

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**FERNANDA CRISTINA SOARES DA SILVA**

**Identificação molecular de *Metarhizium* sp. em adultos de *Aedes aegypti* infectados**

**GOIÂNIA/GO  
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, 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.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

### 1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Fernanda Cristina Soares da Silva

Título do trabalho: Identificação molecular de *Metarhizium sp.* em adultos de *Aedes aegypti* infectados

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [ x ] SIM [ ] NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

### Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro.

**Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Juscelino Rodrigues Filho, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Cristina Soares Da Silva, Discente**, em 18/08/2023, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3848794** e o código CRC **A59E9ED2**.

FERNANDA CRISTINA SOARES DA SILVA

**Identificação molecular de *Metarhizium* sp. em adultos de *Aedes aegypti* infectados**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Prof. Dr. Juscelino Rodrigues Filho

GOIÂNIA/GO  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Fernanda Cristina Soares da  
Identificação molecular de *Metarhizium* sp. em adultos de *Aedes aegypti* infectados [manuscrito] / Fernanda Cristina Soares da Silva. - 2023.  
XXII, 22 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Juscelino Rodrigues.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2023.

Bibliografia.

Inclui fotografias, abreviaturas, símbolos.

1. Fungo entomopatogênico. 2. Mosquito. 3. Extração . 4. DNA. 5. PCR. I. Rodrigues, Juscelino, orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao(s) **28** dia(s) do mês de **julho** do ano de **2023** iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**Identificação molecular de *Metarhizium* sp. em adultos de *Aedes aegypti* infectados**”, de autoria de **Fernanda Cristina Soares da Silva**, do curso de **Farmácia**, da **Faculdade de Farmácia** da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) **Dr. Juscelino Rodrigues Filho** (IPTSP/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Dr. Wolf Christian Luz** (IPTSP/UFG) e **Dr. Luiz Fernando Nunes Rocha** (IFG Senador Canedo). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **10 pontos**, tendo sido o TCC considerado **aprovado**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Juscelino Rodrigues Filho, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wolf Christian Luz, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3848793** e o código CRC **E12FB64A**.

**Identificação molecular de *Metarhizium* sp. em adultos de *Aedes aegypti* infectados**  
***Molecular identification of *Metarhizium* sp. in infected *Aedes aegypti* adults***

Fernanda C. S. Silva <sup>a,b</sup>, Juscelino Rodrigues <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-170, Brasil

<sup>b</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brasil

**Resumo**

A utilização de fungos entomopatogênicos tem sido uma alternativa de controle biorracional para controlar *Aedes aegypti*. Está em desenvolvimento um dispositivo contendo micoinseticida à base de *Metarhizium humberi* IP 46 para o controle focal de adultos de *A. aegypti*, e a avaliação da efetividade deste dispositivo em condições de campo pode ser feita com o auxílio de métodos sensíveis para detecção de IP 46 em mosquitos capturados no ambiente que foram expostos ao fungo. Para isso, o objetivo desta proposta foi padronizar uma metodologia para detectar DNA de IP 46 presente em adultos de *A. aegypti* após exposição fúngica. Adultos foram tratados com formulação de IP 46 em condições de laboratório ou semicampo por até 8 ou 14 dias, respectivamente. No teste de laboratório, foram avaliados os tampões de extração de DNA descritos por Saghai-Marroof et al. (1984) (I), Raeder e Broda (1985) (II) e Doyle e Doyle (1987) (III). Para o teste de semicampo, o tampão mais eficiente na extração de DNA foi utilizado nas amostras tratadas. As extrações e amplificações foram confirmadas por eletroforese. A região TEF-intron foi amplificada por PCR utilizando os primers EF1T e EF2T. Para controle positivo, utilizou-se micélio de IP 46, e para controle negativo, utilizou mosquitos não expostos. Os produtos de PCR com amplificação positiva foram sequenciados. Os resultados dos sequenciamentos mostraram que, com o tampão I, foi possível extrair DNA do IP 46 presente em *A. aegypti* com incubação de 0, 6 ou 8 dias a 75% de umidade relativa (UR) e nos dias 2 ou 8 a mais de 98% de UR. Com o tampão II, a extração de DNA do fungo ocorreu em mosquitos incubados por 4, 6 ou 8 dias a 75% de UR e por 2, 4, 6 ou 8 dias a mais de 98% de UR. O DNA de IP 46 foi obtido de mosquitos incubados por 2, 6 ou 8 dias a 75% de UR e 1, 2, 4 ou 8 dias a mais de 98% de UR, utilizando o tampão III. O tampão II apresentou os resultados mais consistentes, portanto, foi utilizado nos ensaios de semi campo. Com essa metodologia, foi possível detectar IP 46 em mosquitos vivos ou mortos em diferentes estágios de infecção fúngica. Os primers utilizados na PCR foram específicos para *M. humberi*, não

havendo amplificação do DNA de outros microrganismos presentes na microbiota dos mosquitos testados. O tampão descrito por Raeder e Broda (1985) (II) foi o mais eficiente na extração de DNA de *M. humberi* IP 46 em adultos de *A. aegypti*, apresentando potencial para ser utilizado em uma técnica de monitoramento da eficácia do dispositivo em condições de campo. A avaliação do tampão em amostras de semicampo ainda precisa ser feita de forma mais padronizada.

**Palavras-chaves:** Fungo entomopatogênico; Mosquito; Extração; DNA; PCR; Detecção.

### **Abstract**

The use of entomopathogenic fungi has been an alternative of biorational control to control *Aedes aegypti*. A device containing mycoinsecticide based on *Metarhizium humberi* IP 46 for the focal control of *A. aegypti* adults is in developing. The evaluation of the effectiveness of this device under field conditions can be done with the aid of sensitive methods for detecting IP 46 in diseased mosquitoes captured in the field. To standardizing a methodology to detect IP 46 DNA present in *A. aegypti* adults after fungal exposure, adults were exposed to IP 46 formulations under laboratory or semi-field conditions for up to 8 or 14 days, respectively. In laboratory testing, the DNA extraction buffers by Saghai-Marroof et al. (1984) (I), Raeder and Broda (1985) (II) and Doyle and Doyle (1987) (III) were evaluated. For the semi-field test, the most efficient buffer in DNA extraction was used in the treated samples. The extractions and amplifications were confirmed by electrophoresis. The TEF-intron region was amplified by PCR using primers EF1T and EF2T. For positive control, use IP 46 mycelium, and for negative control, use unexposed mosquitoes. PCR products with positive amplification were sequenced. The results of the sequencing appreciated that, with buffer I, it was possible to extract DNA from IP 46 present in *A. aegypti* with incubation of 0, 6 or 8 days at 75% relative humidity (RH) and on 2 or 8 days more of 98% RH. With buffer II, fungal DNA transmission occurred in mosquitoes incubated for 4, 6 or 8 days at 75% RH and for 2, 4, 6 or 8 days at more than 98% RH. IP 46 DNA was obtained from mosquitoes incubated for 2, 6 or 8 days at 75% RH and 1, 2, 4 or 8 days at more than 98% RH, using buffer III. Buffer II showed the most consistent results, so it was used in field trials. With this methodology, it was possible to detect IP 46 in live or dead mosquitoes at different chances of fungal infection. The primers used in the PCR were specific for *M. humberi*, with no amplification of DNA from other microorganisms present in the tested mosquitoes. The buffer described by Raeder and Broda (1985) (II) was the most efficient in the transmission of *M. humberi* IP 46 DNA in *A. aegypti* adults, showing potential



to be used in a technique for monitoring the effectiveness of the device under conditions field. The evaluation of the protocol in semi-field samples still needs to be done in a more standardized way.

**Keywords:** Entomopathogenic fungus; Mosquito; Extraction; DNA; PCR; Detection.

## 1. Introdução

A problemática das arboviroses, como Dengue, Zika e Chikungunya, nos grandes centros urbanos ainda é permanente (Santos et al., 2022). Medidas para controlar o mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor destas doenças, continuam sendo estudadas e desenvolvidas de forma integrada (Baldacchino et al., 2015; Fernández-Salas et al., 2015). Campanhas de conscientização da população, medidas de saneamento e destruição dos criadouros no peridomicílio e domicílio, e o uso de inseticidas químicos, como organofosforados e piretróides, são exemplos de medidas de controle (Braga e Valle, 2007). Entretanto, o uso indiscriminado e sem planejamento de inseticidas químicos gera populações de vetores resistentes, resultando na diminuição do sucesso das campanhas (Melo-Santos et al., 2010; Smith et al., 2016).

Novas medidas de controle estão em fase de estudo, e o controle biológico se destaca (Mascarini et al., 2018). No Brasil, o controle biológico tem ganhado destaque desde 2005 com crescente foco e desenvolvimento na área (Bettioli, 2022). Exemplo disso, é as alternativas com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para controle de pragas agrícolas (Thomas, 2018).

Mas a atenção está para a nova espécie do complexo *M. anisopliae* encontrado no solo do Cerrado brasileiro, o fungo *Metarhizium humberi* IP 46 (Luz et al., 2019). Esta espécie apresenta grande virulência contra vetores de doenças, possuindo potencial como agente de controle biológico contra mosquitos, triatomíneos, carrapatos e outras pragas (Rodrigues et al., 2015, 2021; Luz et al. 2016, 2019). *M. humberi* IP 46 está presente em um dispositivo para controle focal de *A. aegypti*, desenvolvido pela equipe do Laboratório de Patologia de Invertebrados (LPI) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) (Martinez et al., 2021).

O dispositivo simula um criadouro onde fêmeas grávidas em busca de local para oviposição ou machos e fêmeas em busca de local para repouso são atraídos para o interior do dispositivo e se contaminam, podendo então disseminar o patógeno ao entrar em contato com outros mosquitos ou após sucumbirem à infecção fúngica. O dispositivo foi testado em condições de laboratório, semi campo e campo, e apresentou resultados promissores (Martinez et al., 2021).

Nas avaliações envolvendo o isolamento de fungos em *A. aegypti* a metodologia vigente era a descrita por Leles (2013) cujo mosquito é colocado sobre meio ágar-água acrescido de cloranfenicol, cristal violeta, tiabendazol. Tal técnica possibilita a identificação morfológica do fungo para confirmar a eficácia do dispositivo em condições de campo são necessários protocolos como este para detectar a presença de *Metarhizium* sp. em adultos de *A. aegypti*. Mas a metodologia de Leles (2013) apresenta limitações como o crescimento de contaminantes que dificultam a visão para identificação de IP 46.

Uma alternativa seriam técnicas moleculares, que apresentam uma sensibilidade diferencial em vivos, com capacidade de detectar DNA fúngico nas mesmas condições em mosquitos doentes e após a morte por infecção. Já foi visto, como no trabalho de Castro (2017), o uso de técnica molecular para identificação de fungo entomopatogênico presente em inseto, o que credibiliza tal metodologia. Neste mesmo estudo, o protocolo utilizado foi o descrito por Raeder e Broda (1985), apresentando resultados satisfatórios. Também foi evidenciado no trabalho de Tripathy (2017) o uso do protocolo descrito por Saghai-marooof (1984), como uma melhoria do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com potencial para o uso em isolamento de fungo.

Algumas vantagens do uso de detecção molecular como a PCR são maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade e o potencial para automação (Bush e Nitschko, 1999). Mas apesar das vantagens, também existe a complexidade do método, para ser implementado em análises de rotina e contaminantes presentes na amostra também é um fator que pode inibir a reação impedindo a identificação (Boer e Beumer, 1999, Clarke et al., 1992).

A fim de contribuir com o desenvolvimento do micoInseticida para controle biológico de *A. aegypti*, o presente trabalho teve como objeto a padronização de uma técnica de extração de DNA que detecta *M. humberi* em adultos de *A. aegypti* contaminados/infectados primeiramente em laboratório e posteriormente em semi campo, e assim auxiliar na implementação de um método de controle biorracional deste vetor.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Origem, criação e preparação de *Aedes aegypti***

Larvas coletadas na cidade de Goiânia em 2012, levaram à criação de uma colônia de *A. aegypti* mantida no Laboratório de Patologia de Invertebrados (LPI), cuja manutenção é mantida de acordo com a metodologia descrita por Lima et al. (2009) e Rocha et al. (2015)

(CEUA 032/18). Para os testes, foram separados ovos desta colônia de criação e colocados em um recipiente com água aquecida. Após a eclosão das larvas, as larvas emergidas foram alimentadas com ração animal durante 15 dias, e ao atingir o estágio de pupa, estas eram transferidas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para um copo plástico de 50 ml com 20 ml de água. Este foi armazenado em um recipiente plástico transparente de 500 ml, com alimentação *ad libitum* e tampado com tela. Os adultos foram utilizados com idade de 3 a 5 dias após a emergência dos mosquitos.

## **2.2. Origem, cultivo e preparação do fungo entomopatogênico**

*M. humberi* IP 46 isolado de amostra de solo coletada no Cerrado brasileiro em 2001, e pertencente à coleção de fungos entomopatogênicos do LPI (Luz et al., 2001). O fungo foi inoculado em meio sólido de batata dextrose ágar (BDA; Sigma-Aldrich) suplementado com extrato de levedura (0,5 g/l; Sigma-Aldrich) a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  de umidade relativa (UR) e fotofase de 12 horas por 15 dias e armazenados em geladeira a  $4^\circ\text{C}$  até a utilização.

## **2.3. Preparação da formulação granulada**

Conídios de *M. humberi* IP 46 foram suspensos em 10 ml de Tween 80 a 0,1% estéril e, em seguida, 1ml de uma suspensão de  $5 \times 10^8$  conídios/ml foram aplicados em 100 ml de meio basal (Mascarin et al., 2014; Rodrigues et al., 2021). Os frascos Erlenmeyer (250 ml) contendo o meio foram acondicionados em incubadora rotativa (Marconi, MA420) a 250 rpm por 5 dias a uma temperatura de  $27^\circ \pm 3^\circ\text{C}$ . Os microescleródios (ME) produzidos foram quantificados conforme descrito por Rodrigues et al. 2021

Para a elaboração dos grânulos, foi feita a manipulação vermiculita 96,7g (AgroFloc®; Brasil Minérios, Goiânia, Brasil), 3g de celulose microcristalina (Avicel PH-101®; Blanver Farmoquímica, Taboão da Serra, Brasil) e 0,3g de dióxido de silício (Evonik Degussa, Hanau, Alemanha) e em seguida foram autoclavados. Estes foram preparados misturando a cada 100 g dos três ingredientes, a biomassa obtida do meio de cultura após os 5 dias de fermentação, obtendo uma concentração de  $3 \times 10^3$  ME/g, a mistura foi peneirada e posteriormente secada em leito fluidizado (Rodrigues et al., 2021).

## **2.4. Exposição de *Aedes aegypti* a *Metarhizium humberi* IP 46 em condições de laboratório**

Conídios foram raspados da superfície da cultura com o auxílio de uma espátula e secos em dissecadora com sílica gel a 4°C por 5 dias. Foi preparada uma formulação contendo os conídios secos de IP 46 e silicato de magnésio nas concentrações de  $10^7$  conídios/cm<sup>2</sup> e 0,5 mg/cm<sup>2</sup>, respectivamente. O formulado foi aplicado em uma área de 352 cm<sup>2</sup>, que corresponde a parede interna de um copo plástico de 500 ml previamente lixado. Para a avaliação de uma metodologia de extração de DNA, 30 adultos de *A. aegypti* que foram colocados no interior do copo e mantidos expostos à formulação por 1 hora. Em seguida, os adultos foram transferidos para dois novos copos (500 ml) sem tratamento fúngico e contendo solução açucarada a 10% para alimentação *ad libitum*. Os copos foram incubados a  $75 \pm 5\%$  ou  $>98\%$  UR,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotofase de 12 h. Em cada repetição, a cada tempo de incubação de 0 dias (logo após a exposição ao IP 46), 1, 2, 4, 6 ou 8 dias, dois adultos, vivos ou mortos, de cada UR (75% e  $>98\%$ ) foram transferidos para um microtubo de 1,5 ml. Os mosquitos ficaram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização da etapa de extração de DNA.

## **2.5. Exposição de *Aedes aegypti* a *Metarhizium humberi* IP 46 em condições de semi campo**

O teste de semi campo foi realizado em uma estufa (3 módulos de 12 m<sup>2</sup> cada) construída na área externa do IPTSP. O dispositivo contendo a formulação granulada foi instalado no interior de um módulo, e em seguida 100 machos e 100 fêmeas de *A. aegypti* foram liberados. Machos e fêmeas foram alimentados *ad libitum* com solução açucarada a 10%, e as fêmeas alimentadas com sangue de camundongos 2 dias antes de serem liberados no módulo, e no 7º dia após a liberação. (Rodrigues et al. 2021). A cada dois dias, por 14 dias, 8 adultos (vivos ou mortos, preferencialmente mortos) foram coletados. Quatro adultos foram colocados sobre meio ágar-água (10g/l) acrescido de cloranfenicol (5 g/l), tiabendazol (0,004 g/l) e cristal violeta (0,01 g/l) (Leles, 2013) Os outros quatro adultos foram colocados em microtubos de 1,5 ml (2 em cada). Os mosquitos dos microtubos ficaram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ , e os colocados sobre meio ágar-água ficaram armazenados em BOD a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  de umidade relativa (UR) e fotofase de 12 horas.

## **2.6. Extração de DNA de *M. humberi* IP 46 para seleção de metodologia**

Em condições de laboratório, foram manuseadas as amostras de mosquitos tratados com formulado de IP 46 (0, 1, 2, 4, 6 e 8 dias), uma amostra com mosquitos não expostos ao fungo (controle negativo) e a outra amostra apenas com micélio de IP 46 (controle positivo).

Em cada extração foi utilizada a mesma metodologia descrita por Saghai -Maroof et al. (1984), variando apenas o tampão de extração, sendo utilizados os tampões dos protocolos descritos por Saghai-Maroof et al. (1984) (Tampão I: tampão de extração 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB), Raeder e Broda (1985) (Tampão II: tampão de extração 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS), e Doyle e Doyle (1987) (Tampão III: tampão de extração 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 2% PVP). Ao todo foram feitas seis extrações de DNA, com duplicatas de cada tampão.

Seguindo os protocolos adaptados, foram adicionados 300 µl de tampão de extração em cada microtubo contendo os mosquitos ou micélio de IP 46, e com micropistilo as amostras foram maceradas por aproximadamente 5 minutos. Após a maceração, foram adicionados mais 300 µl de tampão de extração, as amostras agitadas em vórtex por 1 minuto e em seguida incubadas a 65°C em banho-maria por 60 minutos; a cada 30 minutos foi feita agitação manual por 30 segundos. Após a incubação, as amostras foram deixadas esfriando em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitados gentilmente por 2 min e centrifugados a 10.000 g por 7 min. Os sobrenadantes (fase aquosa) foram transferidos para novos microtubos, e adicionou igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após nova mistura por leve agitação (2 minutos), foi centrifugado novamente nas mesmas condições. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, neste foram adicionados 500 µl de isopropanol a -20°C, misturados e incubados a -20°C overnight. No dia seguinte, centrifugou a 15.000 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, e o pellet lavado com 600 µl de etanol 96% (-20°C). Os pellets foram secos em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, os pellets foram ressuspensos com 50 µl de Tris-EDTA. As extrações foram confirmadas com eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de extração foram armazenados a -20°C. A partir dos resultados, a melhor metodologia será avaliada também com amostras tratadas em teste de semi campo.

## **2.7. Avaliação de metodologia de extração de DNA de IP 46 em mosquitos em semi campo**

Em cada extração de DNA das amostras de semi campo, foi utilizada a metodologia com melhor desempenho em laboratório, e confirmadas com eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de extração foram armazenados a -20°C. Foram feitas três repetições as quais passaram pelo processo de coleta das amostras em semi campo, extração de DNA e PCR.

## **2.7. PCR e sequenciamento**

Após a extração de DNA das amostras foi realizada amplificação da região TEF-intron (Fator de Extensão da Tradução 1- $\alpha$ ; primers EF1T e EF2T) por polymerase chain reaction (PCR) de todos os produtos de extração (Rehner e Buckley, 2005). A amplificação também foi confirmada por eletroforese de gel de agarose 1%. Os produtos de PCR com amplificação positiva foram enviados para realização do sequenciamento (ACTGene Análises Moleculares, Alvorada, RS). Para a construção da árvore filogenética foram utilizadas sequências padrões obtidas no banco de dados GenBank. As amostras foram alinhadas usando Muscle e ajustada. Análise de máximo verossimilhança foi realizado com MEGA X (v.10.1.7) usando o modelo Kimura-2 Parâmetros. Análise de Bootstrap foi realizado com 1000 réplicas.

## **3. Resultados**

### **3.1. Seleção de uma metodologia de extração com amostras tratadas em laboratório.**

#### **3.1.1. Detecção com tampão I descritos por Saghai-Marroof et al. (1984)**

Nas extrações utilizando o tampão descrito por Saghai-Marroof et al. (1984) (tampão I) a duplicata confirmou a presença de DNA na eletroforese em gel de todas as amostras de mosquito exposto ao fungo, do controle negativo (mosquito sem exposição ao fungo) e no controle positivo (micélio de IP 46) (Fig. 1ac). Em relação ao PCR da primeira repetição, foi possível ver a presença de banda (~700 pb) pela eletroforese no tempo zero, no controle positivo e nas amostras de mosquitos incubados a 75% ou >98% UR, sendo que na UR de 75% foram visualizadas bandas no tempo de 6 e 8 dias, em que os mosquitos já estavam mortos e na UR >98% foram visualizadas no tempo de 2 e 8 dias (Fig. 1b). Já na segunda repetição foi visualizado apenas no controle positivo e na UR >98% nos tempos de 2, 6, e 8 dias (Fig. 1d).

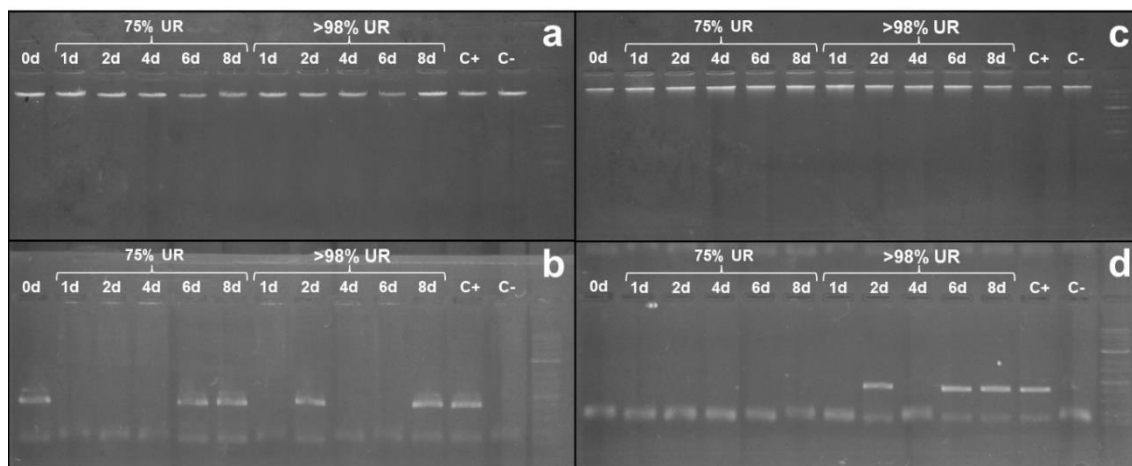


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose das extrações (a, c) realizadas com o tampão de extração do tampão I, e PCRs (b, d) das amostras utilizando os primers EF1T e EF2T. As porcentagens indicam a umidade relativa em que as amostras foram incubadas e os números acompanhados da letra “d” corresponde a quantidade de dias que as amostras ficaram incubadas.

### 3.1.2 Detecção com tampão II descrito Raeder e Broda (1985)

Na extração que utilizou o tampão descrito por Raeder e Broda (1985) (tampão II) a duplicata também confirmou a presença de DNA na eletroforese em gel de todas as amostras de mosquito exposto ao fungo, de controle negativo (mosquito sem exposição ao fungo) e no controle positivo (micélio de IP 46) (Fig. 2ac). A eletroforese da PCR trouxe que, na primeira repetição a presença das bandas (~700 pb) foram visualizadas nas amostras que foram incubadas em UR de 75% e >98% e no controle positivo sendo que na UR de 75% foram visualizadas bandas no tempo de 4, 6 e 8 dias e na UR de 98% foram visualizadas no tempo de 2, 6 e 8 dias (Fig. 2b). Já a segunda repetição, as bandas foram visualizadas na UR de 75% e >98% e no controle positivo sendo que na UR de 75% tiveram bandas no tempo de 4, 6 e 8 dias e na UR de >98% tiveram bandas em todos os tempos 1, 2, 4, 6 e 8 dias (Fig. 2d).

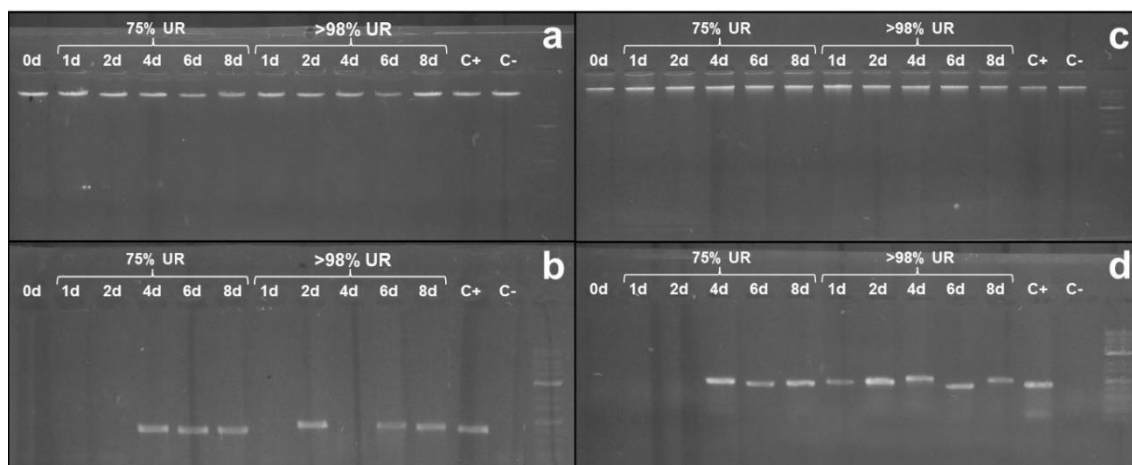


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose das extrações (a, c) realizadas com o tampão de extração do tampão II, e PCRs (b, d) das amostras utilizando os primers EF1T e EF2T. As porcentagens indicam a umidade relativa em que as amostras foram incubadas e os números acompanhados da letra “d” corresponde a quantidade de dias que as amostras ficaram incubadas.

### 3.1.3 Detecção com tampão III Doyle e Doyle (1987)

Em relação ao tampão descrito por Doyle e Doyle (1987) (tampão III), a presença de DNA não foi bem evidenciada em todas as amostras pela eletroforese em gel. Na primeira extração foram visualizadas bandas das amostras do tempo zero, no controle positivo e negativo, nas amostras que foram incubadas nas UR de 75% nos tempos de 1, 2, 4, 6 ou 8 dias e na UR de 98% nos dias 1, 2, 4, 6 ou 8. Porém no controle positivo, e nas amostras incubadas na UR de 98% nos tempos de 6 e 8 dias, a intensidade das bandas foi muito fraca, difícil de serem visualizadas (Fig. 3a). Na segunda repetição da extração de DNA, as amostras que tinham a presença de DNA foram as do controle positivo e negativo e as amostras incubadas nas UR de 75% no tempo 1, 2 e 6 e na UR de 98% foi visualizada apenas uma banda no tempo de 6 dias. Porém as bandas da UR de 75% no tempo de 2 e 6 dias, e na banda da UR de 98% no tempo de 6 dias, tiveram uma intensidade muito baixa, também difícil de visualizar (Fig. 3c).

Na PCR com DNA obtido na extração usando o tampão descrito por Doyle & Doyle, foi possível visualizar pela eletroforese em gel de agarose 1% que a amplificação feita na primeira extração teve a presença de banda no controle positivo e nas amostras incubadas em UR de 75% no tempo 2 e 8 dias e na UR de 98% as bandas foram vistas no tempo de 1, 2 e 4 dias (Fig. 3b). Já a PCR feita na segunda extração a presença das bandas foram vistas no controle positivo, na UR de 75% no tempo 6 e 8 dias e na UR de 98% no tempo de 4 e 8 dias (Fig. 3d).



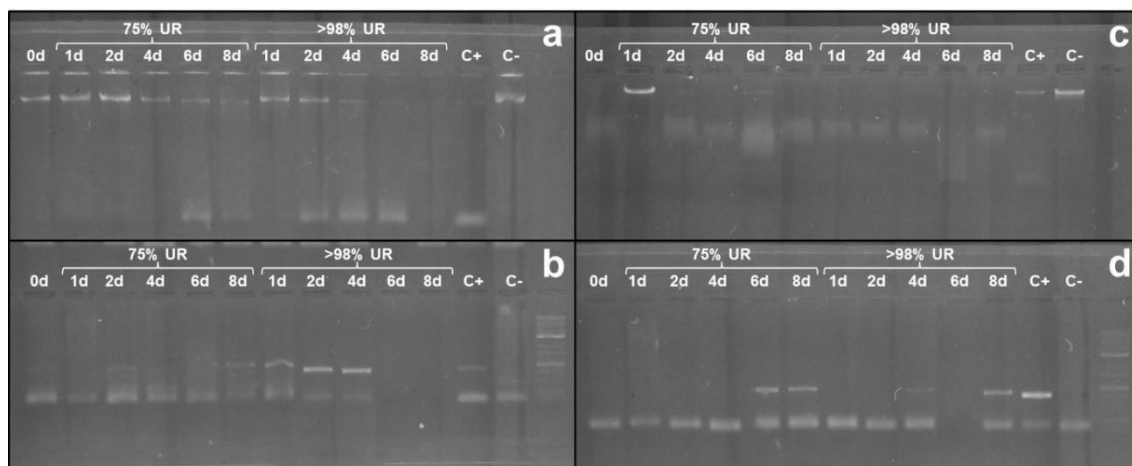


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose das extrações (a, c) realizadas com o tampão de extração da tampão III, e PCRs (b, d) das amostras utilizando os primers EF1T e EF2T. As porcentagens indicam a umidade relativa em que as amostras foram incubadas e os números acompanhados da letra “d” corresponde a quantidade de dias que as amostras ficaram incubadas.

### 3.1.4 Sequenciamento das amostras amplificadas na avaliação da metodologia

O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos de PCR com amplificação positiva (visualização de banda) e com as amostras sequenciadas e alinhadas, foi elaborada a árvore filogenética elaborada para comparar os resultados obtidos da extração com o sequenciamento de outras espécies já identificadas. O sequenciamento confirmou que o DNA extraído e amplificado foi de *M. humberi* (Fig. 4 e 5); porém a amostra da segunda PCR do tampão I na UR de 98% no tempo de 6 dias e no tampão II na primeira PCR no tempo de 1 dia em UR de 98% e na segunda PCR do tempo de 6 dias em >98% UR, o sequenciamento e alinhamento não foram bem-sucedidos e conseqüentemente não foi possível a detecção do IP 46 nessas amostras. O tampão III não foi enviado para o sequenciamento.

O tampão I foi capaz de extrair IP 46 ao final do sequenciamento da primeira PCR nas amostras do tempo zero e as da UR de 75% nos dias 6 e 8, e na segunda PCR desse mesmo tampão apresentou sequenciamento nas amostras da UR de 98% do tempo de 2, 6 e 8 dias (Fig. 4). Já no tampão II o sequenciamento foi visível nas amostras da primeira PCR na UR de 75% no tempo de 4, 6 e 8 dias e na UR de 98% nos dias 1, 2, 4, 6, e 8. E nas amostras da segunda PCR do tampão II o sequenciamento foi feito nas amostras de 75% no tempo de 4, 6 e 8 dias e na UR de 98% no tempo de 2, 6 e 8 dias (Fig. 5).

As amostras do tampão I ficaram agrupadas com um suporte de bootstrap de 90% se ramificando com todas as outras espécies apontando a mesma relação de ancestralidade (Fig. 4), onde a espécie com maior relação ancestral foi o *M. anisopliae* ARSEF 7487 e ARSEF 7450.

Já no tampão II, as amostras também ficaram agrupadas, mas estas apresentaram suporte de bootstrap de 92% também se ramificando com todas as outras espécies apontando a mesma relação de ancestralidade principalmente com o *M. anisopliae* ARSEF 7487 e ARSEF 7450 (Fig. 5).

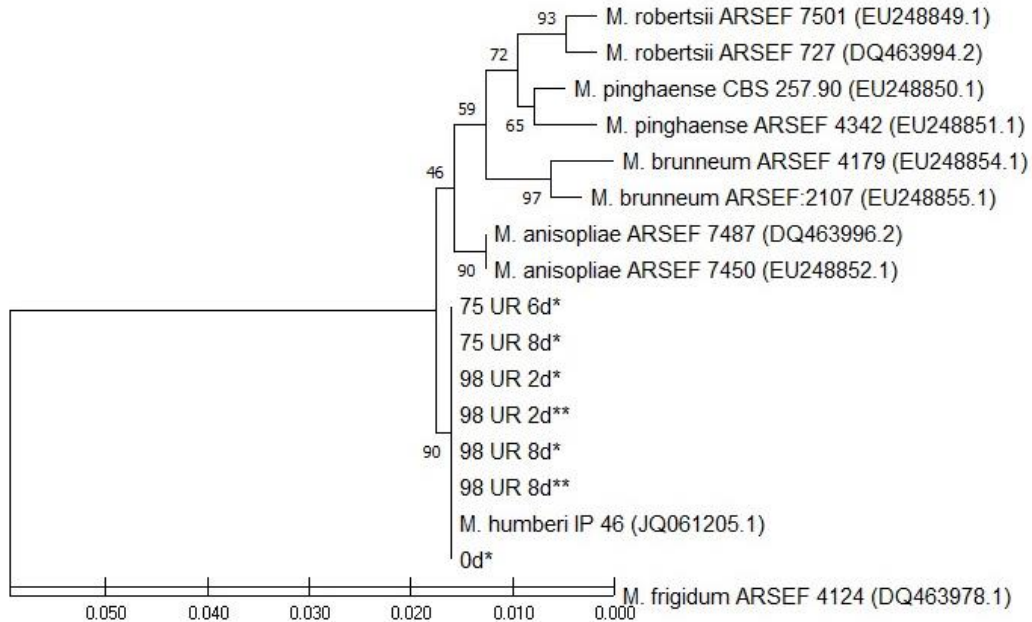


Figura 4 – Filograma de sequência de genes do Fator de Extensão da Tradução 1- $\alpha$  (TEF-intron) alinhados e com as sequências obtidas no tampão I. As árvores foram enraizadas usando a sequência de *Metarhizium frigidum* ARSEF 4124. Todas as sequências dos isolados foram obtidas no GenBank.

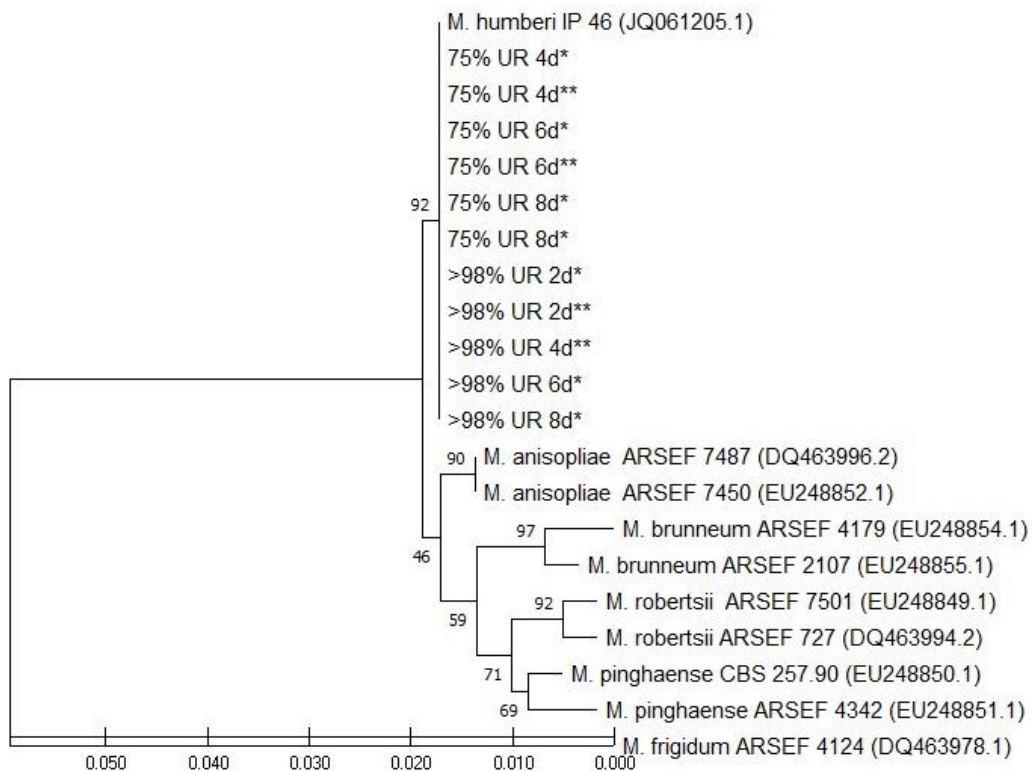


Figura 5 - Filograma de sequência de genes do Fator de Extensão da Tradução 1- $\alpha$  (TEF-intron) alinhados e com as sequências obtidas no tampão II. As árvores foram enraizadas usando a sequência de *Metarhizium frigidum* ARSEF 4124. Todas as sequências dos foram obtidas no GenBank.

### 3.2. Avaliação da metodologia escolhida com amostras tratadas em semi campo

No tratamento dos mosquitos em condições de semi campo com o dispositivo que continha formulação granulada com IP 46, a primeira repetição, das três que foram feitas, apresentou extrações de DNA apenas nas amostras no tempo de 6d, 8d, 10d, 12d, 14d e no controle positivo (Figura 6a). No PCR foi possível detectar IP 46 no tempo 6d, 8d, 10d, 14d e no controle positivo (Figura 6b).

Na segunda e terceira repetição, as extrações de DNA foram visualizadas em todas as amostras coletadas em semi campo (Figura 7ab). Nos PCRs de ambas as repetições não houve amplificação do IP 46 em nenhuma das amostras, inclusive no controle positivo (Figura 9cd).

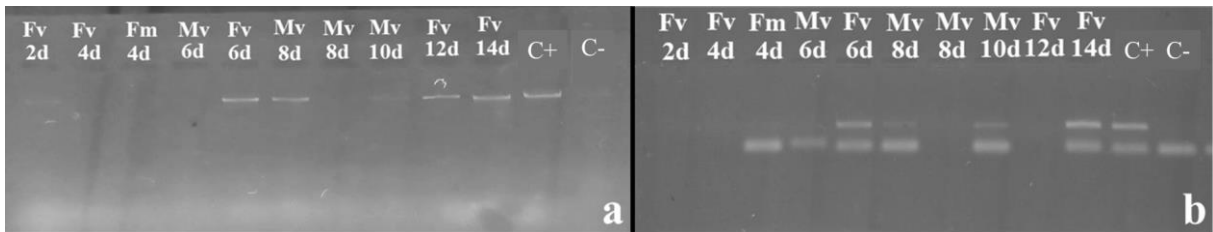


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose da extração (a) realizada em amostras do teste em condições de semi campo na primeira repetição, e PCR (b) das amostras utilizando os primers EF1T e EF2T. As letras na parte superior da imagem irão indicar o sexo do mosquito (Fêmea ou Macho) e o estado no qual eles foram encontrados (morto ou vivo), sendo que cada amostra tem dois mosquitos podendo assim terem sido coletados em estados diferentes. E os números acompanhados da letra “d” corresponde a quantidade de dias que as amostras ficaram incubadas.

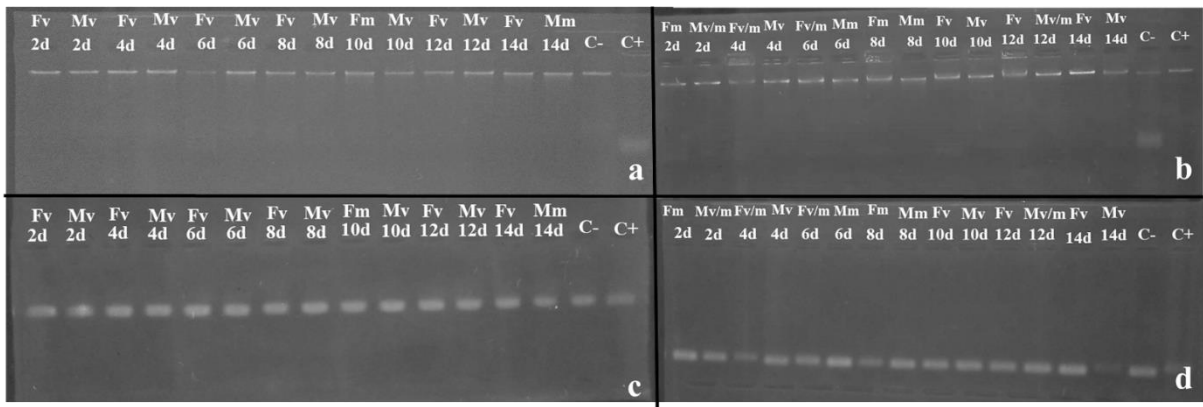


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose das extrações (a, c) realizadas em amostras do teste em condições de semi campo nas segunda e terceira repetições, e PCRs (b, d) das amostras utilizando os primers EF1T e EF2T. As letras na parte superior da imagem irão indicar o sexo do mosquito (Fêmea ou Macho) e o estado no qual eles foram encontrados (morto ou vivo), sendo que cada amostra tem dois mosquitos podendo assim terem sido coletados em estados diferentes. E os números acompanhados da letra “d” corresponde a quantidade de dias que as amostras ficaram incubadas.

Também foram incubadas amostras em ágar-água até a visualização de IP 46. Na primeira repetição, foi possível visualizar o crescimento do fungo na amostra coletada no dia 6, que se tratava de um macho coletado vivo (Figura 8a). Na segunda repetição não foi visualizado o crescimento do IP 46. E na terceira repetição, o IP 46 foi visualizado também em uma amostra coletada no dia 6, que se tratava de um macho coletado vivo, mas moribundo, e em uma amostra do dia 8 que se tratava de uma fêmea coletada morta (Figura 8bc).

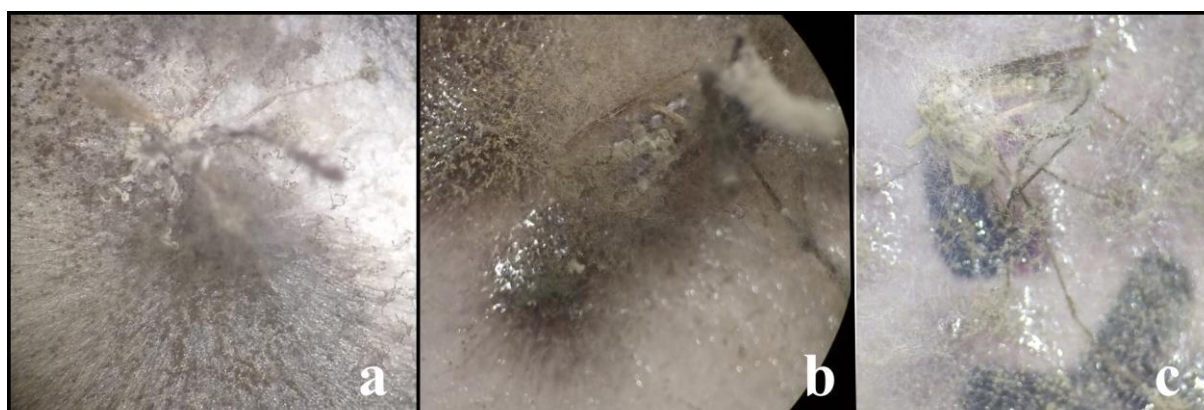


Figura 8 – Ágar-água com amostras de semi campo, de mosquitos contaminados com IP 46 na primeira e terceira repetição (a, b, c). Em cada imagem evidencia o fungo crescendo sobre o mosquito. Primeira imagem é da primeira repetição (a) e a segunda e terceira imagem são da terceira repetição (b, c)

#### 4. Discussão

##### 4.1 Seleção de uma metodologia de extração com amostras tratadas em laboratório.

Para obter uma alta eficiência da amplificação, a extração é uma etapa fundamental. Na extração de DNA os principais procedimentos é a lise das células presente nas amostras e a purificação do DNA, e para cada tipo de amostra existem vários protocolos que podem ser testados, adaptados e otimizados a fim de conseguir DNA de boa qualidade para posterior PCR (EMBRAPA, 2007).

O protocolo de extração seguido foi uma adaptação do protocolo de Saghai-Marroof (1984) que buscou uma forma mais segura em relação aos reagentes utilizados. Produtos como fenol e  $\beta$ -mercaptoetanol apresentam uma alta toxicidade e são comuns nesse tipo de experimento. Neste protocolo adaptado, foi utilizado o clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) que é um reagente menos tóxico do que aqueles vistos corriqueiramente, favorecendo uma maior segurança.

Dos três diferentes tampões de extração de DNA avaliados, o melhor para extração do DNA do fungo *M. humberi* pode-se afirmar foi o tampão II, na sequência tampão I e por último o tampão III. Apesar de todos os tampões terem conseguido extrair DNA em uma quantidade significativa de amostras, parte deste DNA provavelmente também seria do mosquito e de outros microorganismos presentes na microbiota dele, já que extração de DNA extrai todo o conteúdo de DNA que tem na amostra. Mas após a realização da PCR foi evidenciado quais extrações tiveram a capacidade de extrair propriamente o DNA de IP 46.

Na extração com tampão II, os resultados da PCR foram coerentes, amplificando o que foi extraído e apresentando resultado positivo nas mesmas amostras, em ambas as duplicatas, com falha da presença de bandas em apenas duas amostras (UR de 98% no tempo de 1 e 4 dias). Já na PCR das amostras feitas com o uso do tampão I, as bandas tiveram falhas em quatro amostras (dia zero; UR de 75% no tempo de 6 e 8 dias e na UR de 98% no tempo de 6 dias) dentre as bandas que foram evidenciadas nas duplicatas. E por fim, na PCR das amostras feitas com o tampão III, as bandas formadas nas duplicatas tiveram falha de concordância em 6 amostras (dia zero; UR de 75% nos dias 2 e 6 e na UR de 98% nos dias 1, 2 e 8).

Após a exposição dos mosquitos a IP 46, a frequência de mortalidade foi diferente para cada UR. Na incubação a 75% de UR, os mosquitos começaram a morrer a partir do quinto dia após a exposição, enquanto os que foram incubados em >98% UR já morriam após o segundo dia de exposição, possuindo assim amostras de mosquitos vivos ou mortos para fazer as extrações de DNA, sendo que os mosquitos mortos tiveram uma maior detecção certamente pela alta quantidade de fungo que já tinha infectado e crescido no mosquito

É possível notar que a presença das bandas nas extrações e PCRs vão se intensificando nas umidades de 75% e 98% próximo ao fim dos dias de incubação, devido ao aumento do IP 46 no hospedeiro. Sabe-se que o fungo *M. humberi* consegue sobreviver e infectar em umidade relativa de 75% e 98%, porém, é apenas na UR de 98% que ele irá conseguir promover a conidiogênese. Então nas amostras de 75% era possível observar a morte dos mosquitos próximo ao sexto dia, e o fungo não se desenvolvia visualmente sobre o hospedeiro, enquanto na UR de 98% os mosquitos infectados morriam próximo do terceiro dia após a exposição ao

fungo e ainda poderia visualizar nos dias seguintes o desenvolvimento do fungo sobre o mosquito. Essa conidiogênese na UR de 98% possibilitou um aumento da concentração de fungos o que potencializou a detecção do mesmo.

Mas apesar do aumento da concentração do fungo com o avançar dos dias que favoreceu algumas extrações, o tampão II foi capaz de detectar o IP 46, nas amostras incubadas pouco tempo depois da exposição, o que valida significativamente a técnica. Também foi visualizada a detecção do IP 46 no tampão I ainda no tempo zero (logo após a exposição do mosquito à formulação fúngica) que é considerada uma amostra com baixa concentração do fungo, e que provavelmente o mesmo ainda não penetrou no mosquito, mas que talvez ainda possua uma grande quantidade do fungo na parte externa do corpo, sem ter tido tempo para uma autolimpeza. E por fim no tampão III foi também possível detectar o IP 46 nos primeiros dias de exposição. Dessa forma, ressalta-se sensibilidade das técnicas tanto em hospedeiros vivo quanto em hospedeiros mortos, permitindo avaliação das melhores técnicas.

A região que foi amplificada (TEF- intron) nas amostras é a região mais eficaz para distinguir espécies individuais de *Metarhizium* (Bischoff, 2009). A partir da região TEF-intron amplificada foi feito o sequenciamento das amostras que foram demonstradas em uma árvore filogenética conseguindo mostrar a relação do DNA de IP 46, extraído das amostras de mosquitos expostos, com espécies do complexo de *Metarhizium anisopliae* que são as espécies mais próxima a *M. humberi*. Devido a especificidade dos primers utilizados, a PCR amplificou apenas regiões próprias do fungo, sem haver amplificação do DNA de outros microorganismos que poderiam estar ali.

#### **4.2 Avaliação da metodologia escolhida com amostras tratadas em semi campo**

Já os experimentos realizados em semi campo não obtiveram resultados padronizados. Na primeira repetição, das amostras que tiveram extração de DNA, a maioria conseguiu posteriormente ter a região TEF-intron amplificada. Na segunda e terceira repetição não apresentaram bandas na eletroforese das amostras tratadas e no controle positivo. Por se tratar de uma técnica molecular muito sensível, existem variáveis que podem interferir na realização das PCRs, e tais variáveis ainda precisariam ser analisadas para assim ter um melhor resultado nos processos.

As amostras que não passaram pelo processo de extração e amplificação sendo incubadas no ágar-água, apresentaram um resultado com pouca detecção do IP 46 nas amostras, mas que evidenciou claramente, naquelas amostras que o fungo se manifestou. Foram coletadas

amostras de mosquitos mortos, os quais nem todos teve o desenvolvimento do IP 46, mas que possivelmente foi a causa da morte destes mosquitos.

A partir dos experimentos realizados é possível ressaltar a dificuldade em se obter uma padronização a partir de amostras de semi campo. A possibilidade desta problemática pode se dar pela quantidade de fungo que o mosquito vai carregar, mas não apenas por isso, também pode-se ter uma variação no processamento das amostras uma vez que são técnicas sensíveis e que são passíveis de apresentar algum problema.

## 5. Conclusão

Dentre os tampões avaliados, o tampão II foi o que melhor detectou a presença do fungo entomopatogênico *Metarhizium humberi* em adultos de *A. aegypti*, tendo potencial para ser uma técnica utilizada no monitoramento da eficácia do dispositivo em condição de campo, identificando a presença do IP 46. A partir desse estudo serão feitas novas análises para melhor avaliar a eficácia do protocolo.

Dentre os testes realizados para avaliação do protocolo adaptado de Raeder e Broda (1985), tem-se que a avaliação do protocolo em amostras de semi campo que ainda precisam ser aprimoradas para serem apresentadas de forma padronizada.

## 6. Referências

Baldacchino F., Caputo B., Chandre F., Drago A., della Torre A., Montarsi F., Rizzoli A., 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Manag. Sci.*, 71(11), 1471–1485. DOI: 10.1002/ps.4044.

Bettiol, W., 2022. Situação do controle biológico no Brasil. Simpósio sobre Controle Biológico na Agricultura, Anais do Simpósio sobre Controle Biológico na Agricultura (COBIAGRI), Florianópolis: UFSC. ISBN 978-85-8328-116-0.

Braga, I. A., Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16(4), 279-293. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>.

Boer E., Beumer R. R., Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol.*, 1999. Sep 15;50(1-2):119-30. doi: 10.1016/s0168-1605(99)00081-1.

Busch U., Nitschko H., 1999. Methods for the differentiation of microorganisms. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 5;722(1-2):263-78. doi: 10.1016/s0378-4347(98)00369-7.

Castro, M. T., Montalvão, S. C. L., Souza, D. A., Monnerat, R. G., 2017. Ocorrência e patogenicidade de *Beauveria bassiana* à *Hypsipyla grandella* coletada em Brasília. Pesquisas agrárias e Ambientais, 5(4), 263-266. DOI: 10.5935/2318-7670.v05n04a06

Clarke, J. M., DePauw, R. M., Townley-Smith, T.F., 1992. Evaluation of Methods for Quantification of Drought Tolerance in Wheat. Crop Science, 32: 723-728 <https://doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183X003200030029x>

Doyle, J. J., Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 1987.

Faria, M. R.; Magalhães, B. P., 2001. Uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. Biotecnol. Cienc. Desenvolv., 22, 18-21.

Fernández-Salas I., Danis-Lozano R., Casas-Martínez M., Ulloa A., Bond J. G., Marina C. F., Lopez-Ordóñez T., Elizondo-Quiroga A., Torres-Monzón J. A., Díaz-González E. E., 2015. Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. Antiviral Res., 124, 30–42. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.10.015.

Leles, R. N. Isolamento e avaliação de patogenicidade de fungos em *Aedes aegypti* Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás (concluído em 2013).

Luz, C. et al., 2001. Prospecção de bactérias entomopatogênicas em solos de cerrado para controle biológico de mosquitos. Inf. Epidemiol. Sus, 10(1), 49-50. <http://dx.doi.org/10.5123/S0104-16732001000500015>.

Luz C., Sebba G. J., Silva N. R., Silva H. H. G., Monnerat R., 2016. Efficacy of water- and oil-in-water-formulated *Metarhizium anisopliae* in Rhipicephalus sanguineus eggs and eclosing larvae Parasitol. Res., 115, 143-149. DOI: 10.1007/s00436-015-4729-z.

Luz C., Rocha L. F. N., Montalva C., Souza D. A., Botelho A. B. R. Z., Lopes R. B., Faria M., Delalibera I. Júnior., 2019. *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new



member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Latin America. J. Invertebr. Pathol., 166, 107216. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107216>.

Martinez J. M., Rodrigues J., Marreto R. N., Mascarin G. M., Fernandes É. K. K., Humber R.A., Luz C., 2021. Efficacy of focal applications of a mycoinsecticide to control *Aedes aegypti* in Central Brazil. Appl. Microbiol. Biotechnol., 105(23), 8703-8714. DOI: 10.1007/s00253-021-11644-w.

Mascarin G. M., Lopes R. B., Delalibera Í. Jr, Fernandes É. K. K., Luz C., Faria M., 2018. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. J. Invertebr. Pathol., 165, 46–5. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.001.

Melo-Santos M. A., Varjal-Melo J. J., Araújo A. P., Gomes T. C., Paiva M. H., Regis L. N., Furtado A. F., Magalhaes T., Macoris M. L., Andrighetti M. T., Ayres C. F., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop., 113(2), 180–189. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.10.015.

Raeder, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479>.

Rehner, S.A.; Buckley, E. A., 2005. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. Mycol., 97(1), 84–98. DOI: 10.3852/mycologia.97.1.84.

Rocha L. F., Sousa N. A., Rodrigues J., Catão A. M., Marques C. S., Fernandes É. K., Luz C., 2015. Efficacy of *Tolypocladium cylindrosporum* against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. J. Appl. Microbiol., 119(5), 1412-1419. DOI: 10.1111/jam.12945.

Rodrigues J., Catão A. M. L., Dos Santos A. S., Paixão F. R. S., Santos T. R., Martinez J. M., Marreto R. N., Mascarin G. M., Fernandes É. K. K., Humber R. A., Luz C. 2021. Relative humidity impacts development and activity against *Aedes aegypti* adults by granular formulations of *Metarhizium humberi* microsclerotia. Appl. Microbiol. Biotechnol., 105(7), 2725-2736. DOI: 10.1007/s00253-021-11157-6.

Rodrigues, J., Lobo, L. S., Fernandes, É. K. K., Luz C., 2015. Effect of formulated *Metarhizium anisopliae* on eggs and eclosing nymphs of *Triatoma infestans*. Journal of Applied Entomology, 139, 146-153. DOI:10.1111/jen.12183.

Santos, N. R. Costa, A.R.M., Feitosa, C.A., Loth T.P., Klingelfus, A., 2022. A evolução de casos de arboviroses Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Brasil entre 2018 e 2020. The Brazilian J. Infect. Dis., 26(1). DOI: 10.1016/j.bjid.2021.101956.

Smith, L. B.; Kasai, S.; Scott, J. G., 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. Pestic. Biochem. and Physiol., 133, 1-12. DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.03.005.

Thomas, M. B., 2018. Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities Biocontrol, 63, 61-69. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9815-y>.

Tripathy, S. K., Maharana, M., Ithape, D. M, Lenka, D., Mishra, D., Prusti, A., Swain, D., Mohanty, M. R, Reshmi Raj K.R., 2017. Exploring Rapid and Efficient Protocol for Isolation of Fungal DNA. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 6(3): 951-960. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.113>

Saghai-Marooof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., & Allard, R. W., 1984. DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>.