



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Marcos Daniel Filgueiras Gomes

**Atividade inseticida de fungos entomopatogênicos e do
alcaloide matrine em larvas de *Musca domestica* Linnaeus,
1758 (Diptera: Muscidae)**

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E
DISSERTAÇÕES 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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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:

Nome completo do autor: Marcos Daniel Filgueiras Gomes

Título do trabalho: Atividade inseticida de fungos entomopatogênicos e do alcaloide matrine em larvas de *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae)

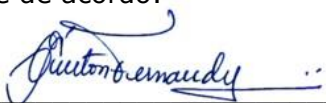
3. Informações de acesso ao documento:

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 da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

Marcos Daniel Filgueiras Gomes

**Atividade inseticida de fungos entomopatogênicos e do
alcaloide matrine em larvas de *Musca domestica* Linnaeus,
1758 (Diptera: Muscidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre em Medicina Tropical
e Saúde Pública.

Orientador: Éverton Kort Kamp
Fernandes

Co-orientador: Caio Marcio de Oliveira
Monteiro

**Goiânia
2017**

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

Filgueiras Gomes, Marcos Daniel

Atividade inseticida de fungos entomopatogênicos e do alcaloide
matrine em larvas de *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera:
Muscidae) [manuscrito] / Marcos Daniel Filgueiras Gomes. - 2017.
LXXII, 72 f.

Orientador: Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes; co-orientador
Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.

Inclui abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Controle biológico. 2. Controle microbiano. 3. Mosca doméstica.
I. Fernandes, Éverton Kort Kamp, orient. II. Título.

CDU 576.8



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MARCOS DANIEL FILGUEIRAS GOMES - Aos nove dias do mês de março do ano de 2017 (09/03/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES, GABRIEL MOURA MASCARIN e CÍNTIA DAS CHAGAS BERNARDO, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"ATIVIDADE INSETICIDA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E COMPOSTO VEGETAL EM LARVAS DE MUSCA DOMESTICA"**, em nível de MESTRADO, área de concentração em PARASITOLOGIA, de autoria de MARCOS DANIEL FILGUEIRAS GOMES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes
Dr. Gabriel Moura Mascarin
Dra. Cíntia das Chagas Bernardo

Aprovado / Reprovado

APROVADO
APROVADO
APROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato HABILITADO (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 45 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Atividade inseticida de fungos entomopatogênicos e do álcool de malte em larvas de Musca domestica Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae).

Assinatura

Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes (IPTSP/UEG) [Assinatura]
Dr. Gabriel Moura Mascarin (EMBRAPA/GO) [Assinatura]
Dra. Cíntia das Chagas Bernardo (IPTSP/UEG) [Assinatura]
Secretário da Pós-Graduação [Assinatura]

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela força e vontade diária de vencer. Logo em seguida, não menos importante, agradeço meus pais, Jane e Edmundo e minha irmã Daniela, por estarem presentes mesmo distantes. Sem vocês nada disso seria possível!

Também venho através deste agradecer ao Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes, por abrir as portas quando minhas esperanças estavam exaurindo, me concedendo a oportunidade, e logo em seguida sua amizade. Deus sabe o que faz.

Agradeço ao Dr. Gabriel Moura Mascarin e ao Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro pelo suporte em diversas ocasiões.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Patologia de Invertebrados, em especial, com grande participação na reta final do trabalho a Msc. Elen Regozino Muniz, meus agradecimentos.

Cíntia, Cárita, Elen, Lucas, Ronaldo e Tchesca... obrigado por me acolher e a cada dia me tornar uma pessoa melhor, em todos os sentidos.

Também agradeço meus amigos de longa data, todos eles, mas meu especial obrigado ao Gabriel e Zander, às vezes só o pensamento de poder contar com a amizade de vocês já era reconfortante.

Minha querida família, sinto falta de vocês a cada dia, cada semana, a cada mês. Mas, quem dera poder viver sempre rodeado dos que amamos, entretanto, como galhos de uma árvore, todos crescemos em direções diferentes, mas a nossa raiz continua sendo a mesma. Esse é o alto preço de viver longe de casa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública pela oportunidade.

O CNPq, pela bolsa de estudos.

A todos que de forma direta ou indireta sempre desejaram o melhor em minha vida. A todos meu muito obrigado!

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	9
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Musca domestica</i>	17
2.2 Métodos de controle de moscas.....	20
2.3 Fungos entomopatogênicos	21
2.3.1 Gênero <i>Metarhizium</i>	23
2.3.2 Gênero <i>Beauveria</i>	25
2.3.3 Gênero <i>Isaria</i>	27
2.4 Controle de insetos utilizando produtos vegetais	27
2.4.1 <i>Sophora flavescens</i> e seus derivados	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS.....	33
4.1- Objetivo geral.....	33
4.2 - Objetivos específicos	33
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1 <i>Musca domestica</i>	34
5.1.1 Coleta e identificação de <i>M. domestica</i>	34
5.1.2 Criação de <i>M. domestica</i>	35
5.2 Isolados fúngicos estudados, cultivo e preparo de suspensões.....	35
5.3 Ensaio com fungos entomopatogênicos.....	37
5.3.1 Triagem da virulência de fungos entomopatogênicos para larvas de <i>M. domestica</i>	37
5.3.2 Comparação da virulência de conídios e blastosporos para larvas de <i>M. domestica</i>	38
5.4 Ensaio com alcaloide vegetal	39
5.4.1 Avaliação da atividade inseticida para larvas de <i>M. domestica</i>	39
5.5 Ensaio associando fungos entomopatogênicos e alcaloide vegetal	40
5.5.1 Germinação relativa de fungos cultivados em meio suplementado com alcaloide vegetal	40

5.5.2 Crescimento radial de fungos cultivados em meio suplementado com alcaloide vegetal matrine	40
5.5.3 Ação conjunta de fungos entomopatogênicos associados a alcaloide vegetal	41
5.6 Análises estatísticas	42
6 RESULTADOS	43
6.1 Triagem da virulência de fungos entomopatogênicos para larvas de <i>M. domestica</i>	43
6.2 Comparação da virulência de conídios e blastosporos para larvas de <i>M. domestica</i>	45
6.3 Avaliação da atividade inseticida do alcaloide matrine para larvas de <i>M. domestica</i>	46
6.4 Germinação relativa de fungos produzidos em meio suplementado com alcaloide vegetal.....	47
6.5 Crescimento radial de fungos produzidos em meio suplementado com alcaloide vegetal.....	52
6.6 Ação conjunta de fungos entomopatogênicos associados a alcaloide vegetal	56
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÕES	64
9 REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo vital de <i>Musca domestica</i> , contendo seus quatro estágios: ovos, larvas, pupa, adulto.....	17
Figura 2. Identificação de estruturas corporais de adulto de <i>Musca domestica</i> . A) aparelho bucal tipo lambedor; B) cabeça; C) tórax; D) abdome.....	18
Figura 3. Ciclo biológico de fungos anamórficos pertencentes a classe Hypocreales.....	23
Figura 4. Armadilha para coleta de moscas. A seta indica a abertura para entrada dos indivíduos adultos.....	34
Figura 5. Gaiola entomológica de madeira para criação de <i>M. domestica</i>	34
Figura 6. Réplica de tratamento indireto com fungo entomopatogênico em larvas de terceiro ínstar de <i>M. domestica</i>	38
Figura 7. Médias ($\pm$ erro padrão) da emergência de adultos de <i>Musca domestica</i> tratadas indiretamente através da exposição à suspensão de conídios ou blastosporos de <i>Beauveria bassiana</i> (IP 316) e <i>Metarhizium robertsii</i> (IP 146), em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$). Médias seguidas da mesma letra não possuem diferença estatística entre si, pelo teste ANOVA seguido Student-Newman-Keuls ($P > 0,05$).....	45
Figura 8. Médias ($\pm$ erro padrão) da emergência de adultos de <i>Musca domestica</i> expostas a ração tratada com suspensão de conídios ou blastosporos de <i>Beauveria bassiana</i> (IP 316) e <i>Metarhizium robertsii</i> (IP 146), em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$). Médias seguidas da mesma letra não possuem diferença estatística entre si, pelo teste ANOVA seguido Student-Newman-Keuls ($P > 0,05$).....	46
Figura 9. Perfil da germinação relativa de conídios de diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp., cultivados em meio de cultura ideal suplementado com presença ou ausência de alcaloide matrine e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ por 24 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem contato com alcaloide). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições.....	49
Figura 10. Perfil da germinação relativa de conídios de diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> , cultivados em meio de cultura ideal suplementado com presença ou ausência de alcaloide matrine e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ por 24 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem contato com alcaloide). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições.....	50
Figura 11. Perfil da germinação relativa de conídios de diferentes isolados de <i>Isaria javanica</i> , cultivados em meio de cultura ideal suplementado com presença ou ausência de alcaloide matrine e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ por 24 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem contato com alcaloide). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições.....	51
Figura 12. Média diária ($\pm$ erro padrão) do diâmetro (mm) de colônias de <i>Metarhizium</i> spp. cultivados em meio BDAL suplementado ou não com alcaloide vegetal matrine (2%), incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ por 15 dias. Médias do diâmetro das colônias crescidas em meio BDAL seguidas com asterisco (*) diferem significativamente da média das colônias crescidas em meio BDAL acrescido de matrine (2%) no mesmo dia.....	53

Figura 13. Média diária ($\pm$ erro padrão) do diâmetro (mm) de colônias de *Beauveria bassiana*, cultivados em meio BDAL suplementado ou não com alcaloide vegetal matrine (2%), incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 15 dias. Médias do diâmetro das colônias crescidas em meio BDAL seguidas com asterisco (*) diferem significativamente da média das colônias crescidas em meio BDAL acrescido de matrine (2%) no mesmo dia.....54

Figura 14. Média diária ($\pm$ erro padrão) do diâmetro (mm) de colônias de *Isaria javanica* cultivados em meio BDAL suplementado ou não com alcaloide vegetal matrine (2%), incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 15 dias. Médias do diâmetro das colônias crescidas em meio BDAL seguidas com asterisco (*) diferem significativamente da média das colônias crescidas em meio BDAL acrescido de matrine (2%) no mesmo dia.....55

Tabela 1. Código dos isolados de fungos entomopatogênicos investigados no presente estudo, sua origem e espécie.....36

Tabela 2. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes isolados de *Metarhizium* spp., e das pupas recuperadas, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$), com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.43

Tabela 3. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes isolados de *Beauveria bassiana*, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$), com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.....44

Tabela 4. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes isolados de *Isaria javanica*., e das pupas recuperadas, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$) com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.....44

Tabela 5. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações do alcaloide matrine, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$) com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.....47

Tabela 6. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas diretamente com diferentes concentrações do alcaloide matrine, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$) com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.....47

Tabela 7. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas, das pupas recuperadas e eficácia do tratamento larval (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações de alcaloide vegetal matrine (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL), ou conídios (1×10^7 conídios/mL) de IP 119 (*Metarhizium anisopliae* s.s), ou associação de conídios com matrine, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$).....57

Tabela 8. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas, das pupas recuperadas e eficácia do tratamento larval (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações de alcaloide vegetal matrine (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL), ou conídios (1×10^7 conídios/mL) de CG 307 (*Beauveria bassiana*), ou associação de conídios com matrine, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$).....58

Tabela 9. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas, das pupas recuperadas e eficácia do tratamento larval (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações de alcaloide vegetal (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL), isolado fúngico CG 1285 (*Isaria javanica*) previamente selecionado, e associação de conídios com produto, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq$ 80%)......59

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

LPI	Laboratório de Patologia de Invertebrados
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
UFG	Universidade Federal de Goiás
°C	Graus Celsius
BDAL	Batata, Dextrose, Ágar + Extrato de Levedura
SDAL	Sabouraud, Dextrose e Ágar + Extrato de Levedura
MML	Meio Mínimo de Cultra + α -Lactose
MM	Meio Mínimo de Cultura
UR	Umidade Relativa
MT	Matrine
ANOVA	Análise de Variância
SNK	Student-Newman-Keuls
ppm	Parte-por-milhão
mL	Mililitro
g	Gramas
cm	Centímetro
rpm	Rotações Por Minutos
mg	Miligrama
IP	Instituto de Patologia
CG	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
ARSEF	ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures
ETL	Eficácia do Tratamento Larval
ML	Mortalidade Larval
MPR	Mortalidade de Pupas Recuperadas
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária

RESUMO

O presente estudo investigou a virulência de *Metarhizium* spp., *Beauveria bassiana* e *Isaria javanica* contra larvas de *Musca domestica*; comparou também a virulência de diferentes propágulos fúngicos, e avaliou a eficácia de matrine, um alcaloide vegetal, e sua associação com fungos entomopatogênicos contra larvas de *M. domestica*. Além disso, o estudo relata a viabilidade conidial e o crescimento radial de diferentes isolados fúngicos em meio de cultura suplementado ou não com matrine. Nesse sentido, conídios produzidos em meio BDAL foram suspensos em Tween 80 a 0,01% e ajustados a 1×10^8 conídios/mL e espalhados em papel filtro para o tratamento indireto de larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*. A eficácia do tratamento dos isolados de *Metarhizium* spp. variou entre 77,44% (IP 119) e 87,35% (IP 146). A eficácia do tratamento variou de 39,37% (ARSEF 9588) e 70,60% (IP 361) entre os isolados de *B. bassiana*, e variações entre 26,75% (CG 1316) e 53,28% (CG 1283) foram observadas em grupos tratados com isolados de *I. javanica*. Conídios e blastosporos de IP 146 (*Metarhizium robertsii*) e IP 361 (*Beauveria bassiana*) foram produzidos em meio Ádamek, em seguida foram preparadas suspensões e estas ajustadas para 1×10^8 propágulos/mL. Tratamentos indiretos foram conduzidos espalhando-se a suspensão em papel filtro estéril ou em rações para avaliar a virulência em larvas de terceiro ou segundo ínstar de *M. domestica*, respectivamente. Apenas o tratamento com blastosporos IP 146 em ração foi eficaz contra larva de *M. domestica*. Larvas de *M. domestica* também foram imersas em soluções contendo matrine (tratamento direto) ou expostas a papel filtro estéril tratado com matrine (tratamento indireto) em diferentes concentrações (1, 5, 10 e 20 mg / mL); dez larvas foram utilizadas em cada tratamento e grupo de controle. Para ambos tratamentos concentrações de matrine superiores a 1 mg/mL foram eficazes contra larvas de *M. domestica*. A germinação de conídios dos isolados de *Metarhizium* spp., *B. bassiana* e *I. javanica* foi avaliada em 24 e 48 horas sobre meio BDAL acrescido de cloranfenicol e benomil, e suplementado ou não (controle) com matrine (2%). Todos os isolados tiveram germinação em torno de 100%, em ambos os tempos de incubação avaliados. O crescimento radial de isolados também foi avaliado em meio BDAL suplementado ou não (controle) com matrine. Nesse estudo, os isolados de *Metarhizium* spp. e *B. bassiana*, com exceção de CG 138, tiveram crescimento radial reduzido em meio contendo matrine. Os isolados de *I. javanica*, no entanto, não reduziram seu crescimento quando expostos à matrine em meio de cultura. Foi investigada a associação de fungos entomopatogênicos [IP 119 (*Metarhizium anisopliae* s.s.), CG 307 (*Beauveria bassiana*) ou CG 1285 (*Isaria javanica*)] com matrine (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL) contra larvas de *M. domestica*. Em testes indiretos em papel filtro estéril, a associação de conídios fúngicos e matrine foi mais eficaz contra larva de *M. domestica* do que conídios apenas, e a associação foi mais eficiente do que matrine sozinho. Todos os experimentos foram incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq$ 80%. Concluindo, *Metarhizium* sp. é indicado como um agente microbiano promissor para controlar larvas de *M. domestica*; também, blastosporos do isolado IP 146 aplicados à ração foram eficazes no controle de larvas de segundo instar. Além disso, o alcaloide matrine foi eficaz para controlar larvas de *M. domestica*; não afetou a viabilidade dos conídios dos fungos investigados neste estudo, mas retardou o crescimento da maioria dos isolados de *Metarhizium* e *Beauveria* testados. O crescimento radial de isolados de *Isaria* sp. não foi afetado pela suplementação de meio com matrine. Não houve aumento da eficácia contra larva de *M. domestica* quando fungos foram associados ao matrine.

Palavras-chave: *Musca domestica*, fungos entomopatogênicos, alcaloide vegetal.

ABSTRACT

The current study investigated the virulence of *Metarhizium* spp., *Beauveria bassiana* and *Isaria javanica* against *Musca domestica* larva; it also compared the virulence of different propagules, and evaluated the efficacy of matrine, a plant alkaloid, and the association of matrine and entomopathogenic fungi against larvae of *Musca domestica*. In addition, the study reports the conidial viability and radial growth of different fungal isolates in culture medium supplemented or not with matrine. Conidia produced on BDAL medium were suspended in Tween 80 0.01% and adjusted to 1×10^8 conidia / mL, and spread on filter paper for indirect treatment of third-instar larvae of *M. domestica*. The efficacy of treatment ranged from 77,44% (IP 119) to 87,35% (IP 146) among *Metarhizium* spp. isolates. The efficacy of treatment ranged from 39,37% (ARSEF 9588) to 70,60% (IP 361) among the isolates of *B.bassiana*; variations between 26,75% (CG 1316) and 53,28% (CG 1283) was reported in groups treated with isolates of *I. javanica*. Conidia and blastospores of fungi were produced on Adamek medium, and suspensions were prepared and adjusted to 1×10^8 propagules/mL. Aliquots were used in indirect treatments by spreading the suspension to sterile filter paper or to comminuted ration to evaluate virulence in third or second instar larvae, respectively. Only the treatment with IP 146 blastospores in ration was effective against *M. domestica* larva. Larvae were immersed on matrine solutions (direct treatment) or exposed to sterile-filter paper treated with matrine (indirect treatment) in different concentrations (1, 5, 10 and 20 mg/mL). Ten larvae were assayed in each treatment and control group. Matrine concentrations higher than 1 mg/mL were effective against *M. domestica* larva in both treatments. Germination of conidia of *Metarhizium* spp., *B. bassiana* and *I. javanica* isolates was assessed at 24 and 48 h onto BDAL medium plus chloramphenicol and benomyl, supplemented or not (control) with matrine. All isolates had germination around 100%, in both incubation times evaluated. In addition, the radial growth of isolates was evaluated on BDAL medium supplemented or not (control) with matrine. The isolates of *Metarhizium* spp. and *B. bassiana*, with the exception of CG 138, had a reduced radial growth on medium containing matrine. Isolates of *I. javanica* did not reduce their growth when exposed to matrine. The association of entomopathogenic fungi [IP 119 (*Metarhizium anisopliae* s.s.), CG 307 (*Beauveria bassiana*) or CG 1285 (*Isaria javanica*)] with matrine (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL), was investigated against larva of *M. domestica* in indirect tests on sterile filter paper. The association of fungal conidia and matrine was more efficient against *M. domestica* larva than conidia, and the association was more efficient than matrine alone. All experiments were incubated at 27 ± 1 °C and RH $\geq$ 80%. In conclusion, *Metarhizium* sp. is indicated as a promising microbial agent to control larva of *M. domestica*; also, IP 146 blastospores applied to ration were effective in the control of second instar larvae. In addition, the alkaloid matrine was effective to control *M. domestica* larva; it did not affect the viability of the conidia of the fungi investigated in this study, but it slowed down the growth of most of the *Metarhizium* and *Beauveria* isolates tested. Radial growth of isolates of *Isaria* sp. was not affected by supplementation of medium with matrine. No increased efficiency against *M. domestica* larva was detected when fungi was associated with matrine.

Keywords: *Musca domestica*, entomopathogenic fungi, alkaloid.

1 INTRODUÇÃO

Presentes em todos ecossistemas, com distribuição mundial, os insetos formam a maior classe do reino animal. Devido à sua diversidade, na sua grande maioria, os insetos são extremamente benéficos ao ser humano. Uma pequena parcela atua como praga agropecuária ou urbana, causando milhões em prejuízos a pequenos produtores, latifundiários e ao governo. O controle contemporâneo baseia-se principalmente em aplicações de bases químicas no ambiente em que o inseto-alvo se encontra, ocasionando contaminações ambientais e aparecimento de populações resistentes. Como método alternativo ao uso intensivo de produtos químicos para controle de artrópodes, a utilização de microrganismos entomopatogênicos torna-se uma ferramenta promissora para reduzir a ocorrência de resistência e minimizar os danos ambientais ocasionados por inseticidas. Assim como o uso de substâncias de origem vegetal também vem sendo considerado potencialmente eficazes e ambientalmente sustentável quando comparado aos métodos convencionais.

Musca domestica (Diptera: Muscidae) possui uma grande importância médica e veterinária, sendo transmissor de aproximadamente 100 doenças, para humanos ou animais, dentre elas, infecções bacterianas, virais, por helmintos e protozoários (FÖRSTER et al., 2007; MALIK et al., 2007). Por ser um inseto altamente sinantrópico, cosmopolita e com diversos relatos de populações resistentes a inseticidas químicos, estudos utilizando métodos alternativos desenvolvidos sob a perspectiva de reduzir a ocorrência de resistência e contaminações ambientais, tornam-se extremamente relevantes (RENN et al., 1999; FERNANDES et al., 2013).

O controle microbiano de insetos é uma área em ascensão situada no âmbito da patologia de invertebrados, ciência com enfoque em enfermidades que acometem insetos, ocasionadas por vírus, bactérias, nematelmintos protozoários e fungos entomopatogênicos. Estes são responsáveis por aproximadamente 80% das doenças em artrópodes (ALVES, 1998). Em virtude da grande variabilidade genética, estes entomopatógenos atuam positivamente no controle de artrópodes pertencentes a diversas ordens da classe Insecta. *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, são fungos entomopatogênicos pertencentes as famílias Clavicipitaceae e Cordycipitaceae, respectivamente, possuem distribuição mundial e são encontrados naturalmente habitando o solo, infectando artrópodes, ou em associação endofítica (BING; LEWIS, 1991; GOLO et al., 2014). Apresentam largo espectro de hospedeiros e grande destaque

na literatura, sendo estes gêneros os mais estudados em controle biológico. Na ciência, as pesquisas relacionadas ao controle de *M. domestica* utilizando fungos são publicados a partir da década de 80 com estudos relacionados a sua virulência e seus mecanismos de ação no organismo do artrópode.

A utilização de compostos vegetais pela humanidade para controle de insetos é relatada desde a China antiga, Grécia, Egito e Índia desde pelo menos dois milênios atrás até os tempos atuais. São usadas para diversos fins como, perfumaria, cosméticos, detergentes, farmacologia, química fina e compostos aromáticos para a indústria alimentar. A partir da década de 90, sua finalidade ganhou um enfoque diferente: a utilização em programas de controle de pragas, haja vista que algumas plantas, ao longo de sua evolução, desenvolveram mecanismos para sua própria defesa. Substâncias químicas como os metabólicos secundários de plantas apresentam propriedades inseticidas; isto é, com atividade tóxica contra os insetos, podem causar sua morte ou sua repelência. Óleos essenciais presentes na planta também possuem destaque dentro de programas de controle de pragas.

Atualmente, os compostos vegetais com maior atividade inseticida são derivados de plantas das famílias Solanaceae, gênero *Nicotiana*, produtoras da nicotina e nornicotina; Leguminosae, gêneros *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea*, produtoras de rotenóides; Asteraceae, gênero *Chrysanthemum*, produtoras de piretrinas e Meliaceae, gênero *Azadirachta*, produtoras de azadiractina (VIEIRA; FERNANDES, 1999, apud LOVATTO et al., 2004).

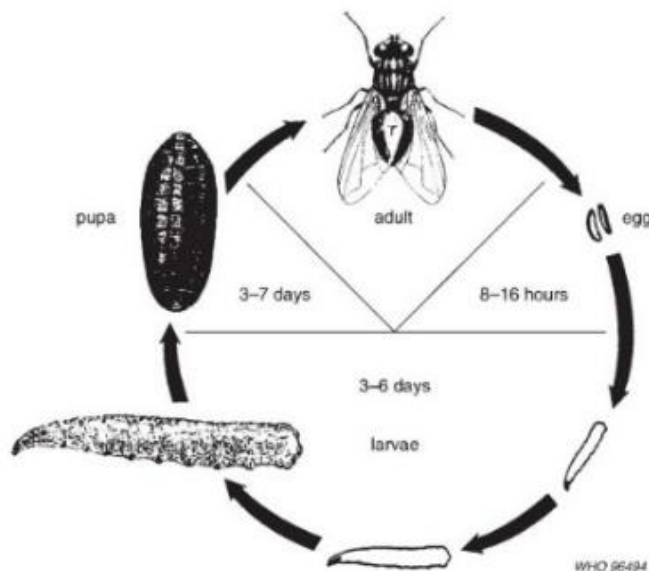
Objetivou-se neste estudo selecionar isolado de fungo entomopatogênico virulento e investigar o efeito de composto vegetal à base de alcaloide matrine associado ou não com fungo entomopatogênico para larvas de *Musca domestica*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Musca domestica*

Musca domestica Linnaeus, 1758 pertence à ordem Diptera e família Muscidae. É conhecida popularmente como mosca doméstica devido a seus hábitos sinantrópicos (fenômeno de adaptação das espécies às condições ecológicas criadas pelo homem no processo de urbanização) e endofílicos (hábito de permanecer no mesmo local do que o hospedeiro parasitado) (NEVES et al., 2005). Podem voar por vários quilômetros, pousando em excrementos, alimentos, invadindo casas e ambientes de criação de animais (ROMÁN et al., 2004). Apresenta ciclo biológico holometabólico, compreendendo as fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1)(WEIGERT et al., 2002). Os adultos recém emergidos buscam abrigo em ambientes escuros enquanto suas asas e cutícula enrijecem, já que são frágeis e incapazes de voar (WHO, 1991). Após esse período de enrijecimento, que em geral corresponde ao segundo dia após a emergência, já estão aptos a se acasalarem, se a temperatura for favorável, em torno dos 30°C (WHO, 1991).

Figura 1: Ciclo vital de *Musca domestica*, contendo seus quatro estágios: ovos, larvas, pupa, adulto. Fonte: WHO, 1981.

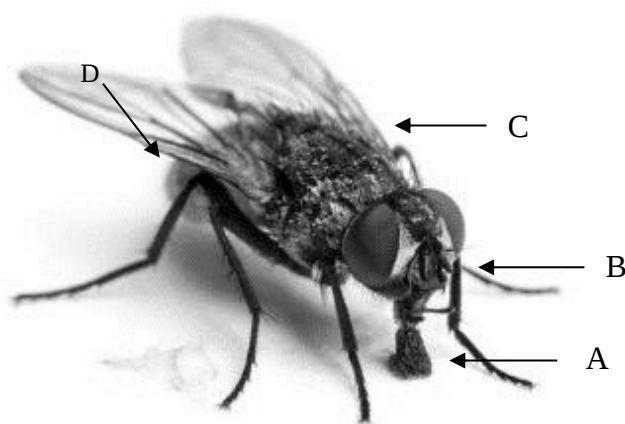


As fêmeas realizam oviposição em qualquer matéria orgânica em fermentação, podendo uma única fêmea ovipor até cinco vezes durante sua vida, com quantidade de ovos variando de 120 a 130 por postura (KEIDING, 1980). Os ovos são brancos, possuem formato de “banana” e tamanho aproximado de 1mm, rompem-se ao fim de algumas horas ou de alguns dias (tempo estimado entre oito horas ou quatro dias)

em função da temperatura (WHO, 1991). Assim que ocorre o rompimento, as larvas começam a alimentar-se avidamente e sofrem duas mudas; portanto, há três ínstaes, sendo estes capazes de desenvolver-se em uma grande variedade de substratos, alimentando-se basicamente de matéria orgânica vegetal (ALEIXO et al., 1984). Sob influência da temperatura, as larvas, após três a sete dias, abandonam o substrato de alimentação para empupar em ambientes mais secos. O período de empupamento pode variar de três ou sete dias em condições favoráveis de temperatura (KEIDING, 1980). A temperatura é um importante fator ambiental para as populações de *M. domestica* em crescimento, sendo que este fator abiótico limita e determina o sucesso dos estágios iniciais de desenvolvimento da mosca (LEVINE; LEVINE, 1991).

Morfologicamente, o corpo de adultos de *M. domestica* é dividido em cabeça, tórax e abdome (Figura 2). Sua cabeça apresenta formas variáveis, geralmente esféricas; a parte superior varia entre achatada ou côncava. Possuem a presença de olhos compostos e ocelos. Os olhos estão presentes, em ambos os sexos, na parte dorsal da cabeça. Nas fêmeas, os olhos estão separados pela fronte, ditos, portanto, dicópticos, enquanto nos machos são holópticos (Figura 2) (MARICONI, 1999).

Figura 2: Identificação de estruturas corporais de adulto de *Musca domestica*. A) aparelho bucal tipo lambedor; B) cabeça; C) tórax; D) abdome. **FONTE:** <http://revoluciontrespuntocero.com>



Juntamente com os caracteres supra citados, a mosca apresenta o aparelho bucal do tipo lambedor (Figura 2), constituído de uma probóscida robusta na qual sua labela apresenta excelente desenvolvimento; pois sofreu adaptações para funcionar como uma esponja, desenvolvendo uma grande capacidade de sugar líquidos (HEWITT, 1916).

O tórax apresenta três regiões fusionadas (protórax, mesotórax e metatórax). O segmento mais desenvolvido é o mesotórax, local em que os músculos que dão movimentação às asas estão presentes. Apresenta quatro faixas longitudinais pretas, paralelas no mesonoto (HEWITT, 1916). As pernas das moscas terminam em um par de garras e um par de pulvilos (estrutura composta por minúsculos pelos glandulares responsáveis pela adesão do inseto às superfícies lisas) e uma formação alongada denominada de empódio, de situação mediana e ventral (REY, 2013).

O abdome é amarelado, com uma faixa preta longitudinal mediana e presença de quatro a nove segmentos visíveis, nos machos terminando nas peças da genitália e nas fêmeas num ovipositor que pode ser curto ou longo (HEWITT, 1916).

M. domestica é uma espécie de distribuição mundial e de grande importância médica e veterinária. Atua como vetor mecânico de diversos agentes patogênicos, incluindo parasitos de homens e de animais (SMITH, 1986; AXTELL; ARENDS, 1990). É um inseto com alto grau sinantrópico de hábitos peculiares, que pode transportar patógenos na parte exterior de seu corpo, seja em suas peças bucais, nas cerdas presentes em todo seu corpo ou em suas pernas, assim como em seu interior, dentro do seu trato intestinal (WHO, 1991). Entre os patógenos transportados por *M. domestica* possuem destaque helmintos do gênero *Habronema* (AMADO et al., 2000), bactérias como *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. (ROMÁN et al., 2004; BANJO et al., 2005; UGBOGU et al., 2006) e *Staphylococcus aureus* (BANJO et al., 2005); protozoários como *Entamoeba histolytica* e *Giardia intestinalis* (SALES et al., 2002); vírus como o poliovírus e vírus causadores de hepatites (UGBOGU et al., 2006) e fungos como *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus* spp. (QUICENO et al., 2010).

A mosca doméstica também pode transmitir *Salmonella typhosa* causadora da febre tifoide, doença infectocontagiosa grave, que causa constante febre, alterações intestinais, esplenomegalia e, se não tratada, pode ocorrer uma confusão mental e levar à morte (REY, 2013). Do mesmo modo, pode transmitir o patógeno causador da cólera, *Vibrio cholerae*, doença epidêmica de escala global, sendo este um dos maiores problemas em países subdesenvolvidos com clima tropical (WALSH; WARREN, 1979).

Também pode ser vetor mecânico de *Bacillus anthracis*, que causa o Antraz, que é uma séria infecção que pode afetar homem e animais; sua contaminação ocorre após inalação, ingestão ou contato cutâneo com o esporo (FASANELLA et al., 2010).

2.2 Métodos de controle de moscas

Faz-se necessário estabelecer métodos de controle para minimizar a ação vetorial destes insetos, métodos estes que devem integrar os controles mecânico, químico e biológico.

O controle mecânico inclui práticas que envolvem a utilização de barreiras e/ou destruição direta das moscas, como destinação correta do lixo e dejetos humanos ou de animais, que neste caso seria a incineração, como também impedir o acesso dos insetos às fontes de alimentos utilizando telas nas portas e janelas em residências e estabelecimentos comerciais (REY, 2013).

O controle químico baseia-se na utilização de inseticidas que possuem como princípio ativos químicos que apresentam toxicidade aos insetos. A resistência dos mesmos aos inseticidas convencionais, no entanto, leva ao aumento da frequência de aplicações, reduzindo ainda mais sua eficácia (SCOTT et al., 2000). A resistência é um problema gradativo no controle de insetos, e geralmente está relacionada à degradação mais rápida dos inseticidas pelos genótipos resistentes (DEVONSHIRE, 1973). Entretanto, este método é empregado em escala global para controle de diversos artrópodes pragas e sua aplicação na agricultura é estimada em 4×10^6 toneladas anuais (IPPOLITO et al., 2015).

O desenvolvimento de resistência aos inseticidas por *M. domestica* aumentou a busca por métodos alternativos para o manejo e controle deste inseto (RENN et al., 1999; KAUFMAN et al., 2005). Neste sentido, o controle por utilização de microrganismos entomopatogênicos têm se mostrado bastante viável, pois têm se mostrado eficaz e inócuo aos animais homeotérmicos (ALVES, 1998; CRAWFORD et al., 1998).

O controle biológico pode ser definido como a utilização de qualquer organismo vivo (predadores, parasitos ou patógenos) naturais ou modificados geneticamente, com finalidade de reduzir, controlar ou suprimir populações específicas de artrópodes que sejam prejudiciais e que podem tornar-se pragas (MELO; AZEVEDO, 1998; SANTIN, 2008).

A utilização de fungos entomopatogênicos, microrganismos com capacidade de infectar insetos e outros artrópodes e causar sua morte, é datada do final do século XIX (ALVES, 1998). Em programas de controle biológico, os fungos podem ser utilizados de três maneiras: (i) através da sua inserção como um inimigo natural em uma área em que o hospedeiro é exótico, denominada de controle clássico, (ii) aumento da população

existente de inimigo natural no ambiente, de forma a limitar ou diminuir a população do hospedeiro, denominada de incremento, e (iii) modificações no manejo da área estudada visando viabilizar a permanência do fungo, chamada de conservação (SHAH; PELL, 2003).

Além de controlar populações de *M. domestica*, os fungos entomopatogênicos também demonstram eficácia para o controle de diversos dípteros e outros insetos (MULLENS, 1989). O controle da densidade populacional de *M. domestica* também é possível através da utilização de outros inimigos naturais, principalmente os parasitoides e predadores (PEREIRA, 1947). Quantidade enorme de minúsculos ácaros, pseudoescorpiões e outros aracnídeos predam ovos de *M. domestica*. As larvas são devoradas por larvas de outros dípteros de hábito carnívoro, e outros animais insetívoros que também as utilizam como fonte de alimento. Os insetos adultos são caçados por animais insetívoros (MARICONI, 1999). Ainda sobre o controle de populações de *M. domestica*, muitos autores têm reportado a eficácia de extratos de plantas e óleos essenciais no controle deste díptero (SINGH; AGARWAL, 1988; AMER; MEHLHORN, 2006; RAHUMAN et al., 2008; TARELLI et al., 2009). A utilização de compostos vegetais para controle de insetos, possui grande destaque na literatura, visto que muitas moléculas extraídas de plantas são capazes de influenciar o comportamento e a biologia de uma ampla variedade de insetos. Essas moléculas geralmente têm ação em doses baixas, podem ser econômicas e ecologicamente benéficas, são biodegradáveis, mais específicas e apresentando baixa toxicidade a peixes, aves e mamíferos (AHMED; EAPEN, 1986; SINGH; AGARWAL, 1988; COATS et al., 1991; RICE; COATS, 1994; LEE et al., 1997).

2.3 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são organismos eucariontes, heterotróficos, podem apresentar forma unicelular ou filamentosa, se reproduzem sexuada ou assexuadamente por intermédio de esporos (INGLIS et al., 2001). Pertencem ao reino Fungi, e estão divididos em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota e Ascomycota (HUMBER, 2013). Embora exista a reprodução sexuada, grande quantidade de fungos perdem a capacidade de se reproduzir sexuadamente, este grupo de fungos são conhecidos como fungos anamórficos e estão inseridos na ordem Hypocreales (ZIMMERMANN, 2007). Os membros dessa ordem são caracterizados pela formação de conídios assexuados, originados em células conidiogênicas, que estão presentes em

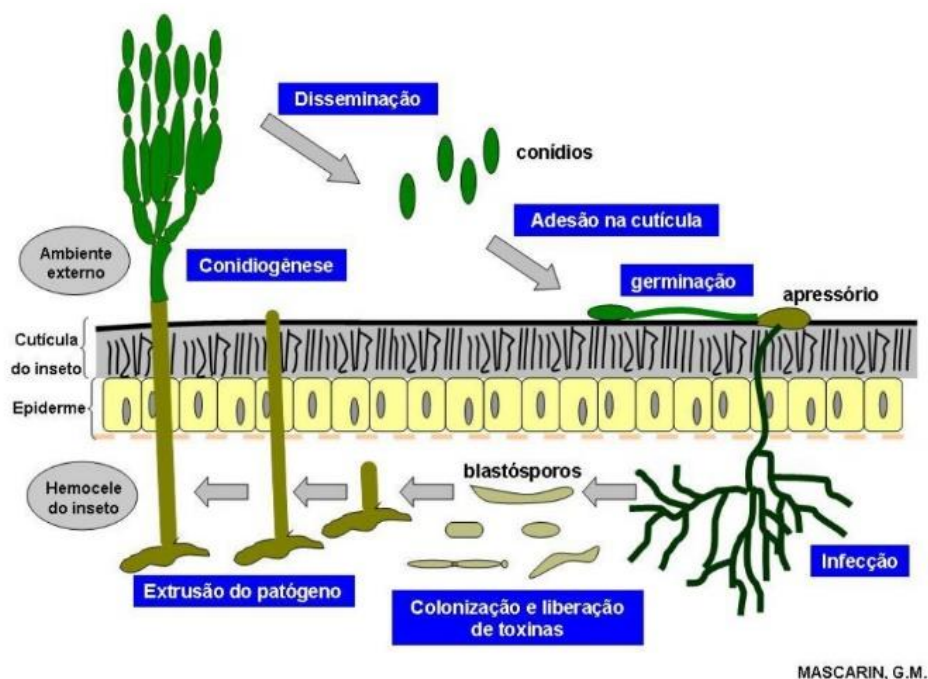
estruturas denominadas de conidióforos, ou em agregados de conidióforos, presentes em toda extensão das hifas (INGLIS et al., 2001).

Estes esporos assexuados também chamados de conídios, são os responsáveis pela infecção fúngica de artrópodes, e estão presentes no ambiente em que insetos e outros artrópodes infectados estão inseridos (SHAH; PELL, 2003). Entre os patógenos de insetos, os fungos entomopatogênicos destacam-se como os mais eficazes em programas de controle biológico (HALL; PAPIEROX, 1982) e também por serem os únicos entomopatógenos capazes de aderir e, conseqüentemente, infectar o hospedeiro através de sua cutícula externa (INGLIS et al., 2001).

Uma possível explicação para a adesão conidial na cutícula do artrópode se dá por interações hidrofóbicas entre a parede das células do conídio e a superfície da cutícula (BOUCIAS et al., 1988, BOUCIAS; PENDLAND, 1991). Após a adesão, ocorre o desenvolvimento do tubo germinativo e em alguns fungos, formação de uma estrutura de penetração denominada de apressório. Para conseguir romper a principal barreira do hospedeiro, o fungo necessita utilizar mecanismos enzimáticos e mecânicos (ARRUDA et al., 2005). A produção de exoproteases possui grande importância durante o processo de penetração, bem como as endoproteases, esterases, lipases, quitinases e quitobiasas (ST. LEGER, 1993; BOUCIAS, PENDLAND, 1998; BUTT et al., 2000). Uma vez que o fungo realiza com sucesso a penetração e chega à hemocele, passa a desenvolver-se sob a forma de corpos hifais, que podem ser uni ou multicelulares, sendo chamados também de blastosporos (DAVIDSON; SWEENEY, 1983; SAMSON et al., 1988; INGLIS et al., 2001). Na hemocele, o fungo pode matar o hospedeiro por danos gerados pelo seu crescimento, inanição (consumo dos nutrientes necessários à sobrevivência do artrópode) e toxicose (GILLESPIE; CLAYDON, 1989). Os metabólitos produzidos pelo fungo são altamente tóxicos ao seu hospedeiro, podendo assim favorecer o sucesso da infecção (ALVES, 1998). Esses metabólitos incluem vários tipos de enzimas e moléculas que atuam na patogenicidade do fungo, com funções de dissolução da cutícula do artrópode, supressão de seu sistema imunológico, interferência com os canais de íons e diversas funções celulares (SCREEN et al., 2001; FREIMOSER et al., 2003). Caso ocorra a morte do hospedeiro, o fungo se exterioriza sob condições apropriadas de temperatura e umidade. No ambiente externo ao hospedeiro, o processo de conidiogênese se inicia novamente dando continuidade ao seu ciclo vital (GOETTEL; INGLIS, 1997; BUTT; GOETTEL, 2000). A dispersão conidial ocorre de forma passiva, principalmente

pelo vento, mas outros fatores como chuva, também desempenham esse papel (INGLIS et al., 2001)(Figura 3).

Figura 3. Ciclo biológico de fungos anamórficos pertencentes a classe Hypocreales. FONTE: MASCARIN, 2010.



No Brasil, o controle biológico com fungos entomopatogênicos vem sendo amplamente empregado, sobretudo para controle de pragas agrícolas. As espécies mais utilizadas são *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* s.l. (FILHO et al., 2009).

2.3.1 Gênero *Metarhizium*

O gênero *Metarhizium* é um dos mais conhecidos entre os fungos entomopatogênicos e causa uma patologia em artrópodes conhecida como “muscardine verde” (DRIVER et al., 2000). Durante muito tempo foi classificado como Deuteromiceto (TULLOCH, 1976), passando a ser classificado como Ascomiceto após isolamento das formas teleomórficas das espécies *Metarhizium taii* e *M. anisopliae* var. *majus*, respectivamente *Cordyceps taii* e *Cordyceps brittlebankisoides* (LIANG et al., 1991; LIU et al., 2001, 2002). Novas análises filogenéticas foram realizadas e as espécies do gênero *Metarhizium* foram classificadas em nove espécies: *M. anisopliae* s.s., *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. globosum*, *M. robertsii* e *M. brunneum* (BISCHOFF et al., 2009).

O fungo *Metarhizium* (Ascomycota: Hypocreales, Clavicipitaceae) possui distribuição mundial e tem como reservatório natural os insetos e principalmente o solo (ZIMMERMANN, 2007). Sua capacidade de infectar uma vasta gama de artrópodes torna-o um dos principais agentes de estudos em controle microbiano (ALVES, 1998).

De acordo com Goettel et al. (1990), as espécies de *Metarhizium* do complexo *M. anisopliae* podem parasitar os insetos das ordens Symphyla, Orthoptera, Dermaptera, Isoptera, Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Siphonaptera e Lepidoptera. Os insetos infectados pelo fungo, após exteriorização dos micélios, tornam-se recobertos por uma camada pulverulenta de conídios, de coloração variando de verde claro a escuro, acinzentados ou esbranquiçados com pontos verdes (ALVES, 1998). Seu desenvolvimento vegetativo ocorre geralmente entre 15 e 32 °C, sendo o ideal 24 a 30 °C e pH ótimo 6,9 (ARRUDA et al., 2005).

O fungo foi originalmente descrito por Metschnikoff (1879) na Ucrânia, onde descreveu um achado de muscardine verde em larvas de besouro do trigo, *Anisoplia austriaca* e depois em *Cleonus punctiventris*. Metschnikoff primeiramente deu o nome de *Entomophthora anisopliae* e logo após de *Isaria destructor*. Sorokin (1883) o classificou como *Metarhizium* (ZIMMERMANN, 2007) e após essa mudança, seu uso em estudos de controle microbiano cresceu exponencialmente e passou a ser utilizado em vários trabalhos de controle biológico de diversos artrópodes.

Luz et al. (1998) buscaram entre 13 isolados de *M. anisopliae* aqueles mais virulentos para ninfas de terceiro ínstar de *Triatoma infestans* (Hemiptera), obtendo após 15 dias de avaliação, mortalidade variando de 45% a 90%, e a concentração letal (CL₅₀) do isolado mais virulento para matar 50% dos insetos foi de $7,1 \times 10^5$ conídios/mL.

A patogenicidade de um isolado de *M. anisopliae* s.l. (= *M. anisopliae* var. *dcjhyium*) foi verificada por Dong et al., (2009) em adultos de *Odontotermes formosanus* (Isoptera), observando aproximadamente 100% de mortalidade três dias após tratamento com suspensão de 3×10^8 conídios/mL. López-Sánchez et al. (2012) estudaram a patogenicidade e a virulência de cinco isolados de *M. anisopliae* s.l. em adultos de *Stomoxys calcitrans* (Diptera), após sete dias de exposição com concentração de 1×10^8 conídios/mL, os resultados mostraram a mortalidade variando entre 31 a 91,7%.

Camargo et al. (2016) realizaram um estudo a campo para verificar a eficácia de *M. anisopliae* formulado em óleo no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae); concluíram que o produto utilizado obteve eficácia variando

de 75,05% e 46,59%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle água e controle óleo.

Tratando-se de *M. domestica*, vários estudos demonstraram a suscetibilidade deste díptero a fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium*, principalmente as espécies do complexo *M. anisopliae*. Barson et al. (1994) observaram a inibição da emergência de adultos quando larvas foram tratadas com *M. anisopliae* nas concentrações de 1×10^7 e 10^8 conídios/mL; quando adultos foram tratados, observaram 100% de mortalidade em 6 dias.

Um estudo laboratorial realizado por Renn et al., (1999) utilizando *M. anisopliae* formulado em isca atrativa com feromônio sexual para controle de adultos de *M. domestica* demonstrou a suscetibilidade destes ao tratamento com mortalidade variando de 95,2 a 100% após 10 dias, com estimativa de adesão de conídios por mosca visitante variando de $2,5 \times 10^3$ até $1,15 \times 10^5$ conídios/inseto.

Fernandes et al. (2013) testaram 10 isolados de fungos entomopatogênicos em larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*. Dois isolados de *M. anisopliae* s.s. obtiveram os melhores resultados com concentrações superiores a 1×10^7 conídios/mL apresentando mortalidade superior a 60%.

2.3.2 Gênero *Beauveria*

Beauveria (Ascomycota: Hypocreales, Cordycipitaceae) é um gênero de fungo entomopatogênico de prevalência mundial, tendo como reservatório natural os insetos e o solo, sendo conhecido por ser capaz de infectar vasta gama de artrópodes considerados pragas (FERNANDES et al., 2009; LANZA et al., 2009).

Descrito primeiramente por Bassi, em 1835, após encontrar bichos-da-seda infectados com fungos que causam doença conhecida como “muscardine branca” (ALVES, 1998). Em 1838, Giuseppe Balsamo Crivelli intitulou a espécie de *Botrytis bassiana*, posteriormente sendo denominada de *Sporotrichum densum*, *Beauveria densa*, *Sporotrichum globuliferum*, *Beauveria globulifera* e *Beauveria bassiana* (AINSWORTH, 1973 *apud* DIAS, 2005). O gênero *Beauveria*, propriamente dito, foi descrito por Vuillemin em 1912 e, através de técnicas moleculares e características morfológicas, doze espécies são atualmente reconhecidas: *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. malawiensis*, *B. vermiconia*, *B. asiatica*, *B. australis*, *B. kipukae*, *B. pseudobassiana*, *B. sungii* e *B. varroae* (REHNER et al., 2011).

Diversos autores comprovaram patogenicidade de *Beauveria* a uma vasta gama de insetos e outros artrópodes. Luz et al. (1998) testaram a patogenicidade de vinte e três isolados de *B. bassiana* em ninfas de terceiro ínstar de *Triatoma infestans*, obtendo índices de mortalidade variando de 17,5% a 97,5% 15 dias após tratamento; a concentração letal (CL₅₀) do isolado mais virulento para matar 50% dos insetos foi de $4,3 \times 10^6$ conídios/mL.

Células leveduriformes de *B. bassiana* obtidas a partir de cultivo em meio sólido apresentaram virulência para larvas de terceiro ínstar de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) e fêmeas de *Teranychus urticae* (Acari) em um estudo desenvolvido por Alves et al. (2002). A concentração letal (CL₅₀) para *D. saccharalis* foi de $5,6 \times 10^6$ células/mL e o tempo médio de sobrevivência das larvas tratadas por imersão na concentração de 10^8 células/mL foi de 5,4 dias. No tratamento das fêmeas de *T. urticae* a concentração letal (CL₅₀) foi de $1,2 \times 10^7$ células/mL e tempo médio de sobrevivência de 3,56 dias.

Quesada-Moraga et al. (2006) testaram 25 isolados de *B. bassiana* e um produto micoinseticida à base de conídios do mesmo fungo contra ninfas de quarto ínstar de *Bemisia tabaci* (Hemiptera) e de *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera); oito dias após inoculação em suspensão 1×10^7 conídios/mL a mortalidade de *B. tabaci* variou entre 3% a 78%, enquanto para *T. vaporariorum* a variação da mortalidade foi de 40% a 85%.

Silva et al. (2006) investigaram a virulência de um isolado de *B. bassiana* para todos os estágios do ciclo biológico de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera). Após tratamento com duas concentrações ($3,4 \times 10^6$ e $3,4 \times 10^8$) os maiores índices de infertilidade foram vistos no estágio de ovo, com infertilidade de 54%, e em larvas tratadas nos ínstares I, II e III com mortalidade de 54%. Em relação à maior concentração, os maiores índices foram vistos no estágio de ovo, com infertilidade de 66,8%, e em larvas nos ínstares I, II e III com mortalidade de 56%.

Badini (2011) investigou virulência de *B. bassiana* em estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*, concluindo que os isolados testados não foram eficazes como controladores microbianos nas suspensões conidiais utilizadas (2×10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5).

Sun et al. (2013) testaram a eficácia de três isolados de *B. bassiana* s.l. em três diferentes concentrações para controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Ixodida). A concentração de 1×10^9 conídios/ml promoveu tempo letal (TL₅₀, TL₉₀) de

7,14 e 9,33 dias, respectivamente; e mortalidade de 90% das fêmeas ingurgitadas 7 dias após tratamento.

Em estudo realizado por Steinkraus et al. (1990), no estado de Nova York, foi relatado o primeiro caso de infecção de *M. domestica* selvagem com muscardine branca, concluindo que essa espécie fúngica pode ser usada como uma ferramenta potencial no controle biológico de moscas. Após esse achado, diversos trabalhos utilizando conídios de *B. bassiana* foram publicados para controle de *M. domestica* (GEDEN et al., 1995; WATSON et al., 1995, 1996; KAUFMAN et al., 2005; LECUONA et al., 2005; MISHRA; MALIK, 2012).

2.3.3 Gênero *Isaria*

O gênero *Isaria* (Ascomycota: Hypocreales, Cordycipitaceae) reúne diversas espécies entomopatogênicas, sendo as mais frequentes: *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* (CHEN et al., 2007; ZIMMERMANN, 2008). Diversos isolados que hoje são classificados no gênero *Isaria*, durante 30 anos, pertenceram ao gênero *Paecilomyces*; esta mudança ocorreu devido ao emprego de técnicas moleculares na identificação das espécies (LUANGSA-ARD et al., 2004, 2005; SUNG et al., 2007; HODGE et al., 2013). As espécies desse gênero possuem distribuição mundial e são comumente isoladas de diversos artrópodes e do solo (ZIMMERMANN, 2008). Seus conídios são pequenos, simples, elípticos ou fusiformes, hialinos, com colônias variando de branco a amarelo. Sua forma completa, ou teleomórfica, pode ocorrer como *Cordyceps* (ZIMMERMANN, 2008). O nome para a patologia causada por esses fungos em insetos é “muscardine amarela”.

Diversos estudos relatam a suscetibilidade de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) para diferentes isolados de *Isaria* sp. (CABANILLAS; JONES, 2009; CABANILLAS et al., 2013; MASCARIN et al., 2013; TIAN et al., 2015); entretanto, trabalhos relatando a atividade inseticida de isolados de *Isaria* sp. à *M. domestica* são bastante escassos (FERNANDES et al., 2013; FAROOQ; FREED, 2016).

2.4 Controle de insetos utilizando produtos vegetais

A utilização de compostos derivados de plantas vem sendo relatada desde a antiguidade. Civilizações chinesas, gregas, egípcias e indianas a pelo menos dois milênios utilizam derivados de produtos vegetais em diversos campos, como: perfumaria,

cosméticos, detergentes, medicinal e para controle de artrópodes (WARE, 1883; THACKER, 2002).

De acordo com Balandrin et al. (1985), algumas plantas têm capacidade de produzir substâncias orgânicas que podem ser utilizadas em variadas aplicações científicas, tecnológicas e comerciais. Esses compostos são categorizados em metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários são substâncias encontradas em abundância na natureza, basicamente utilizados no campo industrial voltado para o manufaturamento de produtos comerciais, tais como óleos vegetais, ácidos graxos e carboidratos. Os metabólitos secundários são compostos derivados biossinteticamente dos metabólitos primários, com menor produção pelo organismo. Não possui função aparente no organismo vegetal, entretanto destaca-se em seu papel ecológico: empregado como atrativo para polinizadores, mecanismo de resistência a pressões ambientais, defensores contra microrganismos e predadores, e também atuam na inibição de outras plantas (aleloquímicos). São comercializados como compostos ativos biologicamente com propriedades farmacêutica e pesticida. Sua utilização está relacionada com baixa contaminação ambiental e dos alimentos, desenvolvimento mais lento de resistência e baixa toxicidade para animais e seres humanos; sendo estas as principais vantagens que os inseticidas vegetais possuem em relação aos inseticidas químicos (BORGES et al., 2011). Neste contexto, o uso de substâncias de origem vegetal torna-se potencialmente eficaz e ambientalmente sustentável em comparação aos métodos convencionais.

Trabalhos sobre controle de *M. domestica* utilizando compostos vegetais vêm sendo publicados desde a década de 1980. Singh e Agarwal (1988) avaliaram o efeito inseticida de óleo essencial de *Cedrus deodara* em adultos de *M. domestica*. Após realizar tratamento tópico utilizando sete frações de óleo, os resultados obtidos após duas horas de exposição mostram mortalidade variando de 0 e 97,5%.

Lee et al. (1997) avaliaram o efeito de 34 monoterpenos através de tratamento tópico em adultos de *M. domestica*. Após 24 horas de exposição, citronela e timol foram os mais tóxicos com concentração letal (CL₅₀) para matar 50% dos insetos, respectivamente, de 64 e 29 mg/inseto.

Após esse período de intenso estudo sobre este muscídeo, houve um hiato de publicações, somente após os anos 2000 novos trabalhos contendo o mesmo modelo experimental foram publicados (PAVELA, 2007; PAVELA, 2008; PALACIOS, 2009; TARELLI et al., 2009). Atualmente, diversos trabalhos continuam sendo publicados, enfatizando a eficácia inseticida dos metabólitos secundários em programas de controle.

Pavela (2011) pesquisou a ação pesticida de 13 fenois e oito ácidos fenólicos em adultos de *M. domestica*; foi observado ação tóxica de todos os fenois testados e um ácido fenólico. Para o fenol mais tóxico a concentração letal (CL₅₀) foi de 53 µg/inseto e para o ácido fenólico foi de 45,8 µg/inseto.

Morey e Khandagle (2012) verificaram a bioeficácia quanto a atividade larvicida, repelência e impedimento de oviposição por quatro óleos essenciais em larvas e adultos de *M. domestica*; óleo de *Mentha piperita*, *Zingiber officinalis*, *Emblica officinalis* e *Cinnamomum verum*. A concentração letal (CL₅₀) do óleo de maior toxicidade (*M. piperita*) foi de 104 ppm, com repelência de 96,8% e impedimento de oviposição de 98,1% na concentração de 1%.

Pavela (2013) verificou a eficácia de sete naftoquinonas como inseticida contra adultos de *M. domestica*. Apenas um dos compostos químicos testados apresentou toxicidade, com concentração letal (CL₉₀ e CL₅₀) de 49 e 21 µg/dose para fêmeas, e concentração letal (CL₉₀ e CL₅₀) de 51 e 18 µg/dose para machos.

2.4.1 *Sophora flavescens* e seus derivados

Sophora flavescens (Fabaceae) possui distribuição mundial e é uma planta leguminosa como *S. alopecuroides* e *S. tonkinensis* (DING et al., 2005). Sua raiz é amplamente utilizada na medicina chinesa como fitoterápico. Os principais componentes de suas raízes são o Matrine (MT)(C₁₅H₂₄N₂O) e Oxymatrine (C₁₅H₂₄N₂O₂), alcaloides com fortes atividades biológicas. MT se destaca sendo utilizado para diversos fins como, medicamento fitoterápico com ação antitérmica, diurético, tratamento da tosse, tumores, arritmia cardíaca e como pesticida (LAI et al., 2003; FU et al., 2005; WANG et al., 2012). *S. flavescens* é atualmente o vegetal mais empregado na China para produção de pesticida botânico, com 92 produtos registrados, podendo os produtos à base de compostos derivados de *S. flavescens* serem utilizados para o controle de diversos artrópodes, como afídios e lagartas (XIN et al., 2016).

O alcaloide matrine é um composto heterocíclico derivado da quinolizidina, e vem sendo reportado sua atividade pesticida seja formulado com outros pesticidas ou sozinho. Matsuda et al. (1991) utilizaram matrine para controle do nematoide *Bursaphelenchus xylophilus* causador de sérios problemas em *Pinus densiflora* uma espécie de pinheiro oriunda da Ásia; comprovando ação nematicida.

Zanardi et al. (2015) reportaram a utilização de biopesticida baseado em matrine para estudo em condições controladas e a campo para controle de quatro espécies

de importância agrícola *Diaphorina citri*, *Panonychus citri*, *Sitophilus zeamais* e *Spodoptera frugiperda*, comprovando atividade biocida em ambas condições para os artrópodes investigados.

Mao e Henderson (2007) verificaram o efeito antialimentar de mistura de alcaloides e a mistura de matrine e oxymatrine em adultos de *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae), observando forte ação sob o inseto.

Em relação a *M. domestica*, trabalhos relatando a atividade do alcaloide matrine em qualquer etapa de seu ciclo biológico não foram encontrados.

3 JUSTIFICATIVA

Musca domestica é um díptero cosmopolita que possui grande impacto na saúde humana e animal, atuando como vetor mecânico ou biológico de diversos patógenos e parasitos. A mosca transporta os agentes causadores de doenças em todo o seu corpo, principalmente nas pernas e peças bucais.

Para minimizar o impacto causado por *M. domestica* utilizam-se inseticidas químicos em larga escala. Esses produtos químicos têm como objetivo controlar populações de insetos interrompendo pelo menos uma etapa de seu ciclo biológico. Porém, o uso exclusivo e indiscriminado tem causado o desenvolvimento de resistência aos inseticidas disponíveis no mercado. Neste contexto, métodos alternativos para controle de artrópodes-pragas possuem grande relevância. O controle biológico é um desses métodos e tem o objetivo de reduzir a população de um determinado organismo indesejável utilizando-se inimigos naturais como os agentes entomopatogênicos, que incluem fungos, bactérias, nematoides, vírus como metazoários. Os fungos se destacam dos demais agentes de biocontrole, visto que seus propágulos não necessitam ser ingeridos pelos insetos para causarem infecção. Outra alternativa viável seria a utilização de substâncias de origem vegetal no controle de pragas, visto que sua utilização é potencialmente eficaz e ambientalmente sustentável.

O estágio de larva parece ser o alvo mais adequado para intervenção do ciclo biológico de *M. domestica*, pois suas larvas procuram locais úmidos no solo para tornarem-se pupas. Aliado a isso, soma-se o fato da aplicação de produtos no solo ser mais viável, visto que sua aplicação é estratégica, simples e menos onerosa; portanto torna-se muito válido o estudo de metodologias que viabilizem o controle biológico deste estágio imaturo.

É sabido que conídios são estruturas fúngicas de resistência contra fatores abióticos estressantes, como a temperatura extrema, radiação ultravioleta e baixa umidade. Apesar do grande espaço de tempo necessário para o conídio obter sucesso em sua infecção, quando comparado aos inseticidas químicos, ele vem sendo o propágulo mais utilizado em programas de controle biológico de acordo com Faria e Wraight, (2007) esses autores relatam que dos 62,7% dos produtos à base de esporos assexuados disponíveis no mercado, 41,2% são baseados exclusivamente em conídios. Outro propágulo fúngico que também merece destaque são os blastosporos, estruturas encontradas naturalmente na hemocele dos artrópodes durante o processo de infecção,

são capazes de induzir patologias em invertebrados, mas não são estruturas de resistência, mas em contrapartida o tempo necessário para sua ação é de poucas horas. O mesmo estudo citou que apenas 4,1% dos micoinseticidas e micoacaricidas registrados no mundo são baseados exclusivamente em blastosporos. Apesar das vantagens e desvantagens de cada um, ambos propágulos são alternativas viáveis para serem utilizadas no controle de artrópodes. Sendo assim, estudos que visam investigar a eficácia de diferentes propágulos fúngicos para artrópodes são de grande relevância.

A utilização de composto vegetal, principalmente os metabólitos secundários, para diversas finalidades vem sendo relatada na literatura. Sua função como pesticida vem sendo utilizada em escala global. Embora, a ação de alcaloides como um bioinseticida para controle de artrópodes pragas seja bem estudada, poucos estudos envolvendo *M. domestica* estão disponíveis na literatura. Sendo assim, estudos nesta linha de pesquisa são importantes, pois podem contribuir com informações cruciais para a utilização sinérgica entre fungos entomopatogênicos e compostos vegetais em programas de manejo integrados de pragas.

4 OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral

Selecionar isolado de fungo entomopatogênico virulento e investigar o efeito de composto vegetal à base de alcaloide matrine para larvas de *Musca domestica*.

4.2 - Objetivos específicos

- i) Avaliar a virulência de isolados de fungos entomopatogênicos pertencentes a diferentes espécies para larvas de *M. domestica*;
- ii) Comparar a virulência de conídios e blastosporos do fungo/isolado mais virulento para larvas de *M. domestica*;
- iii) Avaliar atividade inseticida de composto vegetal à base de alcaloide matrine para larvas de *M. domestica*.
- iv) Avaliar o efeito do alcaloide matrine sobre a germinação de fungos entomopatogênicos em diferentes tempos de incubação;
- v) Avaliar o crescimento radial de fungos entomopatogênicos cultivados sobre meio ideal suplementado ou não com alcaloide matrine ;
- vi) Avaliar possível efeito sinérgico entre fungos entomopatogênicos e alcaloide matrine para controle de larvas de *M. domestica*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 *Musca domestica*

5.1.1 Coleta e identificação de *M. domestica*

A coleta de adultos de *M. domestica* foi realizada no aviário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (UFG), situada no campus Samambaia em Goiânia, Goiás (GO), foram utilizadas quatro armadilhas manufaturadas a partir de garrafas plásticas de 2 L, contendo uma abertura na porção inferior para a entrada das moscas (Figura 5) e isca atrativa à base de açúcares (Unilever®, Garanhuns, Pernambuco, Brasil). As armadilhas foram mantidas no interior do galpão por 1 hora e após esse período, foram levadas ao Laboratório de Patologia de Invertebrados (LPI) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), previamente colocadas em refrigerador de uso doméstico por 1 minuto para imobilização dos adultos, que foram separados em grupos, e identificados segundo MARICONI (1999). Após esta etapa, as armadilhas foram acondicionadas em gaiolas entomológicas (Figura 5) confeccionadas em madeira (41 cm × 20 cm × 27 cm) contendo telas com malhas (14x14 mm) e mantidas no biotério do IPTSP em temperatura ambiente (25 °C ± 2).

Figura 4: Armadilha para coleta de moscas. A seta indica a abertura para entrada dos indivíduos adultos.



Figura 5: Gaiola entomológica de madeira para criação de *M. domestica*.



5.1.2 Criação de *M. domestica*

A alimentação das moscas adultas foi feita em laboratório com leite em pó (Piracanjuba, Bela vista de Goiás, GO, Brasil) acrescido de água (10g/80mL) em potes plásticos de 250 mL (Termopot[®], Goiânia, Goiás, Brasil) e oferecido *ad libitum*. Pedacos de algodão hidrófilo foram imersos nessa mistura para facilitar a alimentação. Esse substrato foi também utilizado pelas moscas para oviposição, sendo trocado diariamente. O substrato contendo ovos era transferido para outros frascos plásticos de 250 mL contendo ração (Guabi[®], Anápolis, Goiás, Brasil) triturada para galinha poedeira. Em seguida, os frascos foram tampados com tela de nylon fina e mantidos em temperatura ambiente (25 ± 2 °C); após emergência dos adultos, os mesmos eram transferidos para caixas entomológicas, também mantidas a 25 ± 2 °C.

5.2 Isolados fúngicos estudados, cultivo e preparo de suspensões

Os fungos investigados nos bioensaios encontram-se listados na Tabela 1, e são provenientes de coleção fúngica estabelecida no Laboratório de Patologia de Invertebrados, pertencente ao IPTSP, UFG.

Os isolados foram semeados com auxílio de alça de níquel-cromo em placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio batata-dextrose-ágar (Difco[®], Maryland, USA) acrescido de extrato de levedura (0,1%) (Difco[®], Maryland, USA) com adição de cloranfenicol (Officinal[®], Goiânia, Goiás, Brasil) e benomil (Du Pont[®], Delaware, USA). Os fungos foram também foram semeados em meio Ádamek (KLEESPIES; ZIMMERMANN, 1992) sólido, ou em meio Ádamek líquido para produção de blastosporos, sendo que a cada 1 litro de água destilada utilizou-se 31,58 mL de milhocina (5g de maisena para 250 mL de água destilada), 42,1 g de extrato de levedura e de glicose, 20 g de ágar e 21,06 mL de Tween 80 a 0,1%. Após semeadura, as placas foram incubadas a 27 ± 1 °C e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ com fotoperíodo de 12 horas, durante 15 dias. Para a produção de blastosporos, foi utilizado 150 mL de meio Ádamek líquido sem ágar em frasco tipo Erlenmeyer (250 mL), sendo estes tampados com algodão hidrófilo e colocados em agitador a 150 rpm por 4 dias, em temperatura ambiente.

Os conídios produzidos foram raspados da superfície do meio de cultura com auxílio de uma espátula e suspensos em 10 mL de solução Tween 80 a 0,01% (Sigma Chemical CO. [®], St. Louis, EUA). As suspensões foram agitadas em vórtex, filtradas em gaze estéril, quantificadas em hemocitômetro e ajustadas para 1×10^8 conídios/mL.

Após o crescimento do fungo em meio líquido Ádamek, o meio foi passado por funil com gaze para retirada do micélio produzido durante o cultivo, e depois colocado em tubos para centrifugação (15 mL) e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspendido em Tween 80 0,01% e centrifugado novamente para retirada de resquícios do meio de cultura. Descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se o pélete em Tween 80 0,01% para quantificação dos propágulos na suspensão com auxílio de hemocitômetro, sendo a concentração ajustada para 1×10^8 blastosporos/mL.

Tabela 1. Código dos isolados de fungos entomopatogênicos investigados no presente estudo, sua origem e espécie.

Coleção	Código de identificação	Hospedeiro/Substrato	Espécie
IP	46	Solo	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.
IP	119	Solo	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.s.
IP	125	Solo	<i>Metarhizium robertsii</i>
IP	146	Solo	<i>Metarhizium robertsii</i>
IP	363	Solo	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.
IP	361	<i>Amblyomma sculpum</i> (Acari: Ixodidae)	<i>Beauveria bassiana</i>
CG	138	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	<i>Beauveria bassiana</i>
CG	307	Solo	<i>Beauveria bassiana</i>
ARSEF	9588	<i>Frankliniella occidentalis</i> (Thysanoptera: Thripidae)	<i>Beauveria bassiana</i>
CG	1285	<i>Bemisia tabaci</i>	<i>Isaria javanica</i>
CG	1283	<i>Bemisia tabaci</i>	<i>Isaria javanica</i>
CG	1315	<i>Bemisia tabaci</i>	<i>Isaria javanica</i>
CG	1316	<i>Bemisia tabaci</i>	<i>Isaria javanica</i>
CG	1326	<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	<i>Isaria javanica</i>

*IP: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, GO, Brasil; CG: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil; ARSEF: ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Ithaca, NY, Estados Unidos.

5.3 Ensaios com fungos entomopatogênicos

Os ensaios foram realizados com a finalidade de selecionar isolados de *Metarhizium* spp., *Beauveria bassiana* e *Isaria javanica*, e seus propágulos (conídios e blastosporos), que apresentam maior virulência para larvas de segundo ou terceiro ínstar de *M. domestica*. A fim de realizar antisepsia das larvas de *M. domestica* em todos os ensaios, estas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, lavadas em água corrente por 30 segundos, e secas em papel toalha estéril.

5.3.1 Triagem da virulência de fungos entomopatogênicos para larvas de *M. domestica*

Um mililitro de suspensão 1×10^8 conídios/mL de cada isolado avaliado (Tabela 1), foi pipetado em papel filtro médio estéril de 9,0 cm de diâmetro (J Prolab[®], São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), o qual foi acomodado ao fundo de frascos plásticos de 250 mL (Termopot[®], Goiânia, Goiás, Brasil) com tampas previamente perfuradas com utilização de agulha estéril de 1,3mm de calibre (Embramac[®], Itapira, São Paulo, Brasil). Em seguida, 30 larvas de terceiro ínstar de *M. domestica* foram transferidas para cada frasco (Figura 3), em triplicata para cada isolado. No grupo controle foi adicionada uma alíquota de 1 mL de solução de Tween 80 0,01%. Os frascos contendo as larvas foram incubados em câmara climatizada a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, monitoradas diariamente com auxílio de data logger HOB0 H8[®] (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA). A mortalidade larval, a mortalidade das pupas e emergência de adultos foram avaliadas 10 dias após tratamento. O experimento foi repetido três vezes, com novos conídios produzidos para cada repetição.

A eficácia do tratamento larval foi calculada utilizando a fórmula (%ETL) = $ML + [(1-ML) \times MPR]$, sendo ML a mortalidade larval e MPR a mortalidade das pupas recuperadas (MELO, 2014).

Figura 6: Réplica de tratamento indireto com fungo entomopatogênico em larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*.



5.3.2 Comparação da virulência de conídios e blastosporos para larvas de *M. domestica*

Os isolados IP 146 (*Metarhizium robertsii*) e 361 (*Beauveria bassiana*) foram selecionados para avaliação comparativa entre propágulos. Foram realizados dois diferentes tratamentos indiretos, em papel com larvas de terceiro ínstar e em ração, com larvas de segundo ínstar. Nos testes em papel, alíquotas de 1 mL da suspensão de conídios ou blastosporos (1×10^8 propágulos/mL), ou Tween 80 0,01% (controle), foram espalhadas em papel filtro médio estéril de 9,0 cm de diâmetro (J Prolab[®], São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) forrados ao fundo de frascos plásticos tampados de 250 mL (Termopot[®], Goiânia, Goiás, Brasil). Após o tratamento, 30 larvas de terceiro ínstar foram acondicionadas sobre o papel filtro tratado. Nos ensaios com ração, 20 mL de suspensão de conídios ou blastosporos (1×10^8 propágulos/mL), ou Tween 80 0,01% (controle), foram homogeneizados em 25g de ração triturada para galinhas poedeiras (Guabi[®], Anápolis, Goiás, Brasil). Em seguida, 30 larvas de segundo ínstar foram adicionadas aos frascos. Após os tratamentos, os potes foram acondicionados em câmara climatizada a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, monitorada diariamente com auxílio de data logger HOBO H8[®] (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) durante todo o experimento. Após 10 dias a emergência dos adultos foi avaliada. Ambos experimentos foram repetidos três vezes, em dias e com lotes de propágulos diferentes.

5.4 Ensaios com alcaloide vegetal

Os ensaios utilizando composto vegetal foram realizados mediante à utilização de um bioproduto à base de alcaloide (Matrine, 1,5%), extraído de plantas do gênero *Sophora*, da família Fabaceae. O produto foi fornecido pelo Grupo Farroupilha, Patos de Minas – Minas Gerais e encontra-se atualmente em fase de registro no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) como acaricida.

5.4.1 Avaliação da atividade inseticida para larvas de *M. domestica*

Quatro concentrações do produto foram selecionadas para realização dos ensaios baseadas em testes preliminares, sendo elas 1; 5; 10 e 20 mg/mL. Larvas de terceiro ínstar de *M. domestica* foram tratadas indiretamente ou diretamente em diferentes concentrações do produto.

No tratamento indireto, 30 larvas foram utilizadas para cada concentração do composto avaliado. Aliquotas de 1 mL de cada concentração ou água destilada (controle) foram pipetadas em papel filtro estéril de 9,0 cm de diâmetro (J Prolab®, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e acomodados ao fundo de frascos plásticos de 250 mL (Termopot®, Goiânia, Goiás, Brasil) com tampa (9,0 cm de diâmetro) previamente perfuradas com utilização de agulha estéril de 1,3mm de calibre (Embramac®, Itapira, São Paulo, Brasil). Em seguida, as larvas foram transferidas para os frascos, entrando em contato com o produto. No tratamento direto, o mesmo *n* amostral foi utilizado e os grupos foram igualmente distribuídos, no entanto, as larvas foram imersas por 3 minutos em 5 mL de cada concentração ou água destilada (controle), e em seguida, foram acondicionadas em frascos plásticos de 250 mL como aqueles utilizados no teste indireto. Após os tratamentos, os potes foram incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, tendo sido a temperatura e umidade relativa monitoradas diariamente com auxílio de data logger HOBO H8® (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) durante todo o experimento. A avaliação foi realizada a partir dos seguintes tempos de exposição: 18, 24, 48, 72; 96; 120 e 240 horas, sendo realizado o registro do número de larvas mortas e pupas recuperadas, para cálculo da eficácia do tratamento larval.

A eficácia do tratamento larval foi calculada como reportado anteriormente. Para cada tipo de tratamento os experimentos foram repetidos três vezes em dias diferentes.

5.5 Ensaios associando fungos entomopatogênicos e alcaloide vegetal

5.5.1 Germinação relativa de fungos cultivados em meio suplementado com alcaloide vegetal

Os isolados presentes na Tabela 1 foram utilizados para verificar possível ação fungicida do matrine para fungos entomopatogênicos quando suplementado em meio BDAL suplementado com matrine (2%).

Para cada isolado investigado, dois tratamentos foram realizados: 1) exposição de conídios a meio BDAL acrescido de cloranfenicol (Officinal[®], Goiânia, Goiás, Brasil) e benomil (Du Pont[®], Delaware, USA), e 2) exposição de conídios ao meio BDAL acrescido de matrine (2%) em meio BDAL, cloranfenicol e benomil, nas mesmas concentrações. Para verificar a germinação conidial, dois tempos de incubação foram avaliados, 24 horas e 48 horas, com temperatura de 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, medição realizada com auxílio de data logger HOBO H8[®] (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) durante todo o tempo de incubação. Alíquotas de 20 µl de suspensão 1×10^6 conídios/mL foram pipetadas em placas de Petri (60 × 15 mm) contendo meio de cultura com ou sem alcaloide, sendo uma réplica por isolado e tratamento. Após o período de incubação, foi inoculado sobre os conídios uma gota de corante azul de metileno. A avaliação foi realizada por contagem de 300 conídios (mínimo) por placa, germinados ou não germinados, com auxílio de microscópio óptico no aumento de 400×. O cálculo do percentual relativo de germinação foi utilizado a seguinte fórmula: Germinação relativa (%) = $(Mt/Mc) \times 100$, sendo que Mt corresponde ao número de conídios germinados em cada placa com meio de cultura suplementado com matrine, e Mc o número médio de conídios germinados nas placas pertencentes ao grupo controle (BRAGA et al., 2001). Foram realizadas três repetições para cada isolado, em dias diferentes, com novos conídios para cada repetição.

5.5.2 Crescimento radial de fungos cultivados em meio suplementado com alcaloide vegetal matrine

Alíquotas de 2,5 µl de cada suspensão conidial dos isolados listados na tabela 1 ajustadas para 1×10^7 conídios/ mL foram pipetadas no centro de placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio BDAL e cloranfenicol (Officinal[®], Goiânia, Goiás, Brasil) com adição ou não de matrine para avaliação do crescimento radial das colônias. As placas foram incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, monitorada diariamente com auxílio de data logger HOBO H8[®] (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) durante todo o

experimento. O diâmetro das colônias foi medido com auxílio de um paquímetro analógico a cada 24 horas, durante 15 dias. Ao completar o 15º dia de avaliação do crescimento radial, os conídios de cada colônia foram raspados, suspensos em solução aquosa de Tween 80 0,01% e quantificados em hemacitômetro para avaliação da produção de conídios.

Logo após, 20 µl de cada suspensão foi inoculado em placas de Petri (60 × 15 mm) contendo meio BDAL acrescido de cloranfenicol (Officinal®, Goiânia, Goiás, Brasil) e benomil (Du Pont®, Delaware, USA), para avaliação da germinação, com 24 e 48 h de incubação. O experimento foi repetido três vezes, em dias diferentes, com novos conídios para cada repetição.

5.5.3 Ação conjunta de fungos entomopatogênicos associados a alcaloide vegetal

Quatro tratamentos foram realizados com propósito de verificar a eficácia da associação fungo e alcaloide: somente conídios, conídios e alcaloide, somente alcaloide, e grupo controle (sem conídios e sem matrine).

No grupo tratado com fungo apenas, todos os isolados da Tabela 1 foram utilizados. Alíquotas de 1 mL das suspensões 1×10^7 conídios/mL foram pipetadas em papel filtro estéril acondicionado ao fundo de frascos plásticos de 250 mL (Termopot®, Goiânia, Goiás, Brasil). Em seguida, 10 larvas de *M. domestica* foram transferidas para cada frasco, em triplicata por isolado. Nos testes utilizando conídios com adição de matrine, somente os isolados IP 119 (*Metarhizium anisopliae* s.s), CG 307 (*Beauveria bassiana*) e CG 1285 (*Isaria javanica*) foram utilizados, selecionados mediante resultados anteriores, com adição das concentrações (1; 5; 10 e 20 mg/mL). Alíquotas de 1mL da suspensão 1×10^7 conídios/mL e 1 mL de cada concentração foram pipetadas em papel filtro estéril acondicionados ao fundo de frascos plásticos de 250 mL (Termopot®, Goiânia, Goiás, Brasil). Em seguida, 10 larvas de *M. domestica* foram transferidas para cada frasco, em triplicata para cada isolado. Nos testes utilizando apenas o produto, as mesmas concentrações foram utilizadas, adicionando 1 mL da diluição em papel filtro estéril acondicionado ao fundo de frascos plásticos tampados de 250 mL (Termopot®, Goiânia, Goiás, Brasil). Em seguida, 10 larvas de *M. domestica* foram transferidas para cada frasco, em triplicata para cada isolado. O grupo controle foi tratado apenas com água destilada, seguindo a mesma metodologia. O experimento foi repetido três vezes, para cada tratamento, com novos conídios produzidos para cada repetição.

A eficácia do tratamento larval foi calculada como reportado anteriormente.

5.6 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através da análise de variância ANOVA (um fator), seguido de teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls (SNK), para avaliar diferença significativa entre as médias dos tratamentos, ambos realizados com utilização do software R versão 3.3.2. Para todos os experimentos realizados, o valor do teste de Shapiro-Wilk foi observado com $P \geq 0,05$ demonstrando normalidades dos dados, e valores de $P \leq 0,05$ demonstrando diferença estatística entre os tratamentos.

6 RESULTADOS

6.1 Triagem da virulência de fungos entomopatogênicos para larvas de *M. domestica*

A mortalidade de larvas tratadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. variou entre 3,3% (IP 363) e 22,35% (IP 146), não sendo constatado diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{(5,10)} = 1,9514$; $P > 0,05$). Entretanto, para mortalidade das pupas recuperadas, todos os tratamentos diferiram significativamente do grupo controle ($F_{(5,10)} = 12,3359$; $P < 0,05$). Em relação a eficácia do tratamento larval (ETL) dos grupos tratados com isolados de *Metarhizium* spp. variou entre 77,44% (IP 119) e 87,35% (IP 146) e não houve diferença significativa entre os tratamentos, somente quando comparados ao grupo controle ($F_{(5,10)} = 18,3326$; $P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes isolados de *Metarhizium* spp., e das pupas recuperadas, em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$), com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.

Tratamento indireto	Concentração (Conídios/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Controle	-	$2,22 \pm 1,11^a$	$12,96 \pm 4,21^a$	$14,95 \pm 1,45^a$
IP 46	10^8	$11,67 \pm 2,89^a$	$84,32 \pm 8,75^b$	$85,79 \pm 8,31^b$
IP 119	10^8	$15,80 \pm 7,66^a$	$74,51 \pm 9,29^b$	$77,44 \pm 9,95^b$
IP 125	10^8	$12,72 \pm 9,38^a$	$86,17 \pm 15,4^b$	$86,63 \pm 13,36^b$
IP 146	10^8	$22,35 \pm 14,15^a$	$81,13 \pm 7,24^b$	$87,35 \pm 2^b$
IP 363	10^8	$3,3 \pm 1,92^a$	$83,95 \pm 12,86^b$	$84,41 \pm 12,40^b$

(%ETL) = $\text{ML} + [(1 - \text{ML}) \times \text{MPR}]$

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

No experimento com *Beauveria bassiana*, os valores da mortalidade larval variaram entre 4% (CG 138) e 10% (ARSEF 9588), entretanto não houve diferença significativa entre as médias ($F_{(4,8)} = 0,8936$; $P > 0,05$), para a mortalidade de pupas recuperadas as médias variaram entre 33,12% (ARSEF 9588) e 62,36% (IP 361), dois isolados CG 307 e IP 361 apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($F_{(4,8)} = 4,1703$; $P < 0,05$). Para os valores da ETL, os mesmos isolados citados anteriormente apresentaram diferença significativa somente quando comparados ao grupo controle ($F_{(4,8)} = 6,4578$; $P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes isolados de *Beauveria bassiana*, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$), com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.

Tratamento indireto	Concentração (Conídios/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Controle	-	$11 \pm 4,01^a$	$12,08 \pm 2,67^a$	$19,12 \pm 1,28^a$
CG 138	10^8	4 ± 2^a	$45,68 \pm 12,35^{ab}$	$47,82 \pm 12,33^{ab}$
CG 307	10^8	8 ± 4^a	$61,16 \pm 3,36^b$	$65,21 \pm 2,29^b$
IP 361	10^8	$9 \pm 6,19^a$	$62,36 \pm 17,36^b$	$70,60 \pm 14,63^b$
ARSEF 9588	10^8	$10 \pm 6,41^a$	$33,12 \pm 1,26^{ab}$	$39,37 \pm 4,90^{ab}$

(%ETL) = $\text{ML} + [(1 - \text{ML}) \times \text{MPR}]$

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

Nos grupos tratados com *Isaria javanica*, com relação a mortalidade larval, não houve diferença significativa entre os grupos ($F_{(5,10)} = 3,6002$; $P > 0,05$) e os valores observados não ultrapassaram 3%. Já para o percentual de pupas recuperadas, apenas os isolados CG 1283 e 1315 apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($F_{(5,10)} = 4,2407$; $P < 0,05$). Com relação a ETL, os mesmos isolados citados anteriormente apresentaram diferença significativa somente quando comparados ao grupo controle ($F_{(4,8)} = 4,3245$; $P < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes isolados de *Isaria javanica*., e das pupas recuperadas, em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$), com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.

Tratamento indireto	Concentração (Conídios/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Controle	-	$2,5 \pm 2,5^a$	0 ± 0^a	$2,5 \pm 2,5^a$
CG 1285	10^8	$2,5 \pm 2,5^a$	$52,36 \pm 19,91^b$	$53,28 \pm 20,18^b$
CG 1283	10^8	$2,22 \pm 1,11^a$	$33,09 \pm 3,21^{ab}$	$34,58 \pm 3,16^{ab}$
CG 1315	10^8	$2,96 \pm 1,61^a$	$46,17 \pm 8,45^b$	$47,93 \pm 7,58^b$
CG 1316	10^8	0 ± 0^a	$26,75 \pm 14,94^{ab}$	$26,75 \pm 14,94^{ab}$
CG 1326	10^8	$1,23 \pm 1,23^a$	$41,11 \pm 8,01^b$	$41,65 \pm 8,53^b$

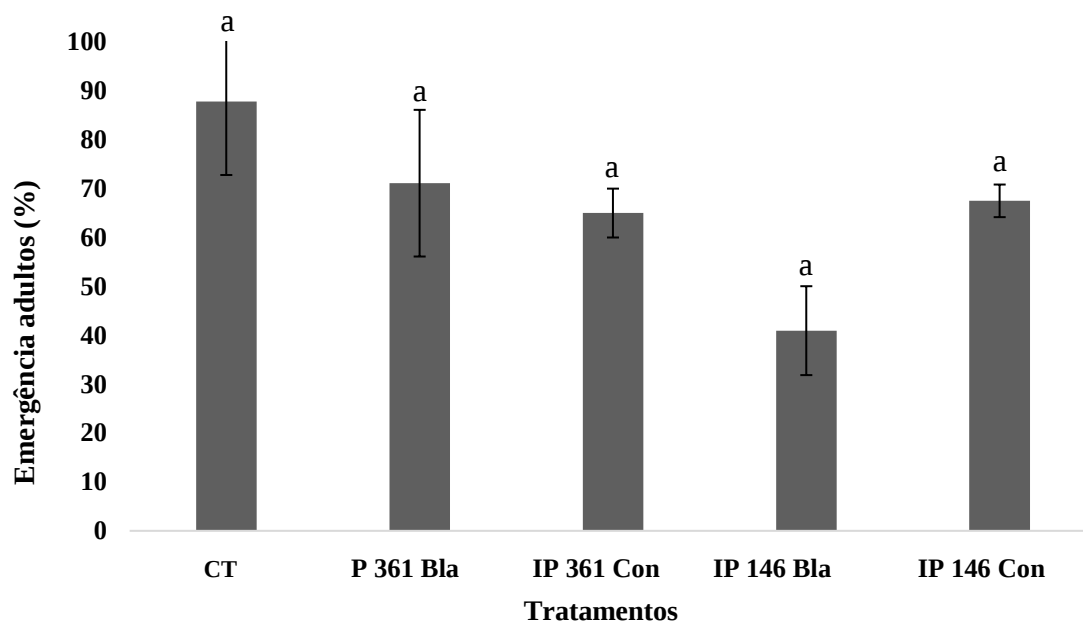
(%ETL) = $\text{ML} + [(1 - \text{ML}) \times \text{MPR}]$

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

6.2 Comparação da virulência de conídios e blastosporos para larvas de *M. domestica*

Quando o fungo foi aplicado sobre o papel, não houve diferença estatística entre conídios ou blastosporos ($F_{(4, 5)} = 1,605$; $P > 0,05$). Porém é possível observar que a utilização de blastosporos de IP 146 resultou em 40,95% de emergência de adultos, sendo que no grupo controle o percentual foi de 87,79% (Figura 7).

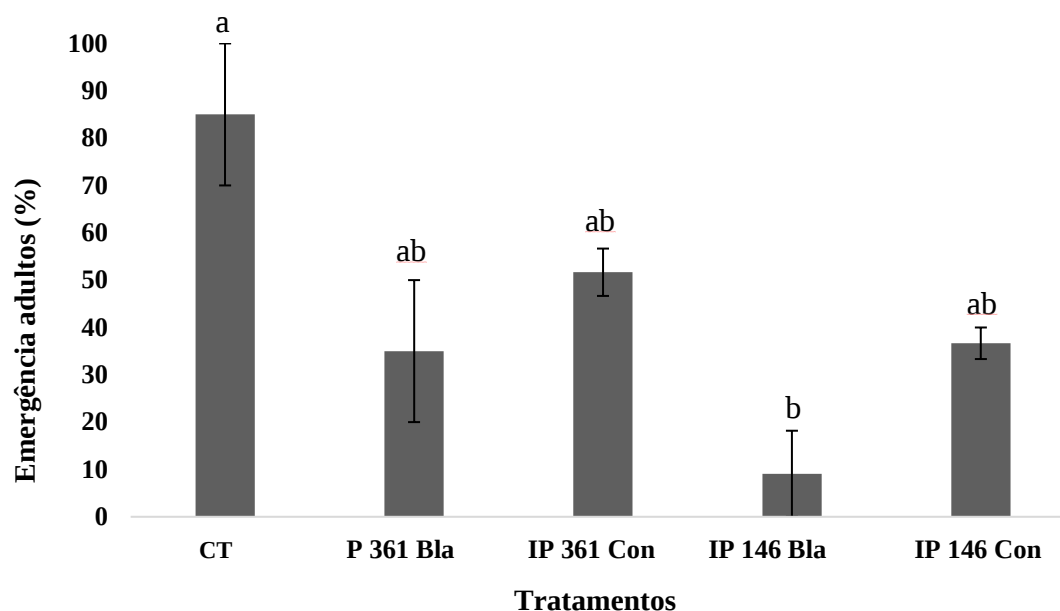
Figura 7. Médias ($\pm$ erro padrão) da emergência de adultos de *Musca domestica* tratadas indiretamente através da exposição à suspensão de conídios ou blastosporos de *Beauveria bassiana* (IP 316) e *Metarhizium robertsii* (IP 146), em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$). Médias seguidas da mesma letra não possuem diferença estatística entre si, pelo teste ANOVA seguido Student-Newman-Keuls ($P > 0,05$).



CT – Controle; Bla – Blastosporos; Con – Conídios.

Para a aplicação do fungo na ração, o tratamento com blastosporos do isolado IP 146, de *M. robertsii*, resultou em 9,09% de emergência de adultos, diferindo dos demais tratamentos e também do controle, cujo valores de emergência variaram entre 35% a 85% (Figura 8).

Figura 8. Médias ($\pm$ erro padrão) da emergência de adultos de *Musca domestica* expostas a ração tratada com suspensão de conídios ou blastosporos de *Beauveria bassiana* (IP 316) e *Metarhizium robertsii* (IP 146), em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$). Médias seguidas da mesma letra não possuem diferença estatística entre si, pelo teste ANOVA seguido Student-Newman-Keuls ($P > 0,05$).



CT – Controle; Bla - Blastosporos; Con – Conídios.

6.3 Avaliação da atividade inseticida do alcaloide matrine para larvas de *M. domestica*

No tratamento indireto os resultados mostram que a partir da concentração de 10 mg/mL do alcaloide a mortalidade larval foi significativamente superior à do grupo controle e das menores concentrações ($F_{(4,8)} = 9,9169$; $P < 0,05$). O mesmo foi observado para mortalidade das pupas recuperadas a partir da concentração de 1 mg/mL ($F_{(4,8)} = 7,6217$; $P < 0,05$) (Tabela 5). Sobre a ETL, concentrações superiores a 10 mg/mL resultaram em 100% de eficácia ($F_{(4,8)} = 14,5454$; $P < 0,05$).

Os resultados do tratamento direto foram semelhantes ao que foi observado no tratamento indireto, sendo verificadas diferenças significativas a partir das concentrações de 10 e 1 mg/mL, para mortalidade de larvas e de pupas recuperadas, respectivamente ($F_{(4,8)} = 10,7058$; $P < 0,05$; $F_{(4,8)} = 9,7561$; $P < 0,05$). Com relação a ETL, foram verificadas diferenças significativas nas concentrações superiores a 1mg/mL ($F_{(4,8)} = 27,3312$; $P < 0,05$), e a partir da concentração de 10 mg/mL, foi observado valores de eficácia superiores a 90%.

Tabela 5. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações do alcaloide matrine, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$) com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.

Tratamento indireto	Concentrações (mg/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Matrine	Controle	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	18,89 $\pm$ 7,78 ^a	16,67 $\pm$ 5,09 ^a
	1	12,22 $\pm$ 7,29 ^a	70,94 $\pm$ 24,5 ^b	50 $\pm$ 26,94 ^b
	5	33,33 $\pm$ 12,62 ^{ac}	67,42 $\pm$ 20,86 ^b	83,33 $\pm$ 9,62 ^b
	10	65,55 $\pm$ 19,66 ^b	100 $\pm$ 0,0 ^b	100 $\pm$ 0,0 ^b
	20	67,78 $\pm$ 17,46 ^{bc}	100 $\pm$ 0,0 ^b	100 $\pm$ 0,0 ^b

(%ETL) = ML + [(1 – ML) x MPR]

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

Tabela 6. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas diretamente com diferentes concentrações do alcaloide matrine, e das pupas recuperadas, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$) com os respectivos percentuais de eficácia do tratamento larval.

Tratamento direto	Concentrações (mg/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Matrine	Controle	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	16,67 $\pm$ 1,92 ^a	16,67 $\pm$ 1,92 ^a
	1	12,22 $\pm$ 7,29 ^a	61,18 $\pm$ 13,69 ^b	64,21 $\pm$ 13,69 ^b
	5	18,88 $\pm$ 10,59 ^a	60,75 $\pm$ 16,19 ^b	76,67 $\pm$ 5,09 ^{bc}
	10	45,45 $\pm$ 6,76 ^b	89,17 $\pm$ 5,83 ^b	94,28 $\pm$ 4,53 ^c
	20	63,33 $\pm$ 18,35 ^b	93,73 $\pm$ 1,85 ^b	98,49 $\pm$ 1,24 ^c

(%ETL) = ML + [(1 – ML) x MPR]

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

6.4 Germinação relativa de fungos produzidos em meio suplementado com alcaloide vegetal

A germinação de conídios dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. cultivados em meio de cultura suplementado ou não com alcaloide matrine demonstrou que, independentemente do tempo de incubação, 24 ou 48 horas, não houve grande variação de viabilidade, com percentuais entre 90% (IP 363) e 100% (IP 46) com 24 horas

e 94,6% (IP 46) e 100% (IP 363) com 48 horas de incubação (Figura 9). Para os isolados de *Beauveria bassiana* também não houve grande variação de viabilidade, com percentuais variando de 97,4% (CG 138) e 100 % (CG 307) com 24 horas e 90,5% (IP 361) e 96,7% (CG 138) (Figura 10). Quando utilizado isolados de *Isaria javanica* foram encontradas germinações superiores a 98% em ambos tempos de incubação (Figura 11).

Figura 9. Perfil da germinação relativa de conídios de diferentes isolados de *Metarhizium* spp., cultivados em meio de cultura ideal suplementado com presença ou ausência de alcaloide matrine e incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 24 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem contato com alcaloide). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições

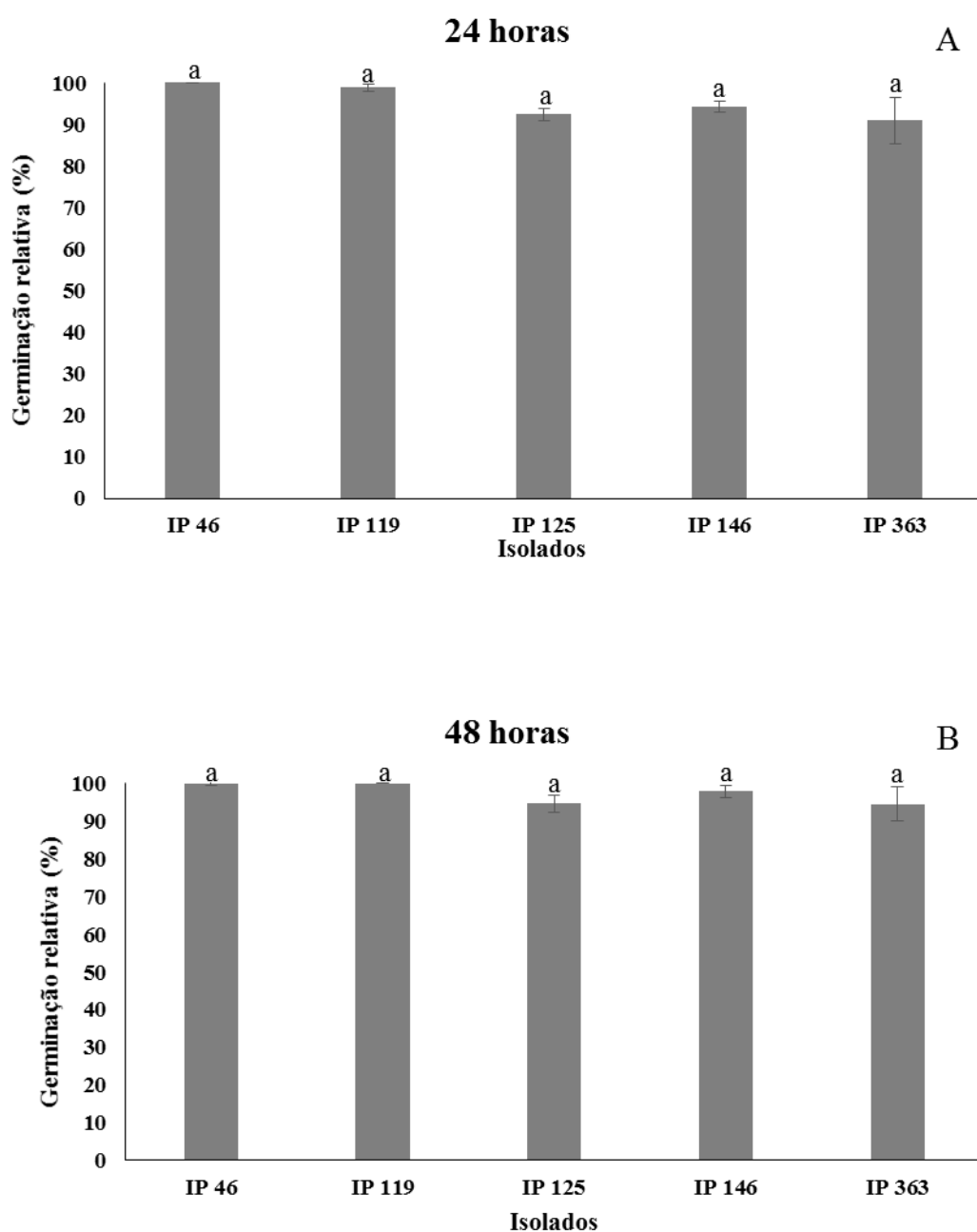


Figura 10. Perfil da germinação relativa de conídios de diferentes isolados de *Beauveria bassiana*, cultivados em meio de cultura ideal suplementado com presença ou ausência de alcaloide matrine e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ por 24 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem contato com alcaloide). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições

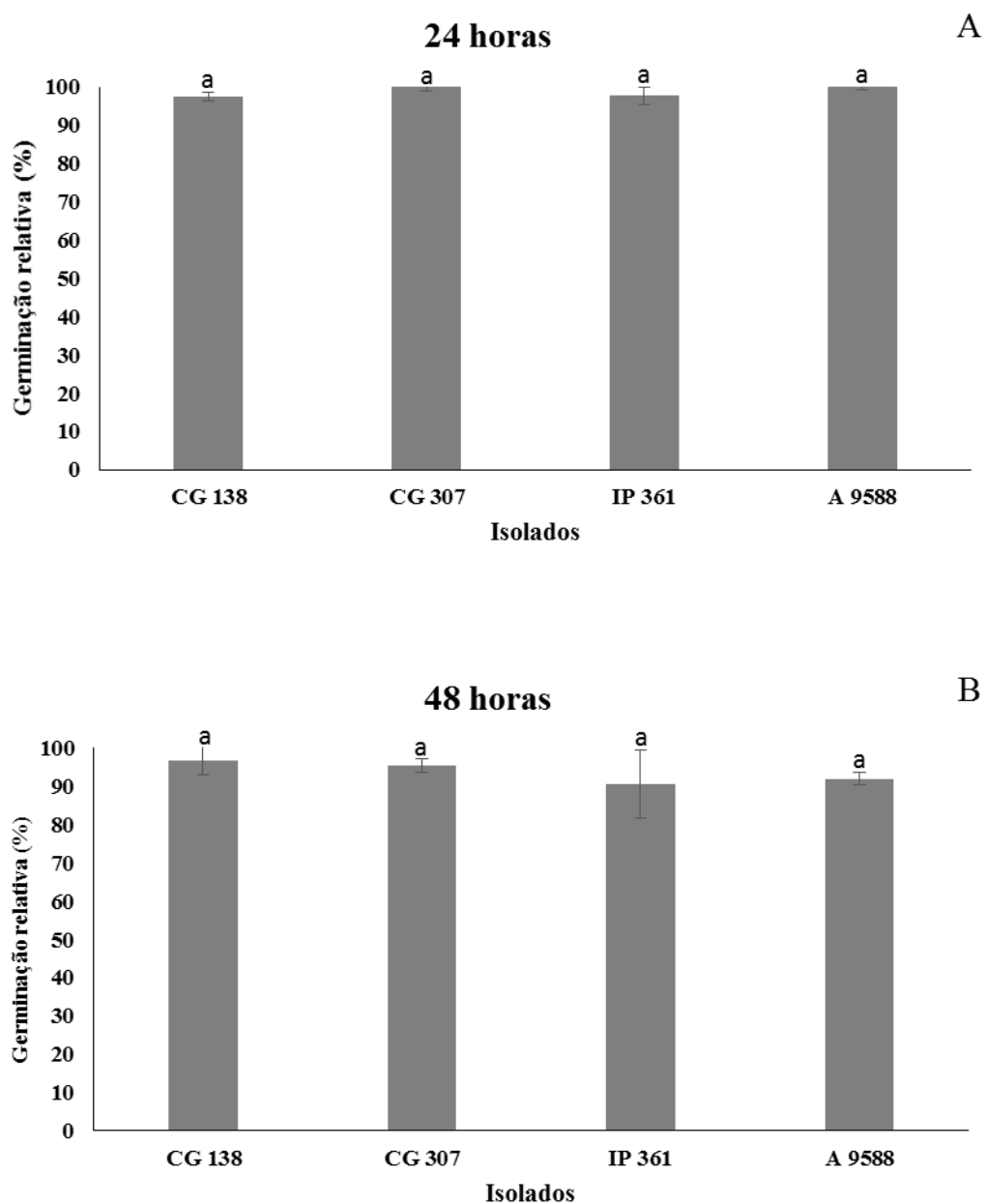
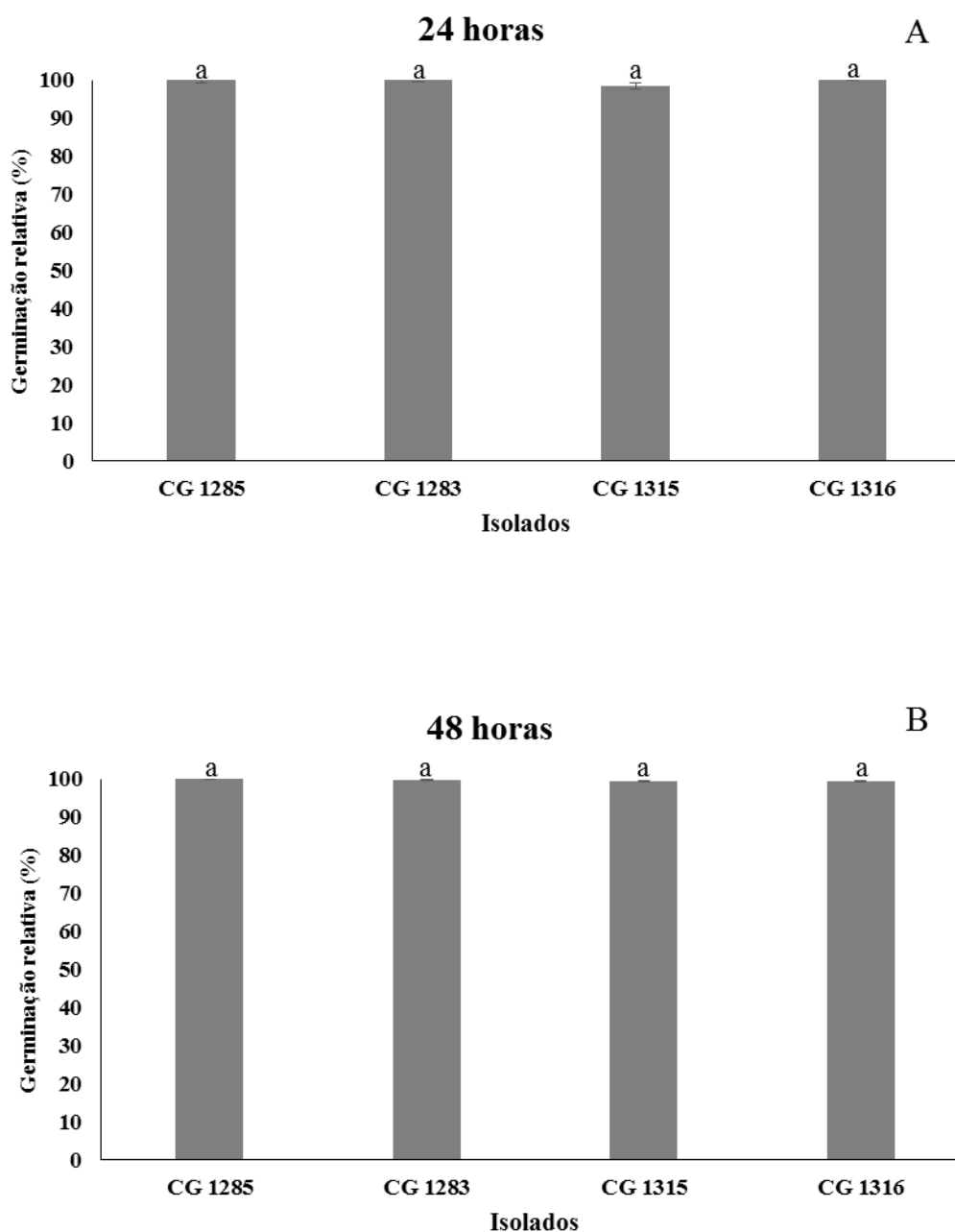


Figura 11. Perfil da germinação relativa de conídios de diferentes isolados de *Isaria javanica*, cultivados em meio de cultura ideal suplementado com presença ou ausência de alcaloide matrine e incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 24 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem contato com alcaloide). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições



6.5 Crescimento radial de fungos produzidos em meio suplementado com alcaloide vegetal

O diâmetro das colônias dos isolados de *Metarhizium* spp. cultivados em meio BDAL suplementado com matrine foi significativamente menor quando comparado com àqueles cultivados em meio BDAL sem matrine (Figura 12). Observou-se que as colônias suplementadas com matrine foram em média 30 mm menores do que as cultivadas em meio BDAL sem matrine, sendo o isolado IP 46 o que apresentou a maior diferença média de diâmetro (31,74 mm) entre os diferentes tratamentos. Esse isolado também apresentou colônias com o maior diâmetro em meio BDAL ($73 \pm 4,2$ mm), enquanto o isolado IP 125 ($54,67 \pm 3,4$ mm) apresentou colônias com o menor diâmetro. Em meio BDAL suplementado com matrine, o maior diâmetro das colônias foi apresentado por IP 46 ($33,67 \pm 1,9$ mm), sendo o menor diâmetro apresentado por IP 119 ($28 \pm 1,6$ mm).

Entre os isolados de *B. bassiana* apenas os isolados CG 307, IP 361 e ARSEF 9588 apresentaram colônias de tamanho reduzido quando expostos ao matrine (Figura 13). As colônias cultivadas em meio BDAL suplementadas com matrine foram em média 5 mm menores do que àquelas cultivadas em meio BDAL sem matrine. Para os isolados cultivados em meio BDAL sem matrine as colônias com maior diâmetro foram as do isolado IP 361 ($57,2 \pm 5$ mm), enquanto as colônias com menor diâmetro foram as do isolado CG 138 ($30,8 \pm 1$ mm). Em meio BDAL suplementado com matrine, o maior diâmetro de colônias foi do isolado ARSEF 9588 ($61,4 \pm 3$ mm), enquanto o menor diâmetro foi apresentado por CG 307 ($32,8 \pm 3$ mm).

Os isolados de *I. javanica* apresentaram diferença estatística apenas no primeiro dia de avaliação para três isolados estudados, CG 1285, CG 1283 e CG 1316 (Figura 14). No décimo quinto dia de crescimento, o maior diâmetro em meio BDAL foi apresentado por CG 1316 ($45,67 \pm 1,69$ mm), sendo o menor diâmetro apresentado por CG 1315 ($40,5 \pm 1,6$ mm). Quando os isolados foram cultivados em meio BDAL suplementado com matrine, o maior diâmetro das colônias foi apresentado por CG 1316 ($51,83 \pm 2,20$ mm), sendo o menor diâmetro apresentado por CG 1285 ($39,33 \pm 2,5$ mm). Entretanto, para nenhum dos isolados houve interferência do matrine no tamanho das colônias.

Figura 12. Média diária ($\pm$ erro padrão) do diâmetro (mm) de colônias de *Metarhizium* spp. cultivados em meio BDAL suplementado ou não com alcaloide vegetal matrine (2%), incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 15 dias. Médias do diâmetro das colônias crescidas em meio BDAL seguidas com asterisco (*) diferem significativamente da média das colônias crescidas em meio BDAL acrescido de matrine (2%) no mesmo dia.

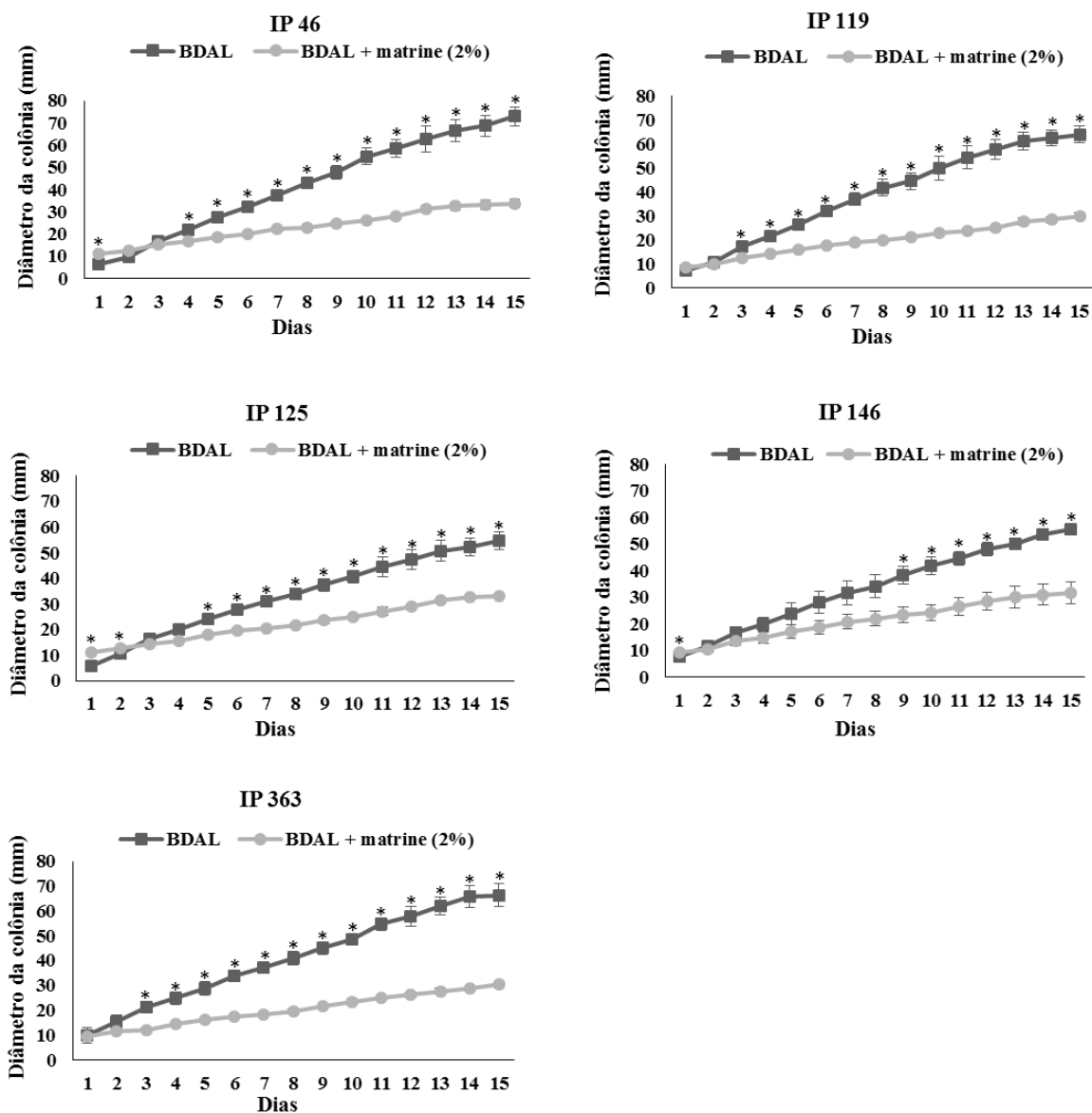


Figura 13. Média diária ($\pm$ erro padrão) do diâmetro (mm) de colônias de *Beauveria bassiana*, cultivados em meio BDAL suplementado ou não com alcaloide vegetal matrine (2%), incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 15 dias. Médias do diâmetro das colônias crescidas em meio BDAL seguidas com asterisco (*) diferem significativamente da média das colônias crescidas em meio BDAL acrescido de matrine (2%) no mesmo dia.

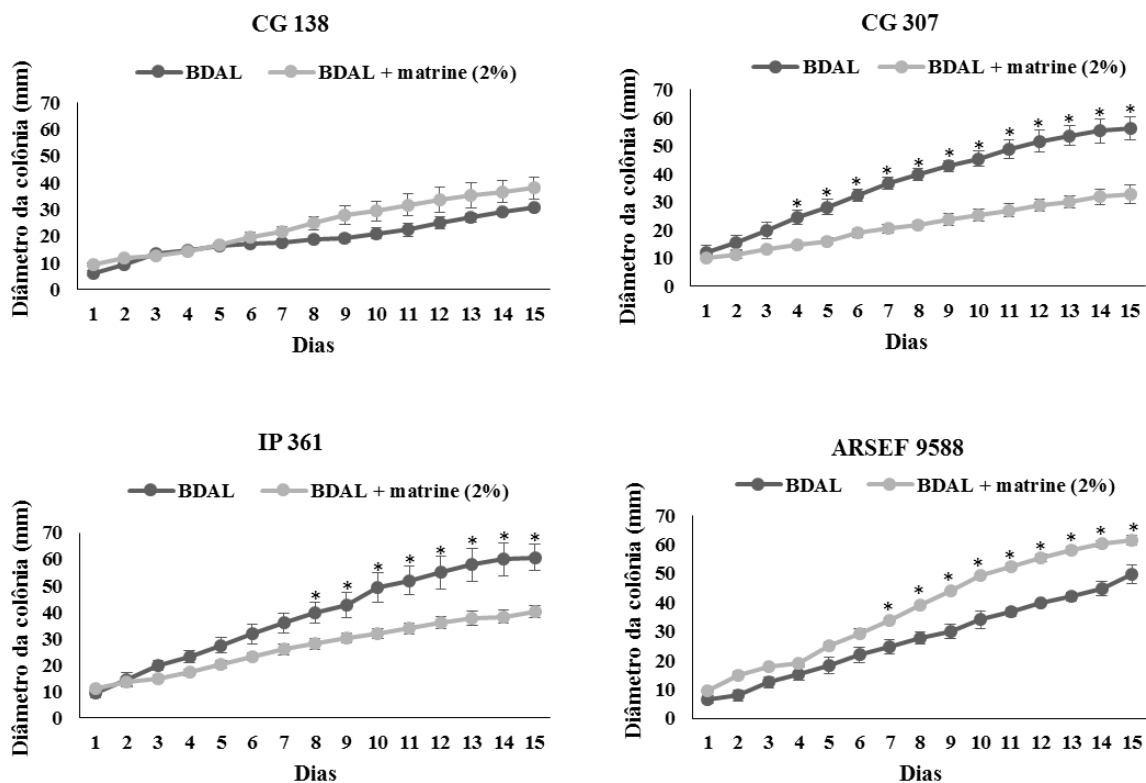
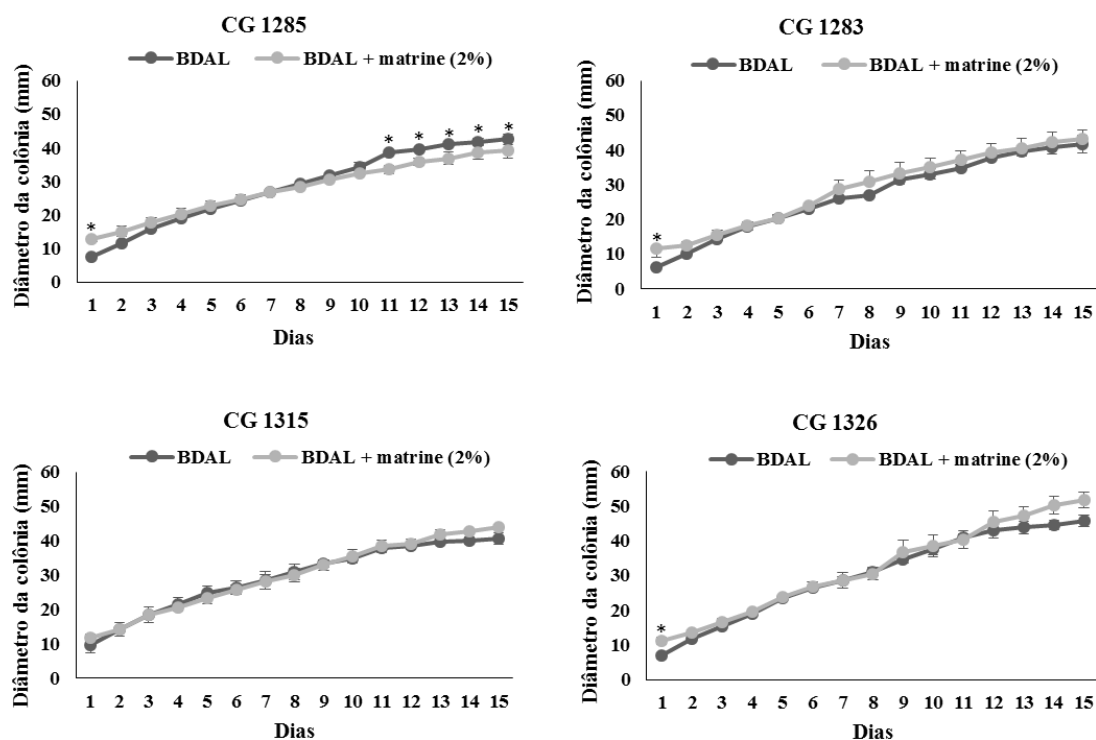


Figura 14. Média diária ($\pm$ erro padrão) do diâmetro (mm) de colônias de *Isaria javanica* cultivados em meio BDAL suplementado ou não com alcaloide vegetal matrine (2%), incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 15 dias. Médias do diâmetro das colônias crescidas em meio BDAL seguidas com asterisco (*) diferem significativamente da média das colônias crescidas em meio BDAL acrescido de matrine (2%) no mesmo dia.



6.6 Ação conjunta de fungos entomopatogênicos associados a alcaloide vegetal

No experimento com o isolado de *M. anisopliae* s.s. (IP 119), foi verificado ETL de 93,65%, e 71,77,24%, no grupo tratado com a maior concentração de matrine (1%) e no grupo tratado apenas com conídios (10^7), respectivamente. Entretanto, quando o tratamento foi realizado utilizando a associação do alcaloide e conídios, ambos com as mesmas concentrações, a ETL foi de 97,14%. Para a menor concentração utilizando somente matrine a ETL foi de 36,56%, quando associada ao fungo a ETL foi de 41,33%. Nos grupos tratados somente com alcaloide, com concentrações inferiores a 10 mg/mL não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Para a associação fungo e alcaloide, apenas o grupo utilizando a menor concentração de alcaloide (0,01% + IP 119) e o grupo controle apresentaram diferença significativa quando comparado aos outros tratamentos da associação ($F_{(11, 22)} = 6,5263$; $P < 0,05$) (Tabela 7).

Para os testes utilizando o isolado de *B. bassiana* (CG 307) a ETL da maior concentração de matrine foi de 93,65%, enquanto no tratamento utilizando apenas conídios, a ETL foi de 19,13%. Com a associação desses dois tratamentos, a ETL obtida foi de 91,48%. Quando comparada a menor concentração de matrine, que apresentou ETL de 36,56%, com a associação do alcaloide com fungo na mesma concentração, a ETL foi de 32,84%. A eficácia dos grupos tratados com alcaloide ou associação de conídios e alcaloide, nas concentrações superiores a 0,1 mg/mL, apresentaram diferença significativa quando comparados ao tratamento utilizando apenas conídios e grupo controle ($F_{(11, 22)} = 13,8115$; $P < 0,05$) (Tabela 8).

Para os testes com *I. javanica* (CG 1285), a maior concentração de matrine (10 mg/mL) apresentou eficácia do tratamento larval de 93,65% e o tratamento utilizando apenas conídios 49,60%. Em relação a associação conídios com alcaloide na maior concentração, a eficácia foi de 98,77%. Diferença significativa foi encontrada em todos os tratamentos (somente alcaloide, somente fungo e associação fungo com alcaloide) quando comparados ao grupo controle ($F_{(11, 22)} = 12,2725$; $P < 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 7. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas, das pupas recuperadas e eficácia do tratamento larval (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações de alcaloide vegetal matrine (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL), ou conídios (1×10^7 conídios/mL) de IP 119 (*Metarhizium anisopliae* s.s), ou associação de conídios com matrine, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq$ 80%).

Tratamento indireto	Concentração (mg/mL ou conídios/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Controle	-	$2,35 \pm 1,18^c$	$15,07 \pm 3,95^a$	$14,36 \pm 7,33^c$
1%	10	$88,47 \pm 2,67^a$	44 ± 11^{ab}	$93,65 \pm 2,12^a$
0,5%	5	$64,57 \pm 9,79^{ab}$	$72,22 \pm 20,03^{ab}$	$93,48 \pm 4,27^a$
0,1%	1	$50,28 \pm 9^{ac}$	$53,74 \pm 25,54^{ab}$	$79,76 \pm 8,90^{ab}$
0,05%	0,5	$29,13 \pm 0,96^{bc}$	$52,01 \pm 15,42^{ab}$	$76,88 \pm 11,39^a$
0,01%	0,1	$11,90 \pm 6,16^c$	$27,99 \pm 1,60^{ab}$	$36,56 \pm 4,76^{ab}$
IP 119	10^7	$15,93 \pm 10,85^{bc}$	$62,28 \pm 17,32^{ab}$	$71,77 \pm 9^{ab}$
1% + IP 119	$10 + 10^7$	$82,38 \pm 11^a$	$69,44 \pm 12,11^{ab}$	$97,14 \pm 0,28^a$
0,5% + IP 119	$5 + 10^7$	$52,62 \pm 21,9^{ac}$	$93,52 \pm 3,34^b$	$95,94 \pm 2,59^a$
0,1% + IP 119	$1 + 10^7$	$63,69 \pm 11,83^{ab}$	$42,93 \pm 17,94^{ab}$	$83,04 \pm 5,25^{ab}$
0,05% + IP 119	$0,5 + 10^7$	$35,63 \pm 16^{bc}$	$38,09 \pm 13,40^{ab}$	$65,86 \pm 15,91^{ab}$
0,01% + IP 119	$0,1 + 10^7$	$26,30 \pm 15,07^{bc}$	$40,65 \pm 18,3^{ab}$	$41,33 \pm 21,58^{bc}$

(%ETL) = ML + [(1 - ML) x MPR]

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

Tabela 8. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas, das pupas recuperadas e eficácia do tratamento larval (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações de alcaloide vegetal matrine (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL), ou conídios (1×10^7 conídios/mL) de CG 307 (*Beauveria bassiana*), ou associação de conídios com matrine, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq$ 80%).

Tratamento indireto	Concentração (mg/mL ou conídios/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Controle	-	$2,35 \pm 1,12^e$	$15,07 \pm 3,95^a$	$14,36 \pm 7,33^a$
1%	10	$86,25 \pm 1,13^a$	44 ± 11^a	$93,65 \pm 2,12^b$
0,5%	5	$64,57 \pm 9,79^{ac}$	$72,22 \pm 20,03^a$	$93,48 \pm 4,27^b$
0,1%	1	$50,28 \pm 9^{acd}$	$53,74 \pm 25,54^a$	$79,76 \pm 8,90^b$
0,05%	0,5	$29,13 \pm 0,96^{ce}$	$52,01 \pm 15,42^a$	$76,88 \pm 11,39^b$
0,01%	0,1	$11,90 \pm 6,16^{de}$	$27,99 \pm 1,60^a$	$36,56 \pm 4,76^a$
CG 307	10^7	$5,20 \pm 1,22^e$	$14,66 \pm 7,89^a$	$19,63 \pm 7,41^a$
1% + CG 307	$10 + 10^7$	$72,65 \pm 12,95^{ab}$	$66,67 \pm 9,62^a$	$91,48 \pm 4,34^b$
0,5% + CG 307	$5 + 10^7$	$42,33 \pm 7,91^{ac}$	$65,43 \pm 19,28^a$	$90,99 \pm 9^b$
0,1% + CG 307	$1 + 10^7$	$36,23 \pm 8,39^{bce}$	$56,85 \pm 7,29^a$	$71,70 \pm 8^b$
0,05% + CG 307	$0,5 + 10^7$	$40,95 \pm 10,12^{bce}$	$61,11 \pm 13,86^a$	$67,92 \pm 3,76^b$
0,01% + CG 307	$0,1 + 10^7$	$31,11 \pm 14,89^{ce}$	$51,79 \pm 17,86^a$	$32,84 \pm 17,65^a$

(%ETL) = $ML + [(1 - ML) \times MPR]$

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

Tabela 9. Média ($\pm$ erro padrão) de mortalidade de larvas, das pupas recuperadas e eficácia do tratamento larval (terceiro ínstar) de *Musca domestica* tratadas indiretamente com diferentes concentrações de alcaloide vegetal (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL), isolado fúngico CG 1285 (*Isaria javanica*) previamente selecionado, e associação de conídios com produto, em condições de laboratório (27 ± 1 °C e UR $\geq$ 80%).

Tratamento indireto	Concentração (mg/mL ou conídios/mL)	Mortalidade larval (ML%)	Mortalidade das pupas recuperadas (MPR%)	Eficácia do tratamento larval (ETL%)
Controle	-	$2,35 \pm 1,12^e$	$15,07 \pm 3,95^a$	$14,36 \pm 7,33^d$
1%	10	$86,25 \pm 1,13^a$	$72,22 \pm 20,03^a$	$93,65 \pm 2,12^a$
0,5%	5	$64,57 \pm 9,79^{ac}$	$53,74 \pm 25,54^a$	$93,48 \pm 4,27^a$
0,1%	1	$50,28 \pm 9^{bcd}$	$52,01 \pm 15,42^a$	$79,76 \pm 8,90^{ab}$
0,05%	0,5	$29,13 \pm 0,96^{de}$	$27,99 \pm 1,60^a$	$76,88 \pm 11,39^{ac}$
0,01%	0,1	$11,90 \pm 6,16^e$	$46,23 \pm 8,76^a$	$36,56 \pm 4,76^c$
CG 1285	10^7	$5,20 \pm 3,40^e$	$77,78 \pm 22,22^a$	$49,60 \pm 6,49^{bc}$
1% + CG 1285	$10 + 10^7$	$71,79 \pm 12,46^{ab}$	$61,48 \pm 15,47^a$	$98,77 \pm 1,23^a$
0,5% + CG 1285	$5 + 10^7$	$76,78 \pm 8^a$	$41,51 \pm 1,11^a$	$92,77 \pm 2,82^a$
0,1% + CG 1285	$1 + 10^7$	$44,44 \pm 12,45^{cd}$	$63,12 \pm 15,21^a$	$67,49 \pm 7,2^{ac}$
0,05% + CG 1285	$0,5 + 10^7$	$16,51 \pm 7,06^e$	$43,55 \pm 11,91^a$	$67,67 \pm 15,69^{ac}$
0,01% + CG 1285	$0,1 + 10^7$	$12,22 \pm 9,58^e$	$15,07 \pm 3,95^a$	$48,27 \pm 15,12^{bc}$

(%ETL) = $ML + [(1 - ML) \times MPR]$

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que conídios de *Metarhizium* spp. quando cultivados em meio BDAL causaram mortalidade expressiva em larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*, sugerindo que os isolados investigados são promissores agentes para controle de larvas deste díptero; em contrapartida, *B. bassiana* e *I. javanica*, não causaram o mesmo efeito. Na literatura é reportada grande variabilidade em virulência de fungos entomopatogênicos para diversos artrópodes. Neste sentido, Farooq e Freed, (2016) investigaram a ação inseticida de conídios de *M. anisopliae* cultivados em meio BDAL em larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*, obtendo alta mortalidade, 15 dias após tratamento. Barson et al. (1994) comprovaram elevada virulência de conídios de *M. anisopliae* cultivados em meio SDAL (Sabouraud, Dextrose e Ágar acrescido de extrato de levedura) para larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*. Fernandes et al. (2013) também obtiveram resultados semelhantes, reportando a virulência de conídios de *M. anisopliae* s.s. cultivados em meio MM (Meio Mínimo de Cultivo) para larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*.

No presente estudo, quando conídios de *M. robertsii* IP 146 foram produzidos em meio Ádamek sólido, não foi verificada sua patogenicidade para larvas de *M. domestica*, como havia sido detectada quando conídios foram produzidos em meio BDAL. Acredita-se que este efeito tenha sido induzido pela variação de nutrientes oferecidos ao fungo durante seu crescimento nos diferentes meios de cultivo. No entanto, conídios do isolado IP 361 de *B. bassiana* que não apresentou alta virulência para larvas de *M. domestica* quando produzido em meio BDAL, mantiveram-se pouco virulentos quando produzidos em meio Ádamek. Diversos trabalhos relatam que a composição nutricional do meio de cultura pode ter efeito fundamental na virulência, assim como na viabilidade e produção de propágulos (KLEESPIES; ZIMMERMANN, 1994; JACKSON et al., 1997; ISSALY et al., 2005; MASCARIN; JACKSON, M. A.; et al., 2015). Rangel et al. (2008) após avaliar a virulência de conídios de *M. anisopliae* cultivados sob diferentes condições de estresse, concluíram que conídios derivados de meios pobres em nutrientes apresentaram aumento considerável de virulência. O mesmo efeito foi observado por Ibrahim et al. (2002) e Shah et al. (2005). Apesar da variação de virulência do isolado IP 146 produzidos em meio BDAL e Ádamek, estudos posteriores devem confirmar se a referida variação pode ser atribuída à variação de nutrientes presente em cada meio de cultivo, como sugerido pelo resultado dos ensaios conduzidos neste estudo.

Baixa virulência de isolados de *B. bassiana* e *I. javanica* para larvas de *M. domestica* foi encontrada nos testes realizados, corroborando com os resultados apresentados por Fernandes et al. (2013), onde baixa mortalidade foi relatada em larvas de terceiro ínstar tratadas com *Beauveria brogniartii*, *B. bassiana* ou *Isaria* sp. Outros ínstares larvais parecem apresentar a mesma tolerância à infecção causada por alguns isolados de *Beauveria*; em estudo com larvas de segundo ínstar, Watson et al. (1994) relataram o baixo controle das larvas mesmo quando expostas a alta concentração conidial, contudo, também existem estudos relatando a eficácia de *B. bassiana* sobre larvas de *M. domestica* (MISHRA; MALIK, 2012; FAROOQ; FREED, 2016). A grande variabilidade genética existente entre isolados de *B. bassiana* s.l., que consequentemente pode resultar em grandes variação em virulência, pode ser um dos fatores responsáveis pelas diferenças de eficácia nos estudos mencionados nesse parágrafo. O fato desses estudos terem sido realizados com diferentes populações de mosca, também pode ter influenciado a discrepância de resultados encontrados. Essa teoria pode ser fundamentada em estudos conduzidos com carrapatos, onde foi evidenciado que diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* possuem graus variados de susceptibilidade a infecção por um mesmo isolado fúngico (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2012; WEBSTER et al., 2016).

Até onde sabemos, estudos referentes à utilização de blastosporos para controle de dípteros, e em especial *M. domestica*, não são relatados na literatura. Em relação ao tratamento indireto utilizando papel, não foi observada diferença significativa quanto a mortalidade das larvas tratadas com conídios ou blastosporos de *M. robertsii* e *B. bassiana*; no entanto, com o tratamento na ração, blastosporos de *M. robertsii* foram eficazes, revelando expressiva eficácia contra as larvas. Diferenças na virulência entre conídios e blastosporos para diversos artrópodes foram reportadas na literatura. Hartelt et al. (2007) testaram suspensões de conídios e blastosporos de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) em larvas de *Ixodes ricinus*, obtendo menores valores de TL₅₀ nos grupos tratados com blastosporos de *M. anisopliae*. Outro estudo que corrobora com os achados do presente trabalho foi desenvolvido por Wassermann et al. (2016), que demonstrou comprovada eficácia de blastosporos de *M. anisopliae* para o controle de larvas e ninfas ingurgitadas de *I. ricinus* em condições laboratoriais e em semi-campo. Alves et al. (2002) demonstraram a virulência de conídios e blastosporos de *B. bassiana* para *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e

Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae), concluindo que blastosporos foram mais virulentos para esses insetos.

Apesar de não serem encontrados relatos na literatura de estudos utilizando alcaloide matrine para controle de *M. domestica*, alguns estudos relatam sua eficácia para controle de diversos outros artrópodes. Zanardi et al. (2016) comprovaram a atividade inseticida de matrine para *Diaphorina citri* (Hemiptera), *Panonychus citri* (Trombidiformes), *Sitophilus zeamais* (Coleoptera) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), quatro espécies de importância agrícola. Mao e Henderson, (2007) verificaram toxicidade de matrine em *Coptotermes formosanus* (Isoptera). Além de sua ação acaricida e inseticida, este alcaloide também vem sendo reportado como eficaz no controle de nematoides fitopatogênicos. Matsuda et al. (1991) também avaliaram e comprovaram sua toxicidade para *Bursaphelenchus xylophilus* (Tylenchida), que é responsável pela doença denominada de murchidão do pinheiro. Matrine, no presente estudo, mesmo quando aplicado em baixas concentrações foi eficaz no controle de larvas de *M. domestica*. Aliando sua eficácia à presença de *Sophora flavescens* em escala mundial, sua utilização em um programa de Manejo Integrado de Pragas torna-se extremamente viável.

A associação de produtos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode melhorar a eficácia do controle biológico de artrópodes-pragas e, além disso, reduzir custos e impactos ambientais quando comparado ao uso exclusivo de inseticidas químicos. No presente estudo, matrine não reduziu a viabilidade dos conídios de *Metarhizium* spp., *B. bassiana* e *I. javanica* quando estes foram cultivados em meio BDAL suplementado com o alcaloide, independente do tempo de exposição avaliado. Outro parâmetro biológico avaliado no presente trabalho demonstrou que os isolados testados de *Metarhizium* spp. e *B. bassiana*, com exceção do CG 138, tiveram seu crescimento radial afetado pelo matrine; em contra partida, os isolados de *I. javanica* não apresentaram alteração do tamanho das colônias em função da presença ou ausência de matrine no meio de cultivo. Resultados semelhantes foram encontrados por Marques et al. (2004) em seu estudo com *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) cultivados em meio de cultura BDA suplementado com óleo de *Azadirachta indica*, obtendo altos índices de germinação em todas concentrações testadas, e redução do diâmetro das colônias, corroborando com os achados de Hirose et al. (2001) e Mertz et al. (2010) em seus trabalhos.

Percentuais elevados de mortalidade larval foram observados em todas as concentrações, tanto nos tratamentos utilizando somente matrine quanto naqueles onde matrine foi associado a conídios. Este fato pode estar relacionado com a ausência da detecção de efeito conjunto de matrine e fungos, visto que a menor concentração de matrine testada foi capaz de controlar 50% da população de insetos, e em concentrações altas, percentuais elevados foram encontrados no primeiro tempo de avaliação. Esses achados sugerem que matrine ocasiona rápida mortalidade nas larvas, consequentemente, impossibilitando os fungos entomopatogênicos de iniciar seu processo de penetração, visto que antes do fungo iniciar este processo, as larvas já encontram-se mortas. Diversos autores relatam neste processo a formação de apressórios na cutícula 48 horas após a infecção experimental (BITTENCOURT et al., 1999; GARCIA et al., 2004; ARRUDA et al., 2005). No ponto de vista do uso associado de conídios com matrine, no controle biológico de artrópodes-pragas, estes resultados são importantes, pois sinaliza a possibilidade da associação entre matrine e fungos entomopatogênicos para o controle de larvas. Apesar de matrine reduzir o crescimento micelial de alguns isolados, ainda assim houve formação de colônias. Estudos complementares poderão comprovar o efeito do matrine para propágulos fúngicos, e determinar o real efeito da combinação de matrine e fungos entomopatogênicos para o controle de *M. domestica*.

8 CONCLUSÕES

As conclusões do presente trabalho foram:

1. Os resultados obtidos nos testes de triagem demonstram o elevado potencial de *Metarhizium* spp. em controlar larvas de terceiro ínstar de *M. domestica*.
2. Blastosporos de IP 146 quando aplicados em ração foram eficazes para o controle de larvas de segundo ínstar de *M. domestica*.
3. Independente da forma de tratamento, direto ou indireto, o alcaloide vegetal matrine na concentração igual ou superior a 10 mg/mL foi eficaz para controle de larvas de *M. domestica*.
4. Independente do tempo de exposição do fungo ao alcaloide, a viabilidade dos conídios não foi afetada.
5. Os isolados de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana*, com excessão do isolado CG 138, cultivados em meio suplementado com matrine apresentaram menor crescimento radial quando comparados àqueles cultivados em meio BDAL. Os isolados de *Isaria javanica* não apresentaram diferença significativa.
6. Para o controle de larvas de terceiro ínstar, a associação de diferentes concentrações de alcaloide vegetal matrine com fungos entomopatogênicos não apresentaram efeito sinérgico, adicional ou antagônico.

9 REFERÊNCIAS

- AHMED, S. M.; EAPEN, M. Vapour toxicity and repellency of some essential oils to insect pests. **Indian Perfumer**, v. 30, p. 273 - 278, 1986.
- ALEIXO, R. C.; LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. Criação da mosca doméstica para suplementação alimentar de rãs. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p.11, 1984.
- ALVES, S. B. **Patologia e controle microbiano: Vantagens e desvantagens**. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, p.1163, 1998.
- ALVES, S. B.; ROSSI, L. S.; LOPES, R. B.; TAMAI, M. A.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, n. 2, p. 70–77, 2002.
- AMADO, S.; GULIAS-GOMES, C. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. Longevity of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) parasitized by *Habronema muscae* Carter. (Nematoda: Habronematidae). **Parasitología al día**. v. 24, n. 1-2, 2000.
- AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 466–472, 2006.
- ARRUDA, W.; LÜBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, n. 3–4, p. 231–244, 2005.
- AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. **Annual review of entomology**, v. 35, p. 101–126, 1990.
- BADINI, A. P. R. M. ***Beauveria bassiana* no controle biológico de estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans***. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. p.1-97, 2011.
- BALANDRIN, M.; KLOCKE, J.; WURTELE, E.; BOLLINGER, W. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154–1160, 1985.
- BANJO, A. D.; LAWAL, O. A.; ADEDUJI, O. O. Bacteria and fungi isolated from housefly (*Musca domestica* L.) larvae. **African J. Biotechnol.**, v. 4, n. August, p. 780–784, 2005.
- BARSON, G., RENN, N., BYWATER, A. F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for control of house fly *Musca domestica* L., a pest of intensive animal units. **J. Invert. Pathol.** v. 64, p. 107–113, 1994.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Huebner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Environmental**

Entomology, v. 20, p. 1207–1211, 1991.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512–530, 2009.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v.29, p.351-354, 1999.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D. DE; BARBOSA, C. D. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89–96, 2011.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1795–1805, 1988.

BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J. C. In fungal cell wall and immune response. **Berlin: Springer**; p. 303–16, 1991.

BOUCIAS, D. G., PENDLAND, J. C. Principles of Insect Pathology. Kluwer, Boston, 1998.

BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S. Bioassays of entomogenous fungi. **Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes.**, p. 141–195, 2000.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.78, p.98-108, 2001.

CABANILLAS, H. E.; JONES, W. A. Pathogenicity of *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the sweet potato whitefly B biotype, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection**, v. 28, n. 4, p. 333–337, 2009.

CABANILLAS, H. E.; LEÓN, J. H. DE; HUMBER, R. A.; MURRAY, K. D.; JONES, W. A. *Isaria poprawskii* sp. nov. (Hypocreales: Cordycipitaceae), a new entomopathogenic fungus from Texas affecting sweet potato whitefly. **Mycoscience**, v. 54, n. 2, p. 158–169, 2013.

CAMARGO, M. G.; NOGUEIRA, M. R. S.; MARCIANO, A. F.; PERINOTTO, W. M. S; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; SCOTT, F. B.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38–42, 2016.

COATS, J. R.; KARR, L. L.; DREWES, C. D. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. **Natural occurring pest bioregulators**. American Chemical Society Symposium series, v. 449, p. 305-16, 1991.

CHEN, C. C.; KUMAR, H. G. A.; KUMAR, S.; TZEAN, S. S.; YEH, K. W. Molecular

cloning, characterization, and expression of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*. **Current Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 8–13, 2007.

CRAWFORD, P. J.; BROOKS, W. M.; ARENDS, J. J. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) as microbial control agents of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 6, p. 1295–1301, 1998.

DAVIDSON, E. W.; SWEENEY, A. W. Microbial control of vectors: a decade of progress. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 3, p. 235–247, 1983.

DEVONSHIRE, A. L. Biochemical Mechanisms of Resistance to Insecticides with Especial Reference to the Housefly, p. 521–529, 1973.

DIAS, B. A. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana***. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina, 2005.

DING, P. L., YU, Y. Q., CHEN, D. F. Determination of quinolizidine alkaloids in *Sophora tonkinensis* by HPCE. **Phytochem. Anal.**, v.16, p. 257–263, 2005.

DONG, C.; ZHANG, J.; HUANG, H.; CHEN, W.; HU, Y. Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. Anisopliae* var. *Dcjhium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. **Microbiological Research**, v. 164, n. 1, p. 27–35, 2009.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, n. 2, p. 134–150, 2000.

FARIA, M. R.; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 2007.

FAROOQ, M.; FREED, S. Infectivity of housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to different entomopathogenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

FASANELLA, A.; SCASCIAMACCHIA, S.; GAROFOLO, G. Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical vector for an Anthrax. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 119-122, 2010.

FERNANDES, É. K. K.; MORAES, Á. M. L.; PACHECO, R. S. Genetic diversity among brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-brazilian isolates and other *Beauveria* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 760–774, 2009.

FERNANDES, É. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; et al. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 307–318, 2011.

FERNANDES, E. G.; VALÉRIO, H. M.; BORGES, M. A. Z. Selection of fungi for the control of *Musca domestica* in aviaries. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 11, p. 1256–1266, 2013.

FILHO, M. M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. Micoínseticidas E Micoacaricidas No Brasil: Como Estamos Após Quatro Décadas? **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 4, p. 769–779, 2009.

FÖRSTER, M.; KLIMPEL, S.; MEHLHORN, H.; et al. Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. **Parasitology Research**, v. 101, n. 1, p. 243–246, 2007.

FU, Y., WANG, C., YE, F. The applications of *Sophora flavescens* Ait. Alkaloids in China. **Pestic. Sci. Adm**, v. 26, p. 30–33, 2005.

FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 239–247, 2003.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO AC, SZABÓ, M.P.J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, v.34, p.1513-1518, 2004.

GEDEN, C.; RUTZ, D.; STEINKRAUS, D. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. **Biological Control**, 1995.

GILLESPIE, A. T.; CLAYDON, N. The Use of Entomopathogenous Fungi for Pest Control and the Role of Toxins in Pathogenesis. **Pesticide Science**, v. 27, n. February, p. 203–215, 1989.

GOETTEL, M. S.; POPRAWSKI, T. J.; VANDENBERG, J. D.; LI, Z.; ROBERTS, D. W. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. **Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents**. p. 209-232, 1990.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G. D. Fungi: Hyphomycetes. **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic Press, London, p. 213–249, 1997.

GOLO, P. S.; GARDNER, D. R.; GRILLEY, M. M.; TAKEMOTO, J. Y.; KRASNOFF, S. B.; PIRES, M. S.; FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

HALL, R. A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultura and medical importance. **Parasitology**, v. 84, p. 205-240, 1982.

HARTELT, K. et al. Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, n. 1, p. 314–320, 2008.

HUMBER, R. A. USDA-ARS Collection of Entomopathogenic fungal cultures – Catalog of Species. USDA- ARS Biological Integrated Pest Management Research, Roberth W. Holley Center for Agriculture and Health, Ithaca, 2013.

HEWITT, C. G. The House-Fly, *Musca domestica* Linn. Its structure, habits, development, relation to disease and control. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 151, p. 285, 1916.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J.; ZEQUI, J. A. C.; MARTINS, L. H.; PERALTA, C. H.; JUNIOR, A. M. Effect of Biofertilizers and Neem oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian archives of biology and technology**. v.44, n.4, p. 419-423, 2001.

HODGE, K. T.; GAMS, W.; SAMSON, R. A.; et al. Lectotypification and status of *Isaria* Pers.: Fr. **Taxon**, v. 54, n. 2, p. 485–489, 2013.

IBRAHIM, L.; BUTT, .T. M.; JENKINSON, P. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**. v.106: p.705–715, 2002.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. Q.; STRASSER, H. Use of Hyphomycetous Fungi for managing insect pests. **Fungi as biocontrol agents**, , n. 1993, p. 23–70, 2001.

IPPOLITO, A.; KATTWINKEL, M.; RASMUSSEN, J. J.; et al. Modeling global distribution of agricultural insecticides in surface waters. **Environmental Pollution**, v. 198, p. 54–60, 2015.

ISSALY, N. *et al.* Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1425–1431, 2005.

JACKSON, M. A. *et al.* Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 35–41, 1997.

KLEESPIES, R. G.; ZIMMERMANN, G. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) sorokin in submerged culture. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 127–135, 1992.

KAUFMAN, P. E.; REASOR, C.; RUTZ, D. A.; KETZIS, J. K.; ARENDS, J. J. Evaluation of *Beauveria bassiana* applications against adult house fly, *Musca domestica*, in commercial caged-layer poultry facilities in New York state. **Biological Control**, v. 33, n. 3, p. 360–367, 2005.

KEIDING, J. The House Fly: Biology and control. p. 81, 1980.

KLEESPIES, R. G.; ZIMMERMANN, G. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 127–135, 1992.

- LAI, J. P., HE, X. W., JIANG, Y., CHEN, F. Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Ait by molecularly imprinted solid-phase extraction. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 375, p. 264–269, 2003.
- LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, v. 39, p. 6–12, 2009.
- LEE, S.; TSAO, R.; PETERSON, C.; COAST, J. R. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 90, p. 883–892, 1997.
- LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TAROCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 3, p. 332–336, 2005.
- LEVINE, O. S.; LEVINE, M. M. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. **Reviews of infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 688–696, 1991.
- LIANG, Z. Q.; LIU, A. Y. *Metarhizium taii*. **Acta Mycologica**. p. 10-260, 1991.
- LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. majus. **Journal of invertebrate pathology**, v. 78, p. 178–182, 2001.
- LIU, Z.; LIANG, Z.; LIU, A.; et al. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 1100–1108, 2002.
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; RAMOS-PARRA, M. Effect of entomopathogenic fungi upon adults of *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 969–973, 2012.
- LOVATTO, B.; CLECI, G.; THOM, H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 971–978, 2004.
- LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; SAMSON, R. A. The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 773–780, 2004.
- LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; MANOCH, L.; SAMSON, R. A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. Isarioidea species. **Mycological research**, v. 109, n. May, p. 581–589, 2005.
- LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 839–846, 1998.

MAO, L.; HENDERSON, G. Antifeedant activity and acute and residual toxicity of alkaloids from *Sophora flavescens* (Leguminosae) against formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of economic entomology**, v. 100, n. 3, p. 866–870, 2007.

MALIK, A.; SINGH, N.; SATYA, S. House fly (*Musca domestica*): A review of control strategies for a challenging pest. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 4, p. 453–469, 2007.

MARICONI, F. A. M.; GUIMARÃES, J. H.; FILHO, E. B. **A Mosca doméstica e algumas outras moscas nocivas**. Piracicaba: FEALQ, 1999.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria. v.34, n.6, p. 1675–1680, 2004.

MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; QUINTELA, E. D.; DELALIBERA, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, v. 66, n. 3, p. 209–218, 2013.

MASCARIN, G. M. et al. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 6653–65, 2015.

MASCARIN, G. M. et al. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of invertebrate pathology**, v. 127, p. 11–20, 2015.

MATSUDA, K.; YAMADA, K.; KIMURA, M.; HAMADA, M. Nematicidal activity of Matrine and its derivatives against Pine Wood Nematodes. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 1, n. 201, p. 189–191, 1991.

MELO, D. R. Atividade do óleo essencial *Lippia sidoides* (VERBENACEAE) e dos monoterpenos timol e carvacrol sobre larvas e pupas de *Musca domestica* LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2014.

MELO, I. L.; AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. Controle Biológico. Jaguariúna: EMPRAPA. v.1, p.69-96, 1998.

MERTZ, N. R.; ALVES, L. F. A. P.; MARCOMINI, A. M.; OLIVEIRA, D. G. P.; SANTOS, J. C. Efeitos de Produtos Fitossanitários Naturais sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in vitro. **Bioassay**. v.5. p.1-10, 2010.

MISHRA, S.; MALIK, A. Comparative evaluation of five *Beauveria* isolates for housefly (*Musca domestica* L.) control and growth optimization of selected strain. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1937–1945, 2012.

- MOREY, R. A.; KHANDAGLE, A. J. Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 111, n.4, p. 1799-1805, 2012.
- MULLENS, B. A. Cross-transmission of *Entomophthora muscae* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) among naturally infected muscoid fly (Diptera: Muscidae) hosts. **J. Invertebr. Pathol**, v.53, p.272-275, 1989
- NEVES, D. P., MELO, A. L., LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11^a ed. p.494. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- PALACIOS, S. M.; BERTONI, A.; ROSSI, Y.; SANTANDER, R.; URZÚA, A. Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. **Molecules**, v. 14, p. 1938-1947, 2009.
- PAVELA, R. Lethal and sublethal effects of thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) on the house fly (*Musca domestica* Lin.) **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, p. 346-356, 2007.
- PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.) **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 274-278, 2008.
- PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say And *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1547-1553, 2011.
- PAVELA, R. Efficacy of naphthoquinones as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 43, n. 0, p. 745-750, 2013.
- PEREIRA, C. A luta contra as moscas. **O Biol.**, v.13, p.25-43, 1947.
- PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; et al. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 257–260, 2012.
- QUESADA-MORAGA, E.; MARANHÃO, E. A. A.; VALVERDE-GARCÍA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. **Biological Control**, v. 36, n. 3, p. 274–287, 2006.
- QUICENO, J.; XIMENA, B.; ROJAS, D.; BAYONA, M. La mosca doméstica como portador de patógenos microbianos , the domestic fly as carrier of microbial. **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, v. 13, n. (1), p. 23–29, 2010.
- RAHUMAN, A. A.; VENKATESAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. **Parasitology Research**, v. 103, n. 6, p. 1383–1390, 2008.
- RANGEL, D. E. N.; ALSTON, D. G.; ROBERTS, D. W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed,

adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, p. 1344–1361, 2008.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G. H.; et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, p. 1055–1073, 2011.

RENN, N.; BYWATER, A. F.; BARSON, G. A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Dipt., Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. **Journal of Applied Entomology**, v. 123, n. 5, p. 309–314, 1999.

RICE, P. J.; COATS, J. R. Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the housefly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). **Pesticide Science**, v. 41, p. 195 - 202, 1994.

ROMÁN, E. M. DE; TKACHUK, O.; ROMAN, R. Detección de agentes bacterianos en adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) recolectadas en Maracay, Estado Aragua, Venezuela. **Entomotropica**, v. 19, n. 3, p. 161–164, 2004.

SALES, M. S. N.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolation of fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) captured at two natural breeding grounds in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1107–1110, 2002.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LATGÉ, J. P. **Atlas of Entomopathogenic Fungi**. Springer- Verlag, Berlin, 1988.

SANTIN, R. D. C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. 2008.

SILVA, A. S.; QUINTAL, A. P. N.; MONTEIRO, S. G.; DOYLE, R. L.; SANTUARIO, J. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1944–1947, 2006.

SINGH, D.; AGARWAL, S. K. Himachalol and β -himachalene: Insecticidal principles of himalayan cedarwood oil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 4, p. 1145–1151, 1988.

SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; et al. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae) in China. **Parasitology International**, v. 62, n. 5, p. 412–415, 2013.

SUNG, G. H.; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J. M.; et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, p. 5–59, 2007.

SCOTT, J. G.; ALEFANTIS, T. G.; KAUFMAN, P. E.; RUTZ, D. A. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. **Pest Management Science**, v. 56, n. August 1999, p. 147–153, 2000.

SCREEN, S. E.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 4, p. 260–266, 2001.

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

SHAH, F. A.; WANG, C. S.; BUTT, T. M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**. v.251: p.259–266, 2005.

SMITH, K. G. V. **A Manual of Forensic Entomology**. 1986.

STEINKRAUS, D. C.; GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; KRAMER, J. P. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of medical entomology**, v. 27, n. 3, p. 309–312, 1990.

ST. LEGER, R. J. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by the deuteromycete fungal pathogens. **Parasites and pathogens of insects**. vol.2. New York: Academic Press, Inc. p.211-219, 1993.

TARELLI, G.; ZERBA, E. N.; ALZOGARAY, R. A. Toxicity to Vapor Exposure and Topical Application of Essential Oils and Monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 3, p. 1383–1388, 2009.

TIAN, J.; DIAO, H.; LIANG, L.; et al. Pathogenicity of *Isaria fumosorosea* to *Bemisia tabaci*, with some observations on the fungal infection process and host immune response. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 147–153, 2015.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**. British Mycological Society, v. 66, n. 3, p. 407–411, 1976.

THACKER, J. M. R. An Introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge, UK. **Cambridge University Press**. p. 343, 2002.

UGBOGU, O. C.; NWACHUKWU, N. C.; OGBUAGU, U. N. Isolation of *Salmonella* and *Shigella* species from house flies (*Musca domestica* L.) in Uturu, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. June, p. 1090–1091, 2006.

WALSH, J. A.; WARREN, K. S. Selective primary health care: An interim strategy for disease control in developing countries. **The New England Journal of Medicine**, v. 301, n. 18, p. 967–974, 1979.

WANG, G. X., CHEN, H. L., JIANG, H.Y., YIN, T.Y., WU, L.Y. Effect of *Sophora flavescens* alkaloids on the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and endothelial cells. **J. Med. Biol. Eng**, v. 32, p. 195–200, 2012.

WARE, G. W. Pesticides. Theory and Application. **San Francisco: Freeman**, p. 308, 1983.

WASSERMANN, M. *et al.* Biological control of Ixodes ricinus larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for Controlling the House fly and Stable Fly. **Biological Control**, v. 5, p. 405–411, 1995.

WATSON, D. W.; RUTZ, D. A.; LONG, S. J.; et al. *Beauveria bassiana* and Sawdust Bedding for the Management of the House Fly, *Musca domestica* (Diptera : Muscidae) in Calf Hutches. **Biological Control**, v. 7, n. 2, p. 221–227, 1996.

WEBSTER, A.; PRADEL, E.; SOUZA, U. A.; et al. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 10–14, 2016.

WEIGERT, S. C.; WEIGERT, S. C.; ROBERTO, M.; et al. Influência da Temperatura e do Tipo de Substrato na Produção de Larvas de. **R. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 5, p. 1886–1889, 2002.

WHO. Vector Control Series: The Housefly. Intermediate level training and information guide. 1991.

XIN, X.; MAN, Y.; LEILEI, F.; ZHI-QING, M.; ZHANG, X. The botanical pesticide derived from *Sophora flavescens* for controlling insect pests can also improve growth and development of tomato plants. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 13–18, 2016.

ZANARDI, O. Z.; RIBEIRO, L. P.; ANSANTE, T. F.; et al. Bioactivity of a matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. **Crop Protection**, v. 67, p. 160–167, 2015.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879–920, 2007.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.