crítico (Autosandri®-815, Tousimis Research Corporation, Rockville, EUA) para secagem total. Uma vez secas, foi feita a impregnação do material com ouro em aparelho metalizador (Denton Vacuum – Desk V®, Denton Vacuum Inc, Moorestown, EUA). Depois, as amostras foram analisadas e microfotografadas em um microscópio eletrônico de varredura (JSM 6610, JEOL USA Inc, Pleasanton, EUA) na voltagem de aceleração de 20 kV.

5.8. Avaliação da mortalidade e desenvolvimento do fungo nos cadáveres (testes *in vivo*)

A mortalidade foi avaliada diariamente por até 10 dias. Ninfas mortas foram retiradas e colocadas sobre uma lâmina de vidro, essa colocada em outra placa de Petri estéril, com papel filtro umedecido, e a placa acondicionada a 25 ± 1 °C, fotofase de 12 h. Diariamente foram avaliados o desenvolvimento de micélio e a produção de novos conídios na superfície dos cadáveres.

Foram realizadas quatro repetições independentes (com 10 ninfas N4-N5 em cada repetição).

5.9. Detecção direta e indireta de corpos hifais na hemolinfa

Em um grupo de ninfas tratadas com formulado óleo-agua separado, diariamente foi retirada uma ninfa viva da placa, sedada, como mencionado, e em seguida submersa por 10 seg em álcool 70%, para redução da microbiota superficial na cutícula. Em seguida, foi lavada duas vezes em água estéril e seca com papel absorvente estéril. Imediatamente as patas do terceiro par foram seccionadas na altura do trocânter (Figura 12A,B) e foram retirados 20 µl de hemolinfa com micropipeta semiautomática (Figura 12C,D). Dez µl da hemolinfa foram transferidos para um tubo tipo Eppendorf com 190 µl de solução salina estéril e homogeneizados com agitador Vórtex durante 1 min. O número de corpos hifais na suspensão foi quantificado (detecção direta) por microscopia convencional com auxílio de uma câmara de Neubauer, com aumento de 400x.

Outros 10 µl foram transferidos para um tubo tipo Eppendorf com 90 µl de solução salina estéril, a mistura homogeneizada em agitador Vórtex durante 1 min, e posteriormente, inoculados 100 µl sobre meio SDAL acrescido de antibiótico (cloranfenicol 0,5 g/l). As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C e 12 h de fotofase, e o desenvolvimento de unidades formadoras de colônia (UFC) avaliado diariamente até 15 dias (detecção indireta).

Foram realizadas cinco repetições independentes (com 20 ninfas N4-N5 em cada repetição).

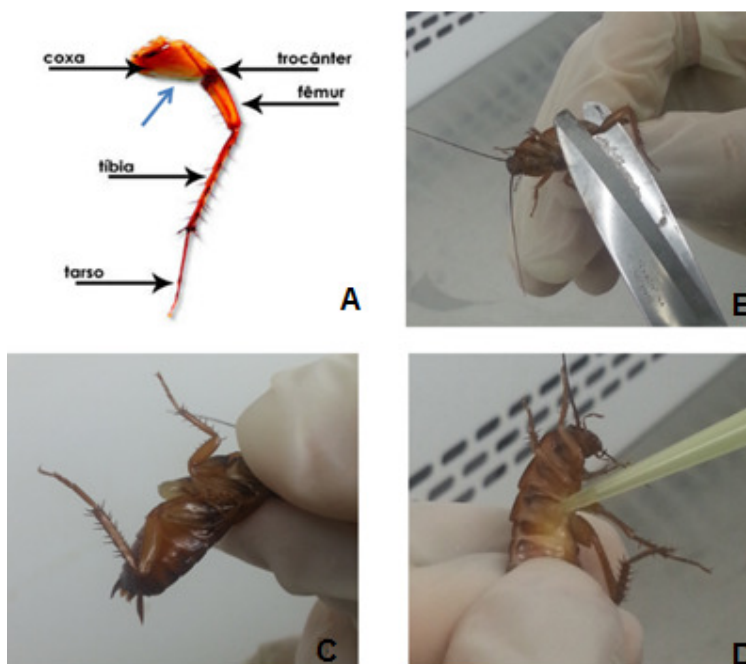


Figura 12 - Retirada de hemolinfa. (A) Anatomia de parte da pata seccionada Fonte: <http://www.osaka.com.br/anatomia-barata.php> (B) secção realizada com tesoura no terceiro par de patas. (C) formação de gota de hemolinfa (D) com auxílio de uma pipeta semiautomática, retirada de 20 μ l de hemolinfa.

5.10. Análise estatística dos resultados

Os valores de muda e de mortalidade relativa acumulada das ninfas foram transformados em arcsin, e os números de corpos hifais e UFC foram examinados com análise de variância e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls (Statística 7.0.0 - Statsoft). As médias foram consideradas significativamente diferentes com $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Comportamento pós-tratamento e muda de ninfas

Após recuperarem da sedação, as ninfas iniciaram movimentos repetitivos com as antenas e patas do primeiro par, logo após aplicação tópica de formulado óleo-água com e sem conídios. Passavam as antenas primeiramente sobre a região dorsal do próprio corpo, onde foi aplicado o formulado, e depois com auxílio do primeiro par de patas, as levaram à boca. As patas do primeiro par foram também passadas pelo aparelho bucal. Não foram observadas ninfas passando antena em outro indivíduo.

Nos 10 dias seguintes, as ninfas do grupo controle, após o estímulo mecânico, se moviam de forma rápida, nos primeiros minutos e depois pararam. Uma parte das ninfas tratadas com conídios formulados, entre o segundo e oitavo dia *pi*, se moviam mais lentamente, nos primeiros minutos após o estímulo e depois pararam.

Partes das ninfas do grupo controle e do grupo tratado com conídios mudaram no decorrer dos 10 dias *pi*. O maior número de ecdise para o grupo tratado com conídios foi no dia 2 ($12,5 \pm 2,5\%$) e para o grupo controle ($5 \pm 1,5\%$) no dia 10. Aos 10 dias, o total de ecdise acumulado foi de $20 \pm 0,8\%$ para grupo tratado com conídios e $15 \pm 0,6\%$ para grupo controle (Figura 13). Não houve efeito significativo do tratamento (conídios, controle) sobre a muda das ninfas ($F_{9,60} = 0,64$; $P = 0,76$). Do total de ninfas tratadas que mudaram, 25% morreram durante o teste após a muda.

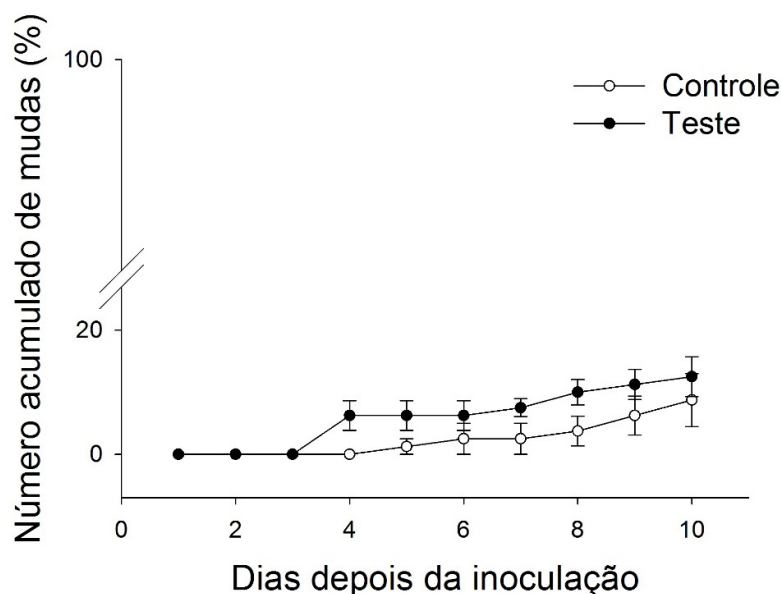


Figura 13 – Número acumulado de ninfas (%) e erro padrão das médias, de ninfas de *Periplaneta americana*, tratadas topicamente com suspensão de conídios de *Metarhizium anisopliae* em óleo-água, até 10 dias pós inoculação.

6.2. Desenvolvimento de *M. anisopliae* na cutícula de *P. americana*

Ao longo das antenas, aglomerados de conídios não germinados foram encontrados no tempo de 20 min (Figura 14C) e 168 h *pi* (Figura 14D).

As ninfas sacrificadas nos tempos de 24 h (Figura 14A), 48 h, 72 h e 168h *pi* (Figura 14B) apresentaram conídios sobre a superfície da cutícula, porém a quantidade diminuiu de acordo com o aumento do tempo. Poucos conídios (< 5 %) apresentavam formação de tubos germinativos nas primeiras 24 h *pi* (Figura 13A). Nos tempos de 48 h, 72 h e 168 h *pi* (Figura 14B), foram visualizados poucos conídios (< 80%), com tubo germinativo.

Conídios germinados e hifas foram encontrados sobre a superfície das exúvias (Figura 14E). Uma ninfa morreu 2 dias depois de mudar. Sobre o cadáver da ninfa morta, exposta 4 dias numa câmara úmida, cresceram micélio e novos conídios (Figura 14F).

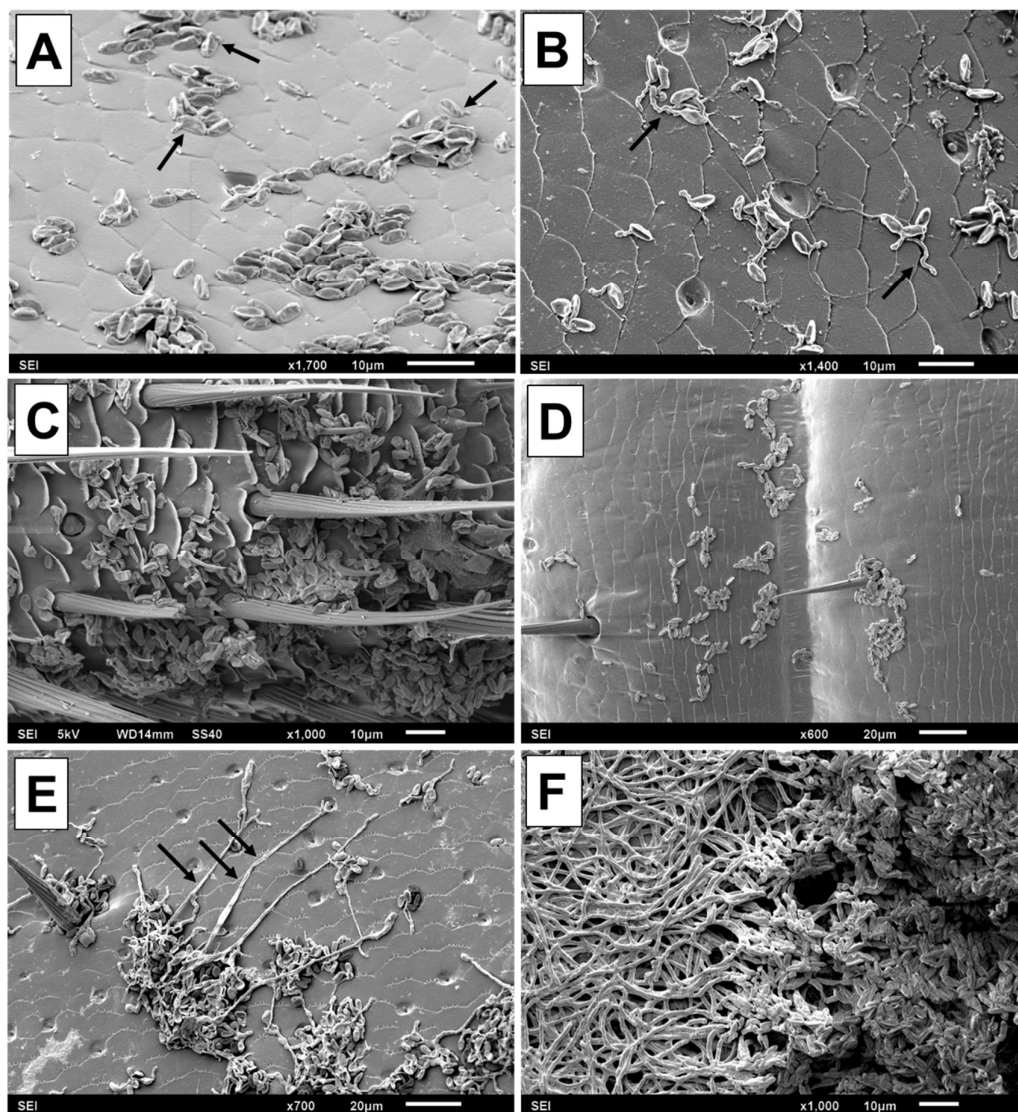


Figura 14 – Parte da cutícula de ninfa de *Periplaneta americana* após a aplicação de conídios de *Metarhizium anisopliae* IP 46, fixada 24 h após inoculação tópica (A), poucos conídios germinados (setas); fixada 168 h após inoculação tópica (B) com conídios apresentando tubo germinativo e hifas curtas (setas). Segmento da antena de ninfa, uma 20 min após inoculação (C) mostrando amontoados de conídios, e outra 168 h após inoculação (D) com poucos conídios não germinados. Exúvia de uma ninfa, fixada 72 horas após inoculação tópica (E) com conídios germinados e presença de hifas longas (setas). Cadáver de ninfa, 168 horas após inoculação tópica (F) com micélio e novos conídios.

6.3. Mortalidade de ninfas

As primeiras ninfas mortas foram encontradas 2 dias *pi*. A mortalidade média atingiu o maior valor no 3º e 4º dia ($7,5 \pm 5\%$) *pi*. A mortalidade acumulada foi de $30 \pm 8,1\%$ e a maioria das ninfas tratadas com conídios ($70 \pm 7\%$) sobreviveu (Figura 15). Nenhuma ninfa do grupo controle não morreu durante os 10 dias. Houve efeito significativo do tratamento com conídios formulados, sobre a mortalidade ($F_{9,30} = 6$; $P < 0,001$).

Micélio apareceu em regiões intersegmentais da região dorsal torácica e abdominal, com 5 dias de incubação dos cadáveres em câmara úmida. Em 50% das ninfas que morreram, cresceram micélio e novos conídios.

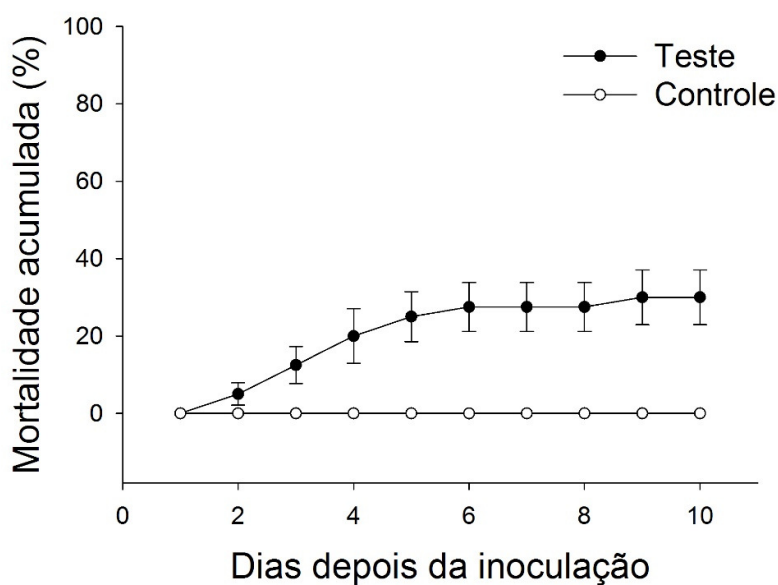


Figura 15 - Mortalidade acumulada (%) e erro padrão das médias, até 10 dias após inoculação, de ninfas de *Periplaneta americana*, tratadas topicamente com conídios de *Metarhizium anisopliae* em óleo-agua.

6.4. Número de corpos hifais na hemolinfa

A maioria das ninfas ($94 \pm 1\%$), sacrificadas diariamente, ao longo de 10 dias, não apresentaram quantidades detectáveis de corpos hifais na hemolinfa com o método direto aplicado. A maioria das ninfas tratadas, não apresentou qualquer concentração de corpos hifais. Os primeiros corpos hifais foram detectados em duas ninfas, 3 dias *pi*. Nos dias seguintes, houve elevada variação, com menor concentração de 10^3 corpos hifais/ μ l de hemolinfa numa ninfa, 5 dias *pi*, e a maior concentração foi de 8×10^7 corpos hifais/ μ l de hemolinfa numa ninfa, 6 dias *pi* (Figura 16A). Corpos hifais não foram encontrados nos dias 9 e 10 *pi*. O grupo controle não apresentou corpos hifais na hemolinfa.

Os UFC foram encontrados em maior concentração ($3,2 \times 10^4$ UFC/ μ l de hemolinfa) no 8º dia, em uma ninfa; a menor concentração (5 UFC/ μ l), no dia 10 *pi*. (Figura 16B). Não foram encontradas UFC na hemolinfa de ninfas do grupo controle.

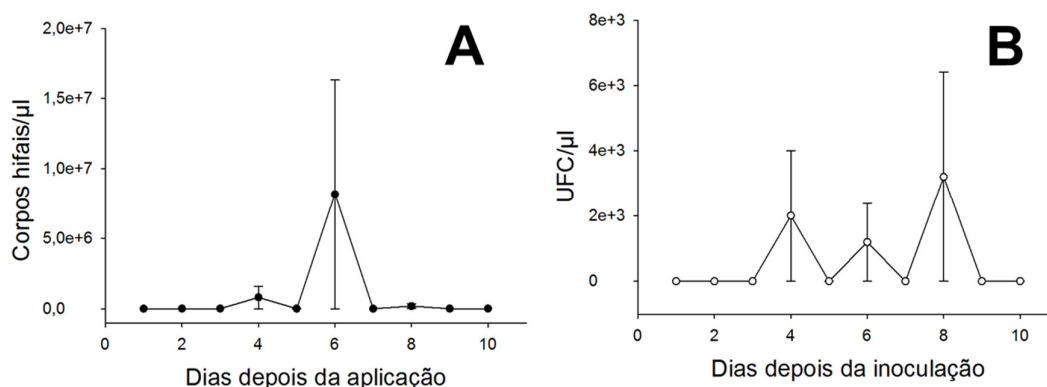


Figura 16 - Média ($\pm$ erro padrão da média) da concentração de corpos hifais/ μ l de hemolinfa, encontrados em ninfas de *Periplaneta americana*, quarto e quinto instar, sacrificadas diariamente, que foram tratadas previamente com conídios de *Metarhizium anisopliae*, ($1,5 \times 10^7$ conídios/ninfa) e incubados a 25°C e umidade relativa próxima da saturação (A), e unidades formadoras de colônia (UFC)(B) por microlitro de hemolinfa, 10 dias pós inoculação.

7. DISCUSSÃO

7.1. Comportamento e muda pós inoculação

Após recuperar da sedação, as baratas detectaram a presença do formulado óleo-água com ou sem conídios, pois imediatamente iniciavam movimentos de passagem das antenas pelo corpo, para retirada mecânica. Esse comportamento se for ligado à detecção dos conídios na cutícula pode ser interpretado como estratégia de autodefesa de *P. americana*. Esse comportamento já foi relatado em insetos sociais como himenópteros e isópteros, que detectaram e removeram conídios de fungos entomopatogênicos da cutícula entre indivíduos e assim impediram a infecção (Lacerda 2009, Okuno et al. 2012, Yanagawa 2015). *P. americana* é considerado inseto subsocial e não está capaz de retirar conídios de outros indivíduos (Tallamy & Wood 1986).

A muda precipitada em ninfas de *P. americana*, baseada nos resultados obtidos no presente estudo, não pode ser interpretada como estratégia de escape da infecção. A ninfa de *P. americana* provavelmente pode escapar da infecção fúngica apenas se não for contaminada e infectada ao final da interfase ninfal o que aconteceu nos testes relatados aqui e também foi relatado para outros insetos como coleópteros e triatomíneos tratados com *B. bassiana* (Vey & Fargues 1977; Luz et al. 2003). Em casos em que o inseto morreu após a muda, a morte pode ser relacionada a infecção anterior ou uma possível contaminação e infecção posterior a muda.

7.2. Desenvolvimento de conídios sobre a cutícula de ninfas

A ausência de tubos germinativos na maioria dos conídios e a ausência de hifas, 168 h *pi*, um período suficiente para completar a invasão de um inseto ou outro artrópode por um fungo entomopatogênico (Moino Jr et al. 2002; Garcia et al. 2004) sobre a cutícula das ninfas de *P. americana*, indicou um eventual efeito fungistático ou até fungicida de componentes da epicutícula, que provavelmente são lipídeos (Koidsumi 1957). Essa ou essas substâncias presentes na epicutícula eventualmente, contribuíram a um bloqueio ou atraso da germinação, formação de apressórios e hifas de *M. anisopliae* IP 46, o que já foi relatado para essa e para outras espécies de fungos e insetos (Kirkland et al. 2004, Lacerda 2009, Humber 2011).

7.3. Presença de *M. anisopliae* na hemolinfa de ninfas

A ausência de corpos hifais na hemolinfa e a baixa mortalidade na maioria das ninfas tratadas, reforçam que *P. americana* consegue impedir o desenvolvimento de *M. anisopliae* IP 46 e talvez também outras linhagens dessa espécie ou outras espécies do mesmo gênero sobre a cutícula, e eventualmente também a posterior penetração da cutícula. A cutícula parece ser a maior barreira para o fungo (*M. anisopliae*) infectar ninfas de *P. americana* ou uma das maneiras principais dessa espécie de barata de impedir a invasão do fungo.

Em outro estudo, foram injetados blastosporos da mesma linhagem (IP 46), produzidos em meio de cultivo, diretamente na hemocele de ninfas (N4-5) de *P. americana*. Em seguida, grandes quantidades de corpos hifais foram encontradas na hemolinfa e mortalidade cresceu rapidamente (Gutierrez, Alejandra dados não publicados) o que sugere que as ninfas não conseguem impedir (com mecanismos do sistema imunológico) uma infecção parenteral por injeção de blastosporos. Essa forma de tratamento parenteral, no momento, não sugere uma aplicação prática.

É interessante ressaltar que ninfas de *P. americana* mais velhas parecem ser mais resistentes à infecção fúngica que ninfas mais jovens, ootecas e adultos, como foi mostrado em outro estudo com IP 46 (Hubner-Campos et al. 2013). Uma suscetibilidade de baratas ligada a estágio ou estágio também já foi relatada para *B. germanica*, *Blaptica dubia*, *Blatta orientalis* e *M. anisopliae* (Quesada-Moraga et al. 2004, Lopes & Alves 2011, Gutierrez et al. 2015).

8. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

P. americana é uma espécie de difícil controle biológico com micoinseticidas à base de *M. anisopliae*

O comportamento de ninfas mais velhas parece auxiliar na remoção e inativação de conídios

A cutícula serve como barreira para impedir a invasão na maioria dos indivíduos tratados, reduzindo o desenvolvimento do fungo

Poucas ninfas foram afetadas pela infecção; as razões não estão claras no momento; um melhor entendimento seria a chave para desenvolvimento de micoinseticida à base de *M. anisopliae* contra *P. americana*

Aditivos numa formulação que contribuem para reduzir a retirada mecânica (antenas e patas) e/ou inativação de conídios (substâncias na epicutícula), permitindo assim um desenvolvimento mais rápido de conídios na superfície da cutícula e sua posterior penetração poderiam melhorar a atividade inseticida.

É possível que outra espécie ou linhagem da mesma espécie demonstrem maior virulência e consigam desenvolver, invadir e penetrar melhor na cutícula. Importante seria encontrar um fungo com atividade alta contra todos os estágios, ooteca, ninfas e adultos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arlian LG 2002. Arthropod allergens and human health. *Annual Review of Entomology*. 47:395–433.
- Arruda LK, Ferrarini VPL, Vailes LD, Pomés A, Chapman MD 2001. Cockroach allergens: enviromental distribution and relationship to disease. *Current Allergy and Asthma Reports* 1:466–473.
- Arruda LK, Vailes LD, Ferrarini VPL, Santos ABR, Pomés A, Chapman MD 2001. Cockroach allergens and asthma. *Journal Allergy Clinical Immunology*. 107: 419-428.
- Augustyniuk-Kram A, Kram KJ 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (review). In: Blanco JA, Forest Ecosystems – More than Just Trees. InTec. [Acessado em 10 de janeiro de 2015, citado em 22 de janeiro de 2015] Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/forestecosystems-more-than-just-trees/entomopathogenic-fungi-as-an-important-natural-regulator-of-insectoutbreaks-in-forests-review>
- Beccalloni G, Eades DC 2015. [página da internet] Cockroach: an amazing diversity. [Acessado em 10 de janeiro de 2015, citado em 22 de janeiro de 2015] Disponível em: <http://cockroach.speciesfile.org/HomePage/Cockroach/Diversity/Diversity.aspx>
- Bell JW, Tobin TR 1981. Orientation to sex pheromone in the American cockroach: analysis of chemo-orientation mechanisms. *Journal Insect Physiology*. 27:501–508.
- Bell JW, Roth LM, Nalepa CA 2007. *Cockroaches: ecology, behavior and natural history*. The John's Hopkins University Press, Baltimore, 247 pp.
- Brasil. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Regulamento aprovado pelo Decreto nº 24.114, de 12 de abril de 1934, e considerando a necessidade de resguardar a saúde humana e animal e o meio ambiente da ação de agrotóxicos, comprovadamente da alta persistência e/ou periculosidade. **Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária [página de internet]**. [Acessado em 07 de outubro de 2014; citado em 07 de novembro de 2014] Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Legislacao+de+Agrotoxicos+Componentes+e+Afins/Portarias>
- Cameron E 1961. *The cockroach (Periplaneta americana, L). An introduction to emomology for students of science and medicine*. William Heinemann, Medical Books, Londres, 107 pp.

- Copeland M 2003. *Cockroach – (Animal)*. Reaktion Books, Londres, 202 pp.
- Dennell R, Malek SRA 1954. The cuticle of the cockroach *Periplaneta americana*. The appearance and histological structure of the cuticle of the dorsal surface of the abdomen. *Proceedings of the Royal Society of London. B*. 143:126–136 .
- Dong K 1997. A single amino acid change in the para sodium channel proteins is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in german cockroach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 27:93–100.
- Entomologia UFV [página de internet] Viçosa: Pós graduação em entomologia. [acessado em 04 de fevereiro de 2015; citado em 04 de fevereiro de 2015]. Disponível em: <http://www.insecta.ufv.br/Entomologia/ent/disciplina/ban%20160/AULAT/aula12/sociais.html>
- Faria MR, Wraight SP 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43:237–256.
- Gammon DW, Brown MA, Casida JE 1981. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 15:181–191.
- Garcia MV, Monteiro AC, Szabo MPJ 2004. Colonização e lesão de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Ciência Rural*. 34:1513–1518.
- Goettel MS, Lacey LA 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga* 40:3–27.
- Gutierrez AC, Golebiowski M, Pennisi M, Peterson G, García JJ, Manfrino RG, Lopez Lastra CC. Cuticle fatty acid composition and differential susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). *Journal of Economic Entomology*. 2:752–760.
- Hajek AE 2004. *Natural enemies. An introduction to biological control*. Cambridge University Press, New York, 396 pp.
- Hubner-Campos RF, Leles RN, Rodrigues J, Luz C 2013. Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. *Parasitology International*. 62:517–521.
- Hubner-Campos, RF 2012. Efeito de fungos entomopatogênicos em ninfas e ootecas de *Periplaneta americana*, [Dissertação de Mestrado] UFG, pp. 41.

- Humber RA 2011. Entomogenous fungi. In: M Schaechter, *Eukariotic microbes*, Elsevier, San Diego, p. 127 – 140.
- Hung SY, Boucias DG 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular recognition response of the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 60:152–158.
- Isman MB 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review Entomology*. 51:45–66.
- Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M, Qiu D 2012. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding*. 3:63–79.
- Kirkland BH, Cho E-M, Keyhani NO 2004. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control* 31:414–421.
- Koidsumi K 1957. Antifungal action of cuticular lipids in insects. *Journal of Insect Physiology*. 1:44–51.
- Kruszelnicki KS 2006. [página da internet] Cockroaches and radiation [acessado em 10 de janeiro de 2015, citado em 22 de janeiro de 2015] Disponível em: <http://www.abc.net.au/science/articles/2006/02/23/1567313.htm?site=science/greatmomentsinscience>
- Kunkel JG 2012. [página da internet] The cockroach FAQ [acessado em 10 de janeiro de 2015, citado em 22 de janeiro de 2015] Disponível em: http://www.bio.umass.edu/biology/kunkel/cockroach_faq.html
- Lacerda FG 2009. Mecanismos de defesa em insetos sociais contra patógenos. *Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde*. 4:31–50.
- Li J, Ho SH 2014. Pandan leaves (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) as a natural cockroach repellent. [artigo na internet] School of Biological Sciences, National University of Singapore [citado em 12 de dezembro de 2014] [4 pp]. Disponível em: http://www3.ntu.edu.sg/eee/urop/congress2003/proceedings/abstract/nus_fos/tdp%20USP/Li%20Jingmei.pdf
- Lopes RB, Alves SB 2011. Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L.) (Blattodea:Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. *Neotrop. Entomol.* 40(3): 368 – 374.
- Luz C, Fargues J 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rodnius prolixus*. *Mycopathologia*. 138: 117–125.

- Luz C, Fargues J, Romaña C 2003. Influence of starvation and blood meal-induced moult on the susceptibility of nymphs of *Rhodnius prolixus* Stal (Hem., Triatominae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. infection. *Journal of Applied Entomology* 127:153–156.
- Maya V, José F, Valiente E, O'Callaghan J 2002. Ultrastructural study of the crest in the ootheca of *Periplaneta americana* using a scanning electron microscope. *Review Ecológica Latin America*. 7:11–16.
- Miller DM, Koeler PG 2014. [página da internet]. Least toxic methods of cockroach control. [acessado em 07 de outubro de 2014; citado em 07 de novembro de 2014]. Disponível em: http://edis.ifas.ufl.edu/document_ig105.
- Mills RR 1982. Integument – structure of integument during ecdysis. In: Bell WJ, Adiyodi KG. *The American Cockroach*. Chapman and Hall Ltda. New York. p. 15–29.
- Miranda RA, Silva JP 2008. Enterobactérias isoladas de *Periplaneta americana* capturadas em um ambiente hospitalar. *Ciencia Et Praxis* 1:21–25.
- Moino Jr A, Alves SB, Lopes RB, Oliveira PM, Neves J, Pereira RM, Vieira AS 2002. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola*. 59:267–273.
- Motta-Delgado PA, Murcia-Ordoñez B 2001. Hongos entomopatogénos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science* 6:77–90.
- Murali-Mohan CH, Lakshmi KA, Devi KU 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the american cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Science and Technology*. 9:29–33.
- Nasirian H 2010. An overview of german cockroach, *Blattella germanica*, studies conducted in Iran. *Pakistan Journal of Biological Science*. 1077–1084.
- Okuno M, Tshuji K, Sato H, Fujisaki K 2012. Plasticity of grooming behavior against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the ant *Lasius japonicus*. *Journal of Ethology*. 30: 23–27.
- Ortiz-Catón M, Alatorre-Rosas R, Valdivia-Bernal R, Ortiz-Catón A, Medina-Torres R, Alejo-Santiago G 2011. Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Revista Biociencia*. 1:42–53.

- Pai H-H, Chen W-C, Peng C-F 2014. Cockroach as potencial vectors of nosocomial infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 25:979–984.
- Parry W 2007. Pavlovian cockroaches learn like dogs (and humans). Training bugs may help us understand our own brain. Discover Magazine [Disponível em internet]. Setembro de 2007 [citado em 25 de janeiro de 2015]. Disponível em: <http://discovermagazine.com/2007/sep/pavlovian-cockroaches-learn-like-dogs-and-humans>.
- Pereira RS 2007. *Efeito de inseticidas, superfícies tratadas e período de exposição em duas populações de Blattella germanica (Linnaeus, 1767) (Blattodea:Blattellidae)*. Tese de mestrado. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 69 pp.
- Phillips AK, Appel AG, Sims SR 2010. Topical toxicity of essential oils to the German cockroach (Dictyoptera:Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*. 103:448–459.
- Ponce G, Cantú PC, Flores A, Badii M, Barragán A, Zapata R, Fernández I 2005. Cucarachas: Biología e importancia en salud pública. *Revista de Salud Publica e Nutricion*. 2–14.
- Quesada-Morada E, Santos-Quirós R, Valverde-García P, Santiago-Álvarez C 2004. Virulence, horizontal transmission and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 87:51–58.
- Rivault C, Cloarec A 1995. Limits of insecticide cockroach control in council flats in France. *Journal of Environmental Management*. 45:379–393.
- Roberts DW, St. Leger RJ 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advanced In Applied Microbiology*. 54:1–51.
- Rocha LFN, Inglis PW, Humber RA, Kipnis A, Luz C 2012. Occurrence of *Metarhizium* spp. in central brazilian soils. *Journal of Brazilian Microbiology*. 53:251–259.
- Rodríguez LA, Arredondo HC 2007. *Teoría y aplicación del control biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México, 303 pp.
- Roth LM 1982. Introduction – distribution, life cycle, ecology, biotic associations and medical importance. In: Bell WJ, Adiyodi KG. *The American Cockroach*. Chapman and Hall Ltda. New York. p. 1–13.
- Rust MK 2008. Cockroaches. In: Bonnefoy X, Kampen H, Sweeney K, *Public health significance of urban pests*, Flórida, p. 53-75.

- Rust MK, Burk T, Bell WJ 1976. Pheromone-stimulated locomotory and orientation responses in the American cockroach. *Animal Behavior*. 24:52–67.
- Salehzadeh A, Tavacol P, Mahjub H 2007. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. *Journal of Vector Borne Disease*. 44:105–110.
- Sandhu SS, Sharma AK, Beniwal V, Goel G, Batra P, Kumar A, Jaglan S, Sharma AK, Malhotra S 2012. Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism and regulation. *Journal of Pathology*. 2012:1–10.
- Scott JG, Cochran DC, Siegfried BD 1990. Insecticide toxicity, synergism, and resistance in the German cockroach (Dictyoptera:Blattellidae). *Entomological Society of America*. 83:1698–1703.
- Tallamy DW, Wood TK 1986. Convergence patterns in subsocial insects. *Annual Review* 31:369–90.
- Vargas VM 1995. La cucaracha un curioso insecto (Dictyocera: Blattaria), 1ed, *Editorial de la Universidad de Costa Rica*, Costa Rica, 120 pp.
- Vega FE, Kaya HK 2012. Scope and basic principles of insect pathology. In Vega & Kaya, *Insect Pathology*, Elsevier, Londres, p. 11–20.
- Vey A, Fargues J 1977. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptonitarsa decemlineta* larvae during ecdises. *Journal of invertebrate pathology* 30:207–215.
- Vianna EES, Berne MEA, Chernaki AM, Silveira Jr P, Ribeiro PB 2000. Performance Reprodutiva de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea:Blattidae) [acessado dia 14 de outubro de 2014; citado em 16 de outubro de 2014] disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67_1/performance_reprod.htm
- Vianna EES, Berne MEA, Riberiro PB 2001. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea:Blattidae). *Revista Brasileira de Agrociência* 7: 111–115.
- Yanagawa A, Yokohari F, Shimizu S 2015. Influence of fungal odor on grooming behavior of the termite, *Coptotermes formosanus*. *Journal of Insect Science* 10: 141.