



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
(PPGMTSP)

ANDRESSA KRISTINY LEMES SEABRA

---

---

**Formulação de *Metarhizium humberi* à base de cera de carnaúba  
e terra diatomácea para controle focal de *Aedes aegypti***

---

---

GOIÂNIA

29/09/2023

**UFG**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

**Exemplos:** Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

**2. Nome completo do autor**

**Andressa Kristiny Lemes Seabra**

**3. Título do trabalho**

Formulação de *Metarhizium humberi* à base de cera de carnaúba e terra diatomácea para controle focal de *Aedes aegypti*

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
  - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Wolf Christian Luz, Professor do Magistério Superior**, em 09/11/2023, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andressa Kristiny Lemes Seabra, Usuário Externo**, em 09/11/2023, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4090827** e o código CRC **A0DDB513**.

ANDRESSA KRISTINY LEMES SEABRA

---

---

**Formulação de *Metarhizium humberi* à base de cera de carnaúba e terra diatomácea para controle focal de *Aedes aegypti***

---

---

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

Área de concentração: Ciências básicas e aplicadas em doenças infectoparasitárias e saúde pública

Linha de pesquisa: Parasitologia

Orientador: Wolf Christian Luz

Coorientador: Juscelino Rodrigues

GOIÂNIA

29/09/2023

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

Seabra, Andressa Kristiny Lemes  
Formulação de *Metarhizium humberi* à base de cera de carnaúba e terra diatomácea para controle focal de *Aedes aegypti* [manuscrito] / Andressa Kristiny Lemes Seabra. - 2023.  
lxix, 69 f.: il.

Orientador: Prof. Wolf Christian Luz; co-orientador Juscelino Rodrigues Filho.  
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, 2023.  
Bibliografia. Anexos. Apêndice.  
Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. mosquito. 2. controle biológico. 3. fungo entomopatogênico. 4. aditivo. I. Luz, Wolf Christian , orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANDRESSA KRISTINY LEMES SEABRA** – Aos vinte e nove dia do mês de setembro do ano de 2023 (29/09/2023), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **WOLF CHRISTIAN LUZ** (IPTSP/UFG), **ELEN REGOZINO MUNIZ** (IPTSP/UFG) e **WALQUÍRIA ARRUDA** (ICB/UFG), para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada na Sala de Leitura do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da UFG, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada:

**“Desenvolvimento de uma formulação de *Metarhizium humberi* à base de cera de carnaúba e terra diatomácea para controle focal de *Aedes aegypti*”, em nível de MESTRADO, área de concentração em CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA, de autoria de ANDRESSA KRISTINY LEMES SEABRA, 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. WOLF CHRISTIAN LUZ, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 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 a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:**

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Prof. Dr. <b>Wolf Christian Luz</b>	aprovada
Profa. Dra. <b>Elen Regozino Muniz</b>	aprovada
Profa. Dra. <b>Walquíria Arruda</b>	aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (**Habilitada** ou **não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h e 45 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, 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.

**TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA**

Formulação de *Metarhizium humberi* à base de cera de carnaúba e terra diatomácea para controle focal de *Aedes aegypti*



Documento assinado eletronicamente por **Wolf Christian Luz, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elen Regozino Muniz, Professora do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Walquiria Arruda, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4017247** e o código CRC **74C6EF22**.

---

*“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”. (Albert Einstein)*

## Agradecimentos

---

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. **Wolf Christian Luz** por acreditar sempre em mim, a constante paciência e dedicação para comigo.

Ao meu coorientador, Dr. **Juscelino Rodrigues**, pelas valiosas contribuições no trabalho, ensinamentos ao fazer análises de dados, mas principalmente por sua amizade.

Aos colegas do **Laboratório de Patologia de Invertebrados**; Juan Martinez, Lucas, Fernanda, Luiz e Shirley pelas boas conversas e convivência.

Ao Programa de **Pós- Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública** do IPTSP – UFG, pela oportunidade.

Ao **Concelho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pelo apoio financeiro recebido durante esses dois anos como aluna de mestrado.

A minha família, em especial meus pais, **André Luís dos Santos Seabra** e **Karla Andréia Lemes Silva Seabra**, pelo exemplo, apoio, amor e confiança sempre depositados.

A todos os **professores** da Universidade Federal de Goiás que contribuíram com minha formação.

Ao site **Biorender** pelo auxílio na criação de algumas imagens.

## Listas de figuras

---

- Fig. 1 Cabeça de *Aedes aegypti* em vista superior- A: Fêmea; B: Macho. a: antena; pa: palpo maxilar; pr: probóscide. 16
- Fig. 2 Ciclo de vida de *Aedes aegypti*, com seus respectivos estágios: ovos (1), larvas (2), pupas (3) e adultos (4). O ciclo biológico consiste em duas fases: aquática (larvas e pupas) e terrestre (adultos e ovos) (Biorender). 18
- Fig. 3 Ciclo de vida *Metarhizium humberi*. Fase patogênica: os conídios (C) entram em contato com a epicutícula do inseto, e inicia-se a etapa de adesão (1), C começam a germinar sobre a epicutícula formando o tubo germinativo (TG) e apressório (A) (2) que auxilia na penetração do fungo no corpo do inseto (3), dentro do inseto, o fungo começa a se multiplicar e crescer internamente ocasionando danos internos e conseqüentemente a morte do inseto (4). Fase saprobiônica: após a morte ocorre a esporulação e conidiogênese *post mortem* (5), por ações ambientais como o vento C se desprendem do corpo do inseto e se propagam pelo meio ambiente dando continuidade ao ciclo de vida do fungo 22
- Fig. 4 Dispositivo de disseminação em gaiola telada; tira de papel de filtro ajustada em um frasco (20 mL) (a) preenchido com solução aquosa de sacarose a 10% previamente esterilizada (15 mL) para a alimentação dos adultos de *Aedes aegypti*. 29
- Fig. 5 Área de peridomicílio simulado para testes em condições de semi-campo; tecidos pendurados em cada sala para descanso de mosquitos (a); dispositivo de disseminação no chão da sala da área (b). 30
- Fig. 6 Locais de cada peridomicílio com dispositivo de disseminação contendo CC+TD e controle. 31
- Fig. 7 Pó micronizado de cera de carnaúba e liofilizado (a); terra diatomácea autoclavada (b); pó de cera de carnaúba e terra diatomácea armazenados sobre sílica gel (c). 34
- Fig. 8 Criação de *Aedes aegypti* em laboratório: Papel filtro com ovos foi colocado em bacia de plástico com água (a,b); as larvas foram alimentadas com ração para gato até a pupação (b); as pupas foram transferidas para copo plástico com água (c); o copo com as pupas foi colocado dentro de um recipiente plástico telado; e os adultos emergentes foram alimentados com solução de sacarose a 10% (d). 35
- Fig.9 Dispositivo copo de plástico transparente (200 mL) com a superfície lateral interna asperizada (a); formulação C+CC+TD espalhada sobre a superfície 36

lateral interna do dispositivo (b). Dispositivo telado para evitar a fuga de adultos de *Aedes aegypti* durante os experimentos (c).

Fig.10 Dispositivo de disseminação, reservatório fechado para água (a), 37  
compartimento superior aberto (b), prato com gel (c), três barbantes (só um  
mostrado d) que conecta a água com o gel, tubo para preencher o reservatório  
(e), tampa (f) e compartimento onde é posto o tecido (g) tratado com formulação  
(i), incisão e fixação do tecido no compartimento superior do dispositivo (h).

Fig.11 Germinação média (%) de conídios de *Metarhizium humberi* IP 46, 24 h após 41  
incubação sobre meio SDAL a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotófase. Anteriormente, os  
conídios [C] (5 mg) foram colocados em microtubos sem aditivos (a) ou  
misturados com cera micronizada de carnaúba [CC] seguindo a proporção de (a  
cada 2 mg de CC tinha  $10^7 \text{C}$ , e volume final de 5 mg) (b), terra diatomácea  
[TD] (a cada 0,5 mg de TD tinha  $10^7 \text{C}$ , volume final de 5 mg) (c) ou os dois  
aditivos (a cada 2 mg de CC, e 0,5 mg de TD tinha  $10^7 \text{C}$ , volume final de 5 mg)  
(d) a 43%, 75% ou  $> 98\%$  umidade relativa,  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotófase até 14  
d (quatro repetições independentes).

Fig.12 Germinação média (%)  $\pm$  erro padrão da média de conídios de *Metarhizium* 42  
*humberi* IP 46, 24 h após incubação sobre meio SDAL a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de  
fotófase. Anteriormente, os conídios [C] (5 mg) foram colocados em  
microtubos sem aditivos ou misturados com cera micronizada de carnaúba  
[C+CC] (a cada 2 mg de CC tinha  $10^7 \text{C}$ , e volume final de 5 mg), terra  
diatomácea [TD] (a cada 0,5 mg de TD tinha  $10^7 \text{C}$ , volume final de 5 mg) ou  
os dois aditivos [C+CC+TD] (a cada 2 mg de CC, e 0,5 mg de TD tinha  $10^7 \text{C}$ ,  
volume final de 5 mg), agitados e incubados a 43% □, 75% ▨ ou ▩  $> 98\%$  de  
umidade relativa,  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotófase até 14 d. Os valores (quatro  
repetições independentes) dentro do mesmo grupo (C; C+CC; C+TD;  
C+CC+TD) com letras diferentes (a–c) foram significativamente diferentes  
(ANOVA  $F_{2,21} \geq 18,2$  e  $P \leq 0,001$ ).

Fig.13 Mortalidade relativa acumulada média  $\pm$  erro padrão da média de adultos de 44  
*Aedes aegypti* [incubados a 75% (a) e  $> 98\%$  (b) de umidade relativa,  $25 \pm 1^\circ \text{C}$   
e 12 h de fotófase por 15 d]. Anteriormente, dez adultos foram expostos durante  
1 h em copo plástico, não tratado (controle) ou tratado com cera micronizada de  
carnaúba [CC] ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) e/ou terra diatomácea [TD] ( $0,5 \text{ mg/cm}^2$ ) misturados  
ou não com conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] ( $10^7 \text{C/cm}^2$ ) (quatro  
repetições independentes).

Fig.14 Desenvolvimento de *Metarhizium humberi* em cadáveres de *Aedes aegypti*. 46  
Adultos mortos foram colocados sobre meio ágar-água com cristal violeta e

incubados a 25° C, > 98% UR e fotófase de 12 h. O crescimento semi-quantitativo de conídios foi analisado diariamente (a–d) durante 10 d. Ampliação com estereoscópio (60x; Leica DMLS |V/00, Leica Microsystems, São Paulo, Brasil).

- Fig.15 Média do número de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por inicialmente 60 fêmeas de *Aedes aegypti* durante 15 d, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) misturados ou não com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e/ou terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e gel. Os testes foram realizados com quatro repetições independentes em gaiolas teladas em umidade relativa e temperatura ambiente. 49
- Fig.16 Mortalidade relativa média acumulada  $\pm$  erro padrão da média de adultos de *Aedes aegypti*. Anteriormente, com quatro repetições independentes, 60 adultos foram expostos durante 15 d em gaiola telada, com dispositivo de disseminação previamente não tratado (controle) (a,b) ou tratado com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e/ou terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) (a,b) misturados ou não com conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] (10<sup>7</sup> C/cm<sup>2</sup>) (b) em umidade relativa ambiente, 25  $\pm$  1° C e 12 h de fotófase. 50
- Fig.17 Média do número de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por inicialmente 100 fêmeas de *Aedes aegypti* durante 15 d, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) (a,b) ou tratado com conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] (10<sup>7</sup> C/cm<sup>2</sup>) (b) misturados ou não com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e/ou terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) (a,b) e gel. Os testes foram realizados em Goiânia, GO, Brasil, entre dezembro de 2022 a abril de 2023 (a) (época chuvosa, com oito repetições independentes) e junho a agosto de 2023 (época seca) (com quatro repetições independentes), em umidade relativa e temperatura ambiente. 50
- Fig.18 Monitoramento de temperatura (a) e umidade relativa (b) fora do dispositivo de disseminação (ambiente), em condições simuladas de peridomicílio em Goiânia, GO, Brasil, entre dezembro de 2022 a abril de 2023 correspondente à época chuvosa. 52
- Fig.19 Média do número total de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por fêmea de *Aedes aegypti* durante 7 d, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) ou tratado com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e gel. Os testes foram realizados em quatro locais peridomiciliares (a–d), em Goiânia, GO, Brasil, entre dezembro de 2022 a abril de 2023 (época chuvosa), em umidade relativa e temperatura ambiente (quatro repetições independentes). 52

Fig.20 Média do número total de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por fêmea de *Aedes aegypti* durante 7 d, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) ou tratado com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e gel. Os testes foram realizados em quatro locais peridomiciliares (a–d), em Goiânia, GO, Brasil, entre junho á agosto de 2023 (época seca), em umidade relativa e temperatura ambiente (quatro repetições independentes). 53

Tab.1 Mortalidade relativa acumulada  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após 5, 10 e 15 d e tempo letal (dias) com seus respectivos intervalos de confiança (IC) para matar 50 e 90% (TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub>) de adultos de *Aedes aegypti* expostos a conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] (10<sup>7</sup> conídios/cm<sup>2</sup>) formulados ou não com pó de cera de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e incubados a 25° C, umidade relativa de 75% ou >98% e fotofase de 12 h por até 15 d. Com os respectivos números de conídios por cadáveres de adultos expostos ou não a CC e TD. Os valores foram calculados com quatro repetições independentes dentro da mesma coluna (mortalidade e número de conídios com ANOVA e teste SNK; TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub> com análise de Probit em seu IC 95%). \* Valores insuficientes para calcular tempo letal 45

## Símbolos, siglas e abreviaturas

---

AA	Ágar-água
ANOVA	Análise de variância
BDA	Batata Dextrose Ágar
°C	Grau Celsius
C	Conídios
CB	Controle biológico
CC	Cera de carnaúba
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
D	Dia
EPM	Erro padrão da média
FE	Fungo entomopatogênico
Fig.	Figura
g	Gramma
h	Hora
IC	Intervalo de confiança
IP 46	Isolado fúngico de <i>Metarhizium humberi</i> armazenado no IPTSP
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LPI	Laboratório de Patologia de Invertebrados
l	Litro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
n°	Número
PET	Polietileno
SDAL	Sabouraud, Dextrose e Ágar acrescido com extrato de levedura
SNK	Comparação múltipla de Student-Newman-Keuls
UFG	Universidade Federal de Goiás
UR	Umidade relativa
Tab.	Tabela
TD	Terra diatomácea
TL <sub>50</sub>	Tempo letal de 50%
TL <sub>90</sub>	Tempo letal de 90%

## Sumário

1	Introdução.....	15
2	Fundamentação Teórica.....	16
2.1	<i>Aedes aegypti</i> .....	16
2.1.2	Morfologia.....	16
2.1.3	Aspectos biológicos.....	17
2.1.4	Importância como vetor.....	18
2.1.5	Controle do vetor no Brasil.....	19
2.1.6	Controle químico.....	20
2.2	Fungos entomopatogênicos.....	21
2.2.1	Aspectos biológicos.....	21
2.2.2	<i>Metarhizium</i> .....	23
2.2.2	<i>Metarhizium humberi</i> .....	23
2.3	Produção e formulação de fungos entomopatogênicos.....	23
2.3.1	Pó de cera de carnaúba.....	24
2.3.2	Terra diatomácea.....	24
2.3.4	Aplicação de fungos entomopatogênicos.....	25
3	Justificativa.....	26
4	Objetivos.....	27
4.1	Objetivo geral.....	27
4.2	Objetivos específicos.....	27
5	Metodologia.....	28
5.1	Condições dos testes.....	28
5.2	Pós e formulações.....	34
5.3	Preparação de meios.....	35
5.4	Origem, cultura e preparação de <i>Metarhizium humberi</i> .....	36
5.5	Origem, manutenção e preparação de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
5.6	Preparação de dispositivos para os testes.....	36
5.7	Gel e infusão.....	37
5.8	Diferentes umidades relativas.....	37
5.9	Testes em laboratório.....	38
5.9.5	Testes em semi-campo.....	39
5.9.6	Testes em campo.....	39
5.9.7	Análise estatística dos dados.....	39

6	Resultados.....	40
6.1	Testes <i>in vitro</i> com aditivos e conídios.....	40
6.2	Testes <i>in vivo</i> em condições de laboratório.....	43
6.3	Testes <i>in vivo</i> em gaiolas teladas.....	48
6.4	Testes <i>in vivo</i> em semi-campo.....	51
6.5	Testes <i>in vivo</i> em campo.....	53
7	Discussão.....	56
8	Conclusão.....	58
9	Referências.....	59

## Resumo

---

### Formulação de *Metarhizium humberi* à base de cera de carnaúba e terra diatomácea para controle focal de *Aedes aegypti*

**Introdução:** *Metarhizium humberi* é um fungo entomopatogênico que apresenta atividade promissora no controle biológico de *Aedes aegypti*, vetor de arboviroses. Condições ambientais estressantes, como baixas umidades relativas (UR), dificultam a ação inseticida de *M. humberi*. Aditivos em formulações de conídios (C), visam melhorar atividade inseticida desse fungo. Pó de cera de carnaúba (CC) como aditivo objetiva aumentar o contato de C na cutícula, e terra diatomácea (TD) provoca danos por abrasão na epicutícula do vetor. **Objetivos:** Diante disso o objetivo desse estudo foi desenvolver uma formulação seca para controle de *A. aegypti*. **Materiais e métodos:** Para isso, foi avaliada a germinação *in vitro* de C com CC e/ou TD, e o potencial de CC e TD como aditivos em condições de laboratório, semi-campo e campo. Para testes *in vitro* de germinação, C foram misturados com CC e/ou TD e expostos a 25°C, 43%, 75%, >98% UR e fotofase de 12 h por 14 d. Em testes *in vivo*: na estufa, adultos foram expostos a CC e/ou TD misturados ou não com C por 60 minutos. Depois, foram incubados a 25°C, UR de 75% ou >98% e fotofase de 12 h. Para testes em gaiolas teladas, os adultos foram expostos a dispositivos de disseminação com CC e/ou TD misturados ou não com C. Em testes de semi-campo, adultos expostos a dispositivos de disseminação com C, C+CC+TD e controle em época chuvosa ou seca. Para todos os testes *in vivo*, a mortalidade foi quantificada durante 15 dias. Em testes em campo, foram colocados dispositivos de disseminação com CC+TD e controle em quatro locais peridomiciliares em Goiânia, GO, Brasil, e ao final de cada repetição os dispositivos foram revisados e o número de ovos quantificados. **Resultados:** os testes mostraram que na germinação *in vitro* C com CC e/ou TD expostos a 43, 75 e >98% UR, tiveram diferença significativa na média da germinação em relação às umidades relativas (nº de conídios germinados 43% < 75% < >98% UR). O tempo de exposição (14 dias) não afetou a germinação. Nos testes de laboratório a 75% UR, no 10º dia a mortalidade em C (58%) foi inferior comparada a C+CC+TD (73%). Em semi-campo, na época chuvosa para C+CC+TD mortalidade foi de 73%, e no controle 17,8%. Na época seca, em C+CC+TD foi 92%, para C 81% e controle 38%. Em campo, o número de ovos variou entre 84 e 2221 ovos. **Conclusões:** Os aditivos CC e TD podem ser utilizados em uma formulação com C de *M. humberi*. CC não foi tóxico para os adultos e a formulação C+CC+TD foi promissora em época seca. **Relevância e impacto:** Os conhecimentos resultantes deste estudo, representam um avanço importante para o pré-desenvolvimento de uma formulação seca eficaz e sustentável para controle biológico, contribuindo para o surgimento de novas abordagens de controle de *A. aegypti*, vetor de grande impacto na medicina tropical e saúde pública.

**Palavras – chave:** mosquito, controle biológico, fungo entomopatogênico, aditivo

---

---

## Abstract

---

---

### Formulation of *Metarhizium humberi* based on carnauba wax and diatomaceous earth for focal control of *Aedes aegypti*

**Introduction:** *Metarhizium humberi* is an entomopathogenic fungus that shows promising activity in the biological control of *Aedes aegypti*, a vector of arboviruses. Stressful environmental conditions, such as low relative humidity (RH), hinder the insecticidal action of *M. humberi*. Additives in conidial formulations (C) aim to improve the insecticidal activity of this fungus. Carnauba wax powder (CC) as an additive aims to increase the contact of C on the cuticle, and diatomaceous earth (DE) causes abrasion damage to the vector's epicuticle.

**Objectives:** The aim of this study was to develop a dry formulation for controlling *A. aegypti*.

**Materials and Methods:** To this end, the *in vitro* germination of C with CC and/or ED was evaluated, as well as the potential of CC and DE as additives in laboratory, semi-field and field conditions. For *in vitro* germination tests, C was mixed with CC and/or TD and exposed to 25°C, 43%, 75%, >98% RH and 12 h photophase for 14 days. In *in vivo* tests: in the greenhouse, adults were exposed to CC and/or ED mixed or not with C for 60 minutes. They were then incubated at 25°C, 75% RH or >98% RH and 12-hour photophase. For tests in screened cages, adults were exposed to spreading devices with CC and/or ED mixed or not with C. In semi-field tests, adults exposed to spreading devices with C, C+CC+DE and control in rainy or dry seasons. For all *in vivo* tests, mortality was quantified over 15 days. In field tests, dissemination devices with CC+ED and control were placed in four peridomiciliary sites in Goiânia, GO, Brazil, and at the end of each repetition the devices were reviewed and the number of eggs quantified.

**Results:** In the *in vitro* tests C with CC and/or DE exposed to 43, 75 and >98% RH, had a significant difference in the mean germination in relation to the relative humidities (number of germinated conidia 43% < 75% > 98% RH). Exposure time (14 days) did not affect germination. In laboratory tests at 75% RH, on the 10<sup>th</sup> day mortality in C (58%) was lower than in C+CC+DE (73%). In the semi-field, mortality in the rainy season for C+CC+DE was 73%, and in the control 17%. In the dry season, C+CC+DE mortality was 92%, C 81% and control 45%. In the field, the number of eggs varied between 84 and 2221 eggs.

**Conclusions:** The additives CC and DE can be used in a formulation with C of *M. humberi*. CC was not toxic to adults and the C+CC+DE formulation was promising in the dry season.

**Relevance and impact:** The knowledge resulting from this study represents an important advance in the development of an effective and sustainable dry formulation for biological control, contributing to the emergence of new approaches to controlling *A. aegypti*, a vector with a major impact on tropical medicine and public health.

Key words: mosquito, biological control, entomopathogenic fungus, additive

## 1. Introdução

---

*Aedes aegypti*, vetor de arboviroses de importância pública (GODOY *et al.*, 2021), tem sido alvo de intensos esforços para controle e prevenção, dada a sua capacidade de transmitir doenças graves. Entre as abordagens inovadoras, os fungos entomopatogênicos têm se destacado como antagonistas naturais eficazes contra mosquitos (SCHOLTE *et al.*, 2004). Nesse contexto, o *Metarhizium humberi* IP 46, um fungo entomopatogênico originário do solo do Brasil central (ROCHA *et al.*, 2022), é potente contra *A. aegypti* (RODRIGUES *et al.*, 2019). No entanto, a ação desse fungo é influenciada por condições ambientais estressantes, o que tem levado à busca por estratégias que otimizem a sua eficácia (BATTA., 2003). Uma abordagem promissora envolve o uso de aditivos em formulações fúngicas, capazes de atenuar efeitos de estresse ambientais (LUZ; BATAGIN, 2005).

O pó de cera de carnaúba é um aditivo, derivado da *Copernicia prunifera*, uma palmeira nativa do nordeste brasileiro (DEMARTELAERE *et al.*, 2021). O seu potencial como aditivo é novo, ainda não se conhece o efeito da cera de carnaúba sobre os conídios de *M. humberi*. Por sua natureza dielétrica (ATHANASSIOU *et al.*, 2007), especula-se que as partículas desse pó, quando misturadas aos conídios, possam servir como veículos que facilitem o contato de conídios com a cutícula lipofílica de *A. aegypti*. Outro aditivo de interesse é a terra diatomácea, um pó derivado de resíduos fósseis de algas diatomáceas, rico em silício (LORINI *et al.*, 1999). Com propriedade abrasiva, ao entrar em contato com a cutícula dos insetos, resulta em danos e desidratação, levando à morte do vetor (BATTA *et al.*, 2008).

A terra diatomácea também tem se mostrado interessante como aditivo em formulações fúngicas (LUZ *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015), aumentando a suscetibilidade à infecção fúngica devido ao estresse causado em insetos após o contato. A combinação dessa substância com conídios de *M. humberi* demonstrou não prejudicar a viabilidade desses conídios (LUZ *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019). Entretanto, permanece desconhecido o impacto da sinergia entre a terra diatomácea e o pó de cera de carnaúba em uma formulação contendo conídios de *M. humberi* contra os adultos de *A. aegypti*.

## 2. Fundamentação teórica

### 2.1. *Aedes aegypti*

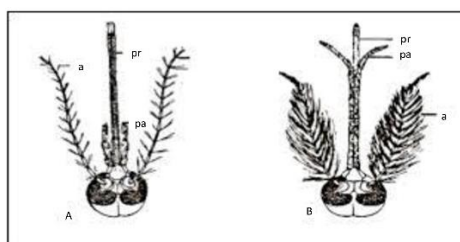
#### 2.1.2. Morfologia

*Aedes aegypti* é um inseto pertencente à ordem Diptera e família Culicidae. Adultos machos e fêmeas apresentam tamanho de 4-7 mm, e um corpo delgado com cabeça, tórax e abdômen. A cabeça se constitui por um par de antenas, aparelho bucal também conhecido como probóscide, e um par de palpos maxilares que se diferem entre os sexos, sendo mais curtos que a probóscide nas fêmeas (Fig. 1A) enquanto nos machos são mais longos (Fig. 1B) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

A probóscide e os palpos apresentam receptores que detectam substâncias voláteis como o dióxido de carbono emitido por hospedeiros, orientando as fêmeas para alimentação, locais de repouso e oviposição. Os olhos se localizam na porção ântero-lateral da cabeça (Fig. 1) e são revestidos por unidades ópticas denominadas de omatídeos, responsáveis pela captação de luz (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). As fêmeas possuem antenas pilosas e aparelho bucal picador (Fig. 1A) que permite a alimentação por hematofagia, enquanto os machos possuem antenas plumosas e aparelho bucal do tipo sugador e se alimentam de néctar de plantas (Fig. 1B).

O tórax é dividido em três segmentos: protórax, mesotórax e metatórax, sendo que o mesotórax corresponde ao maior segmento. Este por sua vez possui características particulares, tais como o mesonoto com um conjunto de escamas prateadas em forma semelhante a uma lira que é característico de *A. aegypti*. O abdômen é subdividido por oito segmentos que são evidentes, e dois segmentos modificados em genitália externa e ânus (CONSOLI; OLIVEIRA 1998). Ademais, possuem três pares de pernas longas com manchas prateadas e um par de asas anteriores que são acompanhadas com um outro par de asas posteriores modificadas denominadas de balancins, estas por sua vez auxiliam no equilíbrio do inseto durante o seu voo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

**Fig. 1.** Cabeça de *Aedes aegypti* em vista superior- A: Fêmea; B: Macho. a: antena; pa: palpo maxilar; pr: probóscide (EIRAS.,2005)



### 2.1.3. Aspectos biológicos

*A. aegypti* é holometabólico e se desenvolve por metamorfose completa em quatro estágios sendo eles; ovos, larvas, pupas e adultos (Fig. 2). Os ovos e adultos são de fase terrestre, enquanto larvas e pupas de fase aquática (Fig. 2). É um mosquito sinantrópico e vive em ambientes urbanos onde se faz presente nos domicílios e peridomicílios. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; CLEMENTS, 2000). As atividades de acasalamento e alimentação ocorre durante o dia (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998) (Fig. 2).

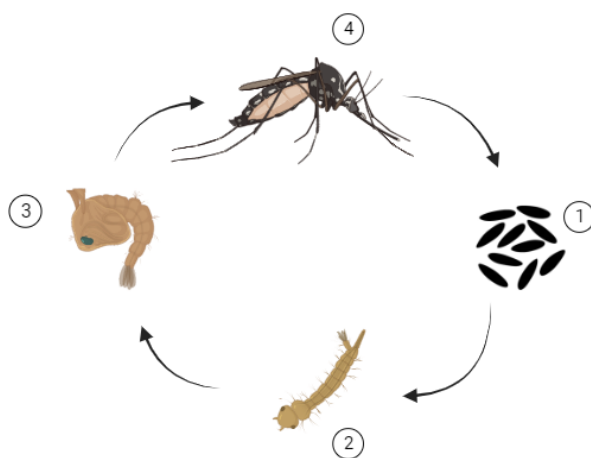
A principal fonte de sangue é o ser humano onde a fêmea consegue alimentar-se mais de uma vez no mesmo hospedeiro, ou em hospedeiros diferentes, e possui preferência em picar regiões mais baixas (DONALISIO *et al.*, 2017). Após repasto sanguíneo, digestão e acasalamento as fêmeas grávidas procuram criadouros para oviposição. A seleção de um criadouro é por meio de alguns fatores, como estrutura, tamanho, coloração do local, além de fatores abióticos dentre eles destacam-se temperatura e umidade (FAY, 1965; BENTLEY; DAY, 1989; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

Após a escolha do criadouro, as fêmeas depositam os ovos em substratos úmidos e nas proximidades de coleções de água dos criadouros (BENTLEY; DAY, 1989; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). Os ovos conseguem resistir à longos períodos de dessecação até o início da estação chuvosa (LOPES *et al.*, 2015). O córion dos ovos é permeável à água, e em condições adequadas de umidade e temperatura, os ovos absorvem água e aumentam de peso e tamanho (CLEMENTS, 1992). Tornam-se então resistentes à perda de água após o total escurecimento do córion, mudando de coloração branca para preta (CLEMENTS, 1992). A eclosão das larvas acontece após a conclusão do desenvolvimento embrionário até 48 h após a oviposição, em condições ambientais adequadas (CLEMENTS, 1992).

Existem diversos fatores que podem interferir na sobrevivência de larvas, como: 1º) disponibilidade de água; as larvas precisam de água para sobreviver e desenvolver. A ausência de água pode levar à desidratação e morte. 2º) a qualidade da água pode afetar na sobrevivência, água limpa e sem contaminantes é mais propícia para à sobrevivência. 3º) a temperatura que é um determinante direto de sobrevivência, temperaturas extremas podem prejudicar o desenvolvimento das larvas e, conseqüentemente, sua sobrevivência. (CHRISTOPHERS, 1960; RUEDA *et al.*, 1990; BARRERA *et al.*, 2006). 4º) a matéria orgânica presente na água, a fonte de alimentação das larvas (CLEMENTS, 1992).

As larvas passam por quatro estádios de desenvolvimento (L1 até L4). Após o período de 5 d em ótimas condições ambientais, as larvas mudam para a fase de pupa onde passam por metamorfose até ocorrer a emergência de adultos (CLEMETS, 1992) (Fig. 2). Adultos machos sobrevivem até 35 (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; CLEMETS, 2000). A sobrevivência de adultos foi considerada maior para fêmeas podendo chegar a até mais de 50 d (SILVA; SILVA, 1999).

**Fig. 2.** Ciclo de vida de *Aedes aegypti*, com seus respectivos estágios: ovos (1), larvas (2), pupas (3) e adultos (4). O ciclo biológico consiste em duas fases: aquática (larvas e pupas) e terrestre (adultos e ovos) (Biorender).



#### 2.1.4. Importância como vetor

*A. aegypti* é vetor de arboviroses como Zika, Chikungunya e dengue. O vetor se distribuiu em regiões tropicais e subtropicais do mundo (SIMMONS *et al.*, 2012). Por meio do comércio de pessoas escravizadas em grandes embarcações e as trocas comerciais, o vetor se disseminou pela África e Ásia durante os séculos XV ao XIX (SIMMONS *et al.*, 2012). Com o aumento do comércio, viagens e urbanização se espalhou globalmente (SIMMONS *et al.*, 2012). O comércio de pneus atuou na dispersão de formas imaturas do vetor em novos ambientes (SIMMONS *et al.*, 2012). A crescente urbanização e conseqüentemente o aumento da densidade populacional resulta no surgimento de novos focos de disseminação do vetor (SIMMONS *et al.*, 2012).

A transmissão de arboviroses por *A. aegypti* é por meio da fêmea previamente infectada, que adquire a infecção através do repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, ou por via transovariana (CONSOLI; OLIVEIRA 1998). Os arbovírus são motivos de preocupação na saúde pública, possuem manifestações clínicas que variam de

doença febril leve, quadros de febre hemorrágica, síndromes articulares e neurológicas, e de forma geral apresentam casos de morbidade e letalidade (LOPES *et al.*, 2014).

Dentre as arboviroses a dengue é uma importante doença epidêmica, que ocasiona impacto econômico, social e de saúde pública. A situação se agrava em regiões que possuem condições ambientais e socioeconômicas que favorecem as características biológicas do vetor (SIMMONS *et al.*, 2012). Regiões com maior frequência de chuvas, propiciam aumento de criadouros artificiais e conseqüentemente populações de mosquitos (SIMMONS *et al.*, 2012; DONALISIO *et al.*, 2017). A adaptação do mosquito às áreas urbanas, favorece seu contato com o homem e a veiculação de doenças (SIMMONS *et al.*, 2012). Além da transmissão de arboviroses o vetor gera incômodo com a sua picada, podendo provocar alergias (DONALISIO *et al.*, 2017).

### **2.1.5. Controle do vetor no Brasil**

Desde 2000, *A. aegypti* tem se tornado alvo em campanhas de erradicação (Plano de Erradicação do *A. aegypti*) cujo principal objetivo se concentrava na redução dos casos de dengue hemorrágica. O controle era realizado por meio da participação voluntária da população, através da conscientização e cooperação popular em campanhas de ataques aos focos do vetor (TAUIL, 2002). O vetor foi erradicado do país entre as décadas de 50 e 60, porém em 1976 houve a reintrodução do mosquito no país (TAUIL, 2002).

O Ministério da Saúde em 2002 criou o Programa Nacional de Controle da Dengue, que apresenta como principais enfoques o fortalecimento das vigilâncias epidemiológicas e entomológicas para ampliar a capacidade de detecção precoce de surtos da dengue, a integração das ações de controle da dengue na atenção básica, com a mobilização do Programa de Agentes Comunitários de Saúde e Programa de Saúde da Família (BRAGA; VALLE, 2007). Atualmente, o controle do vetor é realizado por meio de estratégias de prevenção, destruição ou a destinação adequada de criadouros de *A. aegypti*, a drenagem de reservatórios, bem como a instalação de telas em portas e janelas (Programa Nacional de Controle da Dengue, 2022).

No entanto fatores como, falta de aplicação de ações públicas de prevenção, precariedade de condições sanitárias em algumas cidades brasileiras, pouca participação popular em campanhas de destruição aos focos do vetor e a queda de suscetibilidade de adultos a inseticidas utilizados, dificultam o controle de *A. aegypti* no Brasil (FRANÇA *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2023).

### **2.1.5.1. Controle químico**

O controle químico compreende o uso de inseticidas orgânicos ou inorgânicos, e é uma das metodologias mais empregadas para o controle de vetores na saúde pública (BRAGA & VALLE, 2007). Por suas características químicas esses inseticidas são classificados em quatro grupos principais, organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides.

O primeiro inseticida de efeito prolongado desenvolvido, foi um organoclorado sintético dicloro-difenil-tricloroetano, inseticida criado durante a 2<sup>o</sup> Guerra Mundial, com efeito prolongado. Quando aplicado em ambientes domiciliares, permanecia ativo contra o vetor durante meses (BRAGA; VALLE, 2007). No entanto, devido aos grandes malefícios ocasionados ao homem, e animais ocasionando acúmulo em tecidos do organismo, além da resistência de mosquitos, os inseticidas dessa classe foram proibidos em vários países (BECKER *et al.*, 2010).

No Brasil o organofosforado; temefós foi utilizado como forma de controle de larvas de *A. aegypti*, e hoje não apresenta efetividade contra o vetor. Assim, o uso recorrente de inseticidas gera a seleção genética de populações de mosquitos resistentes. Necessário aumentar a dose de aplicação para contornar a resistência, colocando em risco a saúde do homem, animais e meio ambiente (BARRETO, 2005).

### **2.1.5.2. Controle biológico**

O controle biológico realiza a regulação de populações de pragas de importância agrícola e médica, por meio do uso de inimigos naturais podendo ser predadores, parasitoides ou entomopatógenos como vírus, bactérias e fungos (PARRA *et al.*, 2002).

No Brasil os estudos sobre o controle biológico de pragas iniciaram em 1974, quando o curso de Pós-Graduação em Entomologia da USP criou a disciplina de patologia de insetos, através disso a produção científica com enfoque no controle entomológico foi estimulada e desenvolvida no País (ALVES, 1998). A utilização de entomopatógenos no controle biológico não seleciona populações com indivíduos resistentes, porém algumas desvantagens são relatadas como, uma ação mais lenta no hospedeiro alvo. A maioria dos entomopatógenos necessita de condições favoráveis para a sobrevivência e infecção, como umidade relativa, temperatura entre outros.

O Brasil é referência mundial além de exportar tecnologias de controle biológico para outros países. Produtos denominados de micoinseticidas, formulados à base de fungos entomopatogênicos são eficazes no controle biológico e desempenham um

importante papel na agricultura, um exemplo é a eficácia do gênero *Metarhizium* sobre a cigarrinha da raiz da cana de açúcar (MASCARIN, 2010).

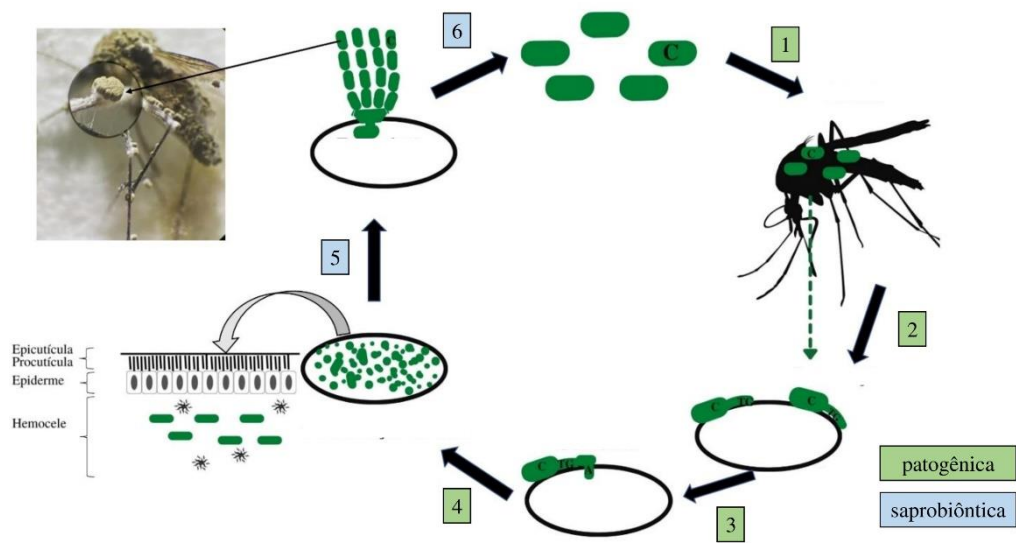
## 2.2. Fungos entomopatogênicos

### 2.2.1. Aspectos biológicos

A maioria das espécies de fungos entomopatogênicos é da ordem Hypocreales do filo Ascomycota, e é encontrada no meio ambiente ou em insetos. São organismos que infectam ácaros e uma ampla gama de insetos ocasionando doenças e a morte desses indivíduos. A principal via de infecção de insetos por esses fungos é através da cutícula (ALVES, 1998; MORA *et al.*, 2017).

O ciclo de vida de *Metarhizium humberi* (Fig. 3) se dá em duas fases, sendo uma patogênica que vai desde a infecção até a morte do hospedeiro, e uma fase saprobiótica que inicia no cadáver do hospedeiro. A fase patogênica se dá quando os conídios se fixam na cutícula do hospedeiro, e inicia o processo de adesão, sendo esta, a etapa primordial para o sucesso da infecção (1). A adesão é favorecida por meio da lipofilicidade dos conídios e da cutícula do inseto. Em condições favoráveis principalmente em locais com alta umidade relativa os conídios começam a germinar (2), formando um tubo germinativo, e logo em seguida um apressório (3) que auxilia na etapa de penetração na cutícula. Durante a penetração, os fungos entomopatogênicos produzem enzimas que degradam a cutícula convertendo os tecidos do inseto em nutrientes para o seu crescimento (FERNANDES, 2012; BUTT *et al.*, 2016). Após a penetração, hifas chegam a hemocele e colonizam todo o inseto ramificando-se e produzindo corpos hifais (4). Por ações de supressão do sistema imunológico, retarda a resposta imunológica do inseto à infecção, permitindo que o fungo se espalhe mais eficazmente. Após a morte do hospedeiro e em condições favoráveis de temperatura e umidade inicia-se a fase saprobiótica, hifas emergem sobre o cadáver e então novos conídios são formados (5). Esses podem contaminar e infectar outros insetos dando continuidade ao ciclo de vida do fungo (6) (BUTT *et al.*, 2016; MORA *et al.*, 2017).

**Fig. 3.** Ciclo de vida *Metarhizium humberi*. Fase patogênica: os conídios (C) entram em contato com a epicutícula do inseto, e inicia-se a etapa de adesão (1), C começam a germinar sobre a epicutícula formando o tubo germinativo (TG) e apressório (A) (2) que auxilia na penetração do fungo no corpo do inseto (3), dentro do inseto, o fungo começa a se multiplicar e crescer internamente ocasionando danos internos e consequentemente a morte do inseto (4). Fase saprobiótica: após a morte ocorre a esporulação e conidiogênese *post mortem* (5), por ações ambientais como o vento C se desprendem do corpo do inseto e se propagam pelo meio ambiente dando continuidade ao ciclo de vida do fungo (autoral).



### 2.2.2. *Metarhizium*

Fungos do gênero *Metarhizium*, ocorrem principalmente em solos, insetos e estabelecem relações de simbioses com plantas de forma facultativa (ZIMMERMANN, 2007; STONE; BIDOCHKA, 2020). O gênero *Metarhizium* é filamentososo com hifas hialinas e morfologicamente constituído por conídios de coloração esverdeada, geralmente cilíndricos ou ovais (ZIMMERMANN, 2007; BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009).

Muitas espécies de *Metarhizium* atualmente são descritas como integrantes dos complexos *M. anisopliae* ou *M. flavoviride* (KHONSANIT; MONGKOLSAMRIT, 2020). No Brasil, *M. anisopliae* é bastante empregado no controle biológico de insetos de importância agrícola (SCHOLTE *et al.*, 2004).

#### 2.2.2.1. *Metarhizium humberi*

Uma nova espécie do complexo *M. anisopliae* foi coletada pela primeira vez em 2001, em amostras de solo no Centro-Oeste do estado de Goiás (GO) (LUZ *et al.*, 2019). A espécie foi nomeada de *M. humberi*. Atualmente sabe-se que a espécie é comum em solos do Brasil e México, e foi isolada de insetos de ordens Coleoptera, Hemiptera e Lepidoptera (LUZ *et al.*, 2019). Pesquisadores demonstraram o potencial dessa espécie

no controle de *A. aegypti*, com alta atividade inseticida em ovos, larvas e adultos deste vetor (LUZ *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2019).

### **2.3. Produção e formulação de fungos entomopatogênicos**

Conídios de fungos entomopatogênicos podem ser produzidos em laboratório onde os propágulos são cultivados em meios de cultura, e armazenados em condições adequadas e controladas de temperatura, umidade relativa e fotófase. No entanto, no meio ambiente, a temperatura, umidade relativa e radiação solar influenciam diretamente na virulência, germinação e conidiogênese *post mortem*, podendo afetar a sobrevivência e a taxa de infecção desses fungos (LUZ; FARGUES, 1997).

Formulações fúngicas são utilizadas a fim de superar fatores de estresse ambientais e aumentar a resistência e infectividade desses fungos no meio ambiente (CARREÑO, 2003). Em formulações, os conídios são misturados com um ou mais aditivos líquidos como; água, óleo puro ou emulsões óleo-água, ou sólidos na forma de pós, e granulados de diferentes tamanhos (BURGUES, 1998).

Formulados secos constituídos de conídios, são capazes de proteger os conídios, além de facilitarem sua aplicação e ainda estabilizam a formulação durante o processo de armazenamento (FARIA; WRAIGHT, 2007). Estudos com a utilização de pós eletrostáticos como o Entostat, comprovaram que foram eficientes na entrega de feromônios para técnicas de auto-confusão e ruptura de acasalamento em pragas de armazenamento (BARTON *et al.*, 2006; ATHANASSIOU, 2016; ATHANASSIOU, 2017). Partículas com cargas eletrostáticas em pó agem como transportadores de conídios para a cutícula que acumula cargas elétricas durante o tempo de voo e/ou ao entrar em contato com uma superfície (EDWARDS, 1962).

#### **2.3.1. Pó de cera de carnaúba**

O pó de cera de carnaúba é eletrostático extraído da folha da palmeira *Copernicia prunifera*, uma planta nativa do Brasil. O potencial do pó como aditivo em formulações fúngicas secas ainda é pouco estudado. Trabalhos avaliando formulações de conídios com o pó de cera de carnaúba, demonstraram que o mesmo é um carreador potencialmente viável de entrega de fungos entomopatogênicos (ATHANASSIOU *et al.*, 2017; MUNIZ *et al.*, 2020).

MUNIZ *et al.*, (2020) testaram uma formulação com de pó de cera de carnaúba, para aumentar a atividade inseticida de fungos *Beauveria bassiana*, *Beauveria*

*pseudobassiana* e *Akanthomyces muscarius* em moscas adultas *Lucilia sericata*. Os tratamentos com conídios de *B. bassiana* e *A. muscarius* formulados com o pó de cera de carnaúba, exibiram um maior desempenho inseticida. O pó foi capaz de aumentar a taxa de infecção de insetos pelos conídios. Além disso, o pó de cera de carnaúba não afetou negativamente a viabilidade dos conídios dos fungos entomopatogênicos testados. Os autores concluíram que a cera de carnaúba pode ser uma opção promissora para melhorar a eficácia de fungos entomopatogênicos no controle de insetos pragas, como a mosca varejeira.

### **2.3.2. Terra diatomácea**

Terra diatomácea é um aditivo em pó composto por diatomáceas, uma espécie de alga com parede celular de sílica (LORINI *et al.*, 1999). Apresenta propriedade abrasiva e, após contato com a cutícula do inseto pode levar à danificação da cutícula. As moléculas de cera da camada superficial da epicutícula são adsorvidas pelas partículas de sílica da terra diatomácea, formando então pequenos canais que permitem a evaporação de água e conseqüentemente a desidratação do inseto, levando a morte (FERREIRA *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2008; ATHANASSIOU; STEENBERG, 2007; BATTA., 2008).

ATHANASSIOU *et al.* (2014) avaliaram efeito inseticida de duas formulações de terra diatomácea contra os besouros *Sitophilus oryzae* e *Rhizopertha dominica* de grãos de trigos armazenados. Os resultados mostraram que ambas as formulações de terra diatomácea foram eficazes no controle dessas pragas de grãos armazenados, com mortalidade superior a 90% após 14 d de exposição.

A terra diatomácea também pode ser utilizada como aditivo em formulações fúngicas para controle biológico de insetos de importância médica (RODRIGUES *et al.*, 2019). Um estudo de laboratório realizado por RODRIGUES *et al.*, (2019) avaliou a eficácia da combinação de terra diatomácea, óleo vegetal ou mineral e *M. anisopliae* contra adultos de *A. aegypti*. Os resultados mostraram que a formulação reduziu a sobrevivência dos adultos, com maior mortalidade do que apenas o uso isolado de *M. anisopliae* e terra diatomácea.

### **2.3.4. Aplicação de fungos entomopatogênicos**

Métodos de aplicação para o hospedeiro alvo são fatores decisivos para o sucesso dos resultados de infecção por fungos entomopatogênicos (FARIA; WRAIGHT, 2007). A estratégia de aplicação de formulações fúngicas depende do vetor alvo. A aplicação

direta de conídios sobre um inseto gera uma maior contaminação quantitativa comparada com a aplicação indireta, em que os conídios são aplicados sobre uma superfície na qual o inseto posteriormente entra em contato (LUZ; BATAGIN, 2005). Métodos de aplicação indireta de conídios são mais realísticos para infectar adultos no campo, onde a pulverização direta de uma formulação parece inviável.

Os adultos de *A. aegypti* procuram locais atrativos para oviposição e repouso (BRAGA; VALLE, 2007). Com isso dispositivos que simulam criadouros e que atraem tanto fêmeas como machos de *A. aegypti* têm potencial para controle focal desse vetor com fungos entomopatogênicos (MARTINEZ *et al.*, 2021). Esses dispositivos possuem substâncias atrativas que direcionam os adultos para um local, e esses entram em contato com uma superfície tratada com o fungo, e se contaminam com conídios. Os adultos contaminados carregam os conídios para outros locais, e podem dar continuidade ao ciclo de contaminação. Esta estratégia permite o controle do vetor em áreas domiciliares e peridomiciliares.

### 3. Justificativa

---

A prevenção e controle das arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti* representam desafios significativos para as autoridades de saúde pública global (WHO, 2023). Entre as estratégias utilizadas para reduzir as populações de mosquitos adultos em áreas urbanas, destaca-se o controle químico (VARGAS *et al.*, 2022). No entanto, a utilização inadequada de inseticidas tem resultado na seleção de populações de vetores resistentes e na diminuição da eficácia dessas medidas de controle (SMITH *et al.*, 2016). Além disso, é importante ressaltar que os inseticidas possuem efeitos tóxicos não apenas para os vetores, mas também para outros organismos vivos (BARRETO, 2005; VARGAS *et al.*, 2022). Nesse contexto, a busca por alternativas mais eficazes e menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente se torna fundamental. Como por exemplo, o uso de formulações com *M. humberi* IP 46 não apresenta riscos à saúde humana e tem se mostrado eficaz contra *A. aegypti* (RODRIGUES *et al.*, 2019).

A inclusão de aditivos nas formulações tem o objetivo de potencializar o efeito inseticida de conídios de *M. humberi* no vetor. O emprego de pó de cera de carnaúba e terra diatomácea em combinação com os conídios de *M. humberi* representa uma abordagem inovadora. Acredita-se que o pó de cera de carnaúba possa aumentar o contato de conídios com a cutícula lipofílica do vetor, melhorando a eficácia da contaminação fúngica. Além disso, a terra diatomácea pode induzir estresse na epicutícula do vetor, tornando-o mais suscetível à infecção e favorecendo a contaminação, uma vez que o mosquito pode tentar remover a formulação.

A adaptação dessa formulação para um dispositivo de disseminação focal demonstra um comprometimento em desenvolver novas estratégias de controle do vetor. Os conhecimentos resultantes da combinação dos aditivos pó de cera de carnaúba e terra diatomácea com conídios de *M. humberi* podem representar um avanço importante no desenvolvimento de uma formulação seca para controle biológico de *A. aegypti*.

## 4. Objetivos

---

### 4.1. Objetivo geral

contribuir para o desenvolvimento de uma formulação seca com conídios de *M. humberi*, pó de cera de carnaúba e terra diatomácea para controle focal de adultos de *A. aegypti*

### 4.2. Objetivos específicos

Avaliar:

- efeito tóxico de cera de carnaúba (laboratório *in vitro*; germinação)
- efeito repelente de cera de carnaúba (semi-laboratório, semi-campo, campo, *in vivo*; oviposição)
- efeito adulticida de conídios formulados ou não com cera de carnaúba e/ou terra diatomácea (laboratório, semi-campo *in vivo*; mortalidade)
- efeito da formulação fúngica na conidiogênese *post mortem* (laboratório, semi-campo; número de conídios em adultos mortos)

## 5. Materiais e métodos

---

### 5.1. Condições dos testes

Dois diferentes dispositivos foram utilizados para desenvolver os testes: um copo de plástico polipropileno transparente para testes exclusivamente em condições de laboratório e um dispositivo de disseminação para testes de laboratório, semi-campo e campo.

#### 5.1.1. Testes em laboratório

Os experimentos foram executados no Laboratório de Patologia de Invertebrados (LPI) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO.

##### 5.1.1.1. Testes *in vivo* em semi-laboratório

Testes com dispositivo de disseminação foram executados em gaiolas teladas (80 cm de largura, 80 cm de altura, 60 cm de comprimento) (Fig. 4). Antes de cada teste, as gaiolas foram limpas com álcool 70% e solução de hipoclorito a 3%. A limpeza foi realizada 48 h antes de iniciar e no final de cada teste.

**Fig. 4.** Dispositivo de disseminação em gaiola telada; tira de papel de filtro ajustada em um frasco (20 mL) (a) preenchido com solução aquosa de sacarose a 10% previamente esterilizada (15 mL) para a alimentação dos adultos de *Aedes aegypti*.



### 5.1.2. Testes em semi-campo

Foram realizados testes com dispositivos de disseminação (Fig. 5) em condições de semi-campo. Para isso foi utilizada uma área simulada de peridomicílio localizada em área urbana no Campus I Colemar Natal e Silva da UFG na cidade de Goiânia, Goiás. A área possui em sua estrutura 5 m de comprimento, 9 m de largura, 3 m de altura dividida em três compartimentos com 12 m<sup>2</sup> de superfície cada e uma antecâmara de 9 m<sup>2</sup> (Fig. 5). O teto foi feito com telhas metálicas, as paredes de cada sala foram separadas por uma malha metálica fina que permite a livre circulação de ar e impede a fuga de mosquitos. Cada sala tem uma porta metálica para entrada e saída de equipamentos de pesquisa. Na parte externa esquerda e direita da área foram penduradas malhas de policarbonato para proteger os mosquitos do sol e da chuva (Fig. 5). Em cada sala foram pendurados três tecidos (1 m<sup>2</sup>) de cor preta para esconderijo ou lugar de descanso para adultos (Fig. 5). Antes de cada teste, todas as salas foram limpas com auxílio de um aspirador elétrico (Midea Petit VCA35, Midea, Uberlândia, Brasil) e uma lavadora de alta pressão (PowerWash Eco EWS30, Electrolux, Curitiba, Brasil) para água. Seguido de lavagem com solução de água com sabão, e posteriormente solução de hipoclorito a 3%.

**Fig. 5.** Área de peridomicílio simulado para testes em condições de semi-campo; tecidos pendurados em cada sala para descanso de mosquitos (a); dispositivo de disseminação no chão da sala da área (b).



### 5.1.3. Testes em campo

Os testes de campo foram executados no Centro Brasil entre dezembro de 2022 a abril de 2023 (estação chuvosa) e junho a agosto de 2023 (estação seca). Em residências na cidade de Goiânia, nos setores Leste Universitário, Leste Vila Nova e Jardim Brasil (Fig. 6). Foram realizadas visitas em cada residência pela equipe de pesquisa para confirmar a presença de adultos *Aedes* sp.

**Fig. 6.** Locais (1: Leste Vila Nova, 2: Jardim Brasil, 3 e 4: Leste Universitário) de cada residência com dispositivo de disseminação contendo pó de cera de carnaúba com terra diatomácea e controle.

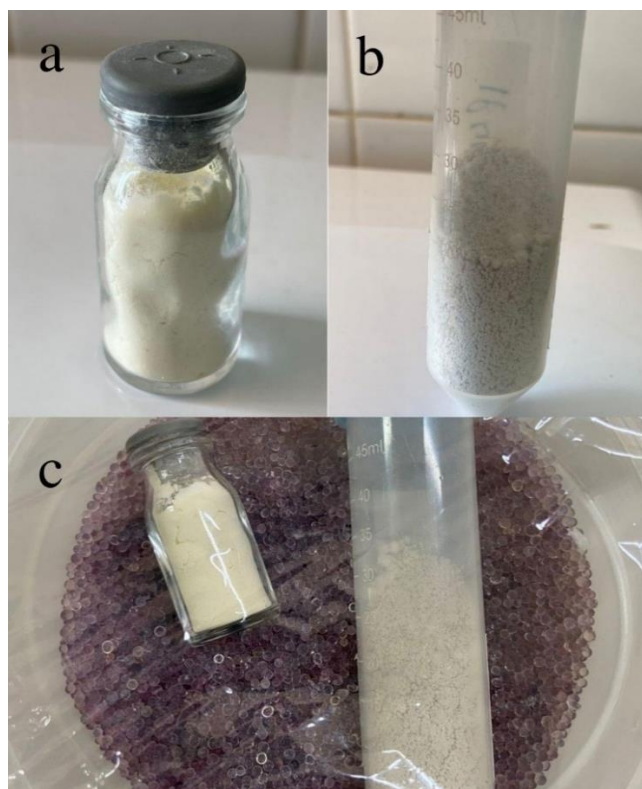


## 5.2. Preparação de pós e formulados

O pó micronizado de cera de carnaúba (CC) (PVP Sociedade Anônima, Parnaíba, Brasil) (Fig. 7a) foi liofilizado (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia/UFG FARMATEC, Goiânia, Brasil). A terra diatomácea (TD) (GPD Vet Química, Passo Fundo, Brasil) (Fig. 7b) foi autoclavada antes dos testes. Os pós foram mantidos em dessecadora sobre sílica gel a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5 d (Fig. 7c).

Três formulações em pó foram ajustadas em: (I) conídios com cera de carnaúba em uma proporção de ( $10^7$  conídios/2 mg de CC), (II) conídios com terra diatomácea ( $10^7$  conídios/0,5 mg de TD) e (III) conídios com cera de carnaúba e terra diatomácea ( $10^7$  conídios/2 mg de CC + 0,5 mg de TD).

**Fig. 7.** Pó micronizado e liofilizado de cera de carnaúba (a); terra diatomácea autoclavada (b); pó de cera de carnaúba e terra diatomácea armazenados sobre sílica gel (c).



### 5.3 Preparação de meios

#### 5.3.1. Sabouraud, Dextrose e Ágar

O meio SDAL (Sabouraud, Dextrose e Ágar acrescido com extrato de levedura) foi preparado com 2,5 g/L de peptona (Kasvi, Curitiba, Brasil,), 2,5 g/L de extrato de levedura (Sigma Aldrich, San Louis, EUA), 10 g/L de dextrose (Neon, São Paulo, Brasil), 15 g/L de ágar-ágar, 0,5 g/L de cloranfenicol (Sigma Aldrich, San Louis, EUA) e 0,004 g/L de tiabendazol (Nortec, Quimica, Duque de Caixas, Brasil).

#### 5.3.1. Ágar-água

O meio ágar-água (AA: 10 g/L de ágar) foi preparado com 0,5 g/L de cloranfenicol, 0,004 g/L de tiabendazol e 0,010 g/L de cristal violeta (Cromato Produtos Químicos, São Paulo, Brasil). Tiabendazol e clorafenicol foram dissolvidos separadamente em 1 mL de etanol absoluto.

#### **5.3.4. Batata, Dextrose e Ágar**

O meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar 49 g/L, Kasvi, Curitiba, Brasil) foi acrescido de 2,5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar-ágar (BDAL).

Todos os meios foram preparados com água destilada aquecida (50°C), agitados com agitador magnético por 2 min à rotação de 500 rpm, posteriormente autoclavados, distribuídos em placas de Petri (6 cm x 1,5 cm) estéreis, e as placas armazenadas a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  até a utilização.

#### **5.4. Origem, cultura e preparação de *Metarhizium humberi***

A linhagem de *M. humberi* IP 46 foi isolada de uma amostra de solo coletada no Cerrado na região central do Brasil em 2001 e está armazenada na coleção de fungos do IPTSP. Foi depositada como CG 620 na Coleção de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (LUZ *et al.*, 2019). Foi cultivada como descrito por RODRIGUES *et al.* (2019), em placas de Petri (100 mm x 20 mm) sobre meio BDAL a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 10\%$  UR e fotofase de 12 h durante 15 d.

Conídios foram raspados da cultura com o auxílio de uma espátula, transferidos para uma placa de Petri e colocados para secagem em dessecadora com sílica gel a  $4^\circ\text{C}$  por 5 d, e então homogeneizados com uma barra de vidro estéril. Para a determinação da relação número de conídios/peso, aproximadamente 5 mg de conídios secos foram pesados e suspensos em 1 mL de Tween 80 (monoleato de polioxietileno sorbitano, Sigma, Jurubatuba, Brasil) estéril a 0,01%. A suspensão foi agitada em vórtex durante 2 min, e o número de conídios foi determinado com base em contagens com hemocitômetro. No início de cada teste, a viabilidade dos conídios (> 95% de germinação) foi verificada com a inoculação de 50  $\mu\text{L}$  de suspensão ( $10^6$  conídios/mL) em meio SDAL, e incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $75 \pm 5\%$  e 12 h de fotofase por 24 h. A germinação foi examinada com microscópio de contraste de fase (Leica 020- 518.500 DM/L5, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha.). Para cada teste foram cultivados e preparados novos lotes de conídios e em seguida utilizados. Os conídios que sobraram de cada lote foram devidamente descartados

### 5.5. Origem, manutenção e preparação de *Aedes aegypti*

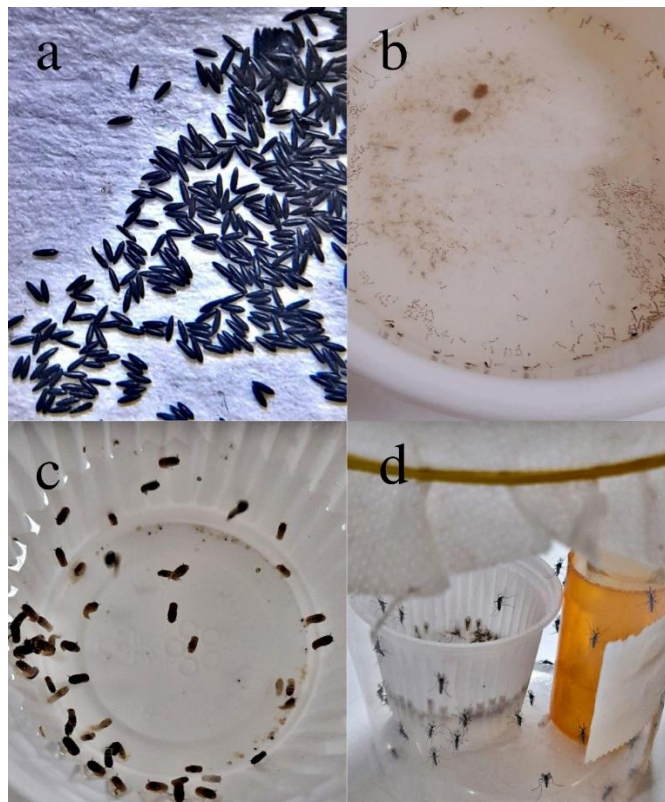
A colônia de *A. aegypti* originou-se de ovos coletados com ovitrampa em Goiânia, Brasil, em 2012, e é mantida no LPI do IPTSP da UFG a  $27 \pm 5^\circ\text{C}$ , umidade relativa (UR) de  $75 \pm 10\%$  e fotofase natural. Os adultos foram mantidos em gaiola telada (50 cm de altura, 40 cm de largura e 50 cm de profundidade) e alimentados *ad libitum* com solução aquosa de sacarose a 10% em frasco (10 mL) com papel filtro. As fêmeas foram alimentadas duas vezes por semana em camundongos seguindo o método descrito por LIMA *et al.* (2009), esta técnica foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG, Goiânia (CEUA 050/20).

Para oviposição foi colocado dentro da gaiola um frasco âmbar (150 mL) contendo água (100 mL) e papel filtro (15 cm de diâmetro, 7 cm de comprimento). Duas vezes por semana, o papel filtro foi retirado e substituído. O papel filtro com ovos foi transferido para câmara úmida ( $27 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e incubado por três d para completar o processo da embriogênese. Posteriormente, foi colocado para secar e estocado em caixa plástica (12 cm de altura, 26 cm de largura e 33 cm de profundidade) à temperatura e umidade ambiente.

Para a manutenção da colônia e produção de adultos para experimentos, papéis filtro com ovos foram colocados em recipiente contendo 1.500 mL de água de torneira ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) para estimular a eclosão de larvas (Fig. 8a). As larvas foram alimentadas com ração seca triturada para gato (Black Jack; Alisul Alimentos S.A., São Leopoldo, Brasil) (Fig. 8b) até atingirem o estágio de pupa, e as pupas foram então transferidas com uma pipeta plástica (3 mL) para um copo plástico (50 mL) contendo água (30 mL). O copo com as pupas foi colocado dentro da gaiola telada para emergência de adultos (RODRIGUES *et al.* 2019).

Para os testes de laboratório e semi-campo, um copo com número adequado de pupas (Fig. 8c) foi colocado dentro de um recipiente plástico polipropileno transparente (500 mL) telado. Um número suficiente de adultos fêmeas e machos de 2 a 5 d após a emergência foram transferidos com aspirador entomológico de sucção bucal para outros recipientes plásticos telados (500 mL), com frasco âmbar (20 mL) contendo 15 mL de solução aquosa de sacarose a 10% e papel filtro (Fig. 8d). A cada 48 h as fêmeas foram alimentadas com sangue de camundongo como descrito anteriormente.

**Fig. 8** Criação de *Aedes aegypti* em laboratório: Papel filtro com ovos (a) foi colocado em bacia de plástico com água (b); as larvas foram alimentadas com ração para gato até a pupação (b); as pupas foram transferidas para copo plástico com água (c); o copo com as pupas foi colocado dentro de um recipiente plástico telado; e os adultos emergentes foram alimentados com solução de sacarose a 10% (d).



## 5.6. Preparação de dispositivos para os testes

### 5.6.1. Copo plástico

A superfície lateral interna de um copo de polipropileno transparente (Copocentro, Anápolis, Brasil, com área de superfície interna total de 253 cm<sup>2</sup>) foi asperizada com uma lixa (A-257, G220, Norton Saint-Gobain Abrasivos, Guarulhos, Brasil) (Fig. 9a). A alteração da textura da superfície permitiu uma melhor distribuição e adesão dos formulados em pó (RODRIGUES *et al.* 2019). Os formulados foram espalhados sobre a superfície lateral interna do dispositivo (Fig. 9b) com auxílio de um pincel (Mestre Tigre 25,4 mm, no 1, São Paulo, Brasil). Durante os testes o dispositivo de copo plástico foi telado para conter os adultos (Fig. 9c).

**Fig. 9.** Dispositivo copo de plástico transparente (200 mL) com a superfície lateral interna asperizada (a); formulação com conídios pó de cera de carnaúba e terra diatomácea espalhada sobre a superfície lateral interna do dispositivo (b). Dispositivo telado para evitar a fuga de adultos de *Aedes aegypti* durante os experimentos (c).



### 5.6.2. Dispositivo de disseminação

O dispositivo de disseminação foi constituído por um recipiente circular preto com 21 cm de altura, 22 cm de diâmetro superior e 13,5 cm de diâmetro inferior (MARTINEZ *et al.*, 2021). Possui um reservatório fechado para água (a), compartimento superior aberto (b). Reservatório e compartimento são separados por um prato com gel (c), três barbantes que conecta a água com o gel (d), tubo para preencher o compartimento inferior com água (e), e tampa (f). Tecido sintético preto (g) foi grampeado em um molde de carpete preto de polietileno PET (Ecotex, Inylbra, São Paulo, Brasil), a fim de permitir uma melhor sustentação do tecido no dispositivo de disseminação. Posteriormente, foram feitas incisões no compartimento superior do dispositivo (h), e o tecido com o carpete foi fixado nas incisões com clips para papel de aço galvanizado (11 x 32 mm, clips nº 5 ACC CX 100 un) (h). As formulações foram espalhadas sobre o tecido (g) com auxílio de um pincel.

**Fig. 10.** Dispositivo de disseminação, reservatório fechado para água (a), compartimento superior aberto (b), prato com gel (c), três barbantes (só um mostrado d) que conecta a água com o gel, tubo para preencher o reservatório (e), tampa (f) e compartimento onde é posto o tecido (g) tratado com formulação (i), incisão e fixação do tecido no compartimento superior do dispositivo (h).



### 5.6.3 Origem do gel e preparação da infusão

Um gel hidrotentor (Copolímero Poliacrílico de Potássio Poliacramida, Forth TecNutri, São Paulo, Brasil) foi preparado seguindo o método descrito por MARTINEZ *et al.* (2021). Foi acrescentado ao gel uma infusão de folhas de bambu (*Bambusa vulgaris vittata*, Poaceae), a infusão foi preparada com folhas cortadas em seções de 4 cm e secas em estufa por 24 h a 40°C. Após a secagem, 10 g de folhas foram colocadas em garrafa plástica contendo 1 L de água de torneira por 15 d para fermentação em temperatura ambiente como descrito por SANTANA *et al.* (2003).

### 5.7. Diferentes umidades relativas

Os testes *in vitro* e em laboratório foram realizados em diferentes umidades relativas; 43% UR (testes *in vitro*), 75% UR e > 98% UR (testes *in vitro* e laboratório). As umidades relativas foram controladas colocando 500 mL de solução saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de potássio; 43% UR), 500 mL de NaCl (cloreto de sódio; 75% UR) e 500 mL de água destilada em umidade próxima a saturação superior à 98% (WINSTON *et al.*, 1960), em containers de plástico (Nitronplast, São Paulo, Brasil) separados e devidamente tampados a 25°C.

## **5.8. Testes em laboratório**

### **5.8.1. Testes *in vitro* com pó de cera de carnaúba, terra diatomácea e conídios**

Tubos falcon de 50 mL com formulações e controle só com conídios (pesados e preparados como descrito anteriormente no item 5.2 foram agitados em vórtex durante 2 min, e armazenados à 25°C, 43% UR, 75% UR ou > 98% UR e fotofase de 12 h durante 14 d. Amostras das formulações correspondentes a 5 mg foram retiradas em tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 d de armazenamento, e suspensas em 1 mL de Tween 80 a 0,01% esterilizado.

Microtubos com suspensões foram agitados em vórtex durante 2 min e as suspensões foram ajustadas em 10<sup>6</sup> conídios/ml para quantificação da germinação. Foram inoculados 50 µl de cada suspensão em placas diferentes de meio SDAL, e as placas foram incubadas a 25°C, UR 75% e 12 h de fotofase por 24 h. A germinação foi avaliada com microscópio de contraste de fase, e os conídios germinados ou não foram quantificados, contando 100 conídios em 4 áreas da placa. Os conídios foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo excedia o diâmetro do conídio (RODRIGUES *et al.* 2019).

### 5.8.2. Testes *in vivo* em laboratório

Em testes com dispositivos de copos plásticos correspondentes (I) CC, (II) TD, (III) CC+TD, (IV) controle sem conídios e aditivos, (V) C, (VI) C+CC, (VII) C+TD e (VIII) C+CC+TD. Dez adultos foram transferidos para cada copo tratado com o auxílio de um capturador de Castro, e expostos a aditivos e/ou conídios por 60 minutos em temperatura e UR ambiente. Em seguida, transferidos para copos telados sem tratamento contendo um frasco de vidro (20 mL) com (15 mL) de solução de sacarose a 10% previamente esterilizada e papel filtro para alimentação *ad libitum* dos adultos. Os copos com adultos foram incubados a 25°C, fotofase de 12 h e 75% UR ou >98% UR. A mortalidade foi monitorada diariamente por um período de 15 d. Os adultos mortos foram retirados e incubados em meio AA com cristal violeta á 25°C, >98% UR e fotofase de 12 h. A conidiogênese semiquantitativa *post mortem* foi verificada diariamente por 10 d. Os adultos mortos foram então transferidos individualmente para tubos com 1 mL de 0,01% Tween 80 e agitados em vórtex durante 3 min. As suspensões de conídios foram diluídas conforme necessário, e o número total de conídios determinado com base em contagem com hemocitômetro.

### 5.8.3. Testes *in vivo* em semi-laboratório

Dispositivos de disseminação com e sem conídios correspondentes aos aditivos (I) CC, (II) TD, (III) CC+TD e (IV) grupo controle sem conídios e aditivos foram colocados separadamente em gaiolas teladas (Fig. 4). Adultos, 30 machos, e 30 fêmeas previamente alimentados com sangue conforme mencionado anteriormente (item 5.5), foram liberados em cada gaiola. Diariamente, por um período de 15 d os adultos alimentavam-se *ad libitum* com solução de sacarose a 10%. Os mosquitos mortos foram colocados sobre meio (AA) e incubados a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  UR e 12 h de fotofase por 10 d. Ao final do experimento os mosquitos vivos foram capturados com auxílio de um aspirador (Dustbustert, Lithium 14.4 Wh, Stanley Black + Decker, Idstein, Alemanha) colocados sobre meio (AA) até a morte e observados em estereomicroscópio (40x; Leica DMLS IV/00, Leica Microsystems, São Paulo, Brasil) para análise qualitativa e quantificação quantitativa de crescimento de micélio e conídios sobre os cadáveres. Os ovos postos no gel e no tecido dos dispositivos foram quantificados seguindo o método descrito por MARTINEZ *et al.* (2021).

## 5.9. Testes em semi-campo

Para testes de semi-campo foram colocados no chão, um dispositivo de disseminação com a formulação (I) C+CC+TD em uma sala da estufa, (II) C em uma segunda sala e um dispositivo (III) controle em terceira sala. Adultos, 100 machos e 100 fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue conforme mencionado anteriormente, foram liberados em cada sala. Diariamente por um período de 15 d os mosquitos mortos foram coletados, quantificados e processados em meio (AA). No décimo quinto dia, os mosquitos vivos nas salas foram capturados com o auxílio de um aspirador e colocados sobre meio AA até a morte, para quantificação de conídios sobre os cadáveres. Os dispositivos foram retirados das salas para quantificação de ovos no tecido e no gel seguindo o método descrito por MARTINEZ *et al.* (2021).

## 5.10. Testes em campo

Para os testes de campo foram colocados no chão de cada local (Fig. 6) protegidos de sol e da chuva dois dispositivos (I) controle e (II) CC+TD. Semanalmente os géis e tecidos com os aditivos eram substituídos por novos, e levados ao laboratório para contagem de ovos conforme descrito por MARTINEZ *et al.* (2021). Dez por cento dos ovos retirados dos géis e tecidos foram estocados em câmara úmida. Posteriormente submergidos em copos com água a (36°C) para estimular a eclosão das larvas, que foram alimentadas com ração para gato até fase de pupa. As pupas foram separadas, e adultos emergidos foram identificados de acordo com RUEDA (2004).

## 5.11. Análise estatística dos dados

Os dados das variáveis dependentes (germinação, mortalidade e oviposição) foram examinados com análise de variância (ANOVA) e teste múltiplo de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK) (Statística 7.1; StatSoft, Tulsa, EUA). Para determinar o efeito das variáveis independentes (tempo, umidade relativa, formulação) sobre as variáveis dependentes, as médias foram consideradas significativamente diferentes quando o valor de  $P < 0,05\%$ . O tempo letal para matar 50% e 90% e seus intervalos de confiança (IC 95%), foi calculado com análise Wolfram Mathematica 7 for Students.

## 6. Resultados

### 6.1. Germinação *in vitro* de conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 com os aditivos

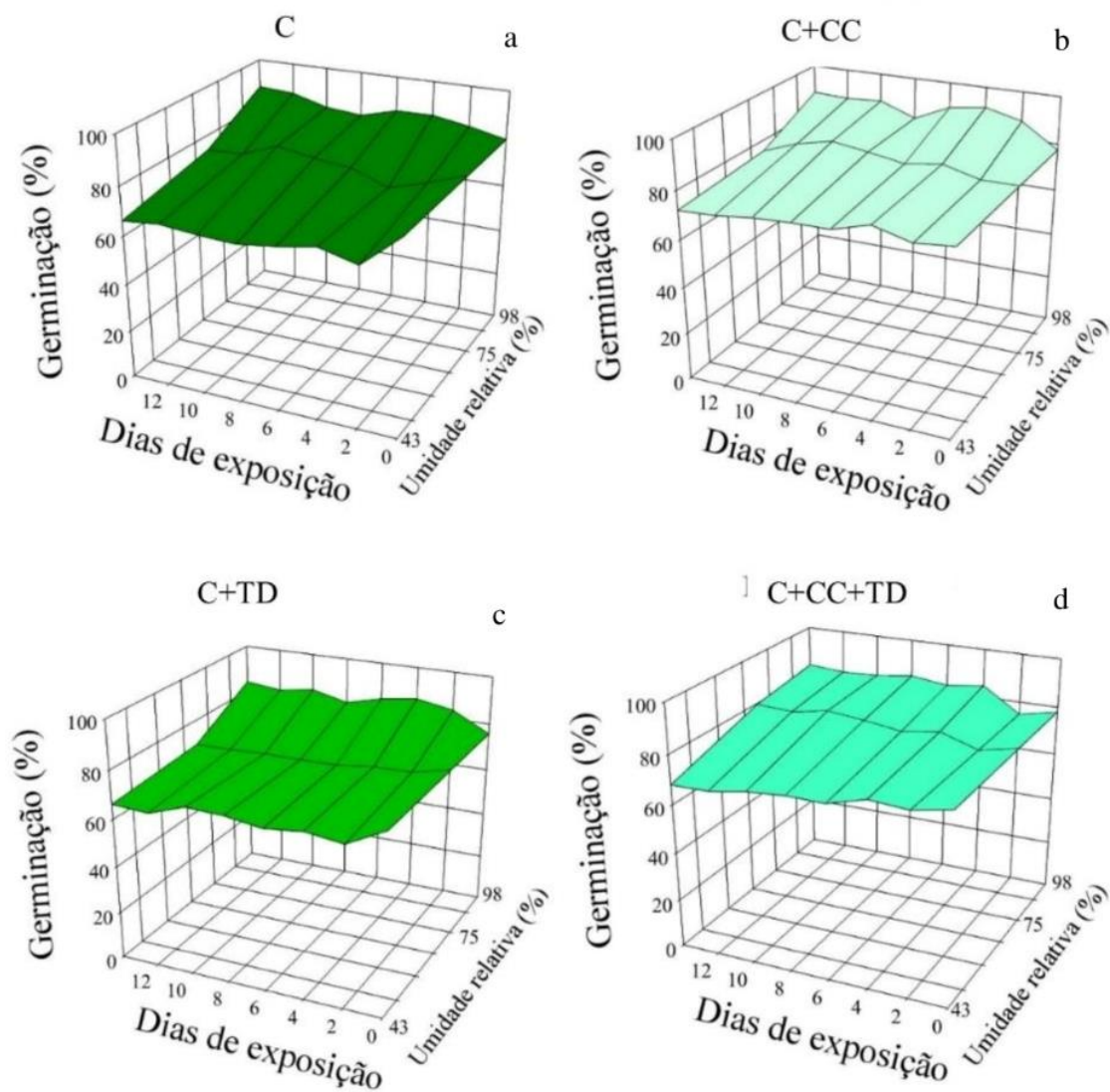
Os testes *in vitro* realizados para avaliar os efeitos dos aditivos pó de cera de carnaúba (CC) e terra diatomácea (TD) em formulações com conídios (C) de *M. humberi*, demonstraram que tanto o CC quanto a TD não apresentaram efeitos fungiestáticos, ou seja, não inibiram a germinação e, não ocasionaram a morte de C (efeitos fungicidas).

A influência das diferentes umidades relativas (UR) (43%, 75% e > 98%) foi comprovada. Independentemente da presença de CC e/ou TD, as UR tiveram efeito significativo na média de germinação de C ( $F_{2,21} = 35$  e  $P < 0,001$ , Fig. 12).

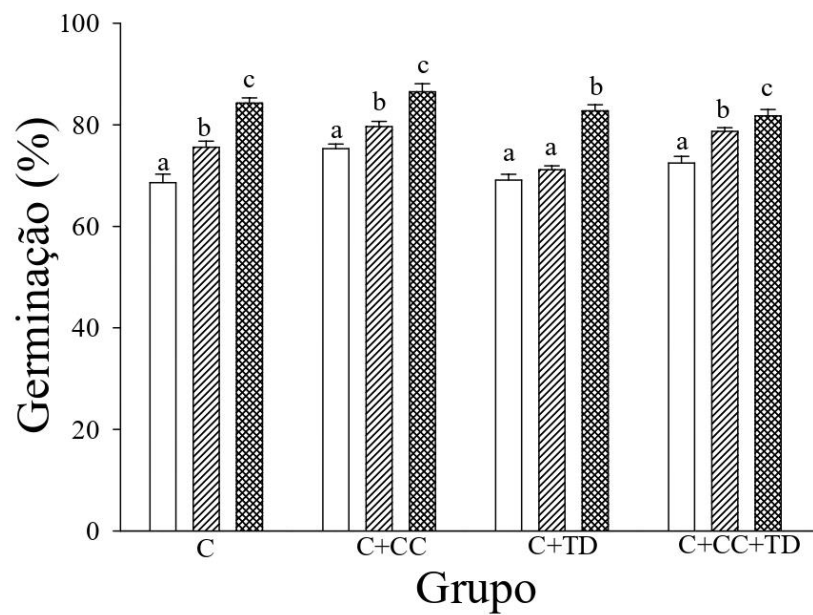
Nas condições de 43% UR e > 98% UR, a germinação foi maior no grupo C+CC quando comparada com as outros grupos testados ( $C+CC > C+CC+TD > C+TD > C$ , Fig. 12) ( $F_{2,21} = 22,5$  e  $P < 0,001$ ). CC não afetou a germinação dos conídios nessas condições. Em 75% UR o grupo C+TD apresentou uma média de germinação inferior em relação aos outros grupos (Fig. 12).

O tempo de exposição não teve impacto significativo na média de germinação para todos os grupos avaliados ( $F_{14,96} \leq 1,45$  e  $P \geq 0,14$ , Fig. 11). Durante o período testado, os grupos mantiveram uma consistência em relação à germinação de C, independentemente do tempo de exposição (Fig. 11).

**Fig. 11.** Germinação média (%) de conídios de *Metarhizium humberi* IP 46, 24 h após incubação sobre meio SDAL a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotófase. Anteriormente, os conídios [C] (5 mg) foram colocados em microtubos sem aditivos (a) ou misturados com cera micronizada de carnaúba [CC] seguindo a proporção de (a cada 2 mg de CC tinha  $10^7$  C, e volume final de 5 mg) (b), terra diatomácea [TD] (a cada 0,5 mg de TD tinha  $10^7$  C, volume final de 5 mg) (c) ou os dois aditivos (a cada 2 mg de CC, e 0,5 mg de TD tinha  $10^7$  C, volume final de 5 mg) (d) a 43%, 75% ou > 98% umidade relativa,  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotófase até 14 dias (quatro repetições independentes).



**Fig. 12.** Germinação média (%)  $\pm$  erro padrão da média de conídios de *Metarhizium humberi* IP 46, 24 h após incubação sobre meio SDAL a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotófase. Anteriormente, os conídios [C] (5 mg) foram colocados em microtubos sem aditivos ou misturados com cera micronizada de carnaúba [C+CC] (a cada 2 mg de CC tinha  $10^7$  C, e volume final de 5 mg), terra diatomácea [TD] (a cada 0,5 mg de TD tinha  $10^7$  C, volume final de 5 mg) ou os dois aditivos [C+CC+TD] (a cada 2 mg de CC, e 0,5 mg de TD tinha  $10^7$  C, volume final de 5 mg), agitados e incubados a 43%  $\square$ , 75%  $\text{▨}$  ou  $\text{▩}$  > 98% de umidade relativa,  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotófase até 14 dias. Os valores (quatro repetições independentes) dentro do mesmo grupo (C; C+CC; C+TD; C+CC+TD) com letras diferentes (a–c) foram significativamente diferentes (ANOVA  $F_{2,21} \geq 18,2$  e  $P \leq 0,001$ ).

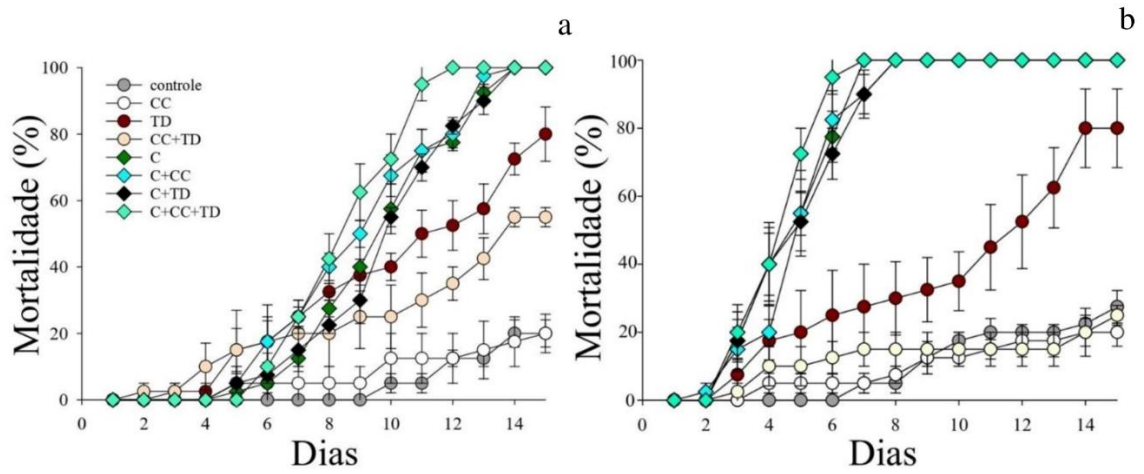


## 6.2. Atividade adulticida em condições de laboratório

A 75% UR, 10 dias após a exposição, observou-se uma mortalidade de  $58 \pm 0,9\%$  no grupo C (Fig. 13a, Tab. 1). Para os grupos de C formulados com CC e TD, a mortalidade foi de  $68 \pm 0,4\%$  e  $55 \pm 0,2\%$ , respectivamente (Fig. 13a, Tab. 1). O grupo C+CC+TD apresentou uma mortalidade ainda maior, atingindo  $73 \pm 0,7\%$  (Fig. 13a). Comparativamente, o controle sem aditivos a mortalidade foi de  $5 \pm 0,2\%$ , enquanto os grupos com aditivos apresentaram mortalidade inferior a  $40 \pm 0,4\%$  (Fig. 13a). A análise do tempo letal para matar 50% ( $TL_{50}$ ) e 90% ( $TL_{90}$ ) dos indivíduos expostos a C e incubados a 75% UR foram de 9,6 d e 13,6 d, respectivamente (Tab. 1). Já para a formulação C+CC+TD, os valores foram reduzidos para 8,3 d e 10,8 d (Tab. 1). Além disso, a análise revelou que houve diferença significativa em  $TL_{90}$  entre os grupos, com C+CC+TD apresentando valor inferior comparado aos grupos C+CC, C+TD e C (Tab. 1).

Em condições de  $> 98\%$  UR, tanto o grupo C quanto os grupos formulados atingiram uma mortalidade de 100% no 10º dia (Fig. 13b). O controle apresentou uma mortalidade de  $17 \pm 0,2\%$ , que foi superior ao grupo CC ( $15 \pm 0,5\%$ ) (Fig. 13b, Tab. 1). As formulações que continham TD e CC+TD a mortalidade foi de  $32 \pm 0,9\%$  e  $15 \pm 0,5\%$ , respectivamente (Fig. 13b, Tab. 1). Não foi observado diferença significativa no tempo letal entre os grupos, com  $TL_{50}$  e  $TL_{90}$  para C a 4,6 d e 7 d, e para C+CC+TD de 4,1 d e 5,7 d (Tab. 1).

**Fig. 13.** Mortalidade relativa acumulada média  $\pm$  erro padrão da média de adultos de *Aedes aegypti* [incubados a 75% (a) e >98% (b) de umidade relativa,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e 12 h de fotófase por 15 d]. Anteriormente, dez adultos foram expostos durante 1 h em copo plástico, não tratado (controle) ou tratado com cera micronizada de carnaúba [CC] ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) e/ou terra diatomácea [TD] ( $0,5 \text{ mg/cm}^2$ ) misturados ou não com conídios de *Metarhizium humberti* IP 46 [C] ( $10^7 \text{ C/cm}^2$ ) (quatro repetições independentes).



**Tab. 1** - Mortalidade relativa acumulada  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após 5, 10 e 15 d e tempo letal (dias) com seus respectivos intervalos de confiança (IC) para matar 50 e 90% (TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub>) de adultos de *Aedes aegypti* expostos a conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] ( $10^7$  conídios/cm<sup>2</sup>) formulados ou não com pó de cera de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e incubados a 25° C, umidade relativa de 75% ou >98% e fotofase de 12 h por até 15 d. Com os respectivos números de conídios por cadáveres de adultos expostos ou não a CC e TD. Os valores foram calculados com quatro repetições independentes dentro da mesma coluna (mortalidade e número de conídios com ANOVA e teste SNK; TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub> com análise de Probit em seu IC 95%). \* Valores insuficientes para calcular tempo letal

UR %	Grupo	Mortalidade (%) $\pm$ EPM			Tempo Letal (IC)			Número de conídios (x 10 <sup>6</sup> /cadáver)
		5° dia	10° dia	15° dia	TL <sub>50</sub>	TL <sub>90</sub>	Inclinação $\pm$ EPM	
75	Controle	0a	5 $\pm$ 0,2d	20 $\pm$ 0,5d	*	*	*	-
	CC	5 $\pm$ 0,5a	12 $\pm$ 0,7d	20 $\pm$ 0,2d	*	*	*	-
	TD	15 $\pm$ 0,6a	40 $\pm$ 0,4bc	80 $\pm$ 0,4b	11,1 (9–13,4)a	19,2 (16,4–24)c	0,1 $\pm$ 0,02	-
	CC+TD	15 $\pm$ 1,1a	25 $\pm$ 0,8cd	55 $\pm$ 0,2c	13,9 (11,1–17,9)b	24,1 (19,6–33,5)d	0,3 $\pm$ 0,12	-
	C	2,5 $\pm$ 0,2a	58 $\pm$ 0,9ab	100a	9,6 (8,6–10,7)a	13,6 (12,3–15,5)b	0,3 $\pm$ 0,04	6,06 $\pm$ 0,12a
	C+CC	5 $\pm$ 0,5a	68 $\pm$ 0,4a	100a	8,9 (7,1–10,7)a	12,9 (11–16,5)abc	0,3 $\pm$ 0,04	6,51 $\pm$ 0,24a
	C+TD	5 $\pm$ 0,3a	55 $\pm$ 0,2ab	100a	9,7 (8,8–10,7)a	13,3 (12,2–14,9)b	0,3 $\pm$ 0,04	6,95 $\pm$ 0,51a
	C+CC+TD	0a	73 $\pm$ 0,7a	100a	8,3 (7,7–8,9)a	10,8 (10–11,8)a	0,5 $\pm$ 0,4	6,17 $\pm$ 0,13a
	F <sub>7,24</sub>	1,1	15,5	81,3	-	-	-	F <sub>3,12</sub> 1,8
	P	0,36	< 0,001	< 0,001	-	-	-	P 0,2
> 98	controle	0b	17 $\pm$ 0,2c	27 $\pm$ 0,4b	*	*	*	-
	CC	5 $\pm$ 0,2b	13 $\pm$ 0,2c	20 $\pm$ 0,4b	*	*	*	-
	TD	20 $\pm$ 1,2b	32 $\pm$ 0,9b	80 $\pm$ 1,1b	10,7 (6,2–16,5)b	19,8 (14,7–36)b	0,1 $\pm$ 0,02	-
	CC+TD	10 $\pm$ 0,5b	15 $\pm$ 0,5c	25 $\pm$ 0,2b	*	*	*	-
	C	55 $\pm$ 0,6a	100a	100a	4,6 (3,9–5,3)a	7 (6,2–8,5)a	0,5 $\pm$ 0,09	6 $\pm$ 0,3a
	C+CC	55 $\pm$ 1,2a	100a	100a	4,8 (4,2–5,4)a	7,1 (6,4–8,1)a	0,5 $\pm$ 0,07	6,74 $\pm$ 0,08a
	C+TD	52 $\pm$ 0,8a	100a	100a	4,7 (4–5,3)a	7,2 (6,4–8,5)a	0,3 $\pm$ 0,04	6 $\pm$ 0,23a
	C+CC+TD	72 $\pm$ 0,7a	100a	100 <sup>a</sup>	4,1 (3,7–4,5)a	5,7 (5,2–6,4)a	0,7 $\pm$ 0,1	6,14 $\pm$ 0,23a
	F <sub>7,24</sub>	12	133,2	48,2	-	-	-	F <sub>3,12</sub> 2,4
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-	-	P 0,1

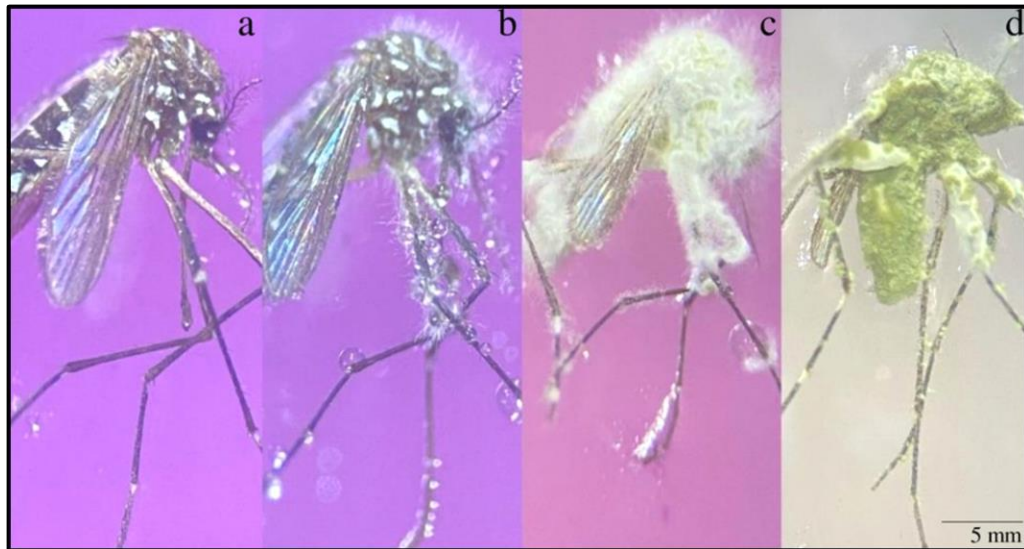
### 6.2.1. Número de conídios *post mortem* em adultos de *A. aegypti* após exposição á conídios e formulados

Nos resultados da incubação de adultos mortos, observou-se que hifas começaram a se desenvolver após 2 d de incubação em câmara úmida, independentemente do tipo de formulação e da UR em que os mosquitos foram previamente expostos (Fig. 14b). A formação de micélio foi observada de 3 a 5 d após a morte dos adultos (Fig. 14c). Os conídios, começaram a ser visíveis nos cadáveres a partir do 10º dia de incubação para todos os tratamentos avaliados (Fig. 14d)

Em mosquitos expostos exclusivamente a C, o número médio de conídios encontrados nos cadáveres após 10 d de incubação variou de  $6,06 \times 10^6 \pm 0,12 \times 10^6$  conídios/cadáver a  $6 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$  conídios/cadáver, para 75% e > 98% UR, respectivamente (Tab. 1). Para o grupo exposto a C+CC+TD, os valores foram de  $6,17 \times 10^6 \pm 0,13 \times 10^6$  conídios/cadáver (75% UR) e  $6,14 \times 10^6 \pm 0,23 \times 10^6$  conídios/cadáver (> 98% UR) (Tab. 1).

Sobre os cadáveres de adultos expostos à formulação C+CC+TD e incubados a 75% ou > 98% UR, houve um menor desenvolvimento de fungos contaminantes em comparação com os demais grupos. Mosquitos expostos apenas a CC e/ou TD, bem como no grupo controle, não foi observado o desenvolvimento do fungo *M. humberi*. A análise estatística não indicou diferença significativa no número de conídios por cadáver entre os diferentes tratamentos para ambas as umidades relativas testadas ( $F_{3,12} \leq 2,4$ ;  $P \geq 0,1$ ). As formulações e os aditivos não influenciaram de forma significativa a quantidade de conídios produzidos nos cadáveres dos mosquitos sob diferentes condições de umidade relativa.

**Fig. 14.** Desenvolvimento de *Metarhizium humberi* em cadáveres de *Aedes aegypti*. Adultos mortos foram colocados sobre meio ágar-água com cristal violeta e incubados a 25° C, > 98% UR e fotófase de 12 h. O crescimento semi-quantitativo de conídios foi analisado diariamente (a: 0 d, b: 2 d, c: 3 d, d: 10 d). Ampliação com estereomicroscópio (60x; Leica DMLS |V/00, Leica Microsystems, São Paulo, Brasil).



### 6.3. Efeito repelente em condições de semi-laboratório

#### 6.3.1 Efeito repelente e adulticida nos grupos controle e aditivos

O dispositivo contendo o aditivo CC apresentou a maior média de ovos depositados, totalizando  $352,5 \pm 55,8$  ovos ( $t = 3,4$ ;  $df = 6$ ;  $P = 0,014$ ) (Fig. 15a). Em comparação com os outros dispositivos testados. No dispositivo com aditivo TD a média foi de  $253 \pm 20,87$  ( $t = 2,1$ ;  $df = 6$ ;  $P = 0,07$ ) (Fig. 15b), indicando uma quantidade menor de ovos em relação ao dispositivo com CC. A combinação de CC+TD teve uma média de  $330,5 \pm 88,5$  ovos ( $t = 2$ ;  $df = 6$ ;  $P = 0,09$ ) (Fig. 15c). O dispositivo controle, que não continha os aditivos, apresentou uma média de  $184,2 \pm 27,5$  ovos sendo menor em comparação com os dispositivos que continham aditivos.

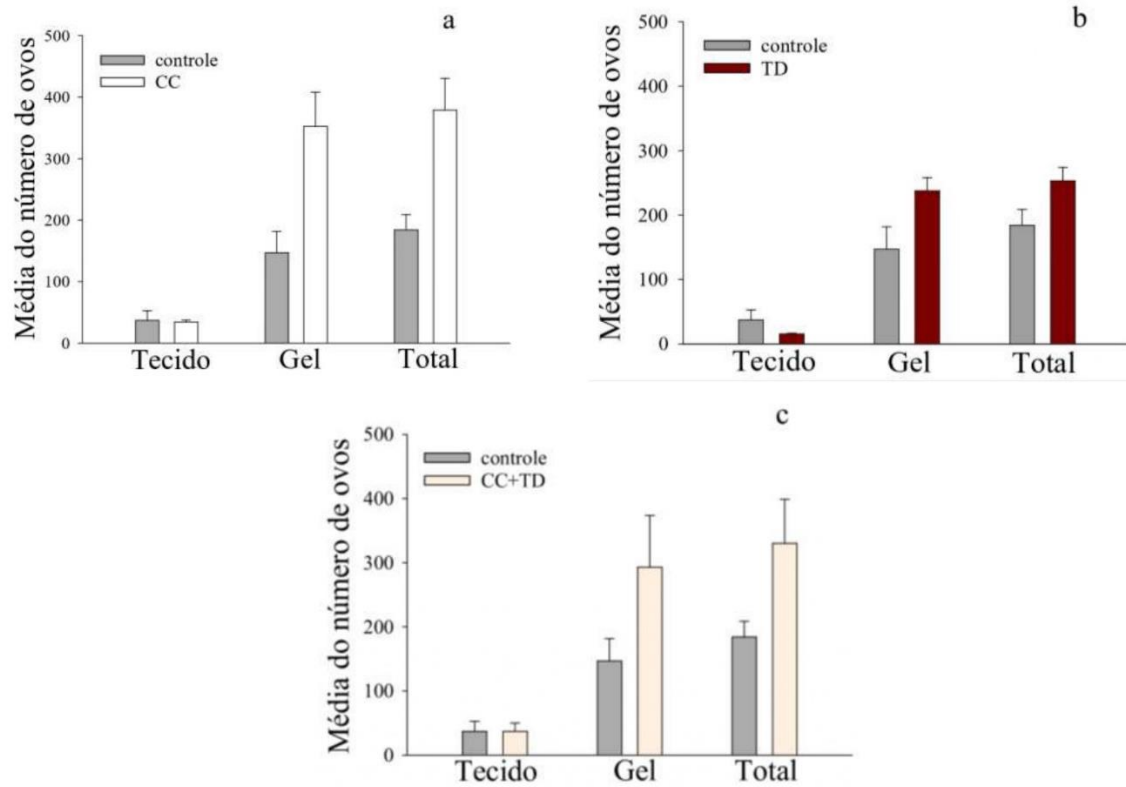
No grupo controle, a média de mortalidade dos adultos foi de  $5 \pm 1,7\%$  no 15º dia de exposição (Fig. 17a), para CC foi de  $5,2 \pm 0,7\%$  (Fig. 17a). Já no grupo tratado com TD, a média de mortalidade foi mais elevada, atingindo  $8 \pm 2,4\%$  (Fig. 17a). No grupo CC+TD a mortalidade foi de  $5,3 \pm 0,8\%$  (Fig. 17a). Não teve diferença significativa entre os grupos ( $F_{42,18} = 0,6$ ;  $P = 0,9$ ).

#### 6.3.2 Efeito repelente e adulticida nos grupos controle e conídios

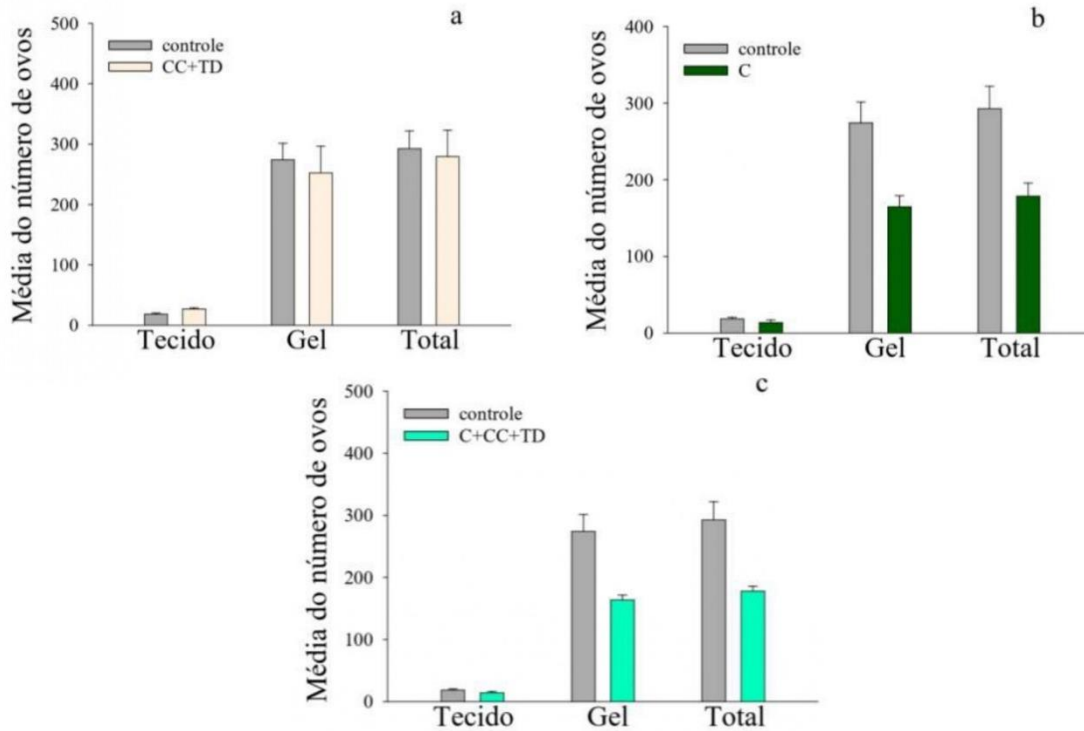
No dispositivo tratado apenas com C, a média do número total de ovos foi de  $178,5 \pm 17,2$  ovos (Fig. 16b). Para C+CC+TD, a média foi levemente inferior, totalizando  $178 \pm 7,7$  ovos (Fig. 16c). No grupo controle, a média do número total de ovos foi mais elevada, chegando a  $292,7 \pm 29,2$  ovos. No grupo que recebeu a combinação de CC+TD, a média foi de  $279,7 \pm 29,2$  ovos (Fig. 16a).

A média da mortalidade relativa?? de adultos de *A. aegypti* no grupo controle foi de  $13,8\% \pm 1$  no 15º dia. Nos grupos CC+TD, C e C+CC+TD as médias foram de  $25,6\% \pm 4$ ,  $56,1\% \pm 6,6$  e  $76,5\% \pm 1,4$ , respectivamente (Fig. 17b) sendo significativamente diferentes ( $F_{42,18} = 3,6$ ;  $P < 0,001$ ).

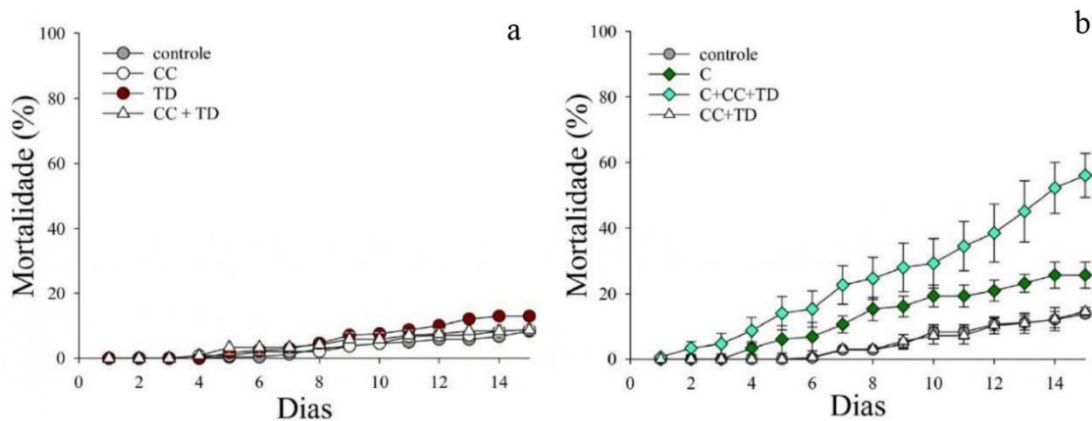
**Fig. 15.** Média do número de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por inicialmente 60 fêmeas de *Aedes aegypti* durante 15 d, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) misturados ou não com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e/ou terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e gel. Os testes foram realizados com quatro repetições independentes em gaiolas teladas em umidade relativa e temperatura ambiente.



**Fig. 16.** Média do número de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por inicialmente 60 fêmeas de *Aedes aegypti* durante 15 d, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) tratado ou não com conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] ( $10^7$  C/cm<sup>2</sup>) misturados ou não com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e gel. Os testes foram realizados com quatro repetições independentes em gaiolas teladas em umidade relativa e temperatura ambiente.



**Fig. 17.** Mortalidade relativa média acumulada  $\pm$  erro padrão da média de adultos de *Aedes aegypti*. Com quatro repetições independentes, 60 adultos foram expostos durante 15 d em gaiola telada, com dispositivo de disseminação previamente não tratado (controle) (a,b) ou tratado com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e/ou terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) (a,b) misturados ou não com conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] ( $10^7$  C/cm<sup>2</sup>) (b) em umidade relativa, temperatura ambiente, e 12 h de fotófase.



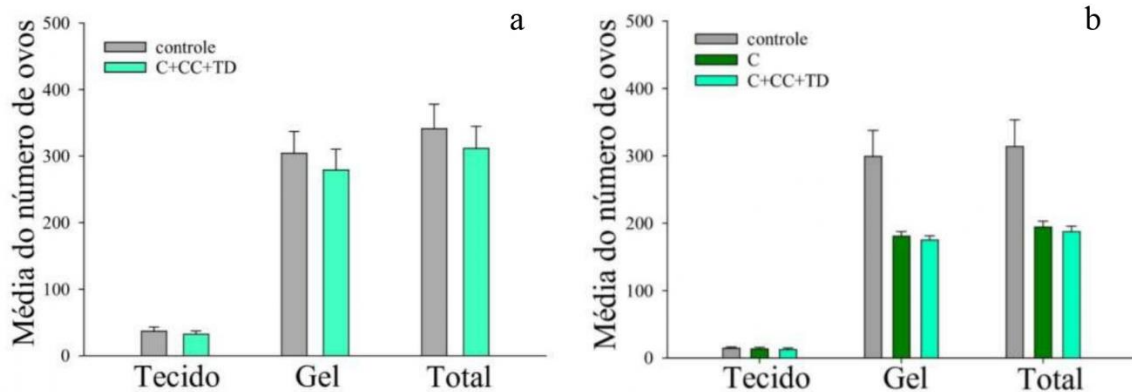
#### 6.4. Efeito repelente e aduicida em condições de semi-campo

Durante a época chuvosa (Fig. 20), a média do número total de ovos quantificados no dispositivo tratado com C+CC+TD foi registrada em  $508 \pm 24,8$  ovos, dos quais  $456,3 \pm 23,4$  ovos foram depositados no gel e  $30,5 \pm 3,6$  ovos no tecido, no 15º de exposição (Fig. 18a). Em comparação, o dispositivo controle apresentou uma média no gel de  $304,3 \pm 33$  ovos e no tecido de  $34,6 \pm 4,8$  ovos (Fig. 18a). A análise estatística não revelou diferença significativa entre os ovos quantificados no dispositivo tratado com C+CC+TD e o dispositivo de controle, tanto no tecido quanto no gel ( $t = 0,6$ ;  $df = 14$ ;  $P = 0,5$  para o tecido;  $t = 1,3$ ;  $df = 14$ ;  $P = 0,2$  para o gel).

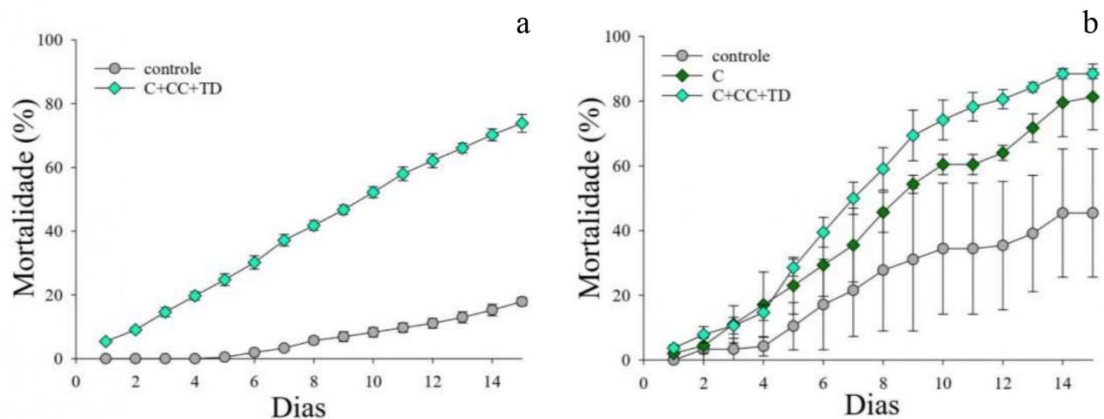
Na época seca, os dispositivos tratados com C+CC+TD apresentaram uma média de  $175 \pm 6$  ovos depositados sobre o gel e  $12,6 \pm 2,1$  ovos no tecido (Fig. 18b). No grupo C a média foi de  $180 \pm 6$  ovos no gel e  $13,6 \pm 2,6$  ovos no tecido (Fig. 18b). O dispositivo controle, por outro lado, registrou uma média de ovos no gel de  $299 \pm 38,4$  ovos e no tecido de  $14,6 \pm 1,7$  ovos (Fig. 18b). A análise estatística revelou diferença significativa entre os ovos quantificados nos dispositivos controle, C e C+CC+TD, no gel ( $F_{2,9} = 6$   $P = 0,02$ ) (controle > C = C+CC+TD).

Primeiros adultos morreram até 24 h de exposição a C+CC+TD tanto para época chuvosa quanto para a seca. A mortalidade acumulada no dia 15 de exposição com formulado C+CC+TD na época chuvosa foi de  $73,7 \pm 0,02\%$  e controle de  $17,8 \pm 0,012\%$  (Fig. 19a). Teve efeito significativo da formulação sobre a mortalidade de adultos ( $F_{14,21} = 66,4$ ;  $P < 0,001$ , formulado > controle). A mortalidade de acordo ao sexo dos adultos expostos a formulado, após 15 d de exposição foi de  $42,8 \pm 0,02\%$  machos e  $30,9 \pm 0,02\%$  fêmeas, o tempo letal  $TL_{50}$  de 11,5 d, e  $TL_{90}$  de 22,6 d. A mortalidade dos adultos controle foi de  $10,8 \pm 0,01\%$  machos e  $7 \pm 0,008\%$  fêmeas. Na época seca, a mortalidade acumulada no dia 15 de exposição com formulado C+CC+TD foi de  $91,8 \pm 3,4\%$  (Fig. 19b), sendo  $41 \pm 3,2\%$  machos e  $36,3 \pm 9,3\%$  fêmeas. A mortalidade só com C foi de  $78,5 \pm 10,6\%$  (Fig. 19b), com  $49,4 \pm 5\%$  machos e  $21,9 \pm 4\%$  fêmeas. No controle, a mortalidade foi de  $13,1 \pm 3,9\%$  (Fig. 19b). Não teve diferença significativa da formulação ( $F_{28,13} = 1,38$ ;  $P = 0,12$ , C+CC+TD = C > controle).

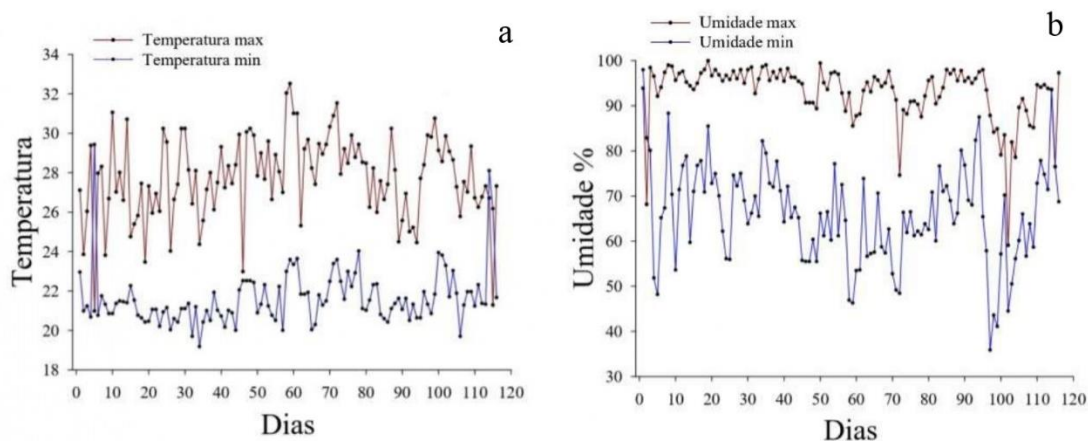
**Fig. 18.** Média do número de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por inicialmente 100 fêmeas de *Aedes aegypti* durante 15 d, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) (a,b) ou tratado com conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] ( $10^7$  C/cm<sup>2</sup>) (b) misturados ou não com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e/ou terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) (a,b) e gel. Os testes foram realizados em Goiânia, GO, Brasil, entre dezembro de 2022 a abril de 2023 (a) (época chuvosa, com oito repetições independentes) e junho a agosto de 2023 (época seca) (com quatro repetições independentes), em umidade relativa e temperatura ambiente.



**Fig. 19.** Mortalidade relativa média acumulada  $\pm$  erro padrão da média de adultos de *Aedes aegypti*. Para cada repetição, 200 adultos foram expostos durante 15 d em sala de peridomicílio simulado, com dispositivo de disseminação previamente não tratado (controle) (a,b) ou tratado com conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 [C] ( $10^7$  C/cm<sup>2</sup>) (b) misturados ou não com cera micronizada de carnaúba [CC] (2 mg/cm<sup>2</sup>) e terra diatomácea [TD] (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) (a,b). Os testes foram realizados em Goiânia, GO, Brasil, entre dezembro de 2022 a abril de 2023 (a) (época chuvosa, com oito repetições independentes) e junho a agosto de 2023 (época seca) (com quatro repetições independentes), em umidade relativa e temperatura ambiente.



**Fig. 20.** Monitoramento de temperatura (a) e umidade relativa (b) fora do dispositivo de disseminação (ambiente), em condições simuladas de peridomicílio em Goiânia, GO, Brasil, entre dezembro de 2022 a abril de 2023 correspondente à época chuvosa.



### 6.5. Efeito repelente dos aditivos em condições de campo

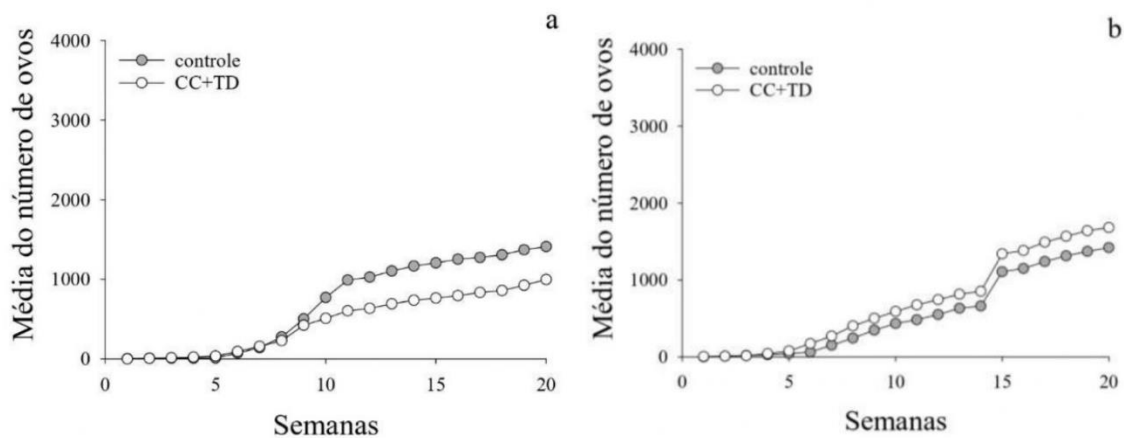
Fêmeas de *A. aegypti* colocaram ovos em ambos os dispositivos (CC+TD e controle) sobre os substratos (tecido e gel) em condições de campo na época chuvosa e seca. O número de ovos variou entre as semanas testadas para todos os locais.

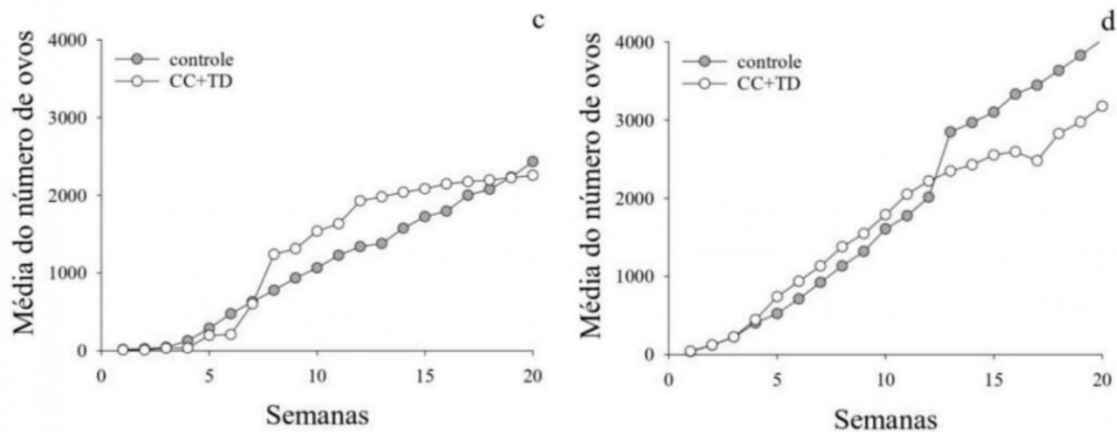
Na época chuvosa, no local 1, a média do número total de ovos em dispositivo controle nas 20 semanas testadas foi de  $695 \pm 126,7$  ovos. Neste mesmo local, o dispositivo com os aditivos CC+TD teve uma média de  $466,1 \pm 80$  ovos (Fig. 21a). O maior número de ovos foi encontrado na superfície do gel para ambos os dispositivos. No local 2, a média do número total de ovos em dispositivo de disseminação controle foi de  $563 \pm 116$  ovos. O número de ovos encontrado na superfície do gel foi de 468 ovos, e no tecido 110 ovos. O dispositivo com CC+TD a média foi de  $713,5 \pm 135,5$  ovos, com o maior número de ovos na sexta e sétima semana com 193 e 222 ovos (Fig. 21b). Para o local 3, o dispositivo de disseminação controle teve nas 20 semanas testadas uma média de  $1109,3 \pm 176$  ovos. Sendo que o maior número de ovos na sexta e na nona semana com 186 e 211 ovos. O dispositivo CC+TD teve um número total de  $1293 \pm 203$  ovos, com o maior número de ovos na oitava semana 636 ovos (Fig. 21c). O maior número de ovos foi encontrado na superfície do gel 1865 ovos, no tecido o número total foi de 64 ovos. No local 4, a média do número total de ovos em dispositivo de disseminação controle durante foi de  $1899 \pm 308$  ovos. O dispositivo com CC+TD teve um número total de 1701

$\pm 226$  ovos, com o maior número de ovos na quinta e décima primeira semana com 295 e 264 ovos (Fig. 21d).

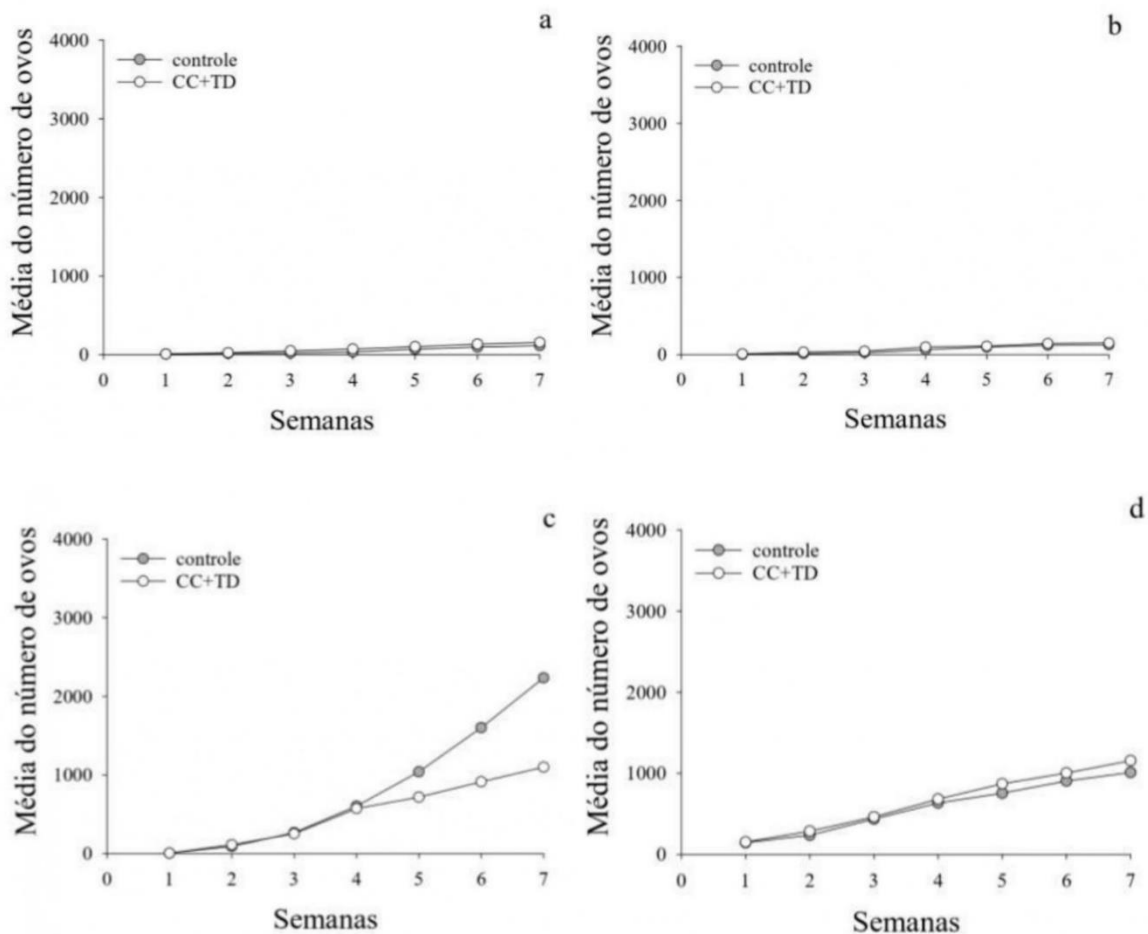
Na época seca, no local 1, a média do número total de ovos em dispositivo controle nas 7 semanas testadas foi de  $52,4 \pm 16$  ovos. Neste mesmo local, o dispositivo com os aditivos CC+TD teve uma média de  $78,2 \pm 20$  ovos (Fig. 22a). O maior número de ovos foi encontrado na superfície do gel para ambos os dispositivos. No local 2, a média do número total de ovos em dispositivo de disseminação controle foi de  $63,2 \pm 19$  ovos. O dispositivo com CC+TD a média foi de  $78,2 \pm 20$  ovos (Fig. 22b). Para o local 3, o dispositivo de disseminação controle teve nas 7 semanas testadas uma média de  $588 \pm 124$  ovos. O dispositivo CC+TD teve um número total de  $658 \pm 141$  ovos (Fig. 22c). No local 4, a média do número total de ovos em dispositivo de disseminação controle foi de  $834 \pm 316$  ovos. O dispositivo com CC+TD teve um número total de  $524 \pm 156$  ovos (Fig. 22d).

**Fig. 21.** Média do número total de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por fêmea de *Aedes aegypti* durante 20 semanas, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) ou tratado com cera micronizada de carnaúba [CC] ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) e terra diatomácea [TD] ( $0,5 \text{ mg/cm}^2$ ) e gel. Os testes foram realizados em quatro locais peridomiciliares (a–d), em Goiânia, GO, Brasil, entre dezembro de 2022 a abril de 2023 (época chuvosa), em umidade relativa e temperatura ambiente (quatro repetições independentes).





**Fig. 22.** Média do número total de ovos ( $\pm$  erro padrão da média) postos por fêmea de *Aedes aegypti* durante 7 semanas, em dispositivo de disseminação com tecido previamente não tratado (controle) ou tratado com cera micronizada de carnaúba [CC] ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) e terra diatomácea [TD] ( $0,5 \text{ mg/cm}^2$ ) e gel. Os testes foram realizados em quatro locais peridomiciliares (a–d), em Goiânia, GO, Brasil, entre junho a agosto de 2023 (época seca), em umidade relativa e temperatura ambiente (quatro repetições independentes).



## 7. Discussão

A infecção e o desenvolvimento de conídios de *M. humberi* IP 46 em adultos de *Aedes aegypti* dependeu da umidade relativa do ambiente. Nos testes *in vivo* de laboratório, independentemente do grupo testado, em umidade próxima a saturação precisou de menos tempo para matar os adultos. A alta umidade ambiente está bem documentada desempenhando um papel crítico na infecção de artrópodes por fungos entomopatogênicos (LUZ; FARGUES, 1997, LUZ; FARGUES, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2021), e na produção de conídios em cadáveres (LUZ; FARGUES, 1998, ARTHURS; THOMAS, 2003; TANG; HOU, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2021). No campo, a umidade relativa é um fator limitante para o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos em insetos. Baixas umidades como na época seca, prejudicam principalmente; a germinação do fungo na cutícula do hospedeiro, e a dispersão de conídios após a morte do inseto.

As descobertas desse trabalho evidenciam a importância do estudo de uma nova formulação seca com conídios de *M. humberi* contra adultos de *A. aegypti*, a fim de superar condições estressantes de umidade relativa na época seca. Além disso, reforçam a importância da progressão dos testes em condições de laboratório, semi-laboratório, semi-campo e eventualmente para o campo onde as condições são reais.

O uso da formulação seca de conídios de *M. humberi* IP 46 com pó de cera de carnaúba e terra diatomácea apresentou vantagens como; a fácil aplicação no dispositivo de disseminação para controle focal. Além disso, foi demonstrado através dos testes de semi-laboratório, semi-campo e campo que, as fêmeas oviposaram sobre o tecido com os aditivos e/ou conídios, a formulação não repeliu as fêmeas de *A. aegypti*. Sendo este um fato positivo, quando comparado a uma formulação com óleo vegetal Graxol que em grandes concentrações repeliu fêmeas grávidas de *A. aegypti* (LOBO *et al.*, 2016). A combinação dos aditivos pó de cera de carnaúba e terra diatomácea não foi tóxica para os conídios. Estes são importantes resultados para gradual desenvolvimento e aplicação dessa formulação como um micoinseticida.

Para todos os testes *in vivo* com a formulação, em condições estressantes de umidades relativas, a combinação de conídios com pó de cera de carnaúba e terra diatomácea matou mais mosquitos em menor tempo quando comparado ao grupo testado somente conídios de *M. humberi*. Sendo um ponto relevante, pois a formulação aumentou a taxa de infecção do fungo mesmo em baixas umidades relativas em condições de laboratório, semi-

laboratório e semi-campo. Selecionando esta formulação como candidata, para ser aplicada em condições de campo na época seca.

Apesar disso a formulação não teve o efeito aduítico esperado. Supôs que, o pó de cera de carnaúba desempenhou um efeito protetor para os mosquitos contra a abrasão na cutícula provocada pela terra diatomácea. Esse efeito, parece ter contribuído para uma redução na mortalidade dos adultos quando comparado ao grupo exposto exclusivamente à terra diatomácea. Esses resultados, indicam que o possível efeito protetor do pó de cera de carnaúba pode ter, impactando significativamente a taxa de mortalidade dos adultos. Além disso, comportamentos de limpeza dos adultos de *A. aegypti*, como demonstrado pelo trabalho de SANTOS (2023, Trabalho de conclusão do curso) pode ter influenciado na dinâmica de infecção do fungo.

Foi visto que conídios e/ou aditivos não tiveram diferença significativa na esporulação de novos conídios sobre mosquitos mortos pela infecção fúngica. Os aditivos pó de cera de carnaúba e terra diatomácea não interferiram na produção *post mortem* dos conídios. Resultados diferentes foram mostrados por RODRIGUES *et al.*, (2019), onde maiores números de novos conídios sobre adultos de *A. aegypti* mortos por infecção foram encontrados no grupo exposto a conídios de *M. humberi* formulados com terra diatomácea.

A presença de novos conídios de fungos entomopatogênicos encontrados sobre mosquitos mortos em áreas de concentração de adultos, como criadouros crípticos de difícil acesso, desempenha um papel importante na disseminação eficaz do fungo. Estes locais são visitados por mosquitos saudáveis, e têm a possibilidade de se infectarem com os conídios do fungo dando continuidade ao ciclo de infecção.

Os mosquitos infectados por fungos entomopatogênicos podem sobreviver por alguns dias, mas, dependendo da virulência do isolado, a atividade alimentar é comprometida (BUSTILLO *et al.*, 2001; MORA *et al.*, 2017). Portanto, as fêmeas tornam-se menos ativas, reduzindo a hematofagia e, conseqüentemente, diminuindo sua competência vetorial (BLANFORD *et al.*, 2005). Além disso, a atividade reprodutiva dos mosquitos é afetada rapidamente após a infecção. A redução do número de fêmeas grávidas e, conseqüentemente, da sua progênie, reduz a densidade populacional do vetor e conseqüentemente a possível transmissão de doenças virais.

Mosquitos adultos são alvos para controle focal com um micoinseticida. As fêmeas grávidas procuram locais para oviposição e adultos de ambos os sexos para descanso. O dispositivo de disseminação desenvolvido por MARTINEZ *et al.* (2021), utilizado nos testes, simulou um criadouro de adultos de *A. aegypti*. Fêmeas que entraram no dispositivo de disseminação oviporaram no gel e com menor frequência no tecido, isso se deve ao fato de que a superfície do gel é úmida enquanto a do tecido é seca. A umidade de substratos no interior do dispositivo influenciou a taxa de oviposição, como já foi demonstrado com *A. aegypti* no trabalho de MARTINEZ *et al.*, (2021). São necessários estudos a respeito do comportamento de fêmeas grávidas no interior do dispositivo, a fim de melhorar o contato das fêmeas com a formulação.

## 8. Conclusões

- Os aditivos CC e TD podem ser utilizados na formulação de *Metarhizium humberi* para controle focal de *Aedes aegypti* por não serem tóxicos e repelentes
- A formulação foi eficiente em condições de laboratório e semi-campo
- Os aditivos CC e TD não influenciaram na esporulação de conídios *post mortem*

## Bibliografia

AKBAR, W. *et al.* Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. **Journal of Economic Entomology**. v. 97, n. 2, p. 273–280, abr, 2004.

ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. **2. ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**. p. 1163, 1998.

ALVES, S.B., Lopes, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. **2. ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**. p. 414, 2008

ARTHURS, S.P., THOMAS, M.B. Seasonal patterns of persistence and infectivity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* on locust corpses in the Sahel. V.100, n.1, p.69-76, out, 2003.

ATHANASSIOU, C., STEENBERG, T. Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) *Vuillemin* (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**. v. 40, n. 3, p. 411–416, mar, 2007.

ATHANASSIOU, C. *et al.* Combining electrostatic powder with an insecticide: effect on stored product beetles and on merchandise. **Pest Management Science**. v. 72, n. 12, p. 2208–2217, abr, 2016.

ATHANASSIOU, C. *et al.* Delivering *Beauveria bassiana* with electrostatic powder for the control of stored product beetles. **Pest Management Science**. v. 73, n. 8, p. 1725–1736, jan, 2017.

BARRERA, R. *et al.* Population dynamics of *Aedes aegypti* and dengue as influenced by weather and human behavior in San Juan, Puerto Rico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 5, n. 12, e1378, dez, 2006.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**. v. 1, n. 2, p. 62-73. jan, 2005.

BARTON, L. *et al.* Adhesive absorption and transfer of dust by Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Dipt., Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**. v. 130, n. 5, p 257–262, jun, 2006.

BATTA, Y. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Crop Protection**. v. 22, n. 2, p. 415–422, mar, 2003.

BATTA, Y. Control of main stored-grain insects with new formulations of entomopathogenic fungi in diatomaceous earth dusts. **International Journal of Food Engineering**. v. 4, n. 1, p. 1–18, jan, 2008

BECKER, N. *et al.* Mosquitoes and their control. **Springer Science & Business Media**, p. 594, 2010.

BENTLEY, M.D. *et al.* Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Review of Entomology**. v. 34, p. 401–421, jan, 1989.

BISCHOFF, J.F. *et al.* A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**. v. 101, n. 4, p. 512–530, jul-ago, 2009.

BLANFORD, S. *et al.* Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. **Science**. v. 308, n. 5728, 1638–1641, jun, 2005.

BRAGA, I. *et al.* *Aedes aegypti*: inseticidas mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 16, n. 4, p. 179–293, dez, 2007.

BURGES, H.D. Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Dordrecht, Netherlands. **Kluwer Academic Press**. p. 412, 1998.

BUSTILLO, A. Fungos em insetos e possibilidades de uso no controle biológico de pragas na Colômbia. In: Seminário Uso de entomopatógenos na Colômbia. **Sociedade Colombiana de Entomologia**. Bogotá, p.30-53, 2001.

BUTT, T.M. *et al.* Degeneration of entomopatogenous fungi. In: An ecological and societal approach to biological control. **Springer Link**. p. 213–226, 2006.

CHRISTOPHERS, S.R. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. **Cambridge University Press** p. 750, 1960.

CLEMENTS, A.N. The biology of mosquitoes, v. 1: Development, nutrition and reproduction. **CABI**, London. p. 510, 2000.

CONSOLI, R., OLIVEIRA R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **FIOCRUZ, Rio de Janeiro**. p. 225, 1998.

DEMARTELAERE, A. *et al.* Utilities and economic importance of *Copernicia prunifera* for Rio Grande do Norte: endangered species. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, n. 1, p. 5065–5088, jan, 2021.

DONALISIO, M.R. *et al.* Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**. v. 51, 30, abr, 2017.

EDWARDS, D.K. Electrostatic charges on insects due to contact with different substrates. **Canadian Journal of Zoology**. v. 40, n. 4, p. 579–584, jul, 1962

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, dez, 2007.

- FAY, R.W. *et al.* Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**. v. 25, n. 3, p. 276–281, set, 1965.
- FERNANDES, E.G. *et al.* Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 43, n. 2, p. 827–833, apr-jun, 2012.
- IGNOFFO, C.M. *et al.* Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* and the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 28, n. 2, p. 259–262, set, 1976.
- LANZA, L. M.; *et al.* Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, v.39, p.6-12, 2009.
- LAZZARINI, G. M. J. *et al.* Impact of moisture on *in vitro* germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v. 110, p. 485–492, 2006.
- LIMA, W.P. *et al.* Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 6, p. 638–641, dez, 2009.
- LOBO, L. S. *et al.* Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations against dengue vectors under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**. v. 26, n. 3, p. 386–401, nov, 2015.
- LOPES. N. *et al.* General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil. **Revista da Pan-Amazônica de Saude**. v. 5, n. 3, p. 55–64, set, 2014.
- LORINI, I. Pragas de grãos de cereais armazenados. **Embrapa Trigos, Passo Fundo, RS.**, p. 61, 1999.
- LORINI, I. *et al.* Terra de diatomáceas como alternativa no controle de pragas de milho armazenado em propriedade familiar. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. v. 4, n. 2, p. 32–36, out, 2001.
- LUZ, C., FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. **Mycopathologia**. v. 138, n. 3, p. 117–125, ago, 1997.
- LUZ, C., FARGUES, J. Factors affecting the production of *Beauveria bassiana* conidia in *Rhodnius prolixus* corpses killed by fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 72, n. 2, p. 97–103, set, 1998.
- LUZ, C., FARGUES, J. Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under Constant and Cyclic Conditions of Temperature and Humidity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 184, n. 3, p. 403–409, jun, 2000.

- LUZ, C., BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. **Mycopathologia**. v. 160, n. 1, p. 51–62, ago, 2005.
- LUZ, C. *et al.* Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, n. 2, p. 214–215, mar, 2008.
- LUZ, C. *et al.* Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**. v. 122, n. 1, p. 29–35, abr, 2012.
- LUZ, C. *et al.* *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Latin America. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 166, 107216, set, 2019.
- MARTINEZ, J.G. *et al.* Efficacy of focal applications of a mycoinsecticide to control *Aedes aegypti* in Central Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 105, n. 23, p. 8703–8714, out, 2021.
- MASCARIN, G.M., PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. **EPAMIG, Viçosa, Brazil**. v. 4, p. 169–195, jan, 2010.
- MEWIS, I. ULRICHS, C. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. **Journal of Stored Products Research**. v. 37, n. 2, p.153–164, abr, 2001.
- MONGKOLSAMRIT, S *et al.* Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. **Studies in Mycology**. v. 95, p. 171–251, mar, 2020.
- MORA, M.A.E. *et al.* Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 84, e0552015, p. 1–10, jan, 2017.
- MUNIZ, E.R. *et al.* Carnauba wax enhances the insecticidal activity of entomopathogenic fungi against the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 174, 107391, jul, 2020.
- ROCHA, L.F.N. *et al.* Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 105, n. 7, p. 417–419, jul, 2011.
- ROCHA, L.F.N. *et al.* Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**. v. 53, n. 3, p. 251–259, mar, 2013.
- ROCHA, L.F.N. *et al.* Efficacy of *Tolypocladium cylindrosporum* against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. **Journal of Applied Microbiology**. v. 119, n. 5, p. 1412–1419, out, 2015.

- RODRIGUES, J. *et al.* Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* s.l. IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on *post mortem* conidiogenesis. **Acta Tropica**. v. 193, p. 192–198, mai, 2019.
- RODRIGUES, N.B. *et al.* Brazilian *Aedes aegypti* as a competent vector for multiple complex arboviral coinfections, **The Journal of Infectious Diseases**. v. 224, n. 1, p. 101–108, jul, 2021.
- RUEDA, L.M. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue virus transmission. **Zootaxa**. v. 589, n. 1, p. 1–60, ago, 2004.
- SANTANA, A. *et al.* Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes (Stegomyia)* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 43, n. 2, p. 214–220, mar, 2014.
- SANTOS, A.H. *et al.* Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**. v. 50, n. 1, p. 37–42, jan, 2009.
- SANTOS, L. S. Autolimpeza em adultos de *Aedes aegypti* expostos á conídios de *Metarhizium humberi* formulados ou não com cera de carnaúba micronizada. Trabalho de conclusão do curso (Ciências Biológicas), Universidade Federal de Goiás. Goiânia. ago, 2023.
- SCHOLTE, E.J. *et al.* Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of Insect Science**. v. 4, 19, jun, 2004.
- SILVA, H.H.G. *et al.* Influence of eggs quiescence period on the *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) life cycle at laboratory conditions. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**. v. 32, n. 4, p. 349–355, ago, 1999.
- SIMMONS, C.P. *et al.* Dengue. **The New England Journal of Medicine**. v. 366, p. 1423–1432, abr, 2012.
- SMITH, L. *et al.* Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 133, p. 1–12, out, 2016.
- STONE, L.B.L., BIDOCHKA, M.J. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 104, n. 23, p. 9935–9945, dez, 2020.
- TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 18, n. 3, p. 867–871, jun, 2002.
- TANG, L. C.; HOU, R. F. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 125, p. 243–248, 2001.

WINSTON, P. *et al.* Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**. v. 41, n. 1, p. 232–237, jan, 1960.

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