



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**



**SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA PARA
CONTROLE BIOLÓGICO DE LARVAS E ADULTOS DE *Aedes aegypti* L, VETOR
DOS VÍRUS DA DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA**

GRAFE OLIVEIRA PONTES

**MANAUS - AMAZONAS
Maio / 2018**

GRAFE OLIVEIRA PONTES

**SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA PARA
CONTROLE BIOLÓGICO DE LARVAS E ADULTOS DE *Aedes aegypti* L, VETOR
DOS VÍRUS DA DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.
Área de concentração: Saúde

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-Orientador: Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida

**MANAUS - AMAZONAS
Maio / 2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P814s	<p>Pontes, Grafe Oliveira</p> <p>Seleção de fungos filamentosos de solos da Amazônia para controle biológico de larvas e adultos de <i>Aedes aegypti</i> L, vetor dos vírus da Dengue, Chikungunya e Zika / Grafe Oliveira Pontes. 2018 121 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientador: Wanderli Pedro Tadei Coorientador: José Eduardo Marcondes de Almeida Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Controle biológico. 2. vetores. 3. larvicida. 4. adulticida. 5. papel impregnado. I. Tadei, Wanderli Pedro II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia



229ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 02 de maio (quarta-feira) de 2018, às 9hs, no Auditório da Biblioteca do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, localizada no Campus I, sede do INPA, Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis. **Grafe Oliveira Pontes** defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: “**Seleção de fungos filamentosos de solos da Amazônia para controle biológico de larvas e adultos de Aedes Aegypti, vetor dos vírus da Dengue Chikungunya e Zika**”.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei – (Presidente)	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Wanderli P. Tadei</u> CPF: <u>737.025.948-15</u>
Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto – UFAM	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Pedro de Queiroz Costa Neto</u> CPF: <u>233.965.042-91</u>
Profa. Dra. Rosemary Aparecida Roque – INPA	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Rosemary Roque</u> CPF: <u>730.703.436-00</u>
Profa. Dra. Iléia Rodrigues Brandão – INPA	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Ileia Rodrigues Brandão</u> CPF: <u>603.243.847-54</u>
Profa. Dra. Yamile Benaion Alencar - UFAM	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: <u>Yamile B. Alencar</u> CPF: <u>444.7006204</u>

Manaus, 02 de maio de 2018.

Resultado Final: Aprovado(a) (X)
 Reprovado(a) ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia
Edmar Vaz de Andrade
Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade
Coordenador

Coordenador do PPGBIOTEC/UFAM

DEDICATÓRIAS

Duas gotas de orvalho, que saciam à minha sede, reflexos de luz, incentivo que me conduz; meu filho e minha esposa: *Macflay X. Pontes e Luziana de S. Xavier*, amores que sempre me acompanharam, ontem, hoje e sempre. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui. Essa vitória é nossa!

À flor que me gerou e ensinou-me o caminho da bondade e do amor. A dedicação e ao sentimento inesgotável, a minha mãe mais do que querida e ao meu grande pai: *Marluce U. Oliveira e José R. Pontes*.

Para a minha primeira amiga e companheira da vida: quem hoje luta; amanhã das vitórias desfruta; só quem planta com carinho colhe do pomar divino; somente através da dedicação chegamos à superação. Cada passo que dou, sinto a tua presença do meu lado; acreditando e incentivando-me na busca pelos meus ideais. Obrigado por tudo! Minha querida irmã, *Ana Paula O. Pontes*.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado esta oportunidade, por nunca ter me deixado fraquejar, mesmo nos momentos de maior agonia, e enfim, agora, concretizá-lo.

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade do Curso.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, mestre e amigo que tanto admiro, obrigado pela orientação e confiança em nosso trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, pela amizade, ensinamento e apoio no decorrer deste projeto.

A Fundação de Amparo a Pesquisa da Amazônia (FAPEAM), pela concessão da bolsa durante período do Curso.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, pelos ensinamentos que obtive.

Em especial a todos os amigos do Laboratório Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Joelma, Sirley, Ricardo, Elerson, Eunice, Leandro, Willian, Joaquim, Jhuan, Rejane, Augusto e Maria) pela hospitalidade, acesso, confiança, amizade, apoio e oportunidades para finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Marluce U. Oliveira e José R. Pontes pelo incentivo na minha educação e ao meu profissionalismo.

A minha querida irmã Ana Paula, principalmente por acreditar que sou capaz, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio sentimental e por estar sempre disponível a ajudar, acreditando que o maior bem que podemos ter é o conhecimento.

Aos amores da minha vida, minha esposa Luziana e ao meu filho Macflay, pela grande contribuição nas atividades laboratoriais deste trabalho, obrigado pelo incentivo e apoio nas horas difíceis, e a compreensão de minha ausência em alguns momentos de nossas vidas.

Ao meu irmão Domes, pelo apoio em todos os momentos, a sua grande disponibilidade de ajudar sempre que necessitei, a sua amizade e ao seu caráter.

Ao meu grande amigo Adolfo Riccio, por acreditar, por sua confiança e por sua sincera amizade. Apesar da distância, o sentimento sempre caminha próximo.

A minha tia Marilaque, pela primeira oportunidade de trabalho, pelo apoio e cuidados em sua residência, pois toda a minha caminhada começou naquele momento.

Ao meu primeiro mentor, Edmilson Rodrigues, acreditou no meu potencial e profissionalismo. Sempre esteve disponível a ensinar e ajudar-me, e eu espero um dia retribuí-lo.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente com esse trabalho e para minha formação profissional e acadêmica.

E mais uma vez, à Deus, por colocar cada uma dessas pessoas no meu caminho e tornar todo esse sonho uma realidade.

*O período de maior ganho em conhecimento e
experiência é o período mais difícil da vida de
alguém.*

Dalai Lama

RESUMO

O uso de inseticidas químicos tornou importante nos programas de controle do *Aedes aegypti*. Com o passar dos anos, os estudos epidemiológicos demonstraram a ineficiência dos inseticidas sintéticos devido à resistência adquirida com a utilização nas atividades relacionadas ao controle de vetores em doenças tropicais, especialmente dengue. Para uma melhor eficácia dos programas de controle de vetores, há necessidade da busca de novas alternativas. O interesse em fungos entomopatogênicos para controle biológico encontra-se em amplo crescimento. Entretanto, ainda são discretos os trabalhos no controle dos diferentes estágios de vida do *A. aegypti*, e a transmissão de micoses entre seus indivíduos e sua prole. Com o intuito de contribuir com novos compostos e no controle integrado da dengue, Febre Chikungunya e Zika vírus. O presente projeto tem como objetivo avaliar a atividade entomopatogênica de fungos isolados de solo da Amazônia em larvas, adultos de *A. aegypti*, e seus efeitos residual sobre o ciclo de vida considerando o número de ovos e larvas e adultos. A metodologia proposta para esse trabalho visa à utilização de conídios dos isolados fúngicos previamente selecionados por gêneros que tenham relevância no controle biológico ou que demonstrem resultados positivos quando utilizados em insetos sonda/triagem, *Tenebrio molitor*. Para a aplicação das formulações foram utilizados conídios em suspensões aquosas para tratamento em larvas, e para adultos foi utilizado suspensões aquosas impregnados em papel filtro colocados em Kit da Organização Mundial de Saúde utilizado para avaliação de susceptibilidade de inseticida químico. Os bioensaios foram realizados em condições de laboratório, avaliando-se o grau de infestação e o efeito entomopatogênico sobre as larvas e adultos de *A. aegypti*. O presente trabalho propõe uma metodologia prática para sexagem e separação de adultos por meio de seleção de pupas, evitando a morte prematura do inseto pelo uso de capturador de Castro no momento de retirada de adultos da colônia. Os resultados obtidos evidenciaram o potencial de quatro isolados fúngicos, IPC 2.1 e IPS 3.1 isolados de solo da Amazônia, e outros dois isolados de outros insetos e de amostras de solo, IBCB 66 e IBCB 425, amplamente utilizados para controle de insetos na agricultura, e avaliados para combate de larvas e adultos do mosquito vetor da dengue, Febre Chikungunya e Zika vírus. Os resultados entre as duas metodologias demonstraram a melhor aplicabilidade para os isolados fúngicos e sua utilização no controle do *A. aegypti*, responsáveis por grande impacto social na saúde pública da Amazônia devido a transmissão de diversas arboviroses.

Palavras-chave: Controle biológico, vetores, larvicida, aduicida, papel impregnado

ABSTRAT

The use of chemical insecticides becomes important in *Aedes aegypti* control programs. Over the years, epidemiological studies have demonstrated the inefficiency of synthetic insecticides due to the resistance acquired with the use in activities related to vector control in tropical diseases, especially dengue. For a better effectiveness of vector control programs, the search for new alternatives is necessary. The interest in entomopathogenic fungi for biological control is in great growth. However, the work on controlling the different stages of life of *A. aegypti* and the transmission of mycoses between individuals and their offspring are still discrete. In order to contribute with new compounds and integrated control of dengue, the present project aims to evaluate the entomopathogenic activity of fungi isolated from Amazonian soil in larvae and adults of *A. aegypti*, and their residual effects on the life cycle considering the number of eggs and larvae and adults. The proposed methodology for this work is the use of conidia of fungal isolates previously selected by genera that have relevance in biological control or that demonstrate positive results when used in probe / sorting insects, *Tenebrio molitor*. For the application of the formulations conidia were used in aqueous suspensions for treatment in larvae, and for adults was used aqueous suspensions impregnated in filter paper placed in Kit of the World Health Organization used to evaluate the susceptibility of chemical insecticide. The present work proposes a practical methodology for sexing and separating adults through the selection of pupae, in order to evaluate the degree of infestation and the entomopathogenic effect on larvae and adults of *A. aegypti*. avoiding the premature death of the insect by the use of Castro's catcher at the time of adult withdrawal from the colony. The results obtained evidenced the potential of four fungal isolates IPC 2.1 and IPS 3.1 isolated from Amazonian soil, and two other isolates from other insects and from soil samples IBCB 66 and IBCB 425, widely used to control insects in agriculture, and evaluated for the control of larvae and adults of the mosquito vector dengue. The results between the two methodologies showed the best applicability for the fungal isolates and their use in the control of *A. aegypti*, responsible for a great social impact on the public health of the Amazon due to the transmission of several arboviruses.

Keywords: Biological control, vectors, larvicide, adulticide, impregnated paper

LISTA DE FIGURA

CAPÍTULO I

Figura I- 1. Cabeça de culicídeo em vista superior: A: fêmea de Culicinae, com destaque a antena pilosa e o palpo menor que a probóscida; B: Culicinae, macho, destacando a antena plumosa e o palpo maior do que o aparelho bucal. a: Antena; Pa: Palpo maxila.....	22
Figura I- 2. Esquema da probóscida de um Culicídeo (A, B e C). lb: Labro; md: Mandíbulas; hf: Hipofaringe; mx: Maxilas; l: Lábio; f: Palpo; ca: Canal alimentar. D: Arranjo do aparelho bucal durante a hematofagia, com destaque ao processo de retração do lábio (l) e a penetração das demais estruturas (a) no capilar (b).....	22
Figura I- 3. A: Culicídeo em vista lateral com destaque ao escudo (Es) e ao escutelo (E); B: Mesonoto com evidência do escudo e escutelo; C: <i>Aedes aegypti</i> , com destaque para a disposição das escamas prateadas, em forma de lira, sobre o escudo; D: Diferença morfológica entre os sexos do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	23
Figura I- 4. Esquema das fases evolutivas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	24
Figura I- 5. Distribuição do risco global de Dengue (determinação do estado do risco com base em relatórios combinados da WHO, dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, Gideon online, ProMED, DengueMap, Eurosurveillance.	26
Figura I- 6. Casos prováveis de Dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2015, 2016 e 2017.....	27
Figura I- 7. Casos prováveis de CHIKV, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2015, 2016 e 2017.....	29
Figura I- 8. Casos prováveis de febre pelo ZIKV, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016 e 2017.....	30
Figura I- 9. Esquema do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (<i>Metarhizium anisopliae</i> x <i>Mahanava posticata</i> - cigarrinha da pastagem).....	34

CAPÍTULO II

Figura II- 1. Pontos de coleta de solos para isolamento de fungos. A: Fazenda Experimental UFAM; B: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.	60
Figura II- 2. Pontos para as amostras de solos coletadas em dois círculos concêntricos com raio Λ de 3 e 6 metros do centro.....	61

Figura II- 3. Processo de coleta das amostras de solo: A) Extração de solo com auxílio de trado; B) Armazenamento do solo em sacos plásticos estéreis.	61
Figura II- 4. Pontos de coleta de solo – Fazenda experimental – UFAM, Km 38 BR 174. ...	62
Figura II- 5. Pontos de coleta de solo – INPA, Campus Manaus - SEDE.	62
Figura II- 6. Método e procedimentos para conservação em óleo mineral.....	65
Figura II- 7. Método e procedimentos para conservação em Castellani.....	66
Figura II- 8. Preparo da suspensão de conídios de fungos filamentosos para avaliação entomopatogênica.	67
Figura II- 9. Avaliação entomopatogênica em <i>Tenebrio molitor</i>	68

CAPÍTULO III

Figura III- 1. Criação de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório.....	101
Figura III- 2. Bioensaios em solução aquosa com isolados entomopatogênicos em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	103
Figura III- 3. Seleção de sexo de <i>Aedes aegypti</i> em fase de pupa. A: Diferença morfometria de pupas. a: Macho, b: fêmea; B e C: aparelho reprodutor feminino (postero-anterior e perfil); D e E: aparelho reprodutor masculino (postero-anterior e perfil); F: Colônia de <i>Aedes aegypti</i>	105
Figura III- 4. Bioensaios com adultos de <i>Aedes aegypti</i> . A: Solução aquosa com isolados entomopatogênicos. B: Papel impregnado com isolado fúngico. C: Kit da OMS para testes de susceptibilidade de adultos a inseticidas. a: Peça em forma de guilhotina que pode se fechar totalmente, permitindo acesso a capturador, ou abrir totalmente. b: Transferência de mosquitos para o tubo sem inseticida. c: Transferência de mosquitos para o tubo com inseticida. d: Aspecto durante o período de exposição. e: Transferência de mosquito sobreviventes para tubo sem inseticida. f: Mosquitos providos de água durante o período de observação.	106

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO II

Tabela II- 1. Localização geográfica dos pontos de coletas de solo	63
Tabela II- 2. Fungos isolados de solo da Amazônia	70
Tabela II- 3. Avaliação de sonda/triagem em <i>Tenebrio molitor</i> para identificação de fungos entomopatógenos isolados em amostras de solo	73

CAPÍTULO III

Tabela III- 1. Atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> Rockefeller suspensão aquosa de conídios 1x10 ⁸ em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, 90 ± 10% de umidade relativa.	107
Tabela III- 2. Atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> suspensão aquosa de conídios 1x10 ⁸ em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, 70 ± 10% de umidade relativa.	108
Tabela III- 3. Concentração letal média (CL50) e tempo letal médio (TL50) inoculado com os isolados mais virulentos em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, 70 ± 10% de umidade relativa.	109
Tabela III- 4. Atividade adulticida e tempo letal mediano (TL50) em dias e intervalos de confiança em <i>Aedes aegypti</i> após permanência de 12 horas em papel impregnado com isolados fúngicos em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, 95 ± 5% de umidade relativa por 15 dias.	109
Tabela III- 5. Influência sobre o ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IPS 2.1. Número médio de ovo postura, larvas e adultos.	110
Tabela III- 6. Influência sobre o ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IPS 1.3. Número médio de ovo postura, larvas e adultos.	110
Tabela III- 7. Influência sobre o ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IBCB 66. Número médio de ovo postura, larvas e adultos.	111
Tabela III- 8. Influência sobre o ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IBCB425. Número médio de ovo postura, larvas e adultos.	111

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ADE	Água Destilada Estéril
BDA	Dextrose Ágar Batata
BMS	Biomassa Microbiana do Solo
BOD	Biological Oxygen Demand
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEIB	Centro Experimental Instituto Biológico
°C	Grau Celsius
CHIKV	Febre Chikungunya
cm	Centímetro
CT	Concentração Total
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DENV	Vírus da Dengue
EM	Erro Padrão da Média
FAU	Febre Amarela Urbana
g	Gramma
g/L	Gramma por Litro
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Km	Kilômetro
L	Litro
mL	Mililitro
mg	Miligramma
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
SE	Semana Epidemiológica
TL	Tempo Total
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTO	Unidade Taxinômica operacionais
VFA	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Zika vírus

Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRAT	ix
LISTA DE FIGURA.....	x
LISTA DE TABELA	xii
LISTA DE SIGLAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO I	21
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Aspectos gerais sobre o <i>Aedes aegypti</i>	21
1.2 Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	23
1.3 Importância vetorial.....	25
1.3.1 Vírus da Dengue (DENV)	25
1.3.2 Febre Chikungunya (CHIKV)	28
1.3.3 Zika Vírus (ZIKV).....	29
1.4 Mecanismos de controle do <i>Aedes aegypti</i>	31
1.4.1 Campanhas educativas.....	31
1.4.2 Controle mecânico.....	32
1.4.3 Controle químico	32
1.4.4 Controle biológico	32
1.4.5 Controle biológico por fungos filamentosos	33
1.5 Controle biológico de vetores	36
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
MANUSCRITO 1: O CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS E VETORES – UM MODELO DE APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA E BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA.....	44
CAPÍTULO II: FUNGOS ISOLADOS DE SOLO DA AMAZÔNIA PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE VETORES.....	57
1 INTRODUÇÃO	57
1.2 Fungos para controle biológico de vetores	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Definição, origem e coleta de fungos.....	60

2.2 Isolamento de fungos do solo	63
2.3 Purificação, identificação e preservação dos isolados	64
2.4 Seletividade de fungos entomopatogênicos por “ <i>Insect bait</i> ” utilizando <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4 CONCLUSÕES.....	74
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
MANUSCRITO 2: PRESERVAÇÃO E COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS PARA APLICAÇÃO NA BIOTECNOLOGIA	79
ANEXO II-1	92
ANEXO II-2	96
CAPÍTULO III: ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DE ISOLADOS FÚNGICOS DE SOLO DA AMAZÔNIA EM <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> LINNAEUS, 1762	97
1 INTRODUÇÃO	97
1.1 <i>Aedes aegypti</i> e a transmissão de arboviroses	97
1.3 Medidas de controle vetorial	98
2 MATERIAL E MÉTODOS	100
2.1 Criação e manutenção de mosquitos em laboratório	100
2.2 Avaliação <i>in vitro</i> de isolados fúngicos para avaliação de atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i>.....	101
2.3 Metodologia e preparo dos conídios para bioensaios larvicida.....	102
2.4 Análise dos resultados	103
2.5 Bioensaios para atividade adulticida	104
2.5.1 Seleção de insetos adultos	104
2.5.2 Preparo dos conídios e bioensaios	105
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4 CONCLUSÃO.....	114
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
ANEXO III-1.....	120

1 INTRODUÇÃO

Apesar do desenvolvimento tecnológico e científico, as doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti* permanecem como um dos maiores problemas de saúde pública a ser combatido (MARCONDES; XIMENES, 2016). Este mosquito é o vetor primário dos quatro sorotipos do Vírus da Dengue (DENV) e da Febre amarela urbana (FAU), e sua susceptibilidade a mudanças genéticas entre linhagens virais permitiram melhor adaptação ao vetor e à transmissão humana (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Entre as arboviroses transmitidas por este vetor, a FAU representou, no passado um dos mais dramáticos problemas de saúde pública registrados no país (COSTA et al., 2011), atualmente, está circulante os quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), Febre Chikungunya (CHIKV) e Zika Vírus (ZIKV) (PUSTIGLIONE, 2016).

O *A. aegypti* é considerado um mosquito de grande preocupação para as autoridades sanitárias devido a sua competência vetorial para diversas arboviroses de repercussão mundial. A incidência da Dengue cresceu dramaticamente em todo o mundo nas últimas décadas. O número real de casos de Dengue está subnotificado e muitos casos são mal classificados. Uma estimativa recente indica 390 milhões de infecções por Dengue por ano (95% intervalo credível 284-528 milhões), dos quais 96 milhões (67-136 milhões) manifestam clinicamente (com qualquer gravidade da doença). Em outro estudo, sobre prevalência de Dengue, estima que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estão em risco de infecção por vírus da Dengue (BHATT et al., 2013; WHO, 2016).

O primeiro caso de Dengue, confirmado por exames laboratoriais, ocorrido no Brasil foi registrado em 1981. Atualmente, o Brasil é o país das Américas mais afetado em número de casos de Dengue, sendo responsável por, aproximadamente, 70% dos casos notificados. A circulação concomitante dos quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) na maioria dos Estados tem aumentado o número de casos graves e a taxa de hospitalização (BERTOLACCI-ROCHA et al., 2014; MACIEL; SIQUEIRA JUNIOR; MARTELLI, 2008; SIQUEIRA et al., 2005).

Nos recentes anos, com o movimento das populações e a globalização, algumas infecções e doenças mudaram seu padrão endêmico para epidêmico, é o caso do vírus Chikungunya. Segundo dados do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos, até janeiro de 2015 tinham detectado mais de um milhão de casos suspeitos e cerca de trinta mil tinham sido confirmados atualmente em 42 países do Caribe, América

Central, América do Sul e América do Norte (ZULUAGA GÓMEZ; VANEGAS ISAZA, 2016).

O vírus Zika é um *flavivírus* relacionado ao vírus da Febre Amarela e Dengue. Este vírus tem causado doença febril, acompanhada por discreta ocorrência de outros sintomas gerais. No entanto, apesar da aparente benignidade da doença, mais recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil, quadros mais severos, incluindo comprometimento do sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré, mielite e microcefalia), associados ao Zika têm sido comumente registrados, o que mostra quão pouco conhecida ainda é essa doença (KOHL, 2016; ZANLUCA et al., 2015).

Atualmente o eixo dos programas de controle da Dengue e outras arboviroses tem sido o combate aos mosquitos vetores mediante a vigilância vetorial e a aplicação de inseticidas químicos, que vem apresentando baixa eficiência e alto custo. Essas atividades de controle vetorial têm sido insuficientes para interromper o processo de transmissão dessas doenças (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; BRAGA et al., 2004; HORTA et al., 2011; TAUILL, 2002; ZARA et al., 2016).

Os fungos filamentosos estão entre os principais microrganismos utilizados como ferramenta para controle biológico na agricultura e para obtenção de diversos metabólitos devido à facilidade de cultivo e por serem bons produtores de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006). A maioria dos projetos de pesquisa com controle microbiano de insetos é realizada com fungos entomopatogênicos, devido às características de ação desses patógenos, pois atuam por contato e ingestão. Estão presentes em grandes quantidades na natureza, sendo o solo o seu maior reservatório e apresentam grande variabilidade genética (HAJEK; DELALIBERA, 2010; SCHOLTE et al., 2004).

O nível de patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, a capacidade de multiplicação, dispersão no ambiente, caráter enzoótico e a não toxicidade entre plantas e animais são atributos favoráveis para que este tipo de estratégia possa fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir populações de insetos indesejáveis para níveis que não provoquem prejuízos. O conhecimento da biodiversidade e da bioprospecção microbiana para atividades em controle microbiano de vetores tornam-se um dos principais recursos da biotecnologia.

Desta forma, a Tese está estruturada em três capítulos, o primeiro apresentando uma revisão bibliográfica sobre o *A. aegypti*, o segundo sobre isolamento e conservação de fungos do solo, e o terceiro sobre atividades larvicida e adulticida em *A. aegypti* utilizando fungos entomopatogênicos isolados de solo da Amazônia.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.
- BERTOLACCI-ROCHA, L. G. et al. Introduction of the dengue virus type 4 in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 30, n. 8, p. 1789–1792, 2014.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of Dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199–203, 2004.
- COSTA, Z. G. A. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 11–26, 2011.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 10–15, 2017.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 474–480, 2006.
- HAJEK, A. E.; DELALIBERA, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 147–158, 2010.
- HORTA, M. et al. Resistance of *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) to temephos in Brazil: A revision and new data for Minas Gerais state. **BioAssay**, v. 6, n. 7, p. 1–6, 2011.
- KOHL, A. A previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **Journal of General Virology**, 2016.
- MACIEL, I. J.; SIQUEIRA JUNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle da Dengue. **Revista de patologia tropical**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 2008.
- MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. DE F. F. DE M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. July 2015, p. 4–10, 2016.
- PUSTIGLIONE, M. Occupational medicine and emerging, reemerging and neglected diseases: the conduct in the case of Dengue, Chikungunya and Zika virus/ Medicina do trabalho e doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas: a conduta no caso das febres da Dengue, do Chik. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho VO - 14**, v. 14, n. 1, p. 1, 2016.
- SCHOLTE, E.-J. et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of insect science (Online)**, v. 4, p. 19, 2004.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2005.

TAUIL, P. L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867–871, 2002.

WHO. Media centre: Dengue and severe Dengue fact sheet. **World Health Organization**, p. 1–7, 2016.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika vírus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZARA, A. L. DE SE. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.

ZULUAGA GÓMEZ, M.; VANEGAS ISAZA, D. El virus Chikungunya en Colombia: aspectos clínicos y epidemiológicos y revisión de la literatura. **Iatreia**, v. 29, n. 1, p. 65–74, 2016.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar fungos de solos da Amazônia Central, e selecionar espécies entomopatogênicas para avaliação em controle biológico de *A. aegypti*.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar e selecionar, em laboratório, fungos com potencial entomopatogênico pelo método “*Insect bait*” em *Tenebrio molitor*;

Avaliar a mortalidade em larvas de *A. aegypti* e *A. aegypti* Rockefeller com isolados fúngicos do solo da Amazônia com atividade entomopatogênica;

Avaliar a mortalidade em adultos de *A. aegypti* com isolados fúngicos do solo com atividade entomopatogênica;

Avaliar a influência da infecção fúngica em adultos de *A. aegypti* considerando: estágio de desenvolvimento de imaturos durante ciclo biológico ao número de ovos, larvas e adultos.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O *A. aegypti* é considerado um mosquito tropical e subtropical com distribuição entre os paralelos de 35° de latitude Norte e 35° de latitude Sul, que correspondem à isoterma de inverno de 10 °C (FORATTINI, 2002). Nas Américas, é conhecido por seu alto grau de antropofilia, estando comumente associado à presença humana. Suas fêmeas, além de provocarem grande desconforto ao hospedeiro devido à picada, podem transmitir vários patógenos ao homem e a outros animais, principalmente viroses como a FAU, Dengue, entre outras doenças (CHAVASSE; YAP, 1997; KRAEMER et al., 2015; PUSTIGLIONE, 2016). A presença de suas fêmeas nas habitações humanas, ou próximas a elas, ocorre com o objetivo de encontrar abrigo e repasto sanguíneo (CHAVASSE; YAP, 1997; EIRAS, 2005; FORATTINI, 2002; MARCONDES, 2011).

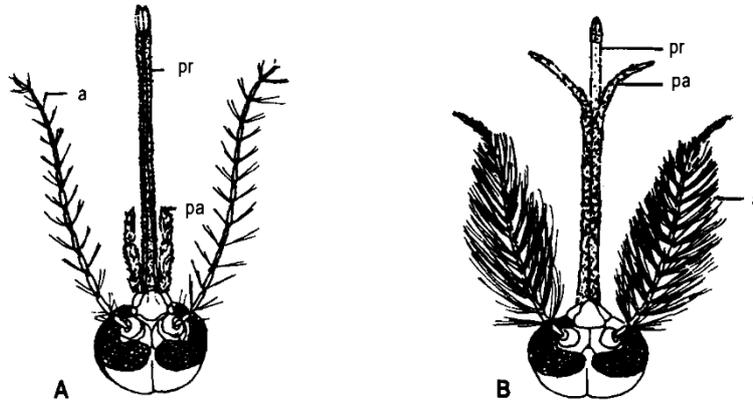
O presente capítulo abordou aspectos gerais sobre *A. aegypti*, seu ciclo de vida, importância vetorial e mecanismos de controle biológico de vetores

1.1 Aspectos gerais sobre o *Aedes aegypti*

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762), é um artrópode pertencente à ordem Diptera, família Culicidae. Como todos os dípteros, apresenta um par de asas funcionais e um par de asas reduzido, chamadas balancins, importantes no equilíbrio do inseto durante o voo. Tem o corpo delgado e pernas longas. As antenas têm 15 artículos cada, divididos em um escapo, um pedicelo e o flagelo segmentado. O flagelo nos machos apresenta-se plumoso e nas fêmeas, pilosas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; EIRAS, 2005).

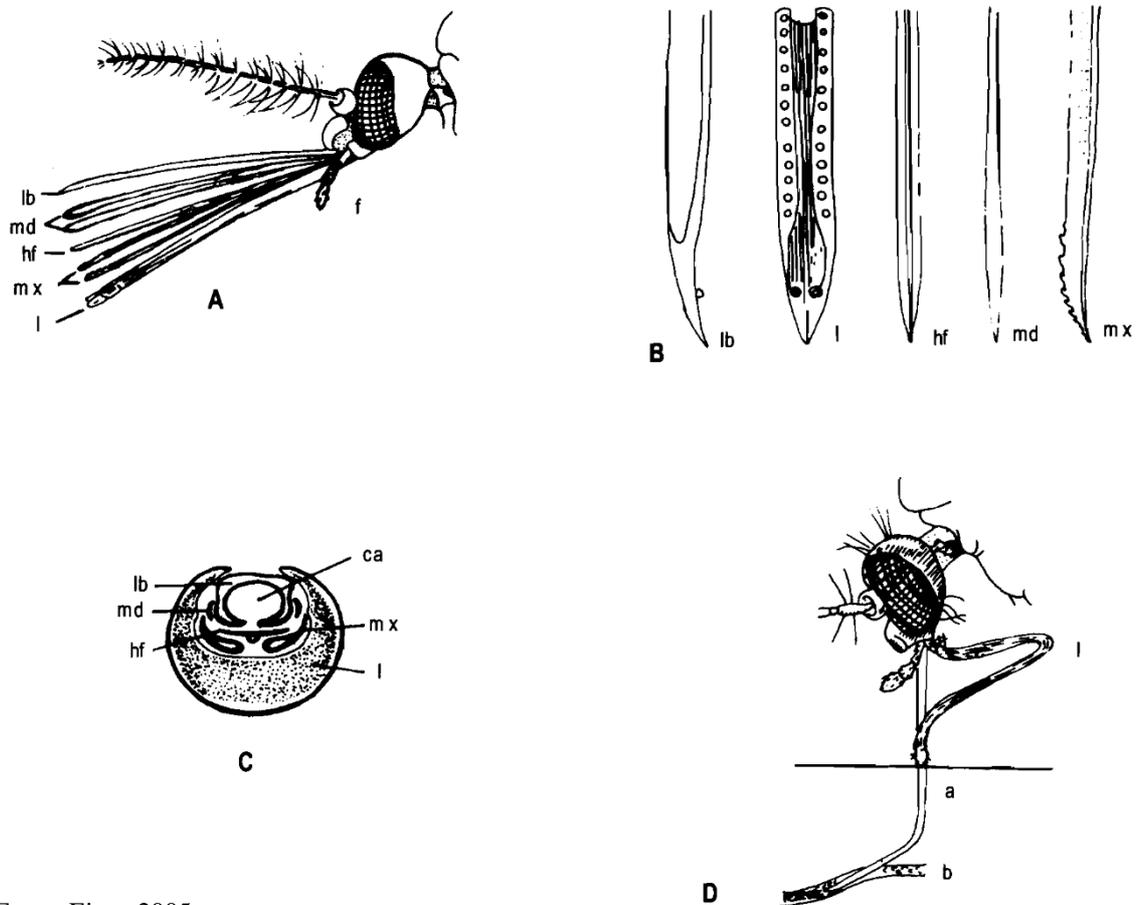
A cabeça de *A. aegypti* (Figura I-1), além das antenas, apresenta outras estruturas importantes como os olhos compostos, a probóscida ou aparelho bucal e um par de palpos maxilares. Os olhos são grandes e ocupam grande parte da porção ântero-lateral da cabeça e são constituídos de pequenos omatídeos (unidades ópticas responsáveis pela captação de luz). A probóscida é constituída por estruturas diversas (maxilas, mandíbulas, labro, hipofaringe) recobertas pelo lábio que permite a formação de um canal pungitivo sugador (Figura I-2). Os palpos maxilares são estruturas penta-articuladas que se situam lateralmente ao aparelho bucal dos mosquitos, sendo que nas fêmeas são mais curtos do que a probóscida e nos machos são mais longos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

Figura I- 1. Cabeça de culicídeo em vista superior: A: fêmea de Culicinae, com destaque a antena pilosa e o palpo menor que a probóscida; B: Culicinae, macho, destacando a antena plumosa e o palpo maior do que o aparelho bucal. a: Antena; Pa: Palpo maxila; pf Probóscida



Fonte: Eiras, 2005

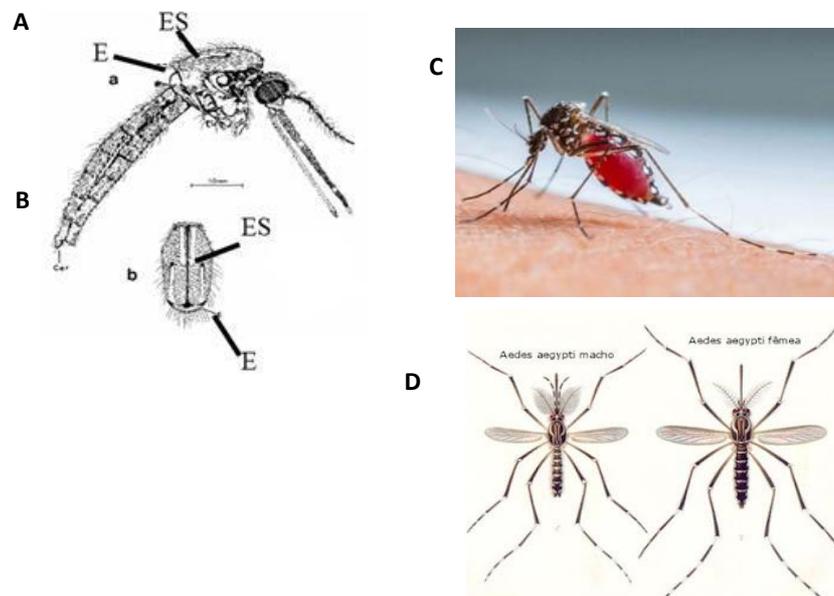
Figura I- 2. Esquema da probóscida de um Culicídeo (A, B e C). lb: Labro; md: Mandíbulas; hf: Hipofaringe; mx: Maxilas; l: Lábio; f: Palpo; ca: Canal alimentar. D: Arranjo do aparelho bucal durante a hematofagia, com destaque ao processo de retração do lábio (l) e a penetração das demais estruturas (a) no capilar (b)



Fonte: Eiras, 2005

O tórax é dividido em protórax, mesotórax e metatórax, sendo grande parte tomada pelo mesotórax, onde estão inseridas as asas funcionais. Os balancins encontram-se inseridos no metatórax. O escudo é característico, apresenta um conjunto de escamas prateadas em forma semelhante a uma lira, e juntamente com o escutelo compreendem o mesonoto. Os machos têm a estrutura corporal menor quando comparados às fêmeas, o abdome é composto por oito segmentos evidentes e dois segmentos modificados em ânus e genitália (Figura I-3) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

Figura I- 3. A: Culicídeo em vista lateral com destaque ao escudo (Es) e ao escutelo (E); B: Mesonoto com evidência do escudo e escutelo; C: *Aedes aegypti*, com destaque para a disposição das escamas prateadas, em forma de lira, sobre o escudo; D: Diferença morfológica entre os sexos do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: A e B: (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998); C e D: (PINHEIRO, 2017) - Adaptado

1.2 Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* tem desenvolvimento holometabólico, apresentando as fases de ovo, larva, pupa e adultos. Os ovos são elíptiformes e recobertos por uma camada impermeável chamada cório. São postos de forma isolada em superfícies próximas a localidades com água represada. Mesmo necessitando de água para a eclosão, parte dos ovos de *A. aegypti* permanece viável por mais de 450 dias em ambiente ressecado (DA SILVA; DA SILVA, 1999; LUZ et al., 2008).

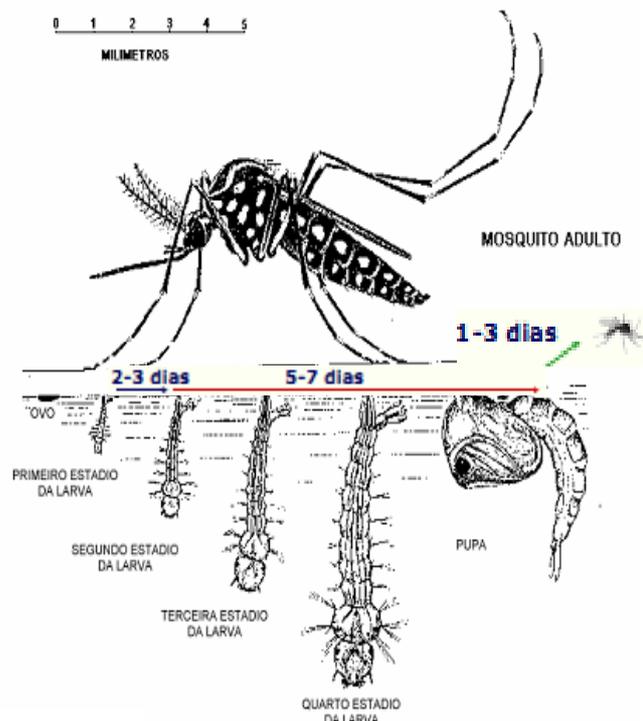
Esse fato contribui com o sucesso adaptativo do vetor, pois além de permitir superação de condições climáticas adversas ainda auxilia na dispersão passiva desses ovos para outras

regiões através do transporte de criadouros contaminados (DA SILVA; DA SILVA, 1999). Após a eclosão, as larvas passam por quatro estádios e um período pupal, todos eles aquáticos, para enfim chegarem à fase de adulto (Figura I-4). A proporção de sexo dos adultos emergidos é de cerca de um macho para cada fêmea. A longevidade desses mosquitos foi considerada maior para as fêmeas quando comparado aos machos, podendo chegar, em condições de laboratório, a até 50 dias para as fêmeas (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009; DA SILVA; DA SILVA, 1999). Estudos realizados em Singapura evidenciaram a capacidade de dispersão ativa desse mosquito, chegando até cerca de 320 metros (LIEW; CURTIS, 2004), entretanto, no Rio de Janeiro, essa capacidade ultrapassou 800 metros (HONÓRIO et al., 2003).

O período que compreende a eclosão dos ovos, o desenvolvimento larvário e fase de pupa pode não exceder sete dias, também em função de condições ideais. As pupas não se alimentam, porém respiram. É nessa fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto. As mesmas se mantêm na superfície da água flutuando, o que facilita a emergência do inseto adulto. O estágio de pupa dura aproximadamente de dois a três dias (DEGALLIER; SÁ FILHO, 2000; FORATTINI, 2002).

Os adultos, 24 horas após emergirem, estão aptos para o acasalamento; uma única cópula é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante a vida. Cada fêmea representa de dois a três ciclos gonotróficos durante a vida e pode pôr de 100 a 200 ovos por vez (DEGALLIER; SÁ FILHO, 2000; MARCONDES, 2011).

Figura I- 4. Esquema das fases evolutivas do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: (LELES, 2009) – Adaptado

Durante o desenvolvimento do *A. aegypti*, o inseto passa por quatro estágios: ovo, larva (com quatro instas), pupa e adulto (LOZOVEI, 2011). As formas imaturas se desenvolvem em água doce, parada e com pouca matéria orgânica. Os adultos apresentam hábitos diurnos e atividades como acasalamento e alimentação ocorrem durante o dia. Machos e fêmeas alimentam-se de seiva, entretanto, a fêmea necessita de repastos sanguíneos para a maturação de ovos, sendo apenas as fêmeas hematófagas. O início da manhã e o fim da tarde são os horários mais comuns para realização da hematofagia (FORATTINI, 2002).

Os criadouros de *A. aegypti* estão fortemente relacionados à ambientes urbanos. Destacam-se nesses ambientes, materiais recicláveis capazes de armazenar água de chuvas como: latas, vasos de plantas, pneus, garrafas, entre outros, bem como em solo ou vegetações próximos à superfície de água (KAY et al., 2000; LELES; ALESSANDRO; LUZ, 2012; REITER, 2007). Outros criadouros encontram-se ainda em locais de estoque de água, por exemplo, as caixas d'água e cisternas. Estes criadouros, são capazes de manter a população dos mosquitos nas cidades mesmo em períodos de menor umidade.

O tempo médio de incubação dos ovos (período compreendido entre a postura e a eclosão das larvas) de *A. aegypti* apresenta grande variação. Cepas goianas do mosquito, criadas em laboratório, tiveram esse período variando entre 1 e 85 dias (DA SILVA; DA SILVA, 1999). As larvas eclodem em blocos, contribuindo para a manutenção da população, mesmo que em diferente densidade populacional, durante todo o ano (RÍOS-VELÁSQUEZ et al., 2007).

1.3 Importância vetorial

Além dos incômodos gerados pela picada, o *A. aegypti* é o principal vetor da febre amarela em seu ciclo urbano, dos quatro sorotipos distintos dos vírus Dengue, Febre Chikungunya e Zika vírus. A transmissão de ambas as doenças para os humanos se dá a partir da picada do mosquito fêmea infectado. O vetor pode se infectar via repasto em um indivíduo previamente infectado (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; DONALISIO; FREITAS, 2015; ZANLUCA et al., 2015).

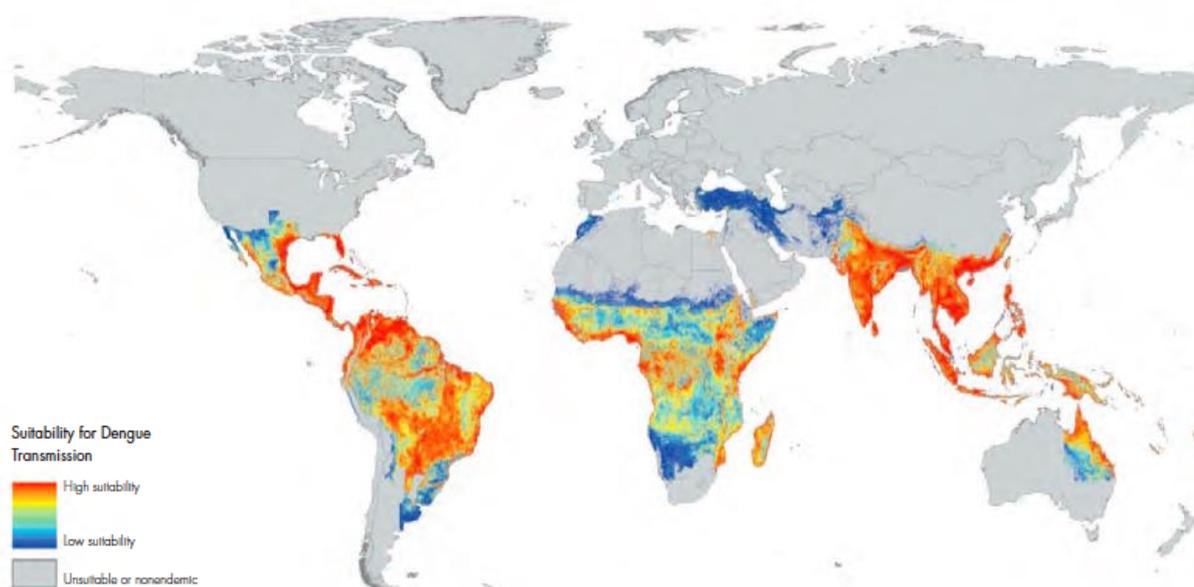
1.3.1 Vírus da Dengue (DENV)

A Dengue é caracterizada como uma das principais arboviroses de repercussão mundial. Casos da doença já foram notificados em mais de 140 países. Os surtos exercem uma enorme carga sobre populações, sistemas de saúde na maioria dos países tropicais do mundo. O

surgimento e propagação de todos os quatro sorotipos do vírus da Dengue da Ásia para as Américas, África e as regiões do Mediterrâneo Oriental representam uma ameaça pandêmica. Embora o fardo global da doença ainda é incerto, os padrões são alarmantes tanto à saúde humana como para a economia. Durante as últimas cinco décadas, a incidência de Dengue aumentou 30 vezes (figura I-5). Cerca de 50 100 milhões de novas infecções são estimadas para ocorrer anualmente em mais de 100 países endêmicos (WHO, 2012).

A disseminação da DENV nas Américas de 1995 a 2010 resultou em maior incidência de infecção no Brasil, comparou ao encontrado no Equador, Paraguai, Peru, Costa Rica, Bolívia, Argentina, México e Nicarágua. Um total de 2.756.622 casos da DENV foram relatados no Brasil entre 2002 e 2007, sendo 98,5% do total em Cone Sul. Os dados disponíveis demonstram a disseminação de *A. aegypti*, a circulação de quatro sorotipos DENV e dificuldade em erradicar ou controlar o mosquito (MARCONDES; XIMENES, 2016).

Figura I- 5. Distribuição do risco global de Dengue (determinação do estado do risco com base em relatórios combinados da WHO, dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, Gideon online, ProMED, DengueMap, Eurosurveillance



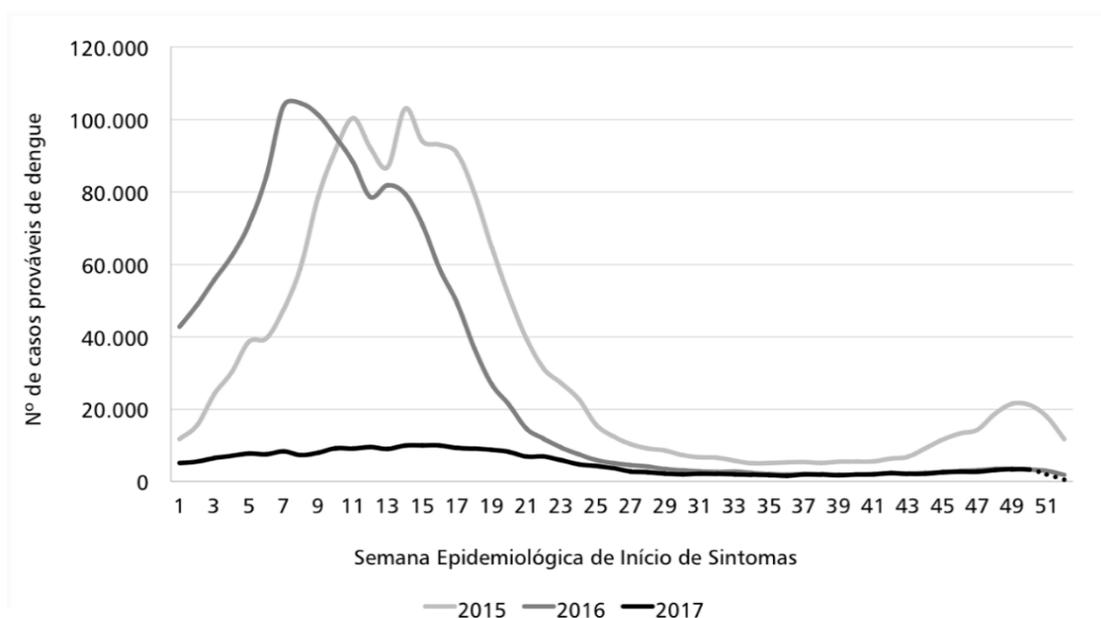
Fonte: WHO, 2012

O primeiro caso de Dengue confirmado por exames laboratoriais ocorrido no Brasil foi no ano de 1981, no Estado de Roraima. A partir desse momento até o ano de 1993 a doença seguiu em ondas epidêmicas em áreas isoladas do país. De 1994 em diante o Dengue vírus passou a gerar epidemias e endemias em praticamente todo o Brasil (SIQUEIRA et al., 2005).

Em 2016, da Semana Epidemiológica (SE) 1 à SE 52, foram registrados 1.483.623 casos prováveis de Dengue, e em 2015, 1.688.688 (Figura I-6). Em 2017, (1/1/2017 a 30/12/2017), foram registrados 252.064 casos prováveis de Dengue no país, com uma incidência de 122,3 casos/100 mil hab., e outros 247.206 casos suspeitos foram descartados. Em 2017, até a SE 52, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis (86.386 casos; 34,3%) em relação ao total do país. Em seguida aparecem as regiões Centro-Oeste (78.729 casos; 31,2%), Sudeste (59.601 casos; 23,6%), Norte (22.660 casos; 9,0%) e Sul (4.678 casos; 1,9%) (BRASIL, 2018).

A análise da taxa de incidência de casos prováveis de Dengue (número de casos/100 mil hab.), em 2017, segundo regiões geográficas, evidencia que as regiões Centro-Oeste e Nordeste apresentam as maiores taxas de incidência: 502,7 casos/100 mil hab. e 151,8 casos/100 mil hab., respectivamente. Entre as Unidades da Federação destacam-se GO (947,3 casos/100 mil hab.), CE (453,0 casos/100 mil hab.) e TO (331,2 casos/100 mil hab.). Em 2017, até a SE 52, foram confirmados 271 casos de Dengue grave e 2.590 casos de Dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2016, foram confirmados 919 casos de Dengue grave e 9.153 casos de Dengue com sinais de alarme (BRASIL, 2018).

Figura I- 6. Casos prováveis de Dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2015, 2016 e 2017



Fonte: Sinan NET- BRASIL, 2018

1.3.2 Febre Chikungunya (CHIKV)

Recentemente, CHIKV foi relatado nos Estados Unidos (Florida), El Salvador, Costa Rica, Panamá, Ilhas do Caribe, Venezuela e as Guianas, e causou um grande número de infecções no Brasil nos Estados brasileiros do Amapá, Bahia e Minas Gerais em 2014. Testes de 22 populações de *A. aegypti* e 13 de *A. albopictus* do Brasil e outros nove países mostraram alta susceptibilidade e capacidade de transmissão do CHIKV. Contudo, 96,7% de uma subpopulação de *A. albopictus* do Rio de Janeiro foram capazes de transmitir CHIKV. Grandes competições internacionais, Copa do mundo em 2014 e os Jogos Olímpicos em 2016 promoveram a introdução de novos vírus no Brasil. A ocorrência de CHIKV indicou a possibilidade de introduzir patógenos de regiões com climas diferentes, desde que vetores adequados estejam disponíveis (MARCONDES; XIMENES, 2016).

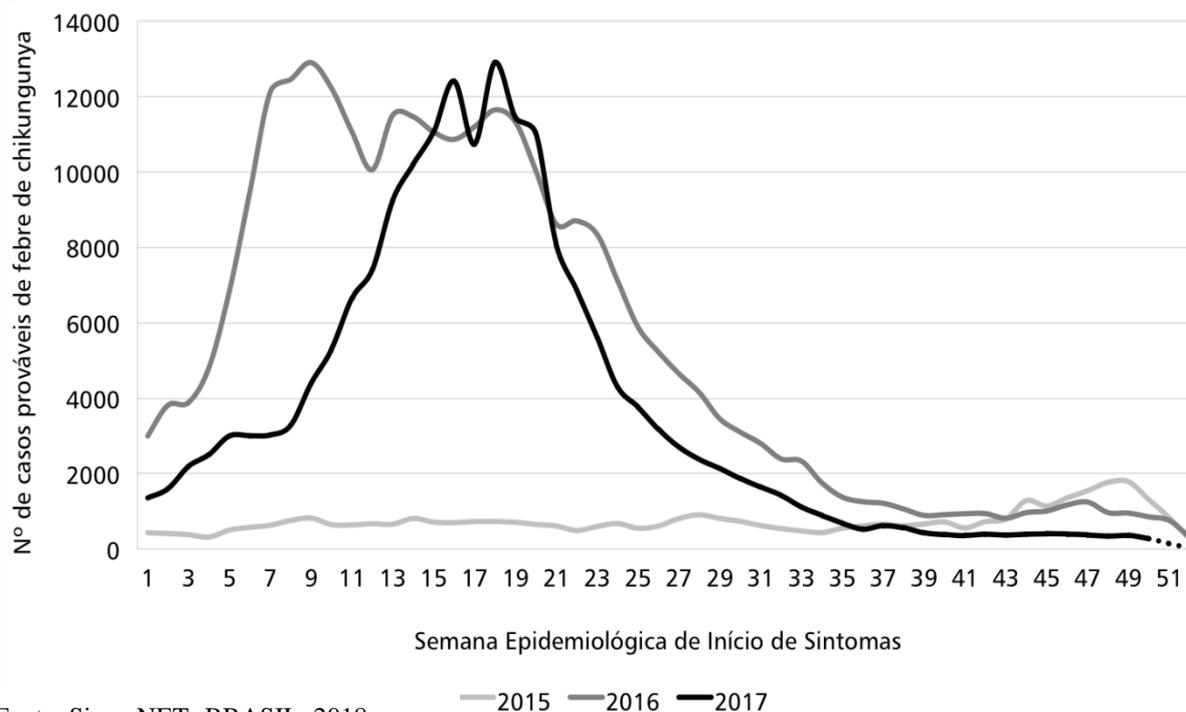
A CHIKV se caracteriza por quadros de febre associados à dor articular intensa e debilitante, cefaleia e mialgia. Embora possua sintomas semelhantes aos da Dengue, chama a atenção a poliartrite/artralgia simétrica (principalmente punhos, tornozelos e cotovelos), que, em geral, melhora após dez dias, mas que pode durar meses após o quadro febril. Embora quadros severos não sejam comuns e não ocorram choque ou hemorragias como na Dengue, manifestações neurológicas (encefalite, meningoencefalite, mielite, síndrome Guillain Barré), cutâneas bolhosas e miocardite podem trazer gravidade aos casos; principalmente, em bebês e idosos (DONALISIO; FREITAS, 2015).

Métodos moleculares utilizados na Coreia permitiram o diagnóstico de infecção por CHIKV em pacientes originalmente suspeitos como sendo infectado pela DENV. Assim, essas doenças precisarão ser adequadamente diagnosticadas no Brasil, onde ambos os casos venha a ser relatados (MARCONDES; XIMENES, 2016).

Em 2016, da SE 1 à SE 52, sendo registrados no país 277.882 casos prováveis de febre de Chikungunya (Figura I-7). Foram confirmados 216 óbitos por febre de Chikungunya, nas seguintes UFs: PE (55), CE (40), RN (39), PB (36), RJ (16), MA (11), AL (10), BA (3), SE (2), AP, PI GO e DF com (1). Em 2017, foram registrados 185.737 casos prováveis de febre de Chikungunya no país, com uma taxa de incidência de 90,1 casos/100 mil hab.; destes, 151.966 (81,8%) foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis, por regiões geográficas, mostra a região Nordeste com a maior taxa de incidência – 249,7 casos/100 mil hab. –, seguida da região Norte, com 93,6 casos/100 mil hab. Entre as UFs, destacam-se CE (1.271,0 casos/100 mil hab.), RR (795,0 casos/100 mil hab.) e TO (207,1 casos/100 mil hab.). Foram confirmados laboratorialmente 173 óbitos por febre de Chikungunya, nas seguintes UFs:

CE (137), MG (12), PA, TO (4), RJ, SP, ES, BA, PB, RN, PI (2), PE, AP, GO e MT (1) (BRASIL, 2018).

Figura I- 7. Casos prováveis de Chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2015, 2016 e 2017



Fonte: Sinan NET- BRASIL, 2018

1.3.3 Zika Vírus (ZIKV)

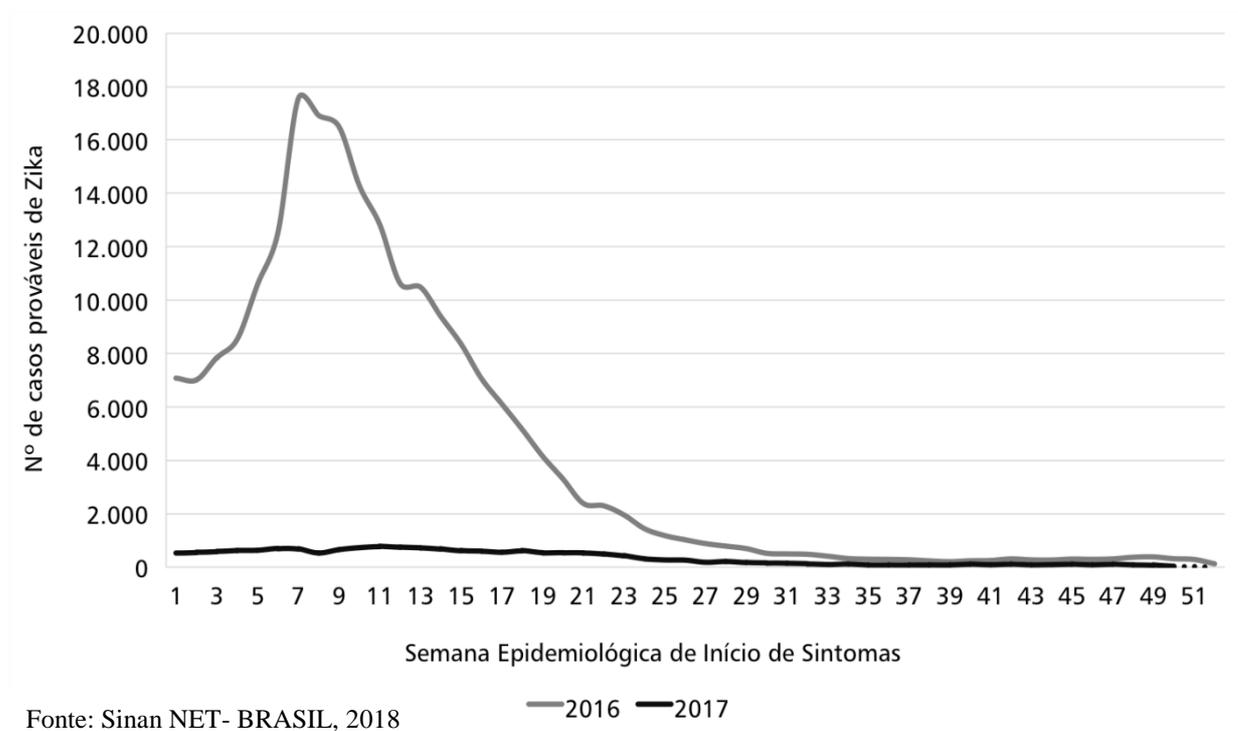
O ZIKV provavelmente foi introduzido no Brasil durante a Copa do Mundo de 2014, quando muitos turistas visitaram as capitais do Brasil, possivelmente contribuindo para a infecção de mosquitos *Aedes (Stegomyia)*. Viagens domésticas e comerciais ligam centros urbanos, contribuindo para o movimento rápido de vários mosquitos vetores e humanos infectados. Comumente, os seres humanos facilitaram o estabelecimento generalizado dos vetores. A partir de 2011 até 2014, infecções concomitantes com DENV, CHIKV e ZIKV (cepa asiática) foram observados na região do Pacífico, como poderia ser esperado, já que esses vírus usam os mesmos vetores (MARCONDES; XIMENES, 2016).

A apresentação clínica da infecção por ZIKV é inespecífica e por essa razão, pode ser confundida com outras doenças febris, principalmente DENV e CHIKV. Esse aspecto dos achados clínicos associado ao fato de 80% dos pacientes apresentarem um quadro assintomático ou leve, somado à indisponibilidade de testes diagnósticos específicos nas unidades

hospitalares, esta contribui para a subnotificação dos casos e desconhecimento da real incidência do ZIKV. O Ministério da Saúde do Brasil chama a atenção para casos de febre acompanhada de exantema pruriginoso como indicativos de suspeita desta infecção (LUZ; IGOR; VIEIRA, 2015).

Foi confirmada transmissão autóctone de ZIKV no país a partir de abril de 2015. Até a SE 52 deste ano, 19 Unidades da Federação confirmaram laboratorialmente autoctonia da doença (BRASIL, 2016). Em 2016, da SE 1 à SE 52, foram registrados 265.207 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país (Figura I-8). Foram confirmados laboratorialmente oito óbitos por ZIKV – RJ (4), ES (2), MA e PB (1) (BRASIL, 2017, 2018).

Figura I- 8. Casos prováveis de Zika vírus, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016 e 2017



Em 2017, foram registrados 17.452 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país, com taxa de incidência de 8,8 casos/100 mil hab.; destes, 8.839 (50,6%) foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis de Zika, segundo regiões geográficas, demonstra que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentaram as maiores taxas de incidência: 39,3 casos/100 mil hab. e 12,4 casos/100 mil hab., respectivamente. Entre as UFs, destacam-se MT (65,0 casos/100 mil hab.), GO (57,8 casos/100 mil hab.), TO (44,9 casos/100 mil hab.) e

RR (39,5 casos/100 mil hab.). Até a SE 52, foram confirmados laboratorialmente dois óbitos por ZIKV, nos Estados de São Paulo e Rondônia (BRASIL, 2018).

Em relação às gestantes, foram registrados 2.160 casos prováveis, sendo 949 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. Ressalta-se que os óbitos em recém-nascidos, natimortos, abortamento ou feto, resultantes de microcefalia possivelmente associada ao ZIKV, foram acompanhados pelo Boletim Epidemiológico sobre o Monitoramento dos Casos de Microcefalia no Brasil. Em 2017, até a SE 52, não foi confirmado laboratorialmente nenhum óbito por Zika vírus (BRASIL, 2018).

1.4 Mecanismos de controle do *Aedes aegypti*

O controle do *A. aegypti* tem constituído um importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento. Mesmo considerando-se situações em que os recursos destinados ao controle do vetor sejam apropriados para a implementação de programas, muitas vezes não se tem alcançado sucesso. A única forma de controle das arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti*, é o combate sobre o vetor, reduzindo suas populações a níveis que não representem risco para a saúde pública (LAURA DE SENE AMÂNCIO ZARA et al., 2016), e tem como principais objetivos: (a) Manejar os problemas existentes como surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade; (b) Prevenir epidemias ou a reintrodução das doenças; e (c) Reduzir os fatores de risco ambiental da transmissão. Para que esses objetivos sejam atingidos é necessário ter informações sobre o hospedeiro humano, a doença, o vetor e o ambiente e dispor dos recursos necessários para a aplicação oportuna (BRAGA et al., 2004; FUNASA, 2001a).

1.4.1 Campanhas educativas

As campanhas e ações educativas tem como objetivo a conscientização dos agentes de campo e da população sobre medidas de prevenção da Dengue através do controle do vetor. A participação da população é essencial para o controle do mosquito uma vez que dela depende a diminuição do número de criadouros artificiais (FUNASA, 2001a, 2001b). A conscientização da população pode ser feita por meios de comunicação, das escolas, de associações comunitárias, cursos, propaganda em rádio e televisão (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

1.4.2 Controle mecânico

Consiste na adoção de práticas capazes de eliminar o vetor e os criadouros ou reduzir o contato do mosquito com o homem. Essas práticas visam o controle de vetores a partir de ações voltadas para o saneamento básico (qualquer modificação do meio que reduza as populações de vetores) e educação ambiental para remoção ou destruição dos insetos, por meio da redução do número de criadouros artificiais no ambiente (pneus, vasos de plantas, coleta adequada de lixo) (LAURA DE SENE AMÂNCIO ZARA et al., 2016).

Segundo a OMS, o saneamento pode ser feito com três objetivos: (1) Modificação do meio como, por exemplo, adequação dos serviços de água potável; (2) Manipulação do meio com tratamento de dejetos sólidos; (3) Saneamento básico: coleta de lixo, tratamento de esgoto e água encanada; e (4) Medidas para reduzir o contato humano com o vetor, como a instalação de telas em janelas, mosquiteiros e uso de repelentes (OPAS, 2011; WHO, 2013).

1.4.3 Controle químico

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (BRAGA; VALLE, 2007). Esse tipo de controle é realizado para o *A. aegypti* desde o início do século passado, com a primeira campanha contra a febre amarela realizada em Cuba e no Panamá quando as residências foram tratadas com petróleo e piretrina. Na década de 1940 o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) se destacou como o principal agente químico utilizado nos programas de erradicação do mosquito realizados no continente americano (PONTES et al., 2015).

A partir do surgimento de resistência ao DDT, na década de 1960, inseticidas organofosforados começaram a ser utilizados. Atualmente o emprego desse método é limitado, sendo a última alternativa de controle a ser utilizada, uma vez que ações menos agressivas e eficazes devem ser prioritárias. Seu uso é recomendado em caso de emergência ou quando não houver outra ferramenta disponível (FUNASA, 2001a, 2001b; OPAS, 2011; WHO, 2013).

1.4.4 Controle biológico

O termo controle biológico é empregado como a ação de predadores, parasitóides e patógenos que mantêm as densidades das pragas e doenças numa média mais baixa do que

ocorreria na sua ausência, sem a necessidade de intervenção humana, por organismos vivos (antagonistas) da população de outras espécies animais. Este tipo de controle não deve ser subestimado, já que populações de muitos protozoários, artrópodes e helmintos parasitos podem apresentar crescimento descontrolado na ausência de seus respectivos antagonistas naturais (SHAHID et al., 2012).

Com base neste comportamento natural, surgiu o conceito de controle biológico, agora com a intervenção humana, para controlar e/ou combater as chamadas pragas parasitárias, observadas tanto na agricultura quanto em medicina veterinária (ALVES, 1998).

A alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, a capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, o caráter enzoótico e a não toxicidade são atributos favoráveis para que este tipo de estratégia possa fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir populações de insetos indesejáveis para níveis que não provoquem prejuízos. Além disso, o controle biológico possibilita a associação de microrganismos com formulações medicamentosas sem resíduos ou toxicidade para animais e ambiente, bem como o menor custo e diminuição da possibilidade de aparecimento de resistência, haja vista a variedade de mecanismos envolvidos e compostos produzidos e empregados por estes agentes no controle de pragas alvo (ALVES; FARIA, 2010; ALVES, 1998; BARROS et al., 2010).

1.4.5 Controle biológico por fungos filamentosos

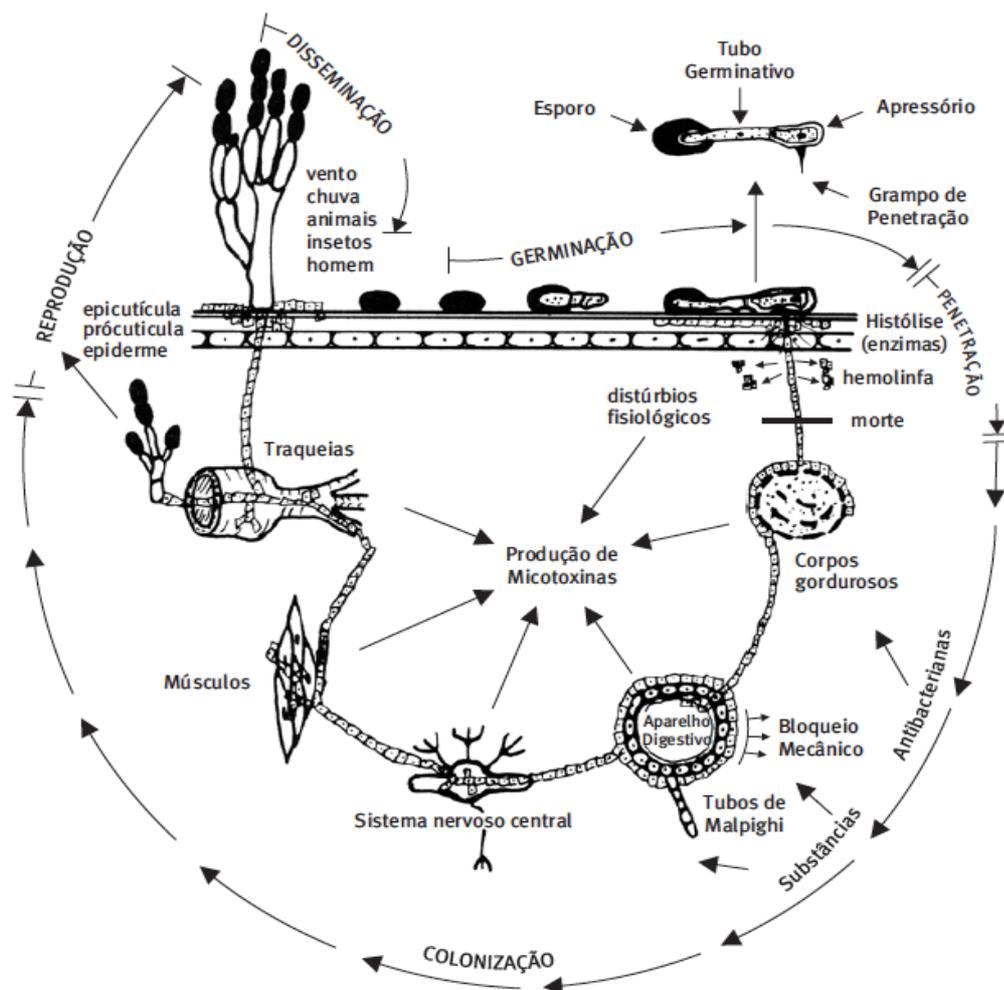
Fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos utilizados no controle biológico de pragas. Muitos fungos são patógenos de largo espectro e estão dispersos em diferentes ambientes, como solos, vegetais, água e ar (HAJEK; DELALIBERA, 2010). As pesquisas com fungos entomopatogênicos como controladores biológicos têm sido realizadas visando auxiliar o estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle de artrópodes (ALVES, 1998; LOPES et al., 2007; SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2004). Merecem destaque os fungos dos gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH; PELL, 2003).

São conhecidos cerca de 90 gêneros com 700 espécies de fungos entomopatogênicos. Esses causam em torno de 80% das doenças de insetos de interesse na agricultura ou saúde pública, sendo que, cerca de vinte espécies de fungos entomopatogênicos incidem sobre pragas de importância econômica. Os fungos são capazes de atacar um grande número de insetos em praticamente todos os estágios de desenvolvimento. A maioria dos fungos atua por contato e

por ingestão, sendo que sua grande variabilidade genética permite estudos de seleção de cepas ou isolados e avaliação dos mais virulentos para o controle de pragas (ALMEIDA et al., 2016; ALVES, 1998; BARROS et al., 2010).

As diferentes estruturas do fungo a serem utilizadas no controle de pragas e suas funções no ciclo natural do patógeno são: conídios, com função de reprodução e de disseminação; blastosporos, com função de disseminação na hemolinfa do hospedeiro; micélio, com função de migrar para fora do hospedeiro e permitir a conidiogênese do fungo; e esporos de resistência, com função de permitir a sobrevivência do fungo no solo. O ciclo biológico de fungos entomopatogênicos, em insetos terrestres, inicia com adesão de conídios ao tegumento do inseto (Figura I- 9) (ALVES, 2011).

Figura I- 9. Esquema do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (*Metarhizium anisopliae* x *Mahanava posticata* - cigarrinha da pastagem)



Fonte: Alves, 2011

A adesão é um processo complexo, na maioria dos fungos. Inicia imediatamente após o contato entre conídios e a cutícula do inseto e envolve forças hidrofóbicas, eletrostáticas e interações moleculares entre o patógeno e a superfície do hospedeiro (SANTI et al., 2010). A cutícula do inseto atua como barreira mecânica e bioquímica de defesa contra a infecção fúngica associada a barreiras comportamentais como a agregação de insetos e hábitos higiênicos (HOWARD et al., 2010). Umidade relativa perto da saturação e tempos mínimos de exposição a essa umidade ótima foram descritos como fatores-chave em fases extra-tegumentares de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* durante a invasão do hospedeiro e após a morte de triatomíneos e outros insetos (FARGES; LUZ, 2000; PELIZZA et al., 2007; SANTOS et al., 2009; SOSA-GÓMEZ; ALVES, 2000).

Após adesão, inicia-se a germinação, que se completa entre doze e vinte horas, com formação do tubo germinativo e hifas. Em alguns fungos há formação de apressório e grampo de penetração (“clamp connection”). Após a germinação, as hifas formadas penetram através do tegumento. A penetração é favorecida pela pressão exercida pelas hifas em áreas membranosas ou esclerosadas associadas a enzimas como proteases, quitinases, amilases e lipases, produzidas durante a penetração (BUTT; JACKSON; MAGAN, 2001). Proteases e metabólitos secundários tóxicos são considerados fatores-chave para a eficiência do processo de invasão (SANTI et al., 2010; ST. LEGER; STAPLES; ROBERTS, 1993).

Após a penetração das hifas, que dura entre seis e doze horas, estas se ramificam e colonizam o tegumento do inseto e em seguida atingem a hemocele. O inseto ativa mecanismos de defesa interna, como estímulo da fagocitose, destruição de plasmócitos infectados, encapsulação do fungo e formação de nódulos, para evitar o crescimento fúngico (HAJEK; DELALIBERA, 2010; HAJEK; ST. LEGER, 1994).

O fungo escapa do sistema imune através da formação de estruturas como corpos de hifas e secreção de toxinas que suprimem a resposta imune de insetos. Essas toxinas, associadas a alterações patológicas na hemocele, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento do micélio e início do processo de esporulação, causam a morte do inseto (ALVES, 2011).

No cadáver, o fungo coloniza o corpo gorduroso, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipoderme, sistema nervoso, músculos e traqueias. Em seguida, as hifas emergem através de espiráculos e da cutícula. Associada ao crescimento do micélio, ocorre a esporulação do fungo no cadáver e disseminação de propágulos fúngicos no ambiente através da água, ventos e animais, podendo contaminar e infectar novos insetos em diferentes fases de desenvolvimento (ALVES, 2011, 1998).

Após o processo de infecção e colonização do hospedeiro, ocorre a extrusão e conidiogênese do patógeno sobre o cadáver, com grande crescimento micelial e grande produção de conídios sobre o corpo do inseto. Além disso, os conídios dos fungos possuem capacidade de disseminação horizontal e podem ser levados por diferentes agentes para outros lugares distantes (ALVES, 1998). Outro fator importante é a produção de micotoxinas pelos fungos, que muitas vezes, contribuem para a morte do hospedeiro, fecundidade e percentagem de eclosão dos ovos, sendo estes fatores proporcionalmente relacionados à concentração de esporos depositados sobre os mesmos (KAAYA; HEDIMBI, 2012; MARANGA et al., 2005).

1.5 Controle biológico de vetores

Fungos têm sido estudados como ferramenta para controle biológico de vetores importantes em saúde pública. Em ensaios de laboratório, triatomíneos, vetores da tripanossomíase americana em diversos países da América Latina, mostraram-se muito susceptíveis à infecção por fungos Hyphomycetes (LAZZARINI; ROCHA; LUZ, 2006; LUZ; BATAGIN, 2005; ROCHA; SILVA; LUZ, 2011). A atividade larvicida e adulticida de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em mosquitos já foram descritas em condições de laboratório (ALVES et al., 2002; SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2004; SILVA; SILVA; LUZ, 2004). Esses fungos foram estudados intensamente para uso contra *Culex quinquefasciatus*, *A. albopictus*, *A. aegypti*, e *Anopheles gambiae* (ALVES et al., 2002; SCHOLTE et al., 2005; SCHOLTE; TAKKEN; KNOLS, 2007).

A atividade de fungos varia de acordo com a espécie. Linhagens virulentas que conseguem infectar e eliminar rapidamente todos os estágios evolutivos de *A. aegypti* têm potencial para um controle mais eficiente desse vetor. *Metarhizium anisopliae* apresentou atividade larvicida (SILVA; SILVA; LUZ, 2004), adulticida (PAULA et al., 2011; SCHOLTE; TAKKEN; KNOLS, 2007) e ovicida (ALBERNAZ; TAI; LUZ, 2009; LUZ et al., 2007, 2008; SANTOS et al., 2009) em *A. aegypti*. Outros fungos dos gêneros *Isaria*, *Paecilomyces* e *Penicillium* também infectam ovos de *A. aegypti*, semelhante a *M. anisopliae* (LUZ et al., 2007).

A busca de alternativas que auxiliem no controle de artrópodes com menor impacto ambiental, diminuindo a utilização de compostos químicos, têm sido uma constante na pesquisa nos últimos anos. As pesquisas com fungos entomopatogênicos como controladores biológicos têm sido realizadas visando auxiliar o estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle de artrópodes (ALVES, 1998; ALVES et al., 2002).

Fungos entomopatogênicos propagam-se em condições naturais por disseminação de conídios formados, principalmente, sobre insetos mortos pela infecção, contaminando o meio ambiente e novos insetos (ALVES, 1998). A transmissão acontece indiretamente ou também pelo contato direto entre insetos saudáveis e insetos vivos contaminados e/ou infectados ou ainda insetos mortos com fungos. Ainda existem poucos estudos sobre transmissão de micoses entre insetos vivos ou diferentes estágios do mesmo inseto. Melhores conhecimentos sobre a dinâmica de uma micose numa população alvo relacionada à transmissão horizontal irão contribuir para um controle mais efetivo da praga visada (ALVES et al., 2002; SOSA-GÓMEZ; ALVES, 2000).

Estudando doses variadas de conídios de *M. anisopliae* em *A. gambiae*, observaram que fêmeas tratadas contaminaram machos durante o voo de acasalamento. Para *A. aegypti*, entretanto, não existe relatos sobre uma transmissão da infecção entre estágios (FARENHORST et al., 2008; SCHOLTE et al., 2004).

Grande parte de fungos entomopatogênicos precisa de alta umidade, sobretudo, durante o desenvolvimento extra-cuticular como na invasão do inseto, e propagação de conídios após a morte do inseto. Formulados à base de óleo, garantem um contato melhor do produto com a cutícula e ovos do inseto, e assim uma maior contaminação quantitativa também com conídios, dando a característica lipofílica tanto da cutícula como dos conídios (BARRETO et al., 2016). Além disso, o óleo aumenta a resistência dos conídios a fatores abióticos como umidades sub-ótimas e luz ultravioleta (ALVES et al., 2002), sendo que formulados oleosos têm mostrado mais eficiência, além de permanecerem viáveis ou mais tempo quando comparados a formulados aquosos ((BATTA, 2003; MARANGA et al., 2005).

Em estudos sobre transmissão horizontal entre indivíduos do mesmo estágio e entre estágios diferentes, grupos tratados foram expostos a grupos não tratados ou à sua própria prole (SCHOLTE et al., 2004). Fungos entomopatogênicos normalmente não estão relacionados a quadros infecciosos em humanos. Casos esporádicos foram notificados em indivíduos imunossuprimidos (VESTERGAARD et al., 2003). Para *M. anisopliae* não se conhecem efeitos adversos em organismos não alvos (ZIMMERMANN, 2007).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERNAZ, D. A. S.; TAI, M. H. H.; LUZ, C. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 141–147, 2009.
- ALMEIDA, J. E. M. et al. Coleção de fungos entomopatogênicos: biodiversidade para o controle biológico de pragas na agropecuária brasileira. **RG News**, v. 2, n. 1, p. 15–19, 2016.
- ALVES, R. T. Controle biológico de insetos-praga. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. DE; JUNIOR, F. B. DOS R. (Eds.). **Biociência - estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1ª ed. Planatina - DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 379–408.
- ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. 2010, p. 47.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba - SP: Fealq, 1998. p. 289–370.
- ALVES, S. B. et al. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). **J. Appl. Ent.**, v. 126, p. 504–509, 2002.
- BARRETO, L. P. et al. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* on tick cuticle and artificial medium. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 138, p. 94–103, 2016.
- BARROS, N. M. et al. Fungos como agente de controle de pragas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Fungos - Uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. p. 491–532.
- BATTA, Y. A. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Crop Protection**, v. 22, p. 415–422, 2003.
- BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 847–852, 2009.
- BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199–203, 2004.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, dez. 2007.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 40, 2015. **Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde** 2016.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v. 48, n. Tabela 2, p. 1–9, 2017.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika

até a Semana Epidemiológica 52, 2017. **Boletim Epidemiológico - SVS - Ministério da Saúde**, v. 49, n. 2, p. 1–13, 2018.

BUTT, T. M. (TARIQ M. .; JACKSON, C. (CHRIS); MAGAN, N. (NARESH). **Fungi as biocontrol agents : progress, problems and potential**. [s.l.] CABI Pub, 2001.

CHAVASSE, D. C.; YAP, H. H. **World Health Organization - (WHO) Chemical Methods for the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance**GenebraCTD/WHOPES/97.2,1997.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998.

DA SILVA, H. H.; DA SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 349–355, 1999.

DEGALLIER, N.; SÁ FILHO, G. **Os mosquitos (Diptera, Culicidae): generalidades, classificação e importância vetorial**. Brasília, DF: [s.n.].

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. v. 18, n. 1, p. 283–285, 2015.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 5, p. 259–272, 2002.

EIRAS, Á. E. Culicidae. In: NEVES, D. P. et al. (Eds.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 355–367.

FARENHORST, M. et al. African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 910–916, 2008.

FARGES, J.; LUZ, C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, n. 3, p. 202–211, 2000.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica - Identificação, biologia e epidemiologia**. [s.l.: s.n.]. v. 2

FUNASA. **Dengue, Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor - Manual de Normas Técnicas**. 3ª ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2001a.

FUNASA. **Controle de vetores - Procedimentos de segurança**. 1ª ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2001b. v. 1

HAJEK, A. E.; DELALIBERA, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 147–158, 2010.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and Insect Hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, n. 1, p. 293–322, 1994.

HONÓRIO, N. A. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 191–8, 2003.

HOWARD, A. F. V. et al. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2010.

KAAYA, G. P.; HEDIMBI, M. The use of entomopathogenic fungi , *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as bio-pesticides for tick control. **International Journal of agricultural sciences**, v. 2, n. 6, p. 245–250, 2012.

KAY, B. H. et al. The importance of subterranean mosquito habitat to arbovirus vector control strategies in north Queensland, Australia. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 846–853, 2000.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 1–18, 2015.

LAURA DE SENE AMÂNCIO ZARA, A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.

LAZZARINI, G. M. J.; ROCHA, L. F. N.; LUZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v. 110, n. 4, p. 485–492, 2006.

LELES, R. N. **Efeito de fungos entomopatogênicos na mortalidade de adultos, oviposição e eclosão de larvas de *Aedes aegypti***. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2009.

LELES, R. N.; ALESSANDRO, W. B. D.; LUZ, C. Effects of *Metarhizium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. p. 1579–1582, 2012.

LIEW, C.; CURTIS, C. F. Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, in Singapore. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 4, p. 351–360, 2004.

LOPES, R. B. et al. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27–31, 2007.

LOZOVEI, A. L. Culicidae (Mosquitos). In: MARCONDES, C. B. (Ed.). **Entomologia Médica e Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 107–174.

LUZ, A. C. et al. Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 799–804, 2007.

LUZ, C. et al. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. v. 103, p. 214–215, 2008.

LUZ, C.; BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. **Micopathologia**. p. 51–62, 2005.

LUZ, K. G.; IGOR, G.; VIEIRA, R. D. M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 24, n. 4, p. 785–788, 2015.

MARANGA, R. O. et al. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, v. 159, p. 527–532, 2005.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. DE F. F. DE M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. July 2015, p. 4–10, 2016.

OPAS. **Estratégia de gestão integrada da Dengue no Brasil 2011**. Disponível em: <<http://blogs.opasbrasil.org/dengue/2011/12/divulgado-o-mapa-da-infestacaopelo-edes-aegypti-no-brasil>>. Acesso em: 7 dez. 2013.

PAULA, A. R. et al. Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 91, 2011.

PELIZZA, S. A. et al. Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 2, p. 133–137, 2007.

PINHEIRO, P. **Como reconhecer o mosquito da Dengue - *Aedes aegypti***. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/2012/04/fotos-mosquito-dengue.html>>. Acesso em: 1 abr. 2018.

PONTES, G. O. et al. O controle microbiano de insetos e vetores – um modelo de aplicação biotecnológica e biodiversidade amazônica. In: MAFRA, R. Z. et al. (Eds.). **Gestão da Biotecnologia na Amazônia: a inovação e a exploração dos recursos e ecossistemas naturais para o desenvolvimento de produtos e processos**. 1^a ed. Manaus: EDUA / UFAM, 2015. p. 42–56.

PUSTIGLIONE, M. Occupational medicine and emerging, reemerging and neglected diseases: the conduct in the case of dengue, Chikungunya and Zika virus/ **Medicina do trabalho e doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas: a conduta no caso das febres da dengue, do Chik**. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho VO** - 14, v. 14, n. 1, p. 1, 2016.

REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of control strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 261–273, 2007.

RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M. et al. Distribution of dengue vectors in neighborhoods with

different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 617–623, 2007.

ROCHA, L. F. N.; SILVA, I. G.; LUZ, C. Activity of some hypocrealean fungi collected in a Cerrado ecosystem against *Rhodnius* spp. (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. **Acta Tropica**, v. 118, n. 1, p. 63–66, 2011.

SANTI, L. et al. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 874–880, 2010.

SANTOS, A. H. et al. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v. 50, n. 1, p. 37–42, 2009.

SCHOLTE, E.-J. et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of insect science (Online)**, v. 4, p. 19, 2004.

SCHOLTE, E.-J. et al. An entomopathogenic fungus for control of adult african malaria mosquitoes. **Science**, v. 308, n. 2005, p. 1641–1642, 2005.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 6, p. 4–9, 2004.

SCHOLTE, E.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica** v. 102, p. 151–158, 2007.

SHAH, P.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 413–423, 2003.

SHAHID, A. A. L. I. et al. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. **Arch. Biol. Sci**, v. 64, n. 1, p. 21–42, 2012.

SILVA, R. O.; SILVA, H. H. G.; LUZ, C. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil of the central brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. **Revista de patologia tropical**, v. 33, n. 2, p. 207–216, 2004.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2005.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; ALVES, S. B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 3, p. 515–522, 2000.

ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, n. 1, p. 81–84, jan. 1993.

VESTERGAARD, S. et al. Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: **Environmental Impacts of Microbial Insecticides**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 35–62.

WHO. Global Strategy for dengue prevention and control 2012–2020. **World Health Organization**, p. 43, 2012.

WHO. Malaria entomology and vector control. **World Health Organization**, n. July, p. 192, 2013.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

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

MANUSCRITO 1: O CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS E VETORES – UM MODELO DE APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA E BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA

Grafe Oliveira Pontes
Luziana de Sousa Xavier
José Eduardo Marcondes de Almeida
Wanderli Pedro Tadei

“Pontes GO, Xavier LS, Almeida JEM, Tadei WP. O controle microbiano de insetos e vetores – um modelo de aplicação biotecnológica e biodiversidade amazônica. In: MAFRA, R. Z. et al. (Eds.). **Gestão da Biotecnologia na Amazônia: a inovação e a exploração dos recursos e ecossistemas naturais para o desenvolvimento de produtos e processos**. 1ª ed. Manaus: EDUA / UFAM, 2015. p. 42–56. ISBN: 978-85-7401-802-7.

1. INTRODUÇÃO

A sociedade, as empresas e os mercados tornam-se cada vez mais globais e exigentes, o que conduz a um desenvolvimento econômico cada vez mais veloz. Neste contexto, a capacidade de liberar conhecimentos e criar novas ideias, diversificar metodologias e aprimorar técnicas tornam-se fatores fundamentais para atender às variabilidades de tendências e necessidades para produtos de uso e de origem biológica (FREIRE, CHAVES E LUZ, 2008).

A Inovação, em seu sentido mais amplo, pode ser definida como algo novo, sendo ela o ponto de partida na relação que há entre empreendedorismo, inovação e tecnologia. Estes procedimentos estão presentes cada vez mais na realidade corporativa (ROGERS E SHOEMAKER, 1971).

O termo biotecnologia refere-se a um conjunto de tecnologias habilitadoras (enabling technologies) que possibilitam utilizar, alterar e otimizar organismos vivos ou suas partes, células, organelas e moléculas, para gerar produtos, processos e serviços com aplicações econômicas em saúde humana e animal, agricultura e meio ambiente (JUDICE E BAÊTA, 2005).

As perspectivas da moderna biotecnologia vêm sendo debatidas sob o enfoque das oportunidades tecnológicas, cuja principal característica é a de procurar, na força desse novo conhecimento, possibilidades de investimentos em novas áreas de aspectos multidisciplinares e econômicos. Os mais otimistas falam no surgimento de um novo setor, o biotecnológico, com configuração própria para se transformar no fenômeno que foi - “e segue sendo” - a informática, iniciada nos anos 60.

O setor biotecnológico também participa e inova com sua importância socioeconômica, que pode ser ilustrada ao seu mercado mundial, estimado em torno de 50 bilhões de dólares, sendo que, somente na agricultura, 30 bilhões de dólares (BARBOSA, 2000). O agronegócio brasileiro vem apresentando resultados significativos - a marca histórica de US\$ 49,7 bilhões em 2007, favorecido pelo desenvolvimento biotecnológico (BRANCO E VIEIRA, 2010).

Como exemplo de modelo em inovação biotecnológica, o programa de controle microbiano de vetores é o método que consiste no combate de pragas por meio de inimigos naturais, cujos microrganismos mantêm os níveis de população dessas pragas em equilíbrio. O controle biológico deve ser considerado como um componente de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), ao lado de outros métodos de controle de insetos e ácaros, associados ou substituindo os defensivos organo-sintéticos que foram utilizados, de maneira isolada, por longos períodos, causando um grande impacto nas técnicas produtivas agrícolas (GALLO et al., 2002).

Neste sentido, o foco deste estudo pode ser sintetizado como exploratório e descritivo para os problemas ligados ao controle de insetos-pragas, sua resistência aos métodos de controle, riscos para a agricultura brasileira e a saúde pública, e os avanços biotecnológicos para o controle de vetores em doenças que acometem a população em regiões endêmicas do Brasil.

2. CONTROLE DA MALÁRIA E DA DENGUE

Apesar do desenvolvimento tecnológico e científico, a malária e a Dengue permanecem como um dos maiores problemas de saúde pública a serem combatidos. A malária é uma doença infecciosa não contagiosa, transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818, reconhecida como um grave problema de saúde pública no mundo, estando presente nas regiões geográficas de clima tropical e subtropical. Em mortes, a malária é apenas superada pela AIDS. De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2011), dentre as regiões mais afetadas, destacam-se a África, o Sudeste Asiático e a América Latina.

Cerca de 3,3 bilhões de pessoas - 1/2 da população mundial - estão em áreas de risco de contrair malária. Entre 2000 e 2013, a taxa de mortalidade global da malária caiu em 47%. A grande expansão do pacote de núcleo OMS, a qual recomendou medidas de controle do vetor - a quimioprevenção, testes de diagnóstico e tratamento - revelou-se tanto rentável e eficiente, com foco no combate ao *Plasmodium falciparum* (WHO, 2015b).

No entanto, milhões de pessoas ainda não conseguem acessar a prevenção e tratamento da malária, e a maioria dos casos e mortes continua a não ser registrada e não declarada. Em

2013, a malária matou cerca de 584.000 pessoas. A meta da OMS é reduzir a carga global da doença em 40% até 2020, e em pelo menos 90% até 2030. Seu objetivo é eliminar a malária em pelo menos 35 novos países em 2030 (WHO, 2015b).

No ciclo de infecção, a malária é transmitida ao homem por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera; Culicidae), infectadas por protozoários do gênero *Plasmodium*, destacando-se o *Anopheles darlingi* Root, 1926, como o principal vetor da malária no Brasil e na Amazônia brasileira (DEANE, 1988; TADEI et al., 1998; 2010).

A Dengue é caracterizada como uma das principais arboviroses de repercussão mundial. A incidência da Dengue tem aumentado 30 vezes ao longo dos últimos 50 anos. Os dados referentes à doença podem inferir que cerca de 50 a 100 milhões de infecções são estimadas para ocorrer anualmente, em mais de 100 países endêmicos, colocando quase metade da população do mundo em risco (WHO, 2012a).

Casos dessa doença já foram notificados em mais de 100 países. O primeiro caso de Dengue, confirmado por exames laboratoriais, ocorrido no Brasil foi registrado em 1981. Atualmente, o Brasil é o país das Américas mais afetado em número de casos de Dengue, sendo responsável por, aproximadamente, 70% dos casos notificados. A circulação concomitante dos três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) na maioria dos Estados tem aumentado o número de casos graves e a taxa de hospitalização (OPAS, 2011; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2005).

Estima-se que 500 mil pessoas com Dengue grave necessitam de internação todos os anos, uma grande parte dos quais são crianças. Cerca de 2,5% dos afetados morrem. Casos nas Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental excedeu 1,2 milhões em 2008 e mais de 3 milhões em 2013 (com base em dados oficiais apresentados pelos Estados-Membros). Recentemente, o número de casos notificados continuou a aumentar. Em 2013, foram notificados 2.350.000 casos da Dengue nas Américas, dos quais 37.687 eram casos da Dengue grave (WHO, 2015a).

Atualmente o eixo dos programas de controle da malária e Dengue tem sido o combate aos mosquitos vetores mediante a vigilância vetorial e a aplicação de inseticidas, que apresentam baixa eficácia e altos custos. Essas atividades de controle vetorial têm sido insuficientes para interromper o processo de transmissão dessas doenças (BARBOSA DA SILVA et al., 2002; BARRETO E TEIXEIRA, 2008; PENNA, 2003; TAUIL, 2002; TEIXEIRA, 1999).

3. INSETICIDAS QUÍMICOS

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (ROSI, 2001). O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos acontecidos no século XX. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (BRAGA E VALLE, 2007; ROZENDAAL, 1997).

No setor de saúde humana, assistiam-se avanços no combate aos insetos transmissores de doenças como a Leishmaniose, febre amarela, encefalite, doença do sono e outros, propiciando a Paul Muller, o descobridor das propriedades do DDT, o Prêmio Nobel de Química em 1948 (ZOMRONE, 1986).

Na década de 40, na esteira do DDT, logo foram lançados novos produtos a base de cloro, tais como o TDE, o metoxiclor, benzeno hexa-clorado (BHC) e os ciclodienos clorados, derivados de uma matéria-prima obtida como subproduto da transformação do carvão (TONHASCA JR, 1985).

Todavia, os primeiros sinais da fragilidade no conjunto de inovações tecnológicas introduzidas no sistema produtivo agrícola foram evidenciados pelos agroquímicos utilizados no combate a insetos. Doses maciças e maior número de aplicações desses produtos não respondiam às expectativas de menor perda na produtividade por danos de insetos. Constatou-se que a gradual tolerância pelos insetos a altas doses de inseticidas químicos devia-se à aceleração da geração de resistência dos insetos. Os inseticidas agiam como força seletiva, eliminando os mais fracos e conferindo aos sobreviventes maior vigor e capacidade de crescimento (FUTINO E SALLES FILHO, 1991).

O uso crescente de inseticidas eleva a instabilidade dos ecossistemas na medida em que rompe a cadeia trófica alimentar, eliminando maciçamente os parasitas ou predadores (insetos, fungos ou bactérias) dos insetos-pragas. Tais parasitas ou predadores, ao ocuparem um nível trófico inferior na cadeia alimentar em relação às suas presas, apresentavam-se numericamente inferiores e, portanto, mais susceptíveis tanto à ação direta dos agroquímicos, como indireta, ao ingerirem suas presas contaminadas. Este fato acarretou o ressurgimento mais intenso das pragas em períodos mais curtos e ocorrência de novas pragas, anteriormente sem grandes expressões de danos econômicos. A contrapartida de maior uso de inseticidas para combatê-

las, entretanto, foi limitada pela dinâmica incorporação de genes de resistência na população de insetos (FUTINO E SALLES FILHO, 1991).

4. ATIVIDADE ENTOMOPATOGÊNICA EM CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS

Alguns organismos possuem maior potencial para o controle biológico de pragas, como os fungos, bactérias, vírus, alguns predadores e insetos parasitoides, por ser possível multiplicá-los em maior escala em laboratórios e ser fácil aplicá-los ou liberá-los no campo (ALVES, 1998a).

Os patógenos são microrganismos causadores de doenças em insetos; neles se desenvolvem com certa rapidez, terminando por causar a morte da praga. Alguns patógenos são facultativos e outros são obrigatórios. Os facultativos se desenvolvem tanto no inseto-hospedeiro como em meio de cultura artificial. São exemplos: fungos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, bactéria como *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, etc (ALVES, 1986).

Quando abordamos o conceito de bioprospecção, relacionamos este termo com a atividade biotecnológica e o entendimento a respeito do acesso à biodiversidade. Um exemplo prático que está ganhando espaço na comunidade científica são as medidas de controle biológico, que visam manipular inimigos naturais para reduzir populações de uma determinada praga alvo (PEDIGO, 2002). Os fungos filamentosos estão entre os principais microrganismos utilizados como ferramenta para controle biológico na agricultura e para obtenção de diversos metabólitos devido à facilidade de cultivo e por serem bons produtores de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006).

O principal mecanismo de infecção de insetos por diversos tipos de fungos é através da cutícula, diferentemente de outros patógenos que invadem o inseto através da ingestão de alimentos contaminados. A invasão parenteral garante a esse grupo de entomopatógenos a possibilidade de infectar diversos estágios como ovos, larvas, pupas e adultos (ALVES et al., 2002; ALVES, 1998b; ALVES et al., 1996).

A extraordinária atividade desses microrganismos está notavelmente baseada na diversidade metabólica e capacidade genética (MONTEIRO, 2012).

O número hipotético para fungos é cerca de 1,5 milhões de espécies no planeta, porém apenas cerca de 70.000 espécies foram descritas, permanecendo 1.430.000 espécies ainda não descritas, os habitats inexplorados podem ser uma fonte de muitas espécies desconhecidas, inclusive o solo (HAWKSWORTH, 1991).

O solo como micro-habitat é um sistema complexo, dinâmico e vivo, podendo ser entendido como o resultado da combinação de matéria orgânica e mineral inconsolidados que fornece habitats para uma ampla variedade de organismos no qual interagem (ADL, 2003), sendo que a complexidade desse sistema é definida pelas diversas e numerosas interações entre os componentes físicos, químicos e biológicos que são modulados pelas condições ambientais do solo (BUSCOT, 2005).

O nível de patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, a capacidade de multiplicação, dispersão no ambiente, caráter enzoótico e a não toxicidade são atributos favoráveis para que este tipo de estratégia possa fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir populações de insetos indesejáveis para níveis que não provoquem prejuízos (ALVES E FARIAS 2010). O conhecimento da biodiversidade e da bioprospecção microbiana tornam-se um dos principais recursos da era biotecnológica.

5. BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA PARA BIOTECNOLOGIA

A diversidade da vida é um dos aspectos mais marcantes do planeta Terra; portanto, saber quantas espécies habitam uma região é uma das questões mais fundamentais da ciência. No entanto, a resposta a esta questão permanece enigmática, como os esforços para provar biodiversidade do mundo até à data têm sido limitados (MORA et al., 2011).

Entendendo-se a corrida da moderna biotecnologia por essa ótica, dimensiona-se a importância dos ecossistemas amazônicos com diversidade e quantidade de riqueza genética, como potencial de genes que podem entrar no patenteamento da bioindústria. Toda essa potencialidade de negócios, estabelecidos a partir dos genomas amazônicos, trará que tipo de desenvolvimento regional? Esta é a questão que mais uma vez se coloca, entre tantas outras oportunidades que surgiram como propulsoras do desenvolvimento amazônico (BARBOSA, 2000).

A nanociência e nanotecnologia (N&N) começaram a integrar de forma mais consistente a agenda da comunidade científica e tecnológica. Hoje as N&N permeiam essencialmente todos os setores da sociedade e ambiente biológico. As reações às nanotecnologias vão, atualmente, do mais contagiante otimismo, pelas possibilidades que oferecem para fazer frente a muitos dos grandes desafios da humanidade, como nas áreas da energia, saúde, biotecnologia, agricultura e pecuária, processamento e armazenamento de informação (PLENTZ E FAZZIO, 2013).

A estrutura da comunidade biológica, incluindo muitas que são endêmicas, compõe o ecossistema florestal amazônico extraordinariamente complexo, sendo caracterizada por uma grande heterogeneidade de flora e de fauna. Naturalmente, a sua fisionomia é determinada pelas árvores; porém, existe, além dessas, toda uma gama de outras formas de vida microbiana ecologicamente adaptadas, vivendo, interagindo ou adaptando-se em plantas herbáceas, os arbustos escandentes, os líquens e musgos que crescem sobre as folhas dos arbustos e plantas herbáceas, vegetais parasitas, saprófagas, além daqueles inferiores – os decompositores e inoculadores – fungos, bactérias etc. (SHUBART, 1983). Embora o número de espécies endêmicas seja mais baixo na Amazônia que em algumas áreas, tais como as encostas orientais dos Andes e a Mata Atlântica, a vasta área da Amazônia confere a esta região um lugar importante no estoque global de biodiversidade (FEARNSIDE, 2003).

6. IMPORTÂNCIA DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA NA BIOTECNOLOGIA DE AGENTES DE CONTROLE DE PRAGAS E VETORES

Todo programa de controle microbiano é baseado em microrganismos entomopatogênicos, como o próprio nome revela, necessitando, portanto de pesquisas na área de biodiversidade a fim de isolar, identificar, caracterizar e selecionar os isolados mais interessantes para o controle de pragas específicas (ALMEIDA E BATISTA, 2001).

A coleção de microrganismos é uma fonte inesgotável de material genéticos para o controle microbiano de insetos e ácaros e a biodiversidade de seus microrganismos e isolados é fonte de riqueza para a agricultura brasileira, fornecendo novas alternativas para o controle de pragas, diminuindo perdas e melhorando a produtividade da lavoura (CANHOS et al., 1999, CANHOS et al., 2015; TANADA E KAYA, 1993).

Além da importância como fonte de variabilidade genética para seleção de patógenos ou isolados de patógenos de insetos, o banco de microrganismos entomopatogênicos é também uma fonte de recursos genéticos utilizados em programas de biotecnologia, melhoramento genético e outras áreas de conhecimento, proporcionando aos Institutos, Universidades, Empresas e outros que trabalham com microrganismos entomopatogênicos material genético a ser aplicado e conservado a longo prazo, devido a importância como agente de controle de pragas e até para o caso de uma produção comercial de entomopatógenos (EMBRAPA-CENARGEN, 1996).

A seleção de isolados mais virulentos e produtivos é um desafio constante para o controle biológico com entomopatógenos no Brasil, pois está diretamente envolvido no processo de produção de bioinseticidas. Isolados específicos para a praga-alvo é de grande

importância em um programa de controle biológico, principalmente para os fungos entomopatogênicos, pois além da virulência, os aspectos produtividade, produção de metabólitos secundários nocivos à saúde e ao ambiente e a resistência aos fatores climáticos são relevantes para a produção de bioinseticidas eficientes e seguros (ALVES, 1998).

A manutenção de coleções de agentes entomopatógenos é de extrema necessidade para o desenvolvimento de bioinseticidas e é outro desafio nesse processo, pois envolve aspectos normativos legais, que regula inclusive a anuência e a repartição de benefícios com os “proprietários” da cepa.

7. REGULAMENTAÇÃO, ACESSO E PROTEÇÃO AOS RECURSOS GENÉTICOS

A implementação, em nível nacional, da Convenção sobre Diversidade Biológica, especialmente dos artigos 8 e 15, que tratam respectivamente do conhecimento tradicional e do acesso aos recursos genéticos e da repartição dos benefícios provenientes da sua utilização, tem gerado intenso debate quanto ao seu impacto sobre a pesquisa. No Brasil vigora atualmente a Medida Provisória 2.186-16/01 (BRASIL, 2001) que instituiu as regras para o acesso e a remessa de componentes do patrimônio genético e o acesso a conhecimentos tradicionais associados. Essa norma previu a criação da autoridade nacional competente o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) no âmbito do Ministério do Meio Ambiente, o qual iniciou suas atividades em abril de 2002.

Em 2003, com o novo governo, a implementação da MP buscou atender, na medida do possível, as demandas de setores da sociedade, editando atos que esclareceram conceitos básicos para sua implementação, diminuindo a burocracia para a aplicação da norma e dando maior transparência às ações do CGEN. Entretanto essas ações estão limitadas pelo texto legal vigente. Assim foi elaborado um anteprojeto de lei para, após sua análise pela casa Civil, ser encaminhado pelo Executivo Federal ao Congresso Nacional (AZEVEDO, 2005).

No dia 20 de maio de 2015, o Congresso Nacional aprovou novo marco legal da biodiversidade (Lei nº 13.123/2015), que vai regular o acesso e a exploração econômica dos recursos genéticos e conhecimentos tradicionais associados à biodiversidade e à agrobiodiversidade. A mudança na legislação estimulará as pesquisas científicas, a criação de produtos baseados em biotecnologia, e aumentará a participação de povos tradicionais nos lucros de produtos feitos, por exemplo, com base em plantas brasileiras (BRASIL, 2015).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente uma das formas de combater doenças parasitárias transmitidas por mosquitos, a exemplo, *Anopheles darlingi* e *Aedes aegypti* é através do controle destes vetores, uma vez que não existe vacina ou mesmo drogas antiparasitárias e antivirais específicas para malária e Dengue. Dentre as ações de controle vetorial, o uso de inseticidas químicos é uma ferramenta comumente utilizada para interrupção de transmissão da doença. Porém, a sua efetividade está na dependência das questões operacionais de aplicação, como por exemplo, o treinamento das equipes de campo, a qualidades dos produtos utilizados, e também a susceptibilidade das populações de vetores aos inseticidas empregados.

No Brasil há evidências de que o histórico dos produtos utilizados acabou provocando o desenvolvimento de resistência aos inseticidas pelas populações de *A. darlingi* e *A. aegypti*. O controle efetivo dos vetores não pode depender de um só método de ação vetorial, ao contrário, deve dispor de várias alternativas para minimizar a questão da resistência. O crescimento e os prejuízos causados pela malária e Dengue no país, atualmente, torna de grande importância a descoberta de novas formulações para o controle vetorial.

Neste contexto, o potencial biotecnológico passou a ser uma alternativa confiável, visto que controle biológico considera a interação entre os microrganismos e os insetos. Assim, ocorre entre diversos gêneros e espécies, abrindo-se um leque de alternativas e possibilidades para se obter um inseticida natural que não provoque prejuízos ao homem e ao meio ambiente. Uma das características que leva o uso de microrganismos entomopatogênicos para controle de insetos e vetores é o seu mecanismo de infecção. Os microrganismos invadem e proliferam-se no hospedeiro por diversos locais em seu corpo, tanto por via oral como parenteral, causando prejuízos epizooticos (condição de doenças) em diferentes estágios dos insetos, como ovo, larva, pupa e adultos.

No Brasil, as pesquisas utilizando microrganismos entomopatogênicos vêm acompanhadas de grandes avanços no controle de pragas na agricultura e na medicina veterinária, minimizando os prejuízos nas lavouras e animais de corte.

A biodiversidade da Região Amazônica é conhecida como um grande celeiro de espécies com potencial biotecnológico. Os microrganismos naturais do meio ambiente e sua interação com várias espécies possibilitam sua adaptação em diversos organismos e ecossistema terrestre. As condições únicas e particulares existentes na Amazônia podem favorecer a seleção de espécies com virulência para seus hospedeiros além da produção e aumento de metabólitos secundários em resposta a um ambiente que se encontra em constante “stress” e adaptação biológica.

REFERÊNCIAS

- ADL, Sina. The ecology of soil decomposition. XIII Wallingford: CABI Publication, 2003 p 335.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos: biodiversidade para o controle microbiano de pragas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. v.20, n.3, p.30-33, 2001.
- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. São Paulo: Manole Ltda, 1986,407. p
- _____. (ed.) Controle microbiano de insetos. Ed. FEALQ: Piracicaba, 1998, 1163 p. a
- _____. Patologia e controle microbiano. In: (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.637-711. b
- ALVES, S. B., ALVES L.F.A., LOPES R.B., PEREIRA, R., VIEIRA, S. A. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *J Appl Entomol*; 126: 504-509, 2002.
- ALVES, S. B., MARCHINI, L. C., PEREIRA, R., Baumgratz L. L., Effects of some insect pathogens on the africanized honey bee, *Apis mellifera* L. (Hym., Apidae). *J Appl Entomol.*, 97: 127-129., 1996.
- ALVES, R. T & FARIAS, M. Pequeno Manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina (DF); Embrapa Cerrados, 2010.
- AZEVEDO, C. M. D. A. A Regulamentação do acesso aos recursos genéticos e aos conhecimentos tradicionais associados no Brasil. *Biota neotrop.* (Online, Ed. port.), 5(1), 19-27.2005. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n1/pt/fullpaper?bn00105012005+pt>. Acesso em 20/07/2015.
- BARBOSA, F. A moderna biotecnologia e o desenvolvimento da Amazônia. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 17(2), 43-79, 2000.
- BARBOSA da SILVA, J. Jr., SIQUEIRA, J. B. Jr; COELHO, G. E; PIMENTA Jr, F. G. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull* 23: 3-6, 2002.
- BARRETO, M., TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados*; 22 64: 53-72, 2008.
- BRAGA, I. A., & VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), 179-293, 2007.
- BRANCO, R. C., & VIEIRA, A. Patentes e biotecnologia aceleram o crescimento da agricultura brasileira. *Parcerias Estratégicas*, 13(26), 33-100, 2010.

BRASIL. Medida Provisória n. 2.186-16/2001. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/MPV/2186-16.htm>>. Acesso em 20 jul, 2015.

BRASIL. Lei 13.123/2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm>. Acesso em 26 jul, 2015.

BUSCOT, F. What are soils? Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Heidelberg: Springer Verlag, 2005. 3-18 p.

CANHOS, V. P., UMINO, C., & MANFIO, G. P. Coleções de culturas de microrganismos. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento no final do século XX, 7, p 81-101, 1999.

CANHOS, D. A., SOUSA-BAENA, M. S., DE SOUZA, S., MAIA, L. C., STEHMANN, JR., CANHOS, V. P., DE GIOVANNI, R., BONACELLI, M. B, LOS, W., PETERSON, A. T. The Importance of Biodiversity E-infrastructures for Megadiverse Countries. PLoS Biol. Jul 23;13(7): 2015 e1002204. doi: 10.1371/journal.pbio.1002204. eCollection 2015 Jul.

DEANE, L. Malaria studies and control in Brazil. American Journal of Tropical medicine and Hygiene, 38: 223-230, 1988.

EMBRAPA - CENARGEN. Coleção de fungos entomopatogênicos do CENARGEN. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. 76 p.

FEARNSIDE, P. M. (2003). Homem e ambiente na Amazônia. A Floresta Amazônica nas mudanças globais, 2003.

FREIRE, C. R. T., CHAVES, L. A., & LUZ, R. M. Gestão da inovação nos setores de biotecnologia e biomedicina: um estudo exploratório. 2008. Disponível em: <http://www.anpad.org.br/diversos/trabalhos/Simp%C3%B3sio/simposio_2008/2008_SIMPOSIO348.pdf>. Acesso em 27/06/2015.

FUTINO, A. M., & SALLES FILHO, S. A biotecnologia na agricultura brasileira: a indústria de defensivos agrícolas e o controle biológico. Agricultura em São Paulo, 38, 45-88, 1991.

GALLO, D., O. NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., BATISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIM, J. D., MARCHINI, L. C., LOPES, J. R. S., OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 2002. 920 p.

GUIMARÃES, L. H., PEIXOTO-NOGUEIRA, S., MICHELIN, M., RIZZATTI, A. C., SANDRIM, F Z., AQUINO, A. C., JÚNIOR, A., POLIZELI, M. L., Sreeninig of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology. (37), 474-480, 2006.

HAWKSWORTH, D. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, Cambridge, 95, 6. 641-655, 1991.

JUDICE, V. M. M., & BAËTA, A. M. C. Modelo empresarial, gestão de inovação e investimentos de venture capital em empresas de biotecnologia no Brasil. *Revista de Administração Contemporânea*, 9(1), 171-191, 2005.

MONTEIRO, M. C. P. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do Cerrado. 76f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, 2012.

MORA, C., TITTENSOR, D. P., ADL, S., SIMPSON, A. G., & WORM, B. How many species are there on Earth and in the ocean. *PLoS Biol*, 9 (8), e1001127, 2011.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Representação OPAS Brasil: Estratégia de gestão integrada da Dengue no Brasil 2011. Disponível em: <<http://blogs.opasbrasil.org/Dengue/2011/12/divulgado-o-mapa-da-infestacaopelo-edes-aegypti-no-brasil>>. Acesso em: 07/12/2013.

PEDIGO, L., RICE M. *Entomology and Pest Management*. 5th Ed. New Jersey. Prentice Hall, 2005. 784 pp.

PENNA, M. L. A challenge for the public health system in Brazil: Dengue control. *Cadernos de Saúde Publica*: 52. 305-309, 2003.

PLENTZ, F. & FAZZIO, A. Considerações sobre o Programa brasileiro de Nanotecnologia. *Ciência e Cultura*, 65(3), 23-27, 2013.

ROGERS, E., SHOEMAKER, F. F. *Communication of innovations: a cross cultural approach*. New York: Free Press, 1971. 227p.

ROSE R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*; 7 (1):17-23, 2001.

ROZENDAAL JA. *Vector control methods for use by individuals and communities*. Geneve: World Health Organization, 1997.

SHUBART, H. O. R. Ecologia e utilização das florestas. In: SALATI, E. et al. *Amazônia: desenvolvimento, integração, ecologia*. São Paulo: Brasiliense; Brasília: CNPq, 1983. p. 101-143.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. B., MARTELLI, C. M., COELHO, G. E., SIMPLÍCIO, A. C., HATCH, D. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 48-53, 2005.

TADEI, W. P., DUTARY-THATCHER, B., SANTOS, J. M. M., SCARPASSA, V. M., RODRIGUES, I. B., RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anoplheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene*, 59 (2): 325-335, 1998.

TADEI, W.P., SANTOS, J.M.N., RODRIGUES, I.B., RAFAEL, M.S. Malária e Dengue da Amazônia: vetores e estratégias de controle. In: Pesquisas e Ações e Saúde nos Institutos de Pesquisa do Ministério da Ciência e Tecnologia. MCT - Subsecretaria de Coordenação das Unidades de Pesquisa, Brasília/DF/ 283 p. 2010.

TANADA, Y. & KAYA, H. K. DNA-Viral infections: Baculoviridae. In: _____, Insect Pathology, Academic Press: London, 1993, p. 171-220.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do Dengue no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro 18: 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. G., BARRETO, M., GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Informe Epidemiológico do SUS, 8: 5-33, 1999.

TONHASCA Jr., Athayde. Defensivos: o mal necessário. Casa da Agricultura, Campinas, 1_21, jan./fev. 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - (WHO). World Malaria Report 2011. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/WMR2011_countryprofiles_lowres.pdf

_____. Dengue and severe Dengue. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acesso em: 07 dez. 2013.

_____. Dengue and severe Dengue. 2015. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em: 25 jul. 2015. a

_____. World Malaria Report 2015. http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2014/en/index.html>. Acesso em: 25 jul. 2015. b

ZOMBRONE, F.A.D. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Perigosa família. Ciência Hoje, SP, 4 (22):44-47, 1986.

CAPÍTULO II: FUNGOS ISOLADOS DE SOLO DA AMAZÔNIA PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE VETORES

1 INTRODUÇÃO

Os fungos estão presentes em quase todos os ambientes da Terra, e a maior diversidade é encontrada nas regiões tropicais do mundo, cujo clima quente e úmido é favorável à sua multiplicação (BLACKWELL, 2011). Entre os biomas tropicais, a Floresta Amazônica compreende a mais rica biodiversidade existente, com um grande número de plantas, animais e microrganismos pouco conhecidos (RODRIGUES et al., 2013).

A Floresta Amazônica é o maior bioma do Brasil. É considerada, mundialmente, como o grande hotspot de biodiversidade do planeta, abrigando mais de 20% das espécies terrestres conhecidas (PANSA, 2017).

O solo amazônico é pobre em matéria orgânica, e o que garante a manutenção de uma floresta tão rica é a inúmera diversidade microbiana presente no solo, que reutiliza os componentes dos próprios vegetais e animais presentes no ambiente (MELO et al., 2012; SOUZA et al., 2011). Com o uso dessas substâncias ocorre a redistribuição de elementos primários, como carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e outros, entre os organismos e o ambiente (GADD, 2007). Logo, os microrganismos são muito importantes porque participam da reciclagem dos componentes da natureza através dos ciclos biogeoquímicos (PETIT et al., 2009).

Dentre os microrganismos que habitam o solo, os fungos normalmente estão entre os mais abundantes em termos de biomassa e atividade fisiológica. São importantes componentes da biodiversidade e essenciais para a sobrevivência de outros organismos, atuam em processos ecológicos globais, podem ser fontes de novos compostos bioativos, além de exercer papel na supressão de doenças de plantas (CARVALHO, 2012).

Acredita-se que aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram registradas, mas estima-se que exista entre 1,5-5,1 milhões de espécies no planeta (HAWKSWORTH, 2001; HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017). Alguns autores estimam que levará 4.000 anos até que todas as espécies de fungos sejam descritas (MUELLER; SCHMIT, 2007).

Apesar do seu papel nos ecossistemas serem bem documentados, poucas espécies de fungos foram descritas e ainda é pequeno o conhecimento sobre a dinâmica populacional, estrutura das comunidades e diversidade desse grupo de microrganismos.

1.2 Fungos para controle biológico de vetores

A biomassa microbiana do solo (BMS) é uma importante fonte de matéria orgânica, sendo constituída principalmente pelos organismos pertencentes aos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya. Dentro do domínio Eukarya, destaca-se a biomassa fúngica e de nematóides. Além de desenvolver papel importante na ciclagem de nutrientes, a BMS também é importante na supressão de patógenos de plantas, decomposição de resíduos e degradação de poluentes, sendo frequentemente considerada como um bom indicador da qualidade do solo e de mudanças nos níveis de matéria orgânica (CARVALHO, 2012).

As comunidades de fungos em solos florestais sofrem variações espaciais e temporais e são afetadas por numerosos fatores bióticos e abióticos, como as estações do ano, características do solo e espécies de árvores (BUÉE et al., 2014; TEDERSOO et al., 2010). Os fungos do solo, pela estreita relação com as plantas, podem ser um dos determinantes primários da estrutura das comunidades vegetais e também são amplamente influenciados por estas comunidades (MUMMEY et al., 2010). As árvores fornecem a liteira ao solo, modificando o acesso da radiação e precipitação da água, e suas raízes interagem diretamente com os microrganismos do solo, através dos exsudatos liberados pelas mesmas (CARVALHO, 2012).

Analisando a prospecção de fungos do solo, podemos definir solo, segundo Meurer (2010), como um corpo natural que se constitui de mistura das fases: sólida, líquida e gasosa, sendo um ambiente heterogêneo do ponto de vista microbiológico, onde estão presentes complexas comunidades microbianas, nas mais diversas associações, contribuindo assim, para o funcionamento equilibrado dos ecossistemas (BELO, 2013; MEURER, 2015).

O solo é um habitat de alta diversidade de fungos, a qual é mais elevada quando próximo de material orgânico, tais como raízes e exsudados de raiz. Um número elevado de fungos microscópicos ocorre em solo puro, os quais são em grande parte ascomicetos e alguns zigomicetos (CARVALHO, 2012).

A estimativa da diversidade de fungos do solo depende do método utilizado para identificação dos mesmos, visto que o número de isolados de fungos (unidades formadoras de colônias - UFCs) ou de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) obtidos varia em função da metodologia adotada (GAMS, 2007). As metodologias de cultivo são capazes de recuperar apenas uma pequena parte da comunidade total de fungos, já que muitos não crescem ou não produzem esporos em meio de cultura (O'BRIEN et al., 2005).

Os fungos filamentosos que ocorrem nos solos estão distribuídos nas divisões: Zygomycota, Ascomicota, Basidiomicota e Deuteromicota, os quais diferem-se das leveduras

por serem multicelulares e possuírem um soma (corpo) filamentosos, formado por hifas que por sua vez se reúnem em um micélio, o qual pode ser visualizado a olho nu, como um emaranhado de fios delgados variando do hialino ao colorido dependendo da espécie (LOUGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2010).

Os procedimentos microbiológicos clássicos para o estudo de fungos do solo são baseados no isolamento e cultivo, em meio de cultura, de esporos ou hifas ativas do solo, para posterior identificação e quantificação. Usando essas técnicas de cultivo é possível distinguir entre hifas ativas e propágulos dormentes (VARGAS GIL; PASTOR; MARCH, 2009).

O método de diluição e plaqueamento é o mais comumente utilizado para o isolamento e quantificação de fungos e bactérias do solo. É uma técnica simples, na qual uma quantidade conhecida de solo é suspensa em água esterilizada e colocada sob agitação durante alguns minutos. Uma série de diluições é preparada a partir dessa suspensão, até que seja alcançada a concentração final desejada, favorecendo o crescimento das colônias e posterior repique monospórico (PFENNING; ABREU, 2008).

Uma das vantagens do uso de fungos para controle de insetos sobre outros microrganismos é que eles não precisam ser ingeridos para infectar seus hospedeiros, de modo que a infecção poderá ocorrer pelo contato com a cutícula ou outras partes do inseto (PERFETTI, 2011).

A eficácia de um fungo como controlador microbiano é medida pela virulência que apresenta e por fatores ambientais tais como, luz, temperatura, salinidade, umidade relativa, velocidade de germinação e esporulação no cadáver do hospedeiro (BUTT; GOETTEL, 2000).

Scholte et al.(2004), descreveram que certas características para implementar o uso de fungos como controle de mosquitos são necessárias, entre os quais, que o fungo deva induzir a morte de larvas ou afete a fase adulta do inseto em uma única aplicação por estágio de desenvolvimento, dispersão por meio das fêmeas para possíveis locais de confinamento, mostrar atividade residual e persistência em mosquitos, seletividade, tolerância a condições adversas, produção em massa de baixo custo, manter a sua viabilidade e que não ser prejudicial para os seres humanos ou outros organismos que não sejam o desejado controle (SCHOLTE et al., 2004).

Na busca por microrganismos com potencial para o uso em biotecnologia, considera-se a premissa de que esses organismos podem ser isolados dos mais diversos ambientes. Habitats pouco explorados podem ser fonte de seleções ainda desconhecidas ou pouco estudadas, que merecem ser pesquisadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Definição, origem e coleta de fungos

Os fungos utilizados para este projeto foram coletados e isolados a partir de amostras de solos. Para assegurar um amplo espectro de isolados, as coletas foram realizadas em dois pontos estratégicos e relacionados à ação antrópica sobre o solo em diferentes localidades (figura II-1): Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizada na Rodovia BR-174 (Manaus-Presidente Figueiredo), Km 38, e Campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis, Manaus - AM, 69067-375.

Figura II- 1. Pontos de coleta de solos para isolamento de fungos. A: Fazenda Experimental – Universidade Federal do Amazonas; B: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

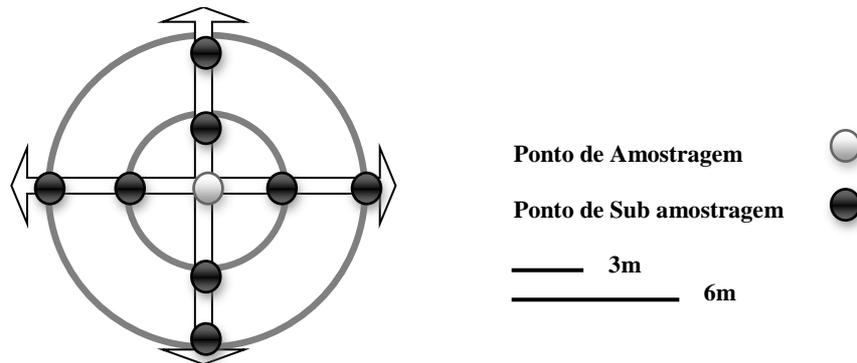


Fontes: <http://ppbio.inpa.gov.br/sitios/fazufam>; www.posto7.com.br/manaus.htm

Atendendo às exigências Técnicas/Científica, este trabalho obteve termos de anuência das instituições participantes, autorização e consentimento do CNPq para realização de coleta e material para isolamento fúngico, requisitos exigidos pela Medida Provisória nº 2.186-16/01, onde se preconiza a obtenção de amostra de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza, orientação Técnica nº 1 do CGEN, (Anexo II-1).

As coletas foram realizadas no período chuvoso (abril–maio) e período seco (outubro–novembro) da região em 2015, coletando cinco amostras compostas por área de estudo. Para o processamento das amostras, foram utilizadas um total de 200 g de solo coletado, para cada ponto de amostragem, oito sub amostras coletadas em dois círculos concêntricos (figura II-2) com raio de 3 e 6 metros do centro do círculo (MONTEIRO, 2012).

Figura II- 2. Pontos para as amostras de solos coletadas em dois círculos concêntricos com raio Λ de 3 e 6 metros do centro



Fonte: Monteiro, 2012

Para extração das amostras de solo, foi utilizado um trado previamente desinfetado com álcool a 70% e flambando em seguida. Cerca de 20 centímetros de profundidade de solo foi extraída, armazenadas em sacos plásticos estéreis (figura II-3) e transportadas para o setor de microbiologia do Laboratório de Malária e Dengue - INPA.

Figura II- 3. Processo de coleta das amostras de solo: A) Cerca de 20 cm de solo foi extraído com auxílio de um trado; B) Armazenamento do solo em sacos plásticos estéreis.



Fonte. Arquivo pessoal

As amostras, quando necessário, foram armazenadas em refrigerador com temperatura de 4 °C até o processamento. Os pontos de coleta de solo estão visualizados em imagens de satélites (figuras II-4 e II-5), a localização geográfica foi obtido a partir de GPS, e descritos na tabela II-1 com as características dos pontos de amostragem.

Figura II- 4. Pontos de coleta de solo – Fazenda experimental – Universidade Federal do Amazonas, Km 38 BR 174.



Fonte: Google Maps adaptado com arquivo pessoal

Figura II- 5. Pontos de coleta de solo – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Campus Manaus - SEDE.



Fonte: Google Maps adaptado com arquivo pessoal

Tabela II- 1. Localização geográfica dos pontos de coletas de solo

Região	Amostragem	Localização
Fazenda Experimental Universidade Federal do Amazonas	Ponto 1	S 2° 38' 50"/W 60° 3' 22"
	Ponto 2	S 2° 39' 24"/W 60° 3' 16"
	Ponto 3	S 2° 38' 50"/W 60° 3' 30"
	Ponto 4	S 2° 39' 70"/W 60° 3' 70"
	Ponto 5	S 2° 38' 59"/W 60° 2' 50"
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia	Ponto 1	S 3° 06' 00"/W 59° 59' 09"
	Ponto 2	S 3° 05' 51"/W 59° 59' 11"
	Ponto 3	S 3° 06' 13"/W 59° 59' 04"
	Ponto 4	S 3° 05' 58"/W 59° 59' 02"
	Ponto 5	S 3° 05' 51"/W 59° 59' 06"

2.2 Isolamento de fungos do solo

No isolamento dos fungos, tem sido preconizado pelo Laboratório de Controle Biológico – Centro Experimental Instituto Biológico (CEIB), Campinas-SP - a utilização do fungicida Dodine em concentrações baixas (< 10 mg/mL) na composição e preparo dos meios de cultura para isolamento de fungos de solos, preservando isolados mais suscetíveis ao fungicida, com resultados favoráveis, principalmente em relação à *Metarhizim anisopliae* (LIU et al., 1993). Para não comprometer o isolamento de outras linhagens fúngicas e sua diversidade, outros três meios de cultura foram utilizados no procedimento (Anexo II-2).

As sub amostras de solos correspondentes a cada um dos cinco pontos de coleta foram misturadas entre si, formando uma amostra composta. Para obtenção das colônias fúngicas foi realizada a técnica de suspensão seriada de acordo com Clark (1965), modificado, retirando 25 gramas da amostra e adicionando a 225 mL de solução salina peptonada 0,1% em um Erlenmeyer para se ter uma diluição de 1:10 (1:10 solo - salina) (BORGES et al., 2011; CLARK, 1965).

As amostras diluídas de cada ponto de coleta foram homogeneizadas em Shake a 140 rpm de rotação por 20 minutos. Após o término do tempo foram realizadas diluições sucessivas até 1.000 vezes para cada amostra. Uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada na superfície de cada meio de cultivo acrescido de cloranfenicol 0,3 g/L (SILVA et al., 2011).

O plaqueamento de cada diluição foi realizado em triplicata, as placas permaneceram abertas por alguns minutos até que o meio absorvesse a diluição, sendo então fechadas, vedadas com filme plástico de PVC (Magipack®), invertidas (com o fundo voltado para cima) e mantidas em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E durante 7 a 14 dias (ALVES, 1998).

2.3 Purificação, identificação e preservação dos isolados

Após o crescimento dos isolados fúngicos, as colônias foram purificadas pela técnica de cultura monospórica, separadas e catalogadas. Todas as colônias que cresceram no meio seletivo foram contabilizadas e os fungos identificados a nível de gênero considerando características microscópicas (conidióforo, hifas e conídios) e macroscópicas (aspecto e coloração das colônias) comparadas com chaves taxonômicas (HUMBER, 2012; LICHTWARDT, 1986).

Para a visualização das microestruturas dos fungos filamentosos foram previamente preparados e esterilizados os sistemas de microcultivo. Cada sistema de microcultivo constitui de uma placa de Petri contendo um chumaço de algodão, uma lâmina, e uma lamínula. Após o preparo dos sistemas, foi adicionado sobre a lâmina, sob condições assépticas, um bloco de meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA). Após a adição desse bloco, inoculou-se fragmentos do isolado fúngico nos vértices, o qual foi coberto com a lamínula. Terminado esse passo, o chumaço de algodão foi embebecido com água destilada estéril, e os sistemas incubados a 28 °C por um período de sete a dez dias (RIDDELL, 1950).

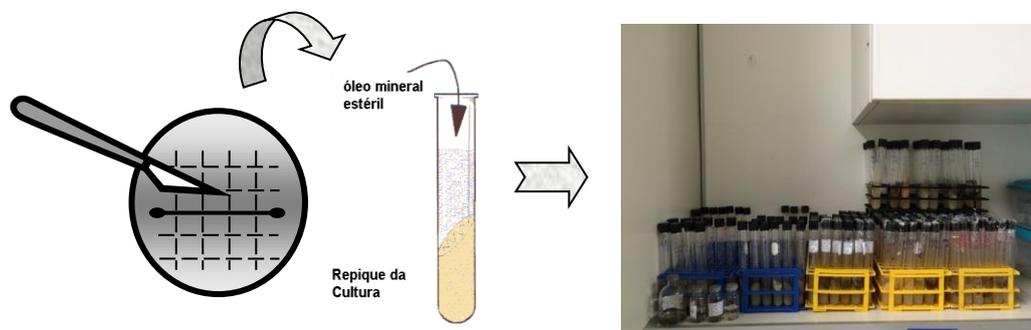
Após o período de crescimento do microcultivo, a lâmina e a lamínula onde o micélio do fungo filamentoso ficou aderido foram preparadas e coradas com azul de metileno, sendo preparadas duas lâminas por isolado. Procedeu-se então a visualização das lâminas em microscópio óptico ZIESS onde foram observadas tanto as estruturas reprodutivas como o aspecto das hifas dos fungos filamentosos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As culturas fúngicas foram preservadas e mantidas de acordo com os diferentes tipos de gêneros de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza no âmbito da coleção micológica (APARECIDO et al., 2007; PASSADOR, 2010).

Na conservação dos isolados, foi utilizado o método de conservação de médio prazo (conservação em óleo mineral e Castellani), visando atingir a hipobiose do microrganismo, (CASTELLANI, 1967; PEREIRA et al., 2016; XAVIER; PONTES; ALENCAR, 2015), e a técnica de armazenagem em microtubos sob refrigeração, adotada por Almeida JEM e colaboradores no CEIB, método este proposto para rotina de crescimento fúngico para bioensaios.

O método de conservação em óleo mineral foi proposto por Lumier e Chevrotier em 1914. Consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral estéril de 1 cm de altura sobre uma cultura de microrganismos em estado sólido (figura II-6). Essa camada de óleo irá limitar a quantidade de oxigênio disponível para o microrganismo, causando uma diminuição no crescimento e no metabolismo (DE SOUSA et al., 2017).

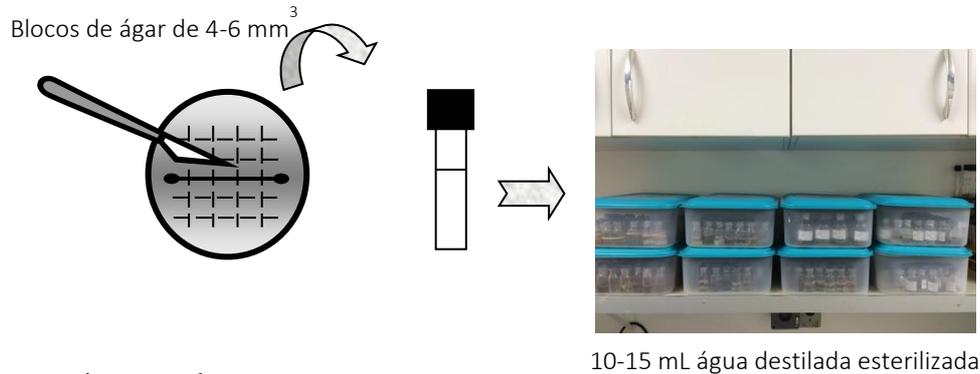
Figura II- 6. Método e procedimentos para conservação em óleo mineral



Fonte: arquivo pessoal

A preservação em água estéril, também chamado de método de Castellani, pode ser feito em água estéril ou solução salina de água (figura II-7). Esse método visa atingir a hipobiose com a diminuição do metabolismo e formação de estado latente da célula devido à falta de fontes nutritivas. Uma suspensão de células ou um bloco de ágar (aproximadamente 5 mm x 10 mm) contendo o microrganismo é adicionado a uma solução de água estéril e conservado a baixas temperaturas ou temperatura ambiente (CONCEIÇÃO DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005).

Figura II- 7. Método e procedimentos para conservação em Castellani



Fonte: arquivo pessoal

Em todas as metodologias utilizadas neste trabalho, foi realizada a conservação em triplicata em todos os isolados fúngicos para os três métodos, e armazenados em temperatura entre 04 – 20 °C.

2.4 Seletividade de fungos entomopatogênicos por “*Insect bait*” utilizando *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

O uso de meios de cultura seletivos auxilia na seleção de fungos entomopatogênicos. No entanto, para explorar a capacidade de novos isolados fúngicos infectar insetos hospedeiros, o método de “*Insect bait*” - inseto isca, costuma ser bem empregado. Este método foi desenvolvido originalmente para isolar nematoides entomopatogênicos de amostras de solo, mas fungos foram, por vezes, adicionalmente isolados. Assim Zimmermann (1986) sugeriu que este método poderia também ser um método padrão de isolamento de fungos entomopatogênicos (MEYLING, 2007; ZIMMERMANN, 1986).

A larva da farinha amarela *T. molitor* L. tem sido usado para indicar qualitativamente presença de fungos entomopatogênicos no solo ou como um modelo para a avaliação de estresse e outros fatores sobre a atividade fúngica (BHARADWAJ; STAFFORD, 2011).

O método para determinação de virulência (entomopatogênico) de isolados fúngicos coletados no Campus do INPA e Fazenda Experimental da UFAM foi realizado como preconizado no Laboratório de Controle Biológico do CEIB/Instituto Biológico, Campinas – SP.

Para avaliação do método, os isolados fúngicos mantidos em preservação foram cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA com pH $5,5 \pm 0,2$, acondicionadas em

estufa a $27 \pm 0,5$ °C por 7 a 14 dias. Após o período de crescimento fúngico, o isolado foi retirado de toda a superfície da placa de meio de cultura com auxílio de bisturi estéril e preparado uma solução aquosa de 10 mL de água destilada estéril (ADE) a 0,05% de Tween 80. A suspensão foi homogeneizada com aparelho de vortex por um minuto com pérolas de vidro e retirado 1 mL para quantificar o número de conídios em diluição 1:1000 com auxílio de câmara de Neubauer em microscópio óptico ZIESS com aumento de 20x (figura II-8) (ALVES; MORAES, 1998).

Figura II- 8. Preparo da suspensão de conídios de fungos filamentosos para avaliação entomopatogênica



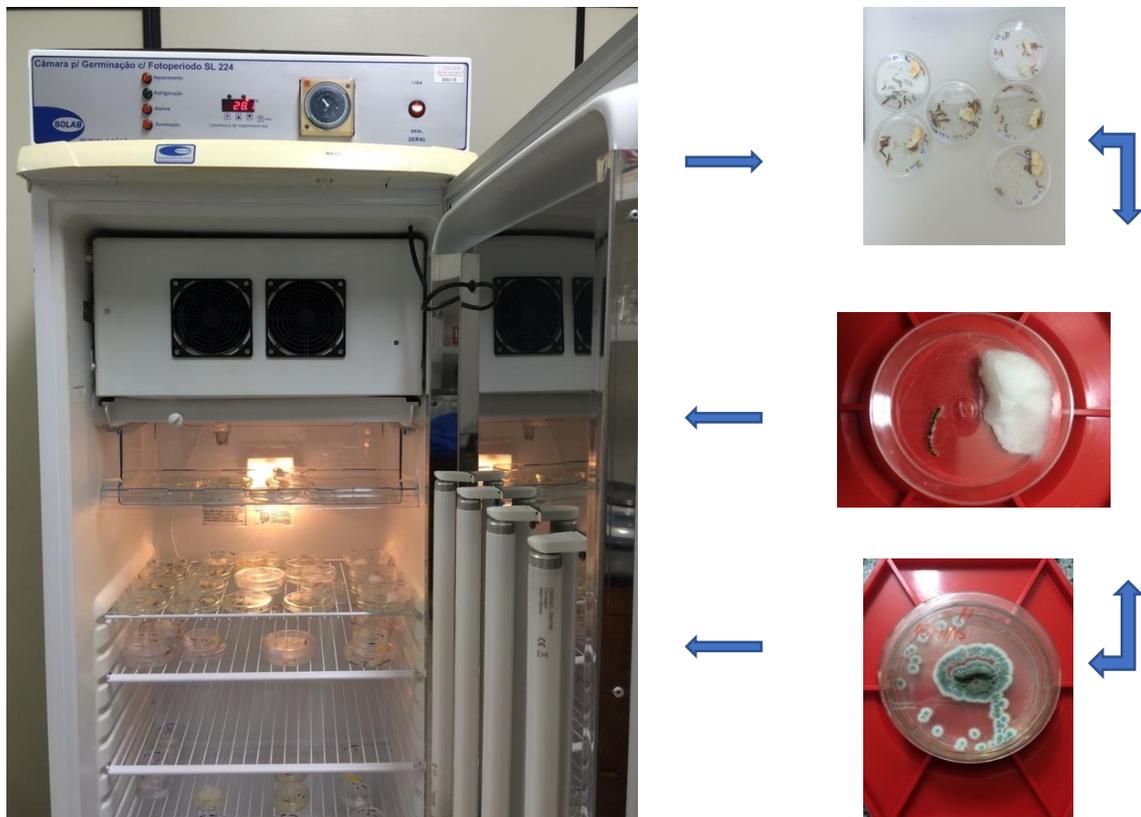
Dez larvas de *T. molitor* de segundo e terceiro instar foram separadas para cada avaliação entomopatogênica dos isolados fúngicos coletados neste projeto. As larvas foram submersas em solução aquosa fúngica com 1×10^8 conídios/mL por 30 segundos, em seguida foram colocadas em placa de Petri de 90 mm.

A testemunha negativa do teste, o mesmo número de larvas de *T. molitor* foram submersas em 10 mL de ADE a 0,05% Tween 80 por 30 segundos, e a testemunha positiva foi avaliada com suspensão aquosa 1×10^8 conídios/mL de *M. anisopliae*, cedido gentilmente da Coleção de fungos entomopatogênicos Ademair Gondim do CEIB – Campinas, SP. Para todos

os testes, as larvas de *T. molitor* foram acondicionadas em uma câmara de germinação com temperatura 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h por 7 a 14 dias.

Após 24 horas em contato, foi oferecido como dieta alimentar para as larvas de *T. molitor* pequenos pedaços de pães. Após a mortalidade, os cadáveres foram lavados com soluções de hipoclorito de sódio a 2% por 1 min, em álcool a 70% por 2 min e duas vezes em água destilada autoclavada por 3min, transferindo-se cada larva morta para outra placa de Petri, contendo um chumaço de algodão umedecido com água destilada, simulando uma câmara úmida para proporcionar a esporulação do fungo pelo tegumento dos insetos. Após o crescimento do fungo sobre a superfície do inseto em câmara úmida, a larva de *T. molitor* foi transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA incubada em câmara de germinação (BOD) com temperatura 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h por 7 a 14 dias para propagação e confirmação do isolado fúngico (ALVES; MORAES, 1998). A análise e cálculos foram realizados manualmente utilizando-se a mortalidade confirmada pelo fungo em *T. molitor* (figura II-9).

Figura II- 9. Avaliação entomopatogênica em *Tenebrio molitor*



Fonte: arquivo pessoal

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método clássico padronizado para o isolamento de fungos filamentosos de amostras do solo é realizado por meio de diluições seriadas utilizando meios de cultivo seletivos para estes microrganismos. A contagem em meio de cultura continua sendo uma ferramenta útil em estudos comparativos, onde o isolamento é o primeiro passo.

As amostras de solos foram coletadas em duas épocas, alta pluviosidade no mês de abril e maio de 2015 e baixa pluviosidade nos meses de outubro-novembro de 2015. Em um total de vinte amostras de solos analisadas.

O agrupamento em morfotipos de fungos filamentosos foi realizado após o isolamento desses microrganismos, os quais foram distinguidos e agrupados com base em características fenotípicas (BARNETT; HUNTER, 1998; LACAZ; PORTO; MARTINS, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A preservação e manutenção das culturas de fungos devem ser realizadas de forma a garantir a sobrevivência do microrganismo, bem como a conservação das propriedades morfológicas, fisiológicas, características genéticas e a pureza dos isolados durante períodos prolongados (CAVALCANTI, 2010).

As metodologias mais adequadas para preservação e manutenção dos microrganismos por períodos prolongados baseiam-se na redução do metabolismo ao nível de dormência. Desse modo, não existe um método universal que seja eficiente para a preservação de todos os gêneros e espécies de fungos, devido suas diferenças metabólicas e fisiológicas (WALKER; WHITE, 2017).

Um método frequentemente utilizado para a preservação de isolados de fungos filamentosos é por meio de repiques sucessivos. Porém, utilizando esse método além de trabalhoso e dispendioso, foi observado alterações nas características morfológicas e fisiológicas das culturas, ocasionando a perda da viabilidade. Com base no agrupamento e na quantificação dos morfotipos de fungos filamentosos isolados das diferentes amostras de solos da Fazenda Experimental da UFAM e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, foram obtidos os resultados apresentados na tabela II-2.

Tabela II- 2. Fungos isolados de solo da Amazônia

Gêneros/Espécies	Períodos Chuvosos		Períodos Seco		UFC
	UFAM	INPA	UFAM	INPA	
<i>Absidia sp</i>	2	1	3	2	8
<i>Acremonium sp</i>	2				2
<i>Aspergillus alliaceus</i>			2		2
<i>A. flavus</i>	2			1	3
<i>A. fumigatus</i>	2				2
<i>A. japonicus</i>	1		2		3
<i>A. ochraceus</i>	1	2	1	1	5
<i>A. paradoxos</i>			2	4	6
<i>A. restrictus</i>		2			2
<i>Aspergillus spp</i>	3	2	4	1	10
<i>A. terreus</i>		3		2	5
<i>Botrytis sp</i>				3	3
<i>Chaetomium sp</i>	2		3		5
<i>Chloridium sp</i>		5			5
<i>Chrysosporium sp</i>	4		8		12
<i>Cladosporium sp</i>	2	3			5
<i>Colletotrichum tropicale</i>		2		1	3
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	2				2
<i>Curvularia sp</i>		2	3		5
<i>Exophiala dermatitidis</i>		1			1
<i>Fusarium spp</i>	4	2		5	11
<i>Geotrichum candidum</i>	2				2
<i>Gliocladium sp</i>		5		3	8
<i>Gliocladium virens</i>		2			2
<i>Hortaea werneckii</i>				3	3
<i>Lecanicillium sp</i>			5		5
<i>Mortierella sp</i>				2	2
<i>Mucor espécie</i>			2		2
<i>Neosartorya sp</i>	1			2	3
<i>Paecilomyces lilacinus</i>		3			3
<i>Paecilomyces marquandii</i>	2	1	4	1	8
<i>Paecilomyces spp</i>	4	3	2	2	11
<i>Paecilomyces varioti</i>		1			1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		2	6	7	15
<i>Penicillium bilaii</i>		2	3	3	8
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1			1	2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	3		1	5
<i>Penicillium claviforme</i>		2			2
<i>Penicillium commune</i>	1	1		3	5
<i>P. corylophilum</i>	1		2	2	5
<i>Penicillium expansum</i>	1	5	11	6	23
<i>Penicillium glabrum</i>				2	2
<i>Penicillium janthinellum</i>				2	2
<i>Penicillium melinii</i>	2			8	10

<i>Penicillium minioluteum</i>				4	4
<i>Penicillium pinophilum</i>				7	7
<i>Penicillium purpurogenum</i>		3	6		9
<i>Penicillium spp</i>	5	8	8	8	29
<i>P. viridicatum</i>		2			2
<i>Ramichloridium subulatum</i>		1			1
<i>Rhizopus sp</i>	1		2	2	5
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>				1	1
<i>Sporothrix schenckii</i>				2	2
<i>Trichoderma spp</i>	5	2	5	7	19
<i>Não identificado</i>	14	17	8	12	51
<i>Micélio estéril</i>	4	3	4	3	14
Total	72	91	96	114	373

Entre amostras coletadas na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), foram identificados 17 gêneros e 18 espécies. Das amostras coletadas no Campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) foram identificados 20 gêneros e 30 espécies. Dentre esses 188 isolados fúngicos foram armazenados e preservados.

Os gêneros melhor representados, de acordo com o número de espécies, foram *Penicillium* e *Aspergillus*, seguido por *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Geotrichum*, *Curvularia*, *Lecanicillium*, *Chloridium*, *Colletotrichum*, *Chaetomium*, *Hortaea*, *Botrytis*, *Acremonium*, *Neosartorya*, *Mortierella*, *Sporothrix*, *Scopulariopsis* e *Cunninghamella*, além das amostras de micélio estéril e das amostras que não foram identificadas.

Do total dos isolados, 51 não puderam ser identificadas com base em marcadores morfológicos, foram encontrados também alguns morfotipos, com destaque para isolados do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, que apresentaram características morfológicas que diferem das espécies já descritas, outro motivo da não identificação foi a falta de crescimento na purificação devido a pequena quantidade da amostra, não podendo, assim realizar triplicada.

Estes fungos encontrados e que não puderam ser identificados apenas pelas características morfológicas, a partir de chaves de identificação, podem ter sido anteriormente isolados e não constarem nos materiais de referência utilizados ou mesmo se tratarem de novos gêneros e/ou espécies. No entanto é necessária a utilização de outras técnicas para esta confirmação.

A identificação de *Trichoderma spp.* não foi realizada até a espécie, pois suas espécies são morfológicamente muito semelhantes entre si e, em geral, as diferentes espécies possuem funções ecológicas similares (METCALF; WILSON, 2001). O gênero *Trichoderma* é caracterizado por apresentar crescimento rápido de colônias em meios de cultura, sendo comumente encontrado em solos e citado em vários estudos como antagonista de diversos patógenos (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007).

O gênero *Penicillium* apresentou uma predominância que pode estar relacionada ao fato de que seus conídios são facilmente dispersos pelo ar e pelo antagonismo sobre outras espécies, seja por produção de metabólitos secundários ou, mesmo indiretamente, por meio da competição nutricional, da produção elevada de esporos e da maior capacidade de crescimento em meios de cultivo.

Hawksworth (1991) citou como pioneiro para a Amazônia o trabalho de Chaves Batista, que descreveu aproximadamente 3.500 novas espécies de fungos entre 1954 e 1972 isolados de ambientes amazônicos.

Borges et al. (2011) obtiveram em amostras de solo de área de monocultivo de erva-mate os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. Ressalta-se que os quatro primeiros também foram obtidos no presente trabalho em solos de floresta. Esses autores enfatizaram que todos os gêneros reportados são comuns em solos de florestas, campos, solos arenosos ou áreas cultivadas (OLIVEIRA; NEVES; ALVES, 2004).

Em outro estudo, Delabona (2011) isolou fungos filamentosos de solo de reservas de floresta Amazônica nativa na Amazônia Oriental, das quais obteve 110 linhagens fúngicas pertencentes aos grupos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Mucor*. A autora ressaltou que poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre o isolamento de fungos filamentosos de solo na região Amazônica (DELABONA, 2011). Da mesma forma, Vital e Zilli (2010) salientaram que poucos estudos têm examinado especificamente a população microbiana do solo desta região, embora exista grande necessidade em se conhecer a diversidade microbiana desse ambiente devido sua relevância, por representar um recurso genético de valor inestimável (VITAL; ZILLI, 2010).

Os isolados fúngicos que demonstraram crescimento desejado e número adequado de conídios, foram previamente selecionados para bioensaios com *T. molitor*, com intuito de avaliar e triar isolados com capacidade entomopatogênica. Testes sobre a patogenicidade de um fungo num inseto ou estágio alvo, em condições de laboratório, visam oferecer ao fungo as melhores condições para a infecção no processo de controle biológico.

Desta forma, 37 isolados fúngicos no período chuvoso e 68 isolados do período seco foram avaliados, doze destes isolados apresentaram mortalidade e crescimento sobre as larvas de *T. molitor*, sendo: IPC 1.2, IPC 3.1, IPC 4.5, IPS 1.3, IPS 2.1, IPS 2.2, IPS 2.3, IPS 3.1, IPS 4.9, IPS 5.6, FPS 2.10, FPS 4.8. Os isolados IBCB 425 e IBCB 66 são entomopatogênicos, e utilizados na agricultura como cepas de referência em controle microbiano de insetos. (Tabela II-3).

Tabela II- 3. Avaliação de sonda/triagem em *Tenebrio molitor* para identificação de fungos entomopatógenos isolados em amostras de solo

Id de acesso	Local / ano	Conídios /mL-1	Substrato	Mortalidade (%)
IPC 1.2	INPA ^a – 2016/1	1 x 10 ⁸	Solo	50
IPS 2.4	INPA ^a – 2016/2	1 x 10 ⁸	Solo	100
IPC 3.1	INPA ^a – 2016/1	2 x 10 ⁸	Solo	90
IPC 4.5	INPA ^a – 2016/1	8 x 10 ⁸	Solo	30
IPS 1.3	INPA ^a – 2016/2	6 x 10 ⁸	Solo	70
IPS 2.1	INPA ^a – 2016/2	1,5 x 10 ⁸	Solo	70
IPS 2.3	INPA ^a – 2016/2	6,5 x 10 ⁸	Solo	60
IPS 3.1	INPA ^a – 2016/2	3 x 10 ⁸	Solo	100
FPS 2.10	Km 38 ^b – 2016/2	1 x 10 ⁸	Solo	20
FPS 4.8	Km38 ^b – 2016/2	1,5 x 10 ⁸	Solo	50
IBCB 425	Iporanga - SP ^c	1 x 10 ⁸	Solo	100
IBCB 66	São José do Rio Pardo - SP ^c	1 x 10 ⁸	<i>Hypothenemus hampei</i>	80

a. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus –AM, Brasil

b. Fazenda Experimental, Universidade Federal do Amazonas, Km 38 – BR 174, Brasil

c. Centro Experimental, Instituto Biológico, Campinas – SP, Brasil

A concentração utilizada foi 1x10⁸ conídios mL⁻¹ por isolado. Os ensaios de seletividade em *T. molitor* foi determinada pela mortalidade do próprio inseto indicando a presença de fungos que sejam entomopatogênicos. Desta forma, foi possível selecionar linhagens com atividade entomopatogênica, constituindo amostras da região para bioensaios de controle biológico contra *A. aegypti* e outros vetores de importância para saúde pública.

4 CONCLUSÕES

Os isolados fúngicos coletados na Fazenda Experimental da UFAM e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia encontram-se preservados em Castellani e óleo mineral. A conservação e preservação dos isolados fúngicos deste trabalho possibilitará a formação de uma coleção de isolados fúngicos – Micoteca, da região Amazônica, constituindo uma coleção de referência do INPA.

O isolamento de microrganismos provenientes do solo é uma etapa fundamental para o desenvolvimento da biotecnologia e o comportamento desses isolados microbianos, é um fator importante de seleção do método de preservação mais eficiente.

A determinação da exata diversidade de fungos em amostras de solo não é um trabalho trivial. Um dos principais problemas associados a esses estudos é a natureza fastidiosa de alguns grupos de fungos que não são capazes de crescer em meio de cultura.

A metodologia utilizando *T. molitor* como sonda de fungo entomopatogênico mostrou ser eficiente ao demonstrar isolados fúngicos com potencial para aplicação em controle biológico de inseto.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2^a ed. Piracicaba - SP: Fealq, 1998. p. 289–370.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 4^a ed. Piracicaba - SP: Fealq, 1998. p. 765–777.
- APARECIDO, C. C. et al. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (Água destilada) e Liofilização. **Biológico**, v. 69, n. 1, p. 5–8, 2007.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. St. Paul Minnesota: APS Press, 1998. v. 38.
- BELO, C. S. B. **Produção de amilase e lipase por fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de solo de floresta e savana de Roraima**. [s.l.] Universidade Federal de Roraima, 2013.
- BHARADWAJ, A.; STAFFORD, K. C. Potential of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as a bioassay probe for *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) activity against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 6, p. 2095–2098, 2011.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.
- BORGES, L. R. et al. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, v. 9, n. 2, p. 185–194, 2011.
- BUÉE, A. M. et al. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an high fungal diversity unexpectedly. **New Phytologist**, v. 184, n. 2, p. 449–456, 2014.
- BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. In: NAVON, A.; ASCHER, K. R. S. (Eds.). **Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes**. Wallingford: CABI, 2000. p. 325.
- CARVALHO, V. G. **Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.
- CASTELLANI, A. A. maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researched a maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene, Mclean**, v. 70, p. 181–184, 1967.
- CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. [s.l.] Universidade de São Paulo - São Paulo, 2010.
- CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. In: BLANC, C. A. et al. (Eds.). **Methods of soil analysis**. 1^a ed. New York: Madson Inc, 1965. p. 1460–1466.

CONCEIÇÃO DIOGO, H.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 6, p. 591–594, 2005.

DE SOUSA, B. R. et al. Técnicas de Obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 2, n. 24, p. 827–842, 2017.

DELABONA, P. DA S. **Bioprospeção de fungos produtores de celulases da região amazônica para produção de etanol celulósico**. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

DOMSCH, K. H. (KLAUS H.; GAMS, W. (WALTER); ANDERSON, T.-H. **Compendium of soil fungi**. [s.l.] IHW-Verlag, Eching, 2007.

GADD, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 3–49. 2007.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 69–72, 27. 2007.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641–655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422–1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. In: **The Fungal Kingdom**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2017. v. 5p. 79–95.

HUMBER, R. A. Identification of entomopathogenic fungi. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of techniques in invertebrate pathology**. London: Academic Press, 2012. p. 151–187.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 2001. v. 33.

LICHTWARDT, R. W. **Arthropods, The Trichomycetes: Fungal Associates of arthropods**. 1ª ed. New York: Springer Verlag, 1986.

LIU, Z. Y. et al. The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from Soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n. 3, p. 248–251, 1993.

LOUGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Fungos - Uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. p. 15–46.

MELO, V. S. et al. Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon. **Soil Use and Management**, 2012.

METCALF, D. A.; WILSON, C. R. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, v. 50, n. 2, p. 249–257, 2001.

- MEURER, E. J. (ED.). **Fundamentos de Química do Solo**. 6^a ed. [s.l.] EVANGRAF, 2015.
- MEYLING, N. V. **Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment**. [s.l: s.n.].
- MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do Cerrado**. Larvas - MG: Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, 2012.
- MOREIRA, F. M. DE S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2^a ed. Larvas - MG: UFLA, 2006.
- MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1–5, 18, 2007.
- MUMMEY, D. L. et al. Spatial analysis reveals differences in soil microbial community interactions between adjacent coniferous forest and clearcut ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1138–1147, 2010.
- O'BRIEN, H. E. et al. Fungal Community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, 2005.
- OLIVEIRA, R. C. DE; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, L. F. A. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Oligonychus yotheri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 347–351, jun. 2004.
- PANSA, C. C. ***Trichoderma* spp . de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas celulolíticas**. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. [s.l.] São Paulo, 2017.
- PASSADOR, M. M. ET AL. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, v. 72, n. 1, p. 51–55, 2010.
- PEREIRA, B. D. S. et al. Avaliação *in vitro* de fungos filamentosos no controle biológico de *Mahavarna fimbriolata*. **Cad. Ciênc. Agrá**, v. 8, n. 2, p. 48–57, 2016.
- PERFETTI, D. J. C. El uso de hongos entomopatógenos para el control biorracional Triatominae, vectores de la enfermedad de Chagas. **Avances Cardiol**, v. 31, n. 4, p. 333–352, 2011.
- PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, 1-9, 2009.
- PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. DE. Diversity of microfungi in tropical soils. In: PERSIANI, A. .; CASADO, M. . (Eds.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. CABI ed. Wallingford: CABI, 2008. p. 184–205.
- RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, p. 265, 1950.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013.

SCHOLTE, E.-J. et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of insect science (Online)**, v. 4, p. 19, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, D. C. V. DA et al. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasil. Bot.**, v. 34, n. 4, p. 607–610, 2011.

SOUZA, J. V. B. DE et al. Anti-mycobacterium activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, p. 28–32, 2011.

TEDERSOO, L. et al. 454 Pyrosequencing and sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. **New Phytologist**, v. 188, n. 1, p. 291–301, 2010.

VARGAS GIL, S.; PASTOR, S.; MARCH, G. J. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. **Microbiological Research**, v. 164, n. 2, p. 196–205, 2009.

VITAL, M. S.; ZILLI, J. E. Avanços em Microbiologia do Solo no Estado de Roraima. In: BARBOSA, R. I.; MELO, V. F. (Eds.). . **Homem, ambiente e ecologia no Estado de Roraima**. Boa Vista - RR: Boa Vista: FEMACT, 2010. p. 409–429.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. In: **Fungi**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 1–35.

XAVIER, L. DE S.; PONTES, G. O.; ALENCAR, Y. B. Preservação e coleções microbiológicas para aplicação na biotecnologia. In: MAFRA, R. Z. et al. (Eds.). . **Gestão da Biotecnologia na Amazônia: a inovação e a exploração dos recursos e ecossistemas naturais para o desenvolvimento de produtos e processos**. 1^a ed. Manaus: EDUA / UFAM, 2015. p. 42–56.

ZIMMERMANN, G. The “Galleria bait method” for detection of entomopathogenic fungi in soil. **J. Appl. Ent.**, v. 102, p. 213–215, 1986.

MANUSCRITO 2: PRESERVAÇÃO E COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS PARA APLICAÇÃO NA BIOTECNOLOGIA

Luziana de Sousa Xavier
Grafe Oliveira Pontes
Yamile Benaion Alencar

Xavier LS, Pontes GO, Alencar YB. Preservação e coleções microbiológicas para aplicação na biotecnologia In: MAFRA, R. Z. et al. (Eds.) **Gestão da Biotecnologia na Amazônia: a inovação e a exploração dos recursos e ecossistemas naturais para o desenvolvimento de produtos e processos**. 1 ed. Manaus: EDUA / UFAM, 2015, v.1, p. 57-70. ISBN: 978-85-7401-802-7”.

1 INTRODUÇÃO

O avanço da biotecnologia mostrou um notável crescimento ao desenvolvimento da microbiologia devido ao reconhecimento, pelo homem, da importância dos fungos, algas e bactérias, resultando em estudos e aprimoramentos de técnicas e métodos para isolamento, cultivo e preservação de microrganismos. A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos (CANHOS e MANFIO, 2001).

Os microrganismos e a biotecnologia compreendem um campo do conhecimento bastante vasto, englobando atividades que vão do cultivo à construção de material biológico. Isso faz com que a aplicação e uso desse material façam parte das diferentes etapas de produção e até mesmo constituam uma verdadeira “cadeia produtiva”, com toda a complexidade inerente a uma atividade tecnológica e industrial fortemente baseada em pesquisa e desenvolvimento (BRASIL, 2002).

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados para o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (CANHOS e MANFIO, 2001). É considerada uma tecnologia robusta, confiável e de baixo risco, capaz de ser implementada em grande escala por uma ampla gama de setores para sua aplicação (PEIXOTO, 2008). O material biológico representa um novo insumo tanto no ambiente da pesquisa e desenvolvimento quanto nos processos produtivos (BRASIL, 2002).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Apesar de sua grande importância no meio ambiente e em processos biotecnológicos, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura é derivada das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos (CANHOS, UMINO e MANFIO, 1999; (BRASIL, 2002).

A maneira mais eficaz de conservar microrganismos de importância econômica é a preservação em coleções (ABREU e TUTUNJI, 2008). As coleções de culturas de microrganismos são centros de conservação biológica, podendo ser desde pequenos centros privados a grandes instituições de ensino e pesquisa, como parte essencial da infraestrutura de apoio às ciências da vida e biotecnológica (SETTE et al., 2006). A sua função primária é de obter, manter e distribuir culturas biológicas para ensino, investigação, ensaios de controle, biotecnologia. É ainda um meio de preservação da diversidade biológica *ex situ* (CARVALHO, 2012).

2 AS COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS

As coleções de culturas podem ser classificadas em três categorias, nomeadamente, coleções privadas, especializadas e públicas. As coleções de culturas privadas são as que se constituíram com o objetivo de servir à instituição em que se localizam, como por exemplo, as que estão associadas a determinadas empresas ou indústrias. As coleções de culturas especializadas desenvolveram-se em resultado dos interesses de investigação específicos de um determinado investigador, sendo as que contêm, geralmente, informação muito rica e especializada, mas também as que comportam maior risco de desaparecer ou porque o investigador passou a ter interesses diferentes ou porque se reformou ou mudou de emprego. As coleções de culturas públicas são aquelas que têm como função primária a distribuição de culturas e a prestação de serviços de utilidade pública (CARVALHO, 2012).

O objetivo principal das coleções de microrganismos é prover ao usuário os produtos e/ou serviços oferecidos, utilizando técnicas e processos que certifiquem a qualidade e que estejam de acordo com as leis, regulamentos e políticas nacionais (SETTE et al., 2006). Neste contexto, as coleções microbiológicas são essenciais para o suporte ao desenvolvimento da biotecnologia, provendo insumos e material biológico certificado (OLIVEIRA, SETTE e FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006).

A preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfológicas e fisiológicas (ABREU e TUTUNJI, 2008). O material biológico preservado por métodos adequados em coleções de cultura tem um amplo espectro de aplicações nas áreas da agricultura, indústria, meio ambiente e saúde (RODRIGUES e LOUREIRO, 2009). Portanto, é de inteira responsabilidade de uma coleção microbiológica garantir a qualidade de seu acervo, e para isso devem operar com base em padrões apropriados para que o material microbiano possa ser certificado, garantindo ao cliente (consumidor) qualidade, manutenção do potencial biotecnológico (estabilidade genética) e autenticidade (SETTE et al., 2006).

Nos países em desenvolvimento, as coleções de culturas não têm merecido a devida atenção de formuladores de políticas para biotecnologia, agências de financiamento e órgãos governamentais. Geralmente as coleções são consideradas subprodutos da pesquisa, em especial da pesquisa básica, e as suas atividades e manutenção são consideradas atribuições e responsabilidades dos próprios investigadores. Nesses países, o governo e grande parte do setor empresarial privado ignoram a importância dessas coleções como infraestrutura relevante para a inovação tecnológica e para a competitividade industrial. Em contraponto, coleções de culturas e bancos genômicos são consideradas peça fundamental em programas de bioprospecção e desenvolvimento em empresas atuantes no setor de biotecnologia em países industrializados (CARVALHO, 2012).

No Brasil, embora o país se destaque no quadro internacional pela capacidade institucional quando comparado a outros países em desenvolvimento, a ausência de uma política adequada para a consolidação de Coleções Biológicas Nacionais é uma das causas preponderantes para o não avanço do setor. Recursos financeiros e humanos devem ser direcionados à dinamização de Coleções Microbiológicas Nacionais de referência na identificação e preservação do patrimônio genético brasileiro, com séria regulamentação como coleções de serviço (VAZOLLER e FRANCO, 2005).

No Brasil existe certo número de coleções de culturas bem estabelecidas em diferentes Universidades e Centros de Pesquisas, que mesmo caracterizadas como Coleções Microbiológicas de pesquisa, deve compor um sistema nacional de informação, registro e controle de qualidade, estratégico às recomendações legais sobre Proteção ao Patrimônio Genético Brasileiro - Medida Provisória nº 2.186-16 de 2001 (BRASIL, 2001). São também as coleções de pesquisas as prováveis fontes das coleções de serviço, por isso se deve estimular a sua existência em conformidade com conjuntos de normas reguladoras e bem estabelecidas,

com contínua atualização das novas metodologias para detecção, amostragem, coleta, cultivo e identificação dos microrganismos, bem como em relação às condutas mais adequadas de preservação e controle de qualidade (VAZOLLER e FRANCO, 2005).

3 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Na escolha de um método de preservação devemos considerar a capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas (MARIANO, 2006; GIRÃO et al., 2004). Os principais métodos de preservação utilizados são temperaturas baixas ou congelamento, nitrogênio líquido, sílica-gel, solo ou areia, tecido seco de hospedeiro infectado, repicagens periódicas, água destilada, liofilização e óleo mineral (BOTELHO et al., 2013; APARECIDO et al., 2012; BUENO, AMBRÓSIO e SOUZA, 2006). Tais métodos estão relacionados ao prazo em que se pretende preservar os microrganismos, a seguir abordados.

3.1 Métodos de conservação em curto prazo - Repicagem contínua ou periódica

O repique contínuo, também chamado de subcultivo ou repicagem periódica, é uma das mais antigas técnicas de conservação. Por ser um método simples, barato e amplamente utilizado caracteriza-se como técnica tradicional de manutenção de culturas em laboratório, sendo bastante utilizada para se obter a viabilidade de microrganismos, principalmente de bactérias (SOLA et al., 2012; ROMEIRO, 2006; COSTA e FERREIRA, 1991). Várias espécies microbianas são conservadas por esse método. Um fator importante para a conservação do microrganismo é a utilização do meio de cultivo adequado, pois assim é possível aumentar o intervalo de tempo entre repicagens (SOLA et al., 2012).

Este método consiste na transferência, de maneira asséptica, de pequena porção de fungo em meio de cultura, de um tubo de ensaio para novos tubos, contendo material para cultivo apropriado, o qual permitirá o desenvolvimento do fungo. Tal procedimento deve ser realizado a cada três ou quatro meses, a fim de que seja evitado o consumo completo de substrato e, também, o acúmulo excessivo de produtos de excreção, provenientes do metabolismo fúngico, uma vez que tais substâncias se comportam como agentes mutagênicos (APARECIDO et al., 2012; PIRES, APARECIDO e FINATTI, 2012; PASSADOR et al., 2010).

3.2 Métodos de conservação em médio prazo – Preservação em óleo mineral, em água destilada estéril, congelamento comum e secagem

O método preservação em óleo mineral consiste na aplicação de uma camada de 1 cm de altura de óleo estéril sobre uma cultura de microrganismos em estado sólido ou líquido. Essa camada de óleo limita a quantidade de oxigênio disponível para o microrganismo, causando assim uma redução no metabolismo e consequentemente na taxa de multiplicação do agente (SOLA et al., 2012; ROMEIRO, 2006; COSTA e FERREIRA, 1991).

A manutenção de culturas submersas em óleo mineral promove a redução do consumo de oxigênio em torno de 10% em poucas horas (SOLA et al., 2012; COSTA e FERREIRA 1991). Outra aplicação do óleo mineral nas culturas de microrganismos é a sua prevenção contra a desidratação do meio de cultivo. Se o óleo for adicionado sob uma cultura em tubo inclinado, por exemplo, todo o meio deve ser coberto, evitando que os microrganismos permaneçam em contato com o ar, evitando que a água do meio seja drenada e levada para o exterior, protegendo da desidratação total e perda do material biológico (SOLA et al., 2012; ROMEIRO, 2006).

Os óleos minerais utilizados devem ser bastante viscosos e com densidade relativa de 0,8 a 0,9 à temperatura de 20 °C, para que eles não sejam mais densos que a água e passem para o fundo da cultura líquida. Os óleos mais recomendados para a conservação de microrganismos são formulados a base de parafina e vaselina, isentos de componentes tóxicos à célula (ROMEIRO, 2006).

Durante a esterilização do óleo mineral, deve-se evitar a formação de umidade para eliminar possíveis contaminações. Existem dois procedimentos de esterilização do óleo mineral: I- através de autoclavagem à 1 atm por 30 minutos, seguida de secagem à 150°C, e II- através de aquecimento à 170 °C por 1 hora. No entanto, a elevação da temperatura do óleo pode às vezes resultar na formação de produtos tóxicos (SOLA et al., 2012; ROMEIRO, 2006; COSTA e FERREIRA, 1991).

A transferência de microrganismos preservados em cultura com óleo mineral deve ser realizada para o mesmo meio de cultivo em que o microrganismo se encontrava durante a preservação, e a repicagem para outro meio de cultura deve acontecer após a drenagem total da camada de óleo (PASSADOR et al., 2010; PEREIRA, BOM e FERRARA, 2008). A temperatura de conservação do meio de cultura após adição do óleo é descrito na literatura com variações de 4 °C a 20 °C, ajustada de acordo com as necessidades individuais de cada microrganismos (SOLA et al., 2012; ROMEIRO, 2006; COSTA e FERREIRA 1991).

A preservação em água, também chamado de método de Castellani, pode ser feita em água destilada ou solução salina estéril. A solução salina é utilizada para a preservação de

microrganismos sensíveis à baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas (SOLA et al., 2012). O método de Castellani consiste em armazenar pequenos discos (7 mm) do meio de cultura contendo o fungo, em frascos de vidro com aproximadamente 4 mL de água destilada esterilizada. Preferencialmente, devem ser utilizadas culturas jovens, com cerca de 10 a 15 dias.

Os frascos para armazenamento pelo método de Castellani são vedados com rolha de borracha previamente esterilizada, e o material microbiológico é observado durante alguns dias para verificar indícios de contaminação entre os procedimentos. Não havendo contaminações bacterianas, o frasco com material microbiano é lacrado com uma tampa hermética de alumínio (COSTA e FERREIRA, 1991). A viabilidade desse método tem sido estudada no Instituto Biológico de São Paulo – Campinas, sendo que bons resultados têm sido obtidos (APARECIDO et al., 2012; PASSADOR et al., 2010; FINATTI e APARECIDO, 2009).

A preservação por congelamento consiste na utilização de freezers comuns que atingem temperaturas de -4 a -20 °C, aconselhável em temperaturas iguais ou inferiores a -20 °C. Apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos de alguns meses a dois anos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Como desvantagem do método, existe a possibilidade de redução da viabilidade de alguns microrganismos em função dos danos causados às células decorrentes da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (ROMEIRO, 2006).

A preservação por secagem consiste em uma suspensão do microrganismo que é derramada sobre carregadores como areia, lama, solo, carvão ativado, grãos de trigo, esferas de vidro, grânulos gelatinosos ou sintéticos, papel-filtro, entre outros. Esses elementos são considerados bons carregadores por apresentar uma área de superfície adequada e a capacidade de absorver parte da umidade para então serem secos à temperatura ambiente ou em aquecimento de 36-40 °C. A secagem também pode ser feita na presença de algum composto hidrofílico como a sílica-gel e o peróxido de fósforo. As técnicas para o preparo de culturas em solo são basicamente duas (SOLA et al., 2012). A primeira consiste na inoculação de um pequeno volume de areia ou solo seco e estéril em pequena quantidade de suspensão de esporos do fungo que se deseja manter, seguido de secagem. Essa técnica não permite o crescimento do fungo e preserva os conídios ou esporos inicialmente introduzidos no solo (SOLA et al., 2012).

A segunda técnica consiste na utilização de um volume de inóculo em solo umedecido e previamente esterilizado por autoclavagem, seguido de um período de incubação. Esta técnica possibilita, para fungos, o crescimento, preservando as células propagativas e de resistência. São obtidos resultados mais satisfatórios quando o solo possui de 20 a 25% de capacidade de

retenção de água. Para determinar a retenção de água em solo, deve-se colocar uma porção de solo em um funil com papel-filtro umedecido e adiciona-se água até que uma gota se forme na ponta do cone de papel. A quantidade de água adicionada ao solo corresponde, aproximadamente, à capacidade de retenção de água desse tipo de solo (SOLA et al., 2012).

O armazenamento em cristais de sílica-gel consiste em pequenos frascos de vidro com tampas metálicas que são parcialmente preenchidos com sílica-gel purificada, de malha 6-2 mesh, previamente esterilizada pelo calor, seca a 130 °C por 3 horas e resfriadas em congelador. A suspensão de esporos é misturada em 5% de leite desnatado, seguido é adicionada à sílica-gel em quantidade suficiente para umedecer $\frac{3}{4}$ da sílica nos frascos de vidro com tampas metálicas. Os frascos são colocados por 20 minutos em banho frio, para evitar efeitos do desprendimento de calor. Como a sílica-gel libera calor quando em contato com a água ou suspensões aquosas, há a necessidade de resfriamento em banho de gelo para evitar danos aos microrganismos. Posteriormente, os frascos são guardados a temperatura ambiente. Para recuperar as culturas, alguns poucos cristais de sílica são asepticamente removidos e colocados em meio de cultura propícia ao desenvolvimento microbiano (SOLA et al., 2012).

3.3 Métodos de preservação em longo prazo - a liofilização e a criopreservação em nitrogênio líquido

A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de microrganismos, justamente por garantir viabilidade dos microrganismos por longos períodos e ser aplicável para a maioria deles (COSTA e FERREIRA, 1991; CANHOS, UMINO e MANFIO, 1999). A técnica se baseia na remoção da água intracelular de materiais biológicos congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo, que são capazes de provocar danos às estruturas celulares (MORGAN et al., 2006).

A liofilização é constituída por três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária. Durante o processo de congelamento pode ocorrer um dano à estrutura celular relacionado com o comportamento peculiar da água sob condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar e no processo de fusão tende a recrystalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula (CARVALHO, 2007).

O congelamento promove a inércia do material a ser liofilizado, gerando uma interrupção das reações químicas e atividades biológicas. Durante essa fase, a suspensão líquida é resfriada com a formação de cristais de gelo. Com a suspensão se tornando mais concentrada, a viscosidade aumenta, induzindo à inibição de nova cristalização. Esse líquido, altamente

concentrado e viscoso, solidifica, produzindo uma fase amorfa, cristalina ou amorfo-cristalina combinada (PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

Na secagem primária a água é removida por sublimação que ocorre sob vácuo e com a adição de calor. O calor aqui fornecido deve ser apenas suficiente para gerar o calor latente de sublimação. A velocidade de secagem na liofilização é lenta, sendo em média de 0,001 °C a 0,06 °C por segundo. Nesta primeira fase, cerca de 90% da água é retirada do produto (PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

A secagem secundária envolve a remoção da água absorvida pelo produto, a água que não se separou com o gelo durante o congelamento e, conseqüentemente não sublimou. A água não congelada deve ser adsorvida na superfície do produto cristalino, sua presença, em quantidades suficientes, pode causar a rápida decomposição do produto, quando estocado à temperatura ambiente (SOLA et al., 2012; COSTA et al., 2009; PAOLI, 2005).

Os procedimentos de estocagem e acondicionamento influenciam significativamente na vida de prateleira dos materiais liofilizados. Dessa forma, os produtos liofilizados, armazenados em ampolas ou frascos de vidro, devem ser acondicionados em ambiente com baixa umidade, baixa temperatura, abrigo de oxigênio, luz e contaminantes (SOLA et al., 2012; CARVALHO, 2012; MORGAN et al., 2006).

Através dessa técnica, a viabilidade de alguns microrganismos pode ser mantida por muitos anos ultrapassando períodos de 17 a 20 anos. A maioria das coleções de microrganismo atualmente utiliza essa técnica para a conservação de bactérias, actinomicetos e muitos fungos, inclusive os leveduriformes, respondendo bem a essa técnica, mesmo considerando que o número total de células que sobrevivem ao processo em cada operação seja relativamente pequeno (SOLA et al., 2012; CARVALHO, 2012).

A preservação pelo processo de crioproteção envolve diferentes passos. O primeiro é preparar as culturas para o congelamento. Para prevenir a desidratação, são necessários que todos os fluidos celulares se solidifiquem juntos, evitando alteração na concentração dos minerais e, formação de cristais de gelo e conseqüente ruptura da parede celular. Para tanto, agentes protetores do congelamento devem ser adotados. O glicerol é bioquimicamente compatível com as estruturas celulares e, portanto, frequentemente usado para preservação. Dessa forma as células podem ser preservadas por um tempo indefinido e recuperar suas funções normais quando forem devidamente descongeladas (ABREU e TUTUNJI, 2008).

A metodologia padrão para a criopreservação tem início na refrigeração do material biológico, mantendo-o a temperatura de 20 °C. Nesta etapa, não se evidencia danos às estruturas celulares, desde que as amostras estejam diluídas em meios adequados (OLIVEIRA, 2007;

COSTA et al., 2009). Com a redução da temperatura, pode ser determinada uma faixa crítica, entre +19 e +8 °C, na qual os microrganismos poderão sofrer algum tipo de injúria celular. Quando este resfriamento é realizado de uma forma inadequada, o fenômeno determinado como choque térmico provoca danos irreversíveis como alterações na membrana plasmática com consequente aumento da permeabilidade e perda de íons e moléculas intracelulares, além da redução do metabolismo (SOLA et al., 2012; WATSON, 2000).

Quando o processo de redução de temperatura atinge a faixa de -6 °C a -15 °C, verifica-se a cristalização da água presente no meio, o aumento da concentração de soluto na fração descongelada e a ausência de formação de cristais de gelo intracelular pelo controle da membrana plasmática. Quando o material atinge a temperatura crítica de -60 °C, verifica-se a inércia celular, sendo possível realizar a imersão do material em nitrogênio líquido, para seu armazenamento e conservação (SOLA et al., 2012; OLIVEIRA, 2007; WATSON, 2000).

A estocagem à baixas temperaturas, apesar de eficiente, pode comprometer a qualidade das amostras armazenadas, visto a possibilidade de variações de temperaturas em freezers. Já os sistemas de nitrogênio líquido garantem o armazenamento a temperaturas constante e por longos períodos (SOLA et al., 2012; PAOLI, 2005).

A elevada taxa de sobrevivência alcançada desperta o interesse de pesquisadores quanto a sua utilização, principalmente pelo aspecto prático, visto a recuperação e viabilidade de populações celulares, mas também na redução das possíveis alterações na sua composição genética. Entretanto, faz-se necessário frisar que os protocolos de criopreservação necessitam de adequação metodológica para cada tipo de microrganismo de interesse (ABREU e TUTUNJI, 2008; COSTA et al., 2009).

Apesar dos crioprotetores serem essenciais para o congelamento seguro da maioria dos sistemas biológicos, essas substâncias não permitem a sobrevivência de todas as células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como do tempo de exposição da célula ao mesmo (OLIVEIRA, SETTE e FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006).

4 PARTICULARIDADES DA PRESERVAÇÃO DAS COLEÇÕES

Apenas as coleções biológicas institucionais poderão pleitear ao Conselho de Gestão de Patrimônio Genético (CGEN/MMA) o credenciamento como Coleção Fiel Depositária. Para isso, devem: I - Preencher o formulário para solicitação de credenciamento disponível no site do CGEN, colocando como representante institucional o (a) Vice-Presidente de Pesquisa e Laboratórios de Referência (VPPLR); II - Anexar os documentos solicitados; III - Encaminhar

a documentação para a VPPLR para ciência, aprovação e assinatura do formulário; IV - Após assinatura pelo (a) Vice-Presidente de Pesquisa e Laboratórios de Referência a solicitação será encaminhada ao CGEN (FIOCRUZ, 2005).

As coleções credenciadas como fiel depositária ao final do ano informarão à VPPLR se tiveram algum depósito de material biológico naquele ano e, em caso positivo, encaminharão relatório quanto aos depósitos para VPPLR, que os enviará para o CGEN, informando também aquelas que não tiveram depósitos (FIOCRUZ, 2005). No Amazonas as instituições credenciadas no CGEN como fiel depositária são: I - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, que tem como Curadora das Coleções Microbiológicas a Dra Lúcia Helena Rapp Py-Daniel; e II - Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, que tem como Curadora da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) a Dra Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, e Curadora da Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM), a MSc. Luciete Almeida Silva (BRASIL, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elaboração de coleções biológicas é fundamental para garantir a preservação da biodiversidade. Elas prestam serviços de preservação, manutenção, depósito, fornecimento, caracterização e identificação taxonômica de material biológico para o desenvolvimento de pesquisa em ciência, tecnologia e inovação, e em vigilância epidemiológica, em conformidade com as normas e legislações nacionais e internacionais vigentes.

A escolha de uma técnica para conservação depende de várias particularidades, não existindo, dessa forma, uma fórmula padrão e universal para a estocagem e preservação de fungos, levando-se em consideração que a preservação deve garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células. A definição da técnica a ser utilizada para a preservação depende também do isolado que será preservado. Sendo assim, deve-se definir qual a melhor metodologia para cada isolado através de testes.

Considerando a vasta diversidade microbiana e que muitos microrganismos ainda esperam pela definição da metodologia mais adequada à sua conservação, conclui-se que este ainda é um tema que ainda demanda muita pesquisa e discussões.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 237-252, 2008. 16f.
- APARECIDO, C. C. et al. Preservação de microrganismos a -80° C. **Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.23-29, jan./jun., 2012.
- BOTELHO, S. D. M. et al. Avaliação de dois métodos de preservação de *Cercospora coffeicola*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 8., Salvador, 2013. **Anais...** Salvador, 2013.
- BRASIL. **Medida Provisória nº 2.186-16**. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Brasília. 23/08/2001.
- _____. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Sistema de avaliação da conformidade de material biológico. 2002**. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0000/10.pdf. Acesso em: 21 jul. 2015.
- _____. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Relação das Instituições Credenciadas no CGEN como Fiéis Depositárias e respectivas coleções. 2015**. Disponível em: http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80043/fiel%20depositario/instituicoes_fiel_depositaria_06-05-15.pdf. Acesso em: 21 jul. 2015.
- BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 42-50, 2006.
- CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. Coleções de culturas de microrganismos. In: JOLY, Carlos Alfredo; BICUDO, Carlos Eduardo de Mattos. (Org.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 81-102. v. 7.
- _____; MANFIO, G. P. **Recursos microbiológicos para Biotecnologia. 2001**. Disponível em: www.mct.gov.br/upd_blob/0000/439.pdf. Acesso em: 10 jul. 2015.
- CARVALHO, C. A. S. **Coleções de culturas microbianas como centro de recursos biológicos**. Lisboa, 2012, 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2012.
- CARVALHO, F. D. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

FINATTI, D.; APARECIDO, C. C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 715-720, 2009.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ. **Manual de organização de coleções da FIOCRUZ**. 2005. VPPLR-M-CB-001 Rev04 em 20/05/2015. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/gestao-estrategica-das-colecoes>. Acesso: 21 jul. 2015.

GIRÃO, M. D. et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Rev Soc Bras de Med Trop**. v. 37, n. 3, p:229-233, 2004.

MARIANO, P. L. S. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras**: estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica. Piracicaba, 2006, 112f. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) - Universidade Estadual Campinas, 2006.

MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v.66, n. 2, p.183-193, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701206000583>. Acesso em: 07 jul. 2015.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. Construindo a historia dos produtos naturais. **MultiCiência**. 2006. Disponível em: https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_08_7.pdf. Acesso em: 07 jul. 2015.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. 2007. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)--Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, 2005.

PASSADOR, M. M. et al. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.

PEIXOTO, R. M. **Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biosurfactantes**. São Paulo, 2008, 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**: séries em Biotecnologia, Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. v. 1.

PIRES, G. C. C.; APARECIDO, C. C.; FINATTI, D. Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longo períodos de tempo. **Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.9-16, jan./jun., 2012.

RODRIGUES, A. M.; LOUREIRO, E. S. Confecção de uma coleção de fungos entomopatogênicos com isolados encontrados em culturas agrícolas e ambientes de preservação ambiental em Mato Grosso do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico** (Impresso). v. 76, n. 2. p. 303-306, 2009.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. Material didático.

SETTE, L. D. et al. Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de microrganismos. **Microbiol. Foco. (Brazilian Society of Microbiology)**, v. 2, p. 49-55, 2006.

SOLA, M. C. et al. Manutenção de Microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer. Goiânia, v.8, n.14, p. 1416, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. Cap. 06.

VAZOLLER, R. F.; FRANCO, B. D. G. M. Coleções Microbiológicas no Brasil: reflexões da Sociedade Brasileira de Microbiologia. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE COLEÇÕES CIENTÍFICAS. 1., 2005. 75f. **Anais**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/colecoessimposio.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2015.

WATSON, P. F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen**. *Animal Reproduction Science*, London, [online], v.60/61, p.481-492, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000000993>. Acesso em: 09 jul. 2015.

ANEXO II-1



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

Número do Protocolo: 014/2014	Data de Entrada: 06/07/2014
Pesquisador Responsável: GRAFE OLIVEIRA PONTES	
Título do Projeto: Bioprospecção de fungos de solos da Amazônia e avaliação do potencial biotecnológico contra larvas e adultos de <i>Anopheles Darling Root</i> e <i>Aedes aegypti</i> L – Malária e Dengue, em Manaus/AM, Brasil.	
Instituição Responsável: INPA	

RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 17.11.2014.

Atenciosamente,


 Maridete de Farias Nairi
 Vice-Presidente CEUA/INPA
 PO Nº 008/2013

TERMO DE ANUÊNCIA

Eu, **Hillândia Brandão da Cunha**, Coordenadora de Pesquisas e Acompanhamento das Atividades Finalísticas - CPAF do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, venho por meio desta informar a V. Sa. que autorizo do aluno de doutorado **Grafe Oliveira Pontes**, aluno do curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, a realizar a pesquisas para o projeto "**Bioprospecção de Fungos de Solos da Amazônia ae Avaliação do Potencial Biotecnológico contra Larvas e Adultos de *Anopheles darlingi* Root e *Aedes aegypti* L - Malária e Dengue, em Manaus/Am-Brasil**", sob orientação da Prof.(a). **Dra. WANDERLI Pedro Tadei**, pesquisador da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde - CSAS.

Declaro conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução Éticas Brasileiras, em especial a Medida Provisória nº 2.186-16 de 2001 para acesso a componente do patrimônio genético com finalidade de bioprospecção ou desenvolvimento científico e tecnológico. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades com instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem estar.

Manaus (AM), 10 de setembro de 2014.


Dra. Hillândia Brandão da Cunha
Coordenadora da CPAF
 PO.Nº 859/2012-INPA/MCTI/PR





UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FAZENDA EXPERIMENTAL
BR 174, KM 38 – ZONA RURAL
CNPJ: 04.378.626/0001-97

TERMO DE ANUÊNCIA

A Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas está de acordo com a execução do projeto: BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO CONTRA LARVAS E ADULTOS DE *Anopheles darlingi* Root e *Aedes aegypti* L. – MALÁRIA E DENGUE, EM MANAUS/AM, BRASIL, coordenado pelo pesquisador Dr. Wanderli Pedro Tadei, Orientador do discente Grafe Oliveira Pontes, Aluno de doutorado em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, e assume o compromisso de apoiar o desenvolvimento da referida pesquisa nesta Instituição durante a realização da mesma.

Declaramos conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Medida Provisória nº 2.186-16, de 2001 para acesso a componente do patrimônio genético com finalidade de bioprospecção ou desenvolvimento científico e tecnológico.

Manaus, 03 de Setembro de 2014


Leandro Amorim Damasceno
Eng.º, Agr.º, MSc
Diretor Fazenda Experimental/UFAM



6219863960707161

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010319/2015-8

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZONIA - INPA

CNPJ: 012.638.960/0015-60

Representante Legal: LUIZ RENATO DE FRANCA

Cargo/Função: Diretor Presidente

CPF: 122.525.901-06 **RG:** 09542957

Projeto: Bioprospecção de fungos de solos da Amazônia e avaliação do potencial biotecnológico contra larvas e adultos de *Anopheles darlingi* Root e *Aedes aegypti* L ? Malária e Dengue, em Manaus/AM, Brasil

Coordenador do Projeto: Wanderli Pedro Tadei

CPF: 737.029.948-15 **RG:** 4459170 - SSP / SP

Finalidade do projeto: O uso de inseticidas químicos torna-se importante nos programas de controle dos vetores da malária e da dengue. Com o passar dos anos, os estudos epidemiológicos demonstraram a ineficiência dos inseticidas sintéticos devido à resistência adquirida com a utilização nas atividades relacionadas ao controle de vetores em doenças tropicais, especialmente malária e dengue. Para uma melhor eficácia dos programas de controle de vetores, há necessidade da busca de novas alternativas. O interesse em fungos entomopatogênicos para controle biológico encontra-se em amplo crescimento. Entretanto, ainda são discretos os trabalhos no controle dos diferentes estágios de vida do *Anopheles darlingi* e do *Aedes aegypti*, e a transmissão de micoses entre seus indivíduos e sua prole. Com o intuito de contribuir com novos compostos e controle integrado da malária e dengue, o presente projeto tem como objetivo avaliar a atividade entomopatogênicas de fungos isolados de solo da Amazônia em adultos de *A. darlingi* e *A. aegypti*, e seus efeitos sobre os ovos e eclosão das larvas de *A. aegypti*. A Metodologia proposta para esse trabalho visa à utilização de conídios dos isolados fúngicos previamente selecionados por gêneros que tenham relevância no controle microbiano de insetos. Para a aplicação das formulações serão utilizados conídios em suspensões aquosas e em água-óleo a 10%, impregnados em papel filtro e colocados em Kit da Organização Mundial de Saúde normalmente usados para teste de inseticida químico. Este procedimento tem como princípio avaliar a aderência e propagação do fungo entomopatogênico na cutícula do inseto. Os bioensaios serão realizados em condições de laboratório, avaliando-se o grau de infestação e o efeito entomopatogênico sobre os adultos de *A. darlingi* e *A. aegypti*, e sua possível influência na oviposição e eclosão das larvas do *A. aegypti*. Os resultados entre as duas metodologias determinarão a melhor aplicabilidade para os isolados fúngicos e sua utilização no controle da malária e dengue, responsáveis por grande impacto social na saúde pública da Amazônia.

Amostras a serem acessadas:

Grupos Taxonômicos: Zygomycota (Zygomycetes e Trichomycetes), Deuteromycota (Hyphomycete), Ascomycota (Clavicipitaceae)

Tipo de material/quantidade de amostras: 45 Amostras de solo (12 sub-amostras de 200g para cada amostra)

Local de depósito de subamostra: Coleções Microbiológicas/INPA

Equipe do projeto: WANDERLI PEDRO TADEI / CPF 737.029.948-15

GRAFE OLIVEIRA PONTES / CPF 860.082.183-53

LUZIANA DE SOUSA XAVIER / CPF 848.354.513-68

Validade da Autorização: 12/05/2015 a 12/05/2018

ANEXO II-2**Meios de cultura para isolamento de fungos entomopatogênicos**

1. Meio de cultura com Dodine.

20,0g de aveia em pó + 1 litro de água destilada. Autoclavar por 20 min a 120 C. Completar o volume para um litro e adicionar:

Agar	20,0g
Dodine (acetate de N-dodecilguanidina)	550,mg
Tetraciclina	5,0 mg
Cristal violeta	10,0mg

2. Meio de cultura sem Dodine.

20,0g de aveia em pó + 1 litro de água destilada. Autoclavar por 20 min a 120 C. Completar o volume para um litro e adicionar:

Agar	20,0g
Tetraciclina	5,0 mg
Cristal violeta	10,0mg

3. Meio de cultura Ágar-aveia.

20,0g de aveia em pó + 1 litro de água destilada. Autoclavar por 20 min a 120 C. Completar o volume para um litro e adicionar:

Agar	20,0g
Tetraciclina	5,0 mg

4. Meio de cultura para fins gerais.

Batata Dextrose e Ágar (BDA). Fabricante Merck.
Completar o volume para um litro e adicionar:

BDA – Merck	39,0g
Cloranfenicol	0,3 mg

CAPÍTULO III: ATIVIDADE LARVICIDA E ADULTICIDA DE ISOLADOS FÚNGICOS DE SOLO DA AMAZÔNIA EM *Aedes (Stegomyia) aegypti* LINNAEUS, 1762

1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos de pequeno porte e também conhecidos popularmente pernilongos e carapanãs. Pertencem à família Culicidae, para a qual são conhecidas aproximadamente 3.500 espécies, classificadas em 95 gêneros e distribuídas em todo planeta (ALKHAIBARI et al., 2016; CANTUÁRIA, 2012). Os mosquitos são uma séria ameaça para a saúde pública, transmitindo várias doenças por diversos agentes etiológicos, sendo um perigo eminente para 2 milhões de pessoas que vivem nos trópicos (BENSERRADJ; MIHOUBI, 2014; FORATTINI, 2002).

As doenças cujos agentes etiológicos são transmitidos por mosquitos vetores, representam uma grande ameaça para a saúde das sociedades em todo o mundo. Essas doenças em conjunto representam cerca de 17% das enfermidades que acometem o homem e estima-se que cerca de 80% da população mundial vive em áreas com risco de pelo menos uma dessas doenças, sendo que a metade em risco de duas ou mais (WHO, 2017).

Diversas espécies de mosquitos são consideradas vetores de agentes patogênicos, contudo, considerando as principais doenças que acometem a população brasileira, uma das espécies que ganham notoriedade científica é o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

1.1 *Aedes aegypti* e a transmissão de arboviroses

O mosquito *A. aegypti* é amplamente distribuído no globo terrestre, presente nas regiões tropical e subtropical, possui hábito diurno, é altamente antropófilo e considerado uma das espécies de mosquito mais associado à espécie humana (FORATTINI, 2002; LOPES et al., 1993; PRADO et al., 2017).

Aedes aegypti é uma das principais espécies de mosquitos de importância epidemiológica, pois têm causado grandes problemas de saúde pública em diferentes países onde são encontrados, por ser transmissor de diferentes patógenos ao homem (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; WHO, 2017).

As fêmeas desse vetor realizam o repasto sanguíneo preferencialmente na espécie humana, é nesse momento que pode ocorrer à transmissão de agentes patogênicos. Após o repasto, as fêmeas dessa espécie realizam posturas de seus ovos, diretamente nas paredes

úmidas dos criadouros com água, que podem ser diferentes tipos de recipientes artificiais, como também criadouros naturais (ALBERNAZ; TAI; LUZ, 2009; OLIVEIRA; ALMEIDA NETO, 2017).

O *A. aegypti* possui desenvolvimento holometábolo, compreendendo os estágios de ovo, quatro instar larval, pupa e adultos, em condições naturais, seu ciclo de vida pode durar em torno de dez dias (FORATTINI, 2002). Os ovos é o estágio mais importante para a disseminação da espécie, em condições adversas, podem permanecer viáveis até mais de um ano, o que favorece a permanência da espécie no ambiente (SOARES-PINHEIRO et al., 2017).

A presença desse vetor em áreas urbanas tem preocupado os órgãos de saúde pública pois, comprovadamente, esse mosquito é transmissor dos agentes etiológicos da Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana. Essas doenças têm ocupado uma posição de destaque em relação à saúde pública, em vários países das Américas, principalmente no Brasil, onde se registra a ocorrência de todas essas arboviroses simultaneamente, desde 2015 (BRASIL, 2018; DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

No caso da Dengue, essa doença aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos, se ampliando para novos países. É uma doença emergente e re-emergente em vários países e vem preocupando as autoridades em saúde, em quase todo o mundo, devido os casos graves e letais que já ocorreram (BRASIL, 2017a).

No Brasil, em 2017, foram registrados 252.054 casos prováveis de Dengue, com uma incidência de 122,3 casos/100 mil habitantes. Na região Norte foi registrado 26.660. No Estado do Amazonas foram registrados 3.984 casos até a semana epidemiológica 52 (BRASIL, 2018).

Em relação aos casos de vírus Zika no país, em 2017, os levantamentos de dados registraram 17.452 casos prováveis, sendo 429 notificados para o Amazonas. Em relação ao Chikungunya, até o mesmo período, foram registrados 185.737 casos. No Estado do Amazonas, o número de casos prováveis foi de 244 (BRASIL, 2018).

A febre amarela, por outro lado, que embora seja possível a vacinação da população humana contra essa doença, tem se tornado assunto preocupante na saúde pública, pois surtos dessa doença acontecem no Brasil em extensão variável. Entre dezembro de 2016 e julho do ano de 2017, foram confirmados 777 casos e 261 óbitos no país (BRASIL, 2017a).

1.3 Medidas de controle vetorial

Historicamente, o controle de mosquitos vetores de agentes patogênicos é realizado com a utilização dos produtos químicos (LIU, 2015; MARCOMBE et al., 2012; ROCHA et al.,

2015). Estes inseticidas químicos asseguram o controle populacional desses vetores, de forma imediata. No entanto, o seu uso contínuo pode levar à formação de resistência das espécies de mosquitos em curto prazo, fato recorrente em diversas regiões no mundo (DABIRÉ et al., 2008; DU et al., 2016; SMITH; KASAI; SCOTT, 2016).

No Brasil, tanto para o controle *A. aegypti* prevalece ainda o uso de inseticidas químicos nos programas, conforme dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017b). Portanto, as eficiências dos inseticidas utilizados nos programas de controle desses mosquitos têm que ser avaliadas, no sentido de verificar o nível de resistência desenvolvido por esses vetores, para assegurar a eficácia das ações implementadas (CUNHA E SILVA et al., 2014; MACORIS et al., 2014).

Um exemplo clássico de resistência desenvolvida pelo *A. aegypti* aos inseticidas químicos, trata-se do larvicida “Temefós”. Este foi amplamente utilizado no tratamento focal em criadouros desses mosquitos no Brasil, logo no início da implantação do programa de controle do *A. aegypti*. No entanto, o uso prolongado deste produto levou a formação de resistência, em diferentes localidades do país (DINIZ et al., 2014). Resistência aos inseticidas organofosforados e piretróides em *A. aegypti* têm apresentado desde os anos 1980/1990 e foi demonstrado impacto sobre o controle desse vetor (CAMPOS; ANDRADE, 2003; MARCOMBE et al., 2012).

Isolados fúngicos têm sido usados como ferramenta para controle biológico de vetores importantes em saúde pública. Em ensaios de laboratório, triatomíneos, mostraram-se muito susceptíveis à infecção por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (LECUONA et al., 2001; LUZ; BATAGIN, 2005). Larvas de 3º instar de *Musca doméstica*, demonstrou alta taxas de mortalidades quando expostas a suspensão aquosa de conídios de *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* (DE SENNA-NUNES et al., 2002) e *M. anisopliae* (FERNANDES et al., 2010).

Beauveria sp. e *Metarhizium* sp. são fungos entomopatogênicos com amplo espectro de hospedeiros, e com bons resultados contra *A. aegypti*. Conídios de *B. bassiana* testados contra larvas de *A. aegypti* apresentaram elevada taxa de mortalidade após quatro dias de experimento (MIRANPURI; KHACHATOURIANS, 1990).

Isolados de *M. anisopliae* causaram até 100% de mortalidade de larvas de segundo estágio de *A. aegypti* (SILVA; SILVA; LUZ, 2004). Daoust e Roberts (1982) testaram o fungo *M. anisopliae* observando alta virulência para larvas de *Culex pipiens*, *A. aegypti* e *Anopheles stephens* (DAOUST; ROBERTS, 1982). De acordo com Riba et al. (1986), o segundo estágio

de *A. aegypti* é o de maior resistência à infecção pelo fungo; porém, quando testado, o fungo *Penicillium* spp. foi altamente patogênico e virulento às larvas (RIBA et al., 1986).

Além da atividade em larvas, fungos mostraram ter também atividade aduítica e ovicida em *A. aegypti* em condições de laboratório e semi-campo. Adultos de *A. aegypti*, tratados com *B. bassiana* tiveram uma redução na sobrevivência dos adultos (DARBRO et al., 2012; LELES et al., 2010; LUZ et al., 2007).

Scholte et al. (2007) mostraram que o fungo *M. anisopliae* foi patogênico contra o mosquito adulto de *A. aegypti* e *A. albopictus*, vetores da dengue e da febre amarela. Em outro estudo, vários isolados de *M. anisopliae* foram virulentos contra adultos de *A. aegypti* (PAULA et al., 2011) com potencial para serem usados em programas de controle desse vetor.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a eficiência dos isolados fúngicos de solo da Amazônia com potencial entomopatogênico, testando em ensaios larvicidas e aduíticas contra *A. aegypti* em condições de laboratório.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Criação e manutenção de mosquitos em laboratório

A população de indivíduos utilizada neste projeto foi originada de imaturos e adultos coletados em criadouros naturais e artificiais capturados no perímetro periurbano de Manaus, considerando as zonas Norte e Leste da cidade, e linhagens de *A. aegypti* cepa Rockefeller cedida pela Dra. Maria de Lourdes Marcoris da Sucen/Marília, São Paulo.

Os insetos e imaturos foram mantidos em condições viáveis para manutenção de suas diversas fases de vida no Insetário do Laboratório de Malária e Dengue-INPA.

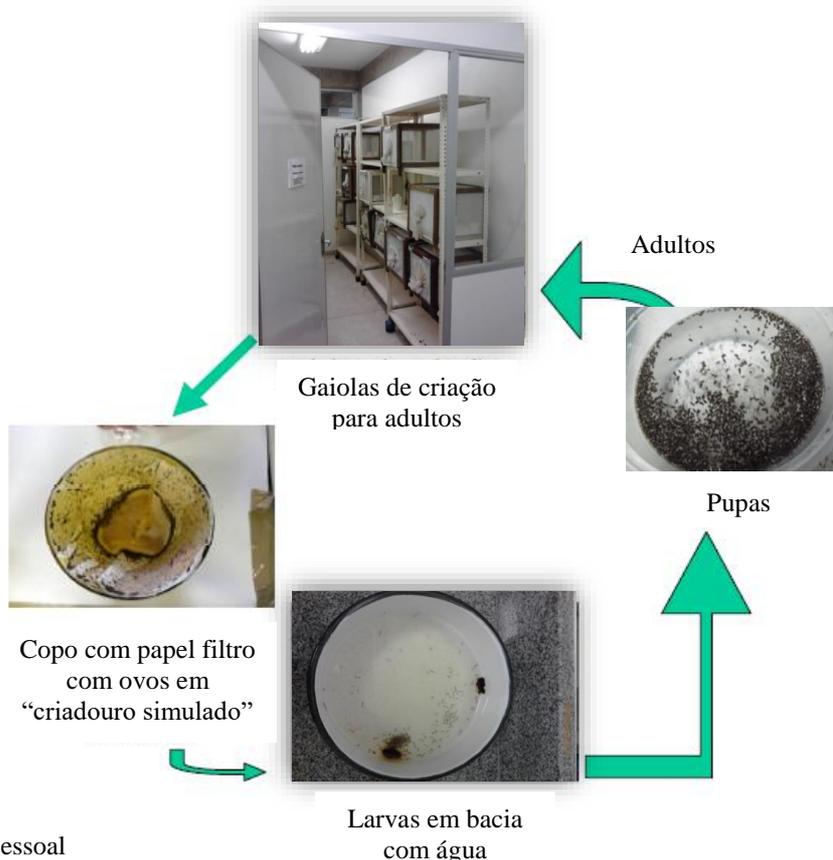
Na alimentação sanguínea das fêmeas capturadas e originadas dos ciclos obtidos dos ovos estocados, foram utilizados camundongos anestesiados durante um período médio de uma hora, três vezes por semana, conforme autorização concedida para uso de animais em experimentação em acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA MCT-INPA (Anexo III-1). Os adultos (machos e fêmeas) foram alimentados com solução de água açucarada em algodão embebido. Para que as fêmeas realizem a oviposição, foi utilizado um copo descartável com água, sendo seu interior revestido com papel filtro branco para criar um microambiente propício à postura.

Na obtenção de larvas, os ovos foram imersos em bacias brancas (20 cm de diâmetro x 7 cm de altura) contendo 0,5 litros de água retirada diretamente de poço artesiano de 150 metros de profundidade.

As larvas eclodidas foram transferidas para bacias novas e alimentadas com ração para peixe como fonte de nutrição para o seu desenvolvimento conforme necessidade. As pupas foram coletadas e transferidas para copos novos para permitir aos adultos emergir no interior das gaiolas.

Toda a criação de adultos ocorreu em condições controladas, temperatura de 27 ± 1 °C, 75 a 80% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas em gaiola telada apropriada para a manutenção do mosquito, no insetário do Laboratório de Malária e Dengue (figura III-1).

Figura III- 1. Criação de *Aedes aegypti* em laboratório



2.2 Avaliação *in vitro* de isolados fúngicos para atividade larvicida em *Aedes aegypti*

Foram utilizados doze isolados fúngicos selecionados e testados em bioensaios contra larvas de *Tenebrio molitor* L, IPC 1.2, IPC 3.1, IPC 4.5, IPS 1.3, IPS 2.1, IPS 2.3, IPS 2.4, IPS 3.1, FPS 2.10, FPS 4.8. Destes, dez isolados fúngicos utilizados pertencem a coleção das

amostras de solo descritas no capítulo 02, e outros dois isolados fúngicos, IBCB 425 e IBCB 66, pertencentes a Coleção de fungos entomopatogênicos Ademar Gondim do CEIB – Campinas, SP.

2.3 Metodologia e preparo dos conídios para bioensaios larvicida

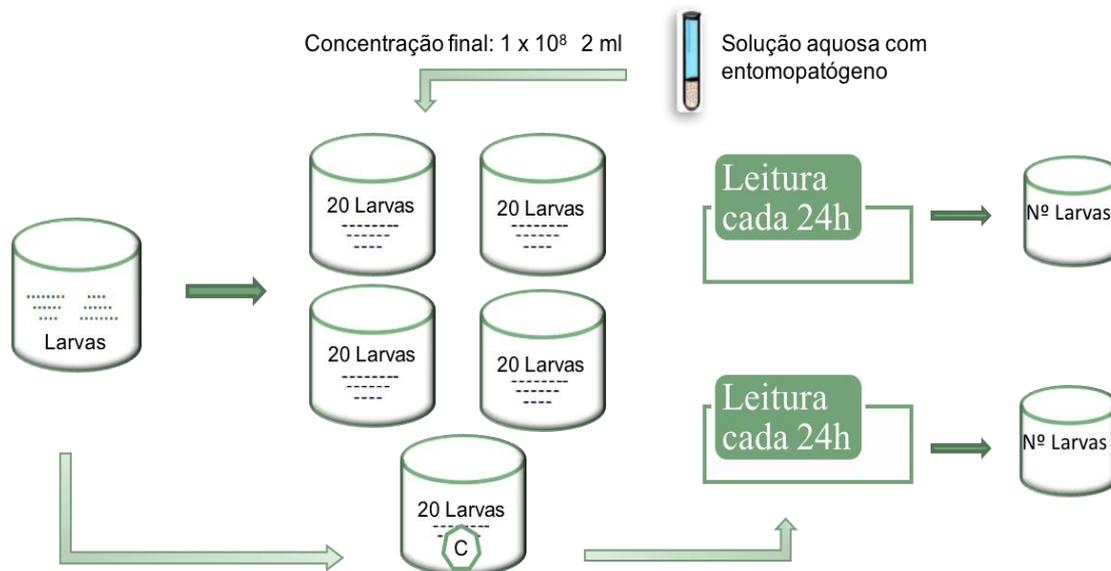
Todos os fungos foram repicados em meio BDA, a partir de coleção própria, mantida (2-8 °C) no Laboratório de Malária e Dengue – INPA e, incubados a 26 ± 1 °C durante 7 a 14 dias em câmara germinadora BOD.

Após o período de crescimento, conídios foram raspados da superfície das culturas e colocados em tubos de ensaio com pérolas de vidro suspensa em 10 mL de água destilada estéril (ADE) contendo Tween 80® a 0,05%. Os tubos foram agitados em vórtex, o conteúdo filtrado em papel de filtro Inlab número 10. Para a quantificação de conídios/mL, uma alíquota da suspensão foi contada em câmara de Neubauer em microscópio óptico ZIESS com objetiva de 20x (ALVES; MORAES, 1998).

As larvas foram colocadas em um recipiente plástico (50 cm³) contendo 18 mL de água destilada com abertura superior fechada com malha de filó presa por um elástico. Foi adicionado 2 mL da suspensão aquosa de conídios a 1×10^9 conídios/mL ao recipiente contendo as larvas, obtendo uma concentração final de 1×10^8 e acondicionadas em câmara de germinação (BOD) com temperatura 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h por 7 a 14 dias, verificando o índice de mortalidade a cada 24 horas (SILVA; SILVA; LUZ, 2004). No tratamento testemunha utilizou-se a mesma metodologia descrita anteriormente, substituindo-se a suspensão de conídios com ADE contendo Tween 80® a 0,05% (figura III-2).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, realizado em quatro réplicas e constando de quatro repetições por tratamento, sendo utilizadas 20 larvas em cada replica, perfazendo total de 400 larvas por tratamento com isolado entomopatogênicos (BARCI et al., 2009).

Figura III- 2. Bioensaios em solução aquosa com isolados entomopatogênicos em larvas de *Aedes aegypti*



Fonte: arquivo pessoal

Para confirmar a mortalidade, as larvas encontradas mortas foram desinfetadas superficialmente. Os cadáveres foram lavados com soluções de hipoclorito de sódio a 2% por 1 min, em álcool a 70% por 2 min e duas vezes em água destilada autoclavada por 3 min, transferindo-se cada larva morta para outra placa de Petri, contendo um chumaço de algodão umedecido com água destilada, simulando uma câmara úmida para proporcionar a esporulação do fungo pelo tegumento dos insetos. Após o crescimento do fungo sobre a superfície do inseto em câmara úmida, a larva de *A. aegypti*, foi transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA com pH 5,5, incubada em câmara de germinação (BOD) com temperatura 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h por 7 a 14 dias para propagação e confirmação do isolado fúngico (ALVES; MORAES, 1998).

2.4 Análise dos resultados

A determinação dos parâmetros relativos à concentração letal 50 (CL50) e do tempo letal 50 (TL50), adotados como valores de referência, foram realizadas avaliações diárias do 1º dia pós-infecção até o dia em que foi constatada mortalidade total de um dos tratamentos. Foram determinados valores relativos à mortalidade corrigida, calculada de acordo com a Equação 1 sugerida por (ABBOTT, 1925).

(1)

$$\% \text{ mortalidade corrigida} = \frac{\text{números de vivos controle} - \text{número vivos tratado} \times 100}{\text{número de vivos controle}}$$

Os resultados obtidos foram analisados levando-se em conta as diferentes concentrações de conídios/mL dos isolado testados, e a porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti* obtidas nos diferentes tratamentos. Foi realizado teste de normalidade entre os dados, em seguida, transformados em raiz quadrada, submetidos à análise de variância (ANOVA) e, a posteriori, ao teste de Tukey para comparação de médias, a 5% de significância global.

Para determinar a concentração letal 50 (CL50) e o tempo letal 50 (TL50), os dados obtidos foram submetidos à análise de Probites POLO PC Software (LEORA - SOFTWARE, 1987).

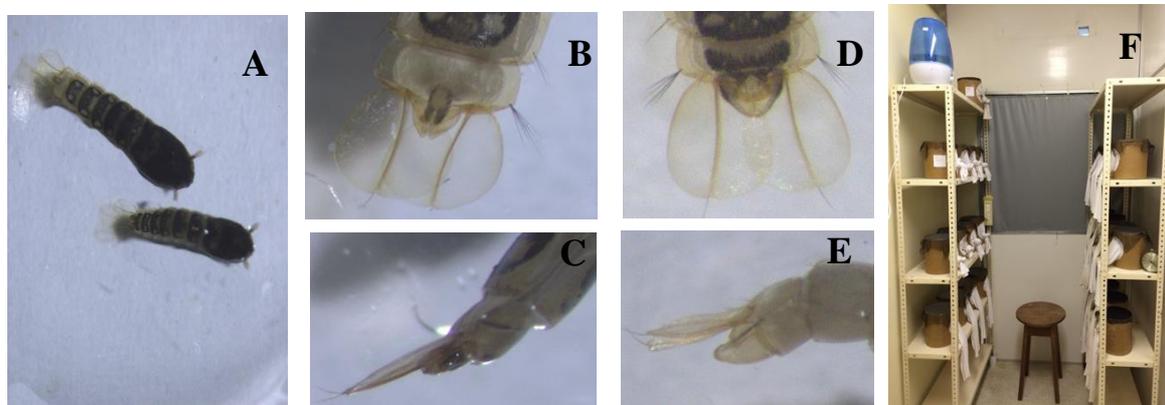
2.5 Bioensaios para atividade aduicida

2.5.1 Seleção de insetos adultos

Ovos de *A. aegypti* Rockefeller e *A. aegypti* selvagens coletados de colônias de insetos do Laboratório de Malária e Dengue (INPA-CoSAS) e recentemente estocados, foram utilizados para realizar bioensaios aduicidas.

Os insetos adultos foram selecionados e separados por sexo ainda na fase de pupa, utilizando Lupa estereoscópica ZIESS para visualização da genitália e tamanho dos imaturos (Figura III-3) (MARIO VARGAS, 1968). Em seguida, as pupas foram transferidas para gaiolas separadas por gênero e mantidas em sala climatizada mantidos a 27 ± 1 °C, $80 \pm 10\%$ de UR e fotoperíodo de 12 horas. Os insetos em sua fase adulta (machos e fêmeas) foram alimentados com solução de água açucarada a 10% em algodão embebido. Repasto sanguíneo para as fêmeas foi realizado apenas após os bioensaios com fungos entomopatogênicos.

Figura III- 3. Seleção de sexo de *Aedes aegypti* em fase de pupa. A: Diferença morfometria de pupas. a: Macho, b: fêmea; B e C: aparelho reprodutor feminino (postero-anterior e perfil); D e E: aparelho reprodutor masculino (postero-anterior e perfil); F: Colônia de *Aedes aegypti*



Fonte: arquivo pessoal

Entre os isolados fúngicos testados em bioensaios larvicida, foram selecionados para avaliação da mortalidade dos insetos adultos e a influência da infecção fúngica sobre o ciclo de vida do inseto os fungos com maior eficiência contra larvas de *A. aegypti*.

Os fungos selecionados foram cultivados em meio BDA, a partir de coleção própria, mantida (2-8 °C) no Laboratório de Malária e Dengue – INPA e, incubados a 26 ± 1 °C durante 7 a 14 dias.

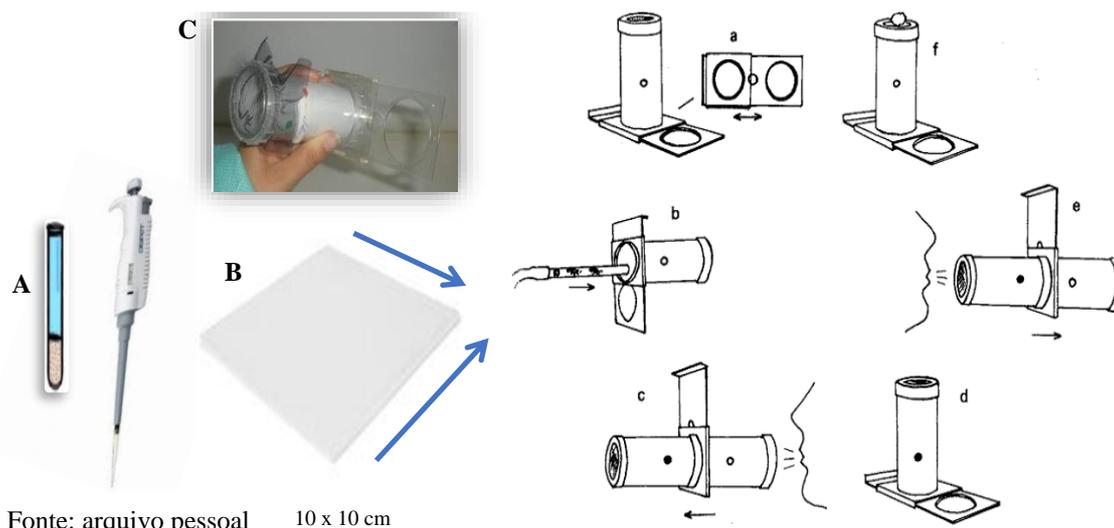
2.5.2 Preparo dos conídios e bioensaios

Conídios foram raspados da superfície das culturas e colocados em tubos de ensaio com pérolas de vidro suspensa em 10 mL de ADE contendo Tween 80® a 0,05%. Os tubos foram agitados em vórtex, o conteúdo filtrado em papel de filtro Inlab número 10. Para a quantificação de conídios/mL, uma alíquota da suspensão foi contada em câmara de Neubauer em microscópio óptico ZIESS com objetiva de 20x (ALVES; MORAES, 1998).

Na realização dos bioensaios de mortalidade em adultos de *A. aegypti* Rockeffer e *A. aegypti* selvagem, foi utilizado Kit da OMS em avaliação de papel impregnado (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). As suspensões de conídios foram preparadas e impregnadas em uma folha de papel filtro absorvente (15 x 15 cm). Com o auxílio de uma micropipeta, foi aplicado sobre cada papel filtro 10 mL de suspensão de conídios com 10^9 conídios/mL em distribuição homogênea sobre a superfície de cada papel filtro. Em seguida, os papéis filtro foram colocados na parte interna do tubo do Kit de Inseticida para revestimento de toda superfície interna e dispostos a secarem por 12 horas. Foram colocados dentro de cada tubo 10 casais de *A. aegypti*

com idade entre 7 a 10 dias de vida para permanecerem em contato com o papel impregnado durante 12 horas (figura III-4).

Figura III- 4. Bioensaios com adultos de *Aedes aegypti*. A: Solução aquosa com isolados entomopatogênicos. B: Papel impregnado com isolado fúngico. C: Kit da OMS para testes de susceptibilidade de adultos a inseticidas. a: Peça em forma de guilhotina que pode se fechar totalmente, permitindo acesso a capturador, ou abrir totalmente. b: Transferência de mosquitos para o tubo sem inseticida. c: Transferência de mosquitos para o tubo com inseticida. d: Aspecto durante o período de exposição. e: Transferência de mosquito sobreviventes para tubo sem inseticida. f: Mosquitos providos de água durante o período de observação



Os bioensaios em adultos foram realizados com quatro réplica por tratamento mais a testemunha, com duas repetições independentes, anotando a mortalidade diariamente por 15 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a posteriori, ao teste de Tukey para comparação de médias a 5% de significância ($P < 0,05$).

Os mosquitos mortos foram removidos das gaiolas usando pinças esterilizadas e colocado em placas de Petri, contendo um chumaço de algodão umedecido com água destilada, simulando uma câmara úmida para proporcionar a esporulação do fungo sobre o inseto. As placas foram incubadas em câmara de germinação (BOD) com temperatura 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h, e após cinco dias foram observados em microscópio para evidenciar qualquer crescimento de fungos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros bioensaios em *A. aegypti* realizado neste trabalho priorizou avaliar o nível de suscetibilidade do inseto em linhagens padronizadas, e que não passaram por nenhum tipo de influência ao uso de inseticidas, *A. aegypti* Rockefeller.

As cepas Rockefeller de *A. aegypti* são mantidas e utilizadas nos diversos laboratórios de entomologia por serem referência de suscetibilidade e empregadas em ensaios biológicos para comparação de resistência com determinada população local. A avaliação nível de suscetibilidade de um inseto é realizado de modo comparativo com uma linhagem nunca exposta à pressão de seleção com uso de produtos químicos, cuja resposta biológica (morte ou sobrevivência) possa ser considerada padrão para a espécie (BISPO; SANTOS, 2008; FIOCRUZ, 2007).

Foram testados doze isolados contra as larvas de *A. aegypti* Rockefeller e larvas de *A. aegypti* de campo em 3º instar, ocorrendo mortalidade nos bioensaios com todos os isolados selecionados no quinto dia de exposição com as duas diferentes cepas de *A. aegypti* (tabela III-1 e tabela III-2).

Tabela III- 1. Atividade larvicida em *Aedes aegypti* Rockefeller suspensão aquosa de conídios 1×10^8 em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, $90 \pm 10\%$ de umidade relativa

Isolado Fúngico	Mortalidade corrigida (% \pm EPM)*		P < 0,05
	05 dias	10 dias	
IPC 1.2	14,68 \pm 4,6a	31,87 \pm 4b	P=0,201
IPS 2.4	13,43 \pm 3,2a	32,8 \pm 6,8b	P=0,490
IPC 3.1	20,62 \pm 5,4a	31,8 \pm 8b	P=0,180
IPC 4.5	33,75 \pm 6,2a	36,5 \pm 6,4a	P=0,001
IPS 1.3	43,75 \pm 3,2a	68,1 \pm 5,4b	P=0,333
IPS 2.1	100	-	P=0,001
IPS 2.3	16,25 \pm 2,9a	33,1 \pm 3,4b	P=0,128
IPS 3.1	46,9 \pm 5,2a	52 \pm 5,9ba	P < 0,001
FPS 2.10	14,68 \pm 2,2a	36,5 \pm 4,3b	P=0,011
FPS 4.8	36,5 \pm 11,2a	40,14 \pm 13a	P=0,002
IBCB 66	14 \pm 4,4a	58,2 \pm 5,6b	P=0,320
IBCB 425	69,6 \pm 4,4a	83,2 \pm 8b	P=0,111

Estatística: Dados seguidos do erro padrão da média, médias na mesma linha seguidos pelas mesmas letras não apresentaram diferença estatística significativa (ANOVA e teste de Tukey, P < 0,05)

*EPM: Erro padrão da média

Tabela III- 2. Atividade larvicida em *Aedes aegypti* de campo em suspensão aquosa de conídios 1×10^8 em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa

Isolado Fúngico	Mortalidade corrigida (% \pm EPM)*		P < 0,05
	05 dias	10 dias	
IPC 1.2	11,82 \pm 4,4a	12,81 \pm 4,7a	P=0,021
IPS 2.4	12,9 \pm 3,2a	28,2 \pm 6,4b	P=0,271
IPC 3.1	4,3 \pm 2,2a	4,9 \pm 2a	P=0,018
IPC 4.5	14,68 \pm 2,2a	30,8 \pm 5,1b	P=0,311
IPS 1.3	44,9 \pm 8,2a	53,7 \pm 7,9a	P=0,031
IPS 2.1	60,2 \pm 4,4a	86 \pm 4b	P=0,280
IPS 2.3	7,8 \pm 2,2a	8,75 \pm 2,9a	P<0,001
IPS 3.1	14,68 \pm 3,7a	30,62 \pm 6,1b	P=0,490
FPS 2.10	13,44 \pm 2,2a	32,5 \pm 13b	P<0,001
FPS 4.8	14,68 \pm 9,2a	29,06 \pm 10,4b	P=0,400
IBCB 66	11,25 \pm 4,8a	31,8 \pm 5,1b	P=0,411
IBCB 425	67,8 \pm 2,9a	74,6 \pm 6,8a	P=0.011

Estatística: Dados seguidos do erro padrão da média, médias na mesma linha seguidos pelas mesmas letras não apresentaram diferença estatística significativa (ANOVA e teste de Tukey, P < 0,05)

*EPM: Erro padrão da média

Visando eliminar os efeitos de mortalidade natural daquela causada pela infecção com os fungos entomopatogênicos, optou-se por utilizar a fórmula de Abbott nos resultados descritos.

Os fungos IPS 2.1, IPS 1.3, IBCB 425, IBCB 66 foram considerados mais virulentos, apresentando respectivamente mortalidade de 100%, 68,1, 83,2% e 56,5% contra larvas Rockefeller decorridos 10 dias de exposição. Em outro bioensaio com larvas de *A. aegypti*, o maior percentual de mortalidade também foi alcançado pelos mesmos isolados citados contra larvas Rockefeller, ocorrendo respectivamente mortalidade de 86%, 53,7%, 74,6%, e 31,8%. A menor porcentagem de mortalidade em larvas Rockefeller (31,8%) ocorreu com os isolados IPS 1.2 e IPC 3.1, enquanto nas larvas de *A. aegypti*, o isolado IPC 3.1 apresentou mortalidade mais baixa (4,9%). A porcentagem de mosquitos mortos no grupo controle foi de 3,5 a 5%.

A partir desses resultados, os isolados com melhor desempenho (IPS 2.1, IPS 1.3, IBCB 425, IBCB 66) foram utilizados para determinar a concentração letal média (CL50) e o tempo letal médio (TL50). A concentração (conídios/mL) e o tempo (dias) para matar 50% das larvas tratadas estão descritas na tabela III-3.

Tabela III- 3. Concentração letal média (CL50) e tempo letal médio (TL50) inoculado com os isolados mais virulentos em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa

Isolado	CL50 (IC - 95%)*	x^2	TL50 (IC - 95%)**	x^2
	(conídios/mL)		(dias)	
IPS 1.3	$6,3 \times 10^6$ ($6,2 \times 10^6$ - $7,8 \times 10^8$)	5,38	4,8 (4,1-5,7)	4,67
IPS 2.1	$4,8 \times 10^6$ ($1,4 \times 10^6$ - $9,6 \times 10^6$)	2,49	1,95 (1,18-3,24)	0,88
IBCB 66	$6,8 \times 10^5$ ($1,4 \times 10^5$ - $9,6 \times 10^5$)	5,42	4,3 (3,5-5,0)	5,78
IBCB 425	$7,8 \times 10^6$ (3×10^6 - 4×10^7)	7,05	3,8 (3,0-4,4)	8,45

* Concentração letal para matar 50% (CL 50 e seus respectivos intervalos de confiança)

**Tempo letal para matar 50 % (TL 50 e seus respectivos intervalos de confiança)

Mortalidades nos grupos controle não foram maiores que 3% durante os testes

Considerando o tempo como fator prioritário em ensaio inseticidas, avaliamos os valores de TL50 para estes isolados, variaram entre 1,95 a 4,8 dias de tratamento. O isolado IPS 2.1 apresentou o menor valor de TL50 1,95 (1,18-3,24), seguido por IBCB 425 com TL50 de 3,8 (3,0-4,4), IBCB 66 com TL50 de 4,3 (3,5-5,0), e IPS 1.3 com TL 50 de 4,8 (4,1-5,7) dias de tratamento.

Para os bioensaios em adultos, os quatro isolados fúngicos descritos com melhor atividade em experimento com larvas foram selecionados para avaliação de mortalidade em adultos, TL50, e a influência de suas micoses no ciclo de vida do *A. aegypti*. A suspensão de cada isolado foi padronizada na concentração de 1×10^9 (tabela III-4).

Tabela III- 4. Atividade adulticida e tempo letal mediano (TL50) em dias e intervalos de confiança em *Aedes aegypti* após permanência de 12 horas em papel impregnado com isolados fúngicos em condições de laboratório a 27 ± 1 °C, $95 \pm 5\%$ de umidade relativa por 15 dias

Fungos	Mortalidade (% \pm EPM) *		P	Tempo letal (dias IC) **	Slope \pm EM	x^2
	10 dias	15 dias		TL50		
IPS 2.1	$38,2 \pm 4,4a$	$64 \pm 4b$	0,0028	13 (12-18)	$0,23 \pm 0,03$	2,29
IPS 1.3	$35,6 \pm 1,4a$	$60 \pm 8b$	0,001	14 (11-20)	$0,17 \pm 0,03$	1,48
IBCB 66	$40 \pm 2,2a$	$69 \pm 13b$	0,008	11 (6-17)	$0,13 \pm 0,02$	3,93
IBCB 425	$46,9 \pm 3,2a$	$73 \pm 14b$	0.014	11 (4-15)	$0,13 \pm 0,02$	0,91

Estatística: Médias na mesma linha seguidos pelas mesmas letras não apresentaram diferença estatística significativa (ANOVA e teste de Tukey, $P < 0,05$).

* Mortalidade corrigida \pm erro padrão da média (EPM)

** Tempo letal (TL 50 e seus respectivos intervalos de confiança 95% e slopes \pm EM)

Mortalidades nos grupos controle não foram maiores que 5% durante os testes.

Todos os valores foram baseados em quatro repetições independentes, cada uma com 20 adultos expostos a culturas de fungos esporulados.

NO primeiro bioensaio adulticida, a virulência dos isolados IPS 2.1, IPS 1.3, IBCB 425, IBCB 66 foi determinada pela exposição direta de *A. aegypti* a 1×10^9 conídios/mL¹. O isolado IBCB 425 mostrou-se virulento com um TL50 de $11,2 \pm 4$ -15 dias.

Durante o tempo de avaliação a mortalidade dos adultos com os isolados IPS 2.1, IPS 1.3, IBCB 425, IBCB 66, foi oferecido alimentação sanguínea às fêmeas para ovo postura em criadouros artificiais. Após esse período, os ovos foram retirados das gaiolas, colocados para eclodir, e as larvas alimentadas até a fase adulta do *A. aegypti*.

O número de ovos, larvas e adultos foram quantificados e comparados ao grupo controle. A diferença estatística entre ovos, larvas e adultos descendentes de cada grupo de *A. aegypti* tratado com os isolados IPS 2.1, IPS 1.3, IBCB 425 e IBCB 66 está descrito respectivamente nas tabelas III-5, III-6, III-7 e III-8.

Tabela III- 5. Influência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IPS 2.1. Número médio de ovo postura, larvas e adultos

Estágio	Número indivíduos \pm EPM*		Redução (%)	P < 0,05
	Testemunha	Papel impregnado		
Ovo	133	115 \pm 13,31	13,35	0,5053
Larva	97	67 \pm 16,84	31,28	<0,0001
Adultos (M.F)	91	56 \pm 15,25	38,18	0,0005

Estatística: diferença estatística através de teste T

* Mortalidade corrigida \pm erro padrão da média (EPM)

Tabela III- 6. Influência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IPS 1.3. Número médio de ovo postura, larvas e adultos

Estágio	Número indivíduos \pm EPM*		Redução (%)	P < 0,05
	Testemunha	Papel impregnado		
Ovo	217	176 \pm 15,45	18,61	0,0495
Larva	186	132 \pm 11,87	28,87	0,0005
Adultos (M.F)	169	87 \pm 5,57	50,03	0,0003

Estatística: diferença estatística através de teste T

* Mortalidade corrigida \pm erro padrão da média (EPM)

Tabela III- 7. Influência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IBCB 66. Número médio de ovo postura, larvas e adultos

Estágio	Número indivíduos ± EPM*		Redução (%)	P < 0,05
	Testemunha	Papel impregnado		
Ovo	298	226 ± 22,74	24,04	0,0128
Larva	244	151 ± 14,26	38,04	0,0021
Adultos (M.F)	233	128 ± 12,85	45,66	0,0053

Estatística: diferença estatística através de teste T

* Mortalidade corrigida ± erro padrão da média (EPM)

Tabela III- 8. Influência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* em colônias de laboratório pós-tratamento a isolados IBCB425. Número médio de ovo postura, larvas e adultos

Estágio	Número indivíduos ± EPM*		Redução (%)	P < 0,05
	Testemunha	Papel impregnado		
Ovo	179	116 ± 13,06	35,17	0,0333
Larva	141	81 ± 7,06	42,84	0,0022
Adultos (M.F)	165	79 ± 8,68	52,53	0,0004

Estatística: diferença estatística através de teste T

* Mortalidade corrigida ± erro padrão da média (EPM)

Quando comparamos os resultados entre os isolados fúngicos, verificamos uma redução com o número de imaturos e adultos. Escalonando a eficiência de cada fungo, podemos definir que $IPS\ 2.1 \leq IPS\ 1.3 \leq IBCB\ 66 \leq IBCB\ 425$.

Os resultados obtidos neste trabalho para atividade larvicida assemelham aos apresentados por Daoust e Roberts (1982) e Alves (2002), que verificaram atividade larvicida em apenas 30% dos isolados testados que causaram mortalidade próxima a 90%. No presente estudo o isolado IPS 2.1 é capaz de reduzir o número de larvas em até 86% após dez dias a exposição ao fungo. Da mesma forma, foi demonstrado que o isolado IBCB 425 é capaz de reduzir as larvas do vetor da dengue em até 74,6%.

Alguns fungos não demonstraram mortalidade em larvas superior a mortalidade em adultos. O isolado IBCB 66 foi mais eficiente contra adultos do que em larvas. Existe diferenças na susceptibilidade ao fungo em diferentes fases de desenvolvimento de insetos. As fases imaturas são mais susceptíveis do que a fase de pupa e adulta, entretanto, também existe diferenças entre os instares larvais/ninfais, sendo considerado normal que os primeiros instares são mais susceptíveis (ALVES, 1998). Porém, a fase ninfal do percevejo do gênero *Blissus* (Hemiptera: Lygeidae) foi mais resistente à infecção de *B. bassiana* do que os adultos da mesma espécie (SAMUELS; CORACINI, 2004).

Ao fim dos bioensaios, as larvas que não foram encontradas mortas pela inoculação do fungo mostram-se lentas ou imóveis, e não passaram para seu próximo estágio no ciclo de vida após o período de avaliação do experimento, ao contrário, as larvas chegariam a fase de pupa ou adultos após dez dias de vida (LOZOVEI, 2011). Um outro aspecto de efeitos no desenvolvimento das larvas poderia ser no tempo que leva para o estágio de pupa. Mudanças no tempo de desenvolvimento podem ser causadas pela depleção de nutrientes que acontece enquanto o fungo coloniza o hospedeiro ou por causa da liberação de toxinas na hemolinfa (SAMUELS; CHARNLEY; REYNOLDS, 1988).

Scholte et al. (2007), avaliaram *M. anisopliae* em *A. aegypti* e *A. albopictus* onde encontraram resultados semelhantes ao aplicar uma dose de $1,6 \times 10^{10}$ conídios/m² em um cobertor preto que funciona como local de repouso para adultos em gaiolas. Esses resultados indicaram que ambas as espécies de mosquitos são altamente suscetíveis à infecção por esses fungos. Em um segundo estudo, também muito recente, sobre fungos contra vetores da dengue, De Paula et al. (2008), mostraram que *M. anisopliae* possui um TL50 de três dias e *B. bassiana* de cinco dias, respectivamente. Este estudo é de grande relevância, pois mostrou que *M. anisopliae* é capaz de reduzir a sobrevivência de *A. aegypti* em alta porcentagem em sete dias após exposição ao fungo experimentalmente em laboratório (MUNGUÍA, 2011).

A diminuição em número de ovos, fecundidade e emergência de adultos foi descrita nos experimentos de Leles (2009). Nos trabalhos de Munguía (2011), fêmeas de *A. aegypti* quando confinadas com o macho contaminado com isolados de *M. anisopliae* tiveram um impacto severo na fertilidade, reduzida em 99% em comparação às fêmeas controle.

Gomes (2009), avaliando as porcentagens de mortalidade das larvas, formação de pupas, mortalidade de pupas, emergência dos adultos e mortalidade dos adultos, descreveu em seu trabalho que os experimentos com imaturos de *A. aegypti* resultou em 60% de larvas mortas e 40% de pupas formadas. Das pupas formadas 20% morreram e 80% formaram mosquitos adultos. Não ocorreu mortalidade dos mosquitos adultos durante oito dias de observação.

Os resultados deste trabalho mostraram que fêmeas de *A. aegypti* tratadas com conídios podem contaminar ovos durante a oviposição e assim transmitir a micose aos ovos, reduzindo o número de novas larvas e adultos.

A transmissão de *M. anisopliae* entre adultos já foi descrito anteriormente para *An. gambiae* quando fêmeas tratadas com o fungo infectaram machos sadios durante o acasalamento (SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2004). Acredita-se que o contágio de ovos no presente estudo tenha se dado pelo contato durante a postura das fêmeas contaminadas.

Este estudo descreveu atividade adulticida em *A. aegypti* de isolados fúngicos com ação já conhecida contra ovos e larvas deste mosquito (ALBERNAZ; TAI; LUZ, 2009; SANTOS et al., 2009; SILVA; SILVA; LUZ, 2004) e contra adultos de anofelínos (MNYONE et al., 2009). Um fungo, capaz de atacar todos os diferentes estágios de desenvolvimento do mosquito vetor da Dengue se apresenta como forte candidato a integrar um programa sustentável de controle desse importante vetor.

4 CONCLUSÃO

Levando-se em conta o que foi observado, os isolados fúngicos coletados nos dois períodos chuvoso e seco, conclui-se que:

- A seleção de isolados virulentos ao mosquito *A. aegypti* visa o desenvolvimento de um programa de controle biológico com um fungo de fácil produção e com alta persistência no ambiente.
- Importante selecionar isolados de fungos que possa ser virulentos para o estágio de larvas e adultos do mosquito, contudo com métodos de controle diferentes para ambos os estágios.
- Os Isolados IPC 1.2, IPS 2.4, IPC 3.1, IPC 4.5, IPS 1.3, IPS 2.1, IPS 2.3, IPS 3.1, FPS 2.10, FPS 4.8, IBCB 66, IBCB 425 foram virulentos contra larvas de *A. aegypti* Rockefeller.
- Os fungos não somente causam mortalidade diretamente das larvas, mas também são capazes de interferir no ciclo de vida do *A. aegypti*, causando a redução em número de ovos, larvas e adultos.

Os resultados relatados no presente estudo evidenciaram o potencial maior do IPC 1.2, e IBCB 425 para o controle de larvas de *A. aegypti*, IBCB 425 e IBCB 66 para fase adulta. Desta forma, a partir destes resultados, identificamos isolados fúngicos entomopatogênicos mostraram ser viáveis como ferramenta para programas de manejo integrado de vetores, sendo uma alternativa para o desenvolvimento de produtos com ação inseticida para o *A. aegypti*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A Method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265–267, 1925.
- ALBERNAZ, D. A. S.; TAI, M. H. H.; LUZ, C. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 141–147, 2009.
- ALKHAIBARI, A. M. et al. *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: Attack on several fronts accelerates mortality. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005715, 2016.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba - SP: Fealq, 1998. p. 289–370.
- ALVES, S. B. et al. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). **J. Appl. Ent.**, v. 126, p. 504–509, 2002.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 4ª ed. Piracicaba - SP: Fealq, 1998. p. 765–777.
- BARCI, L. A. G. et al. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. e1, p. 7–13, 2009.
- BENSERRADJ, O.; MIHOUBI, I. Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria. v. 3, n. 1, p. 54–62, 2014.
- BISPO, D.; SANTOS, R. DOS. Estabelecimento de Colônia de *Aedes aegypti* por meio de amostra proveniente do bairro Porto Dantas-Aracaju-Sergipe. **Revista da Fapese**, v. 4, p. 97–112, 2008.
- BRASIL. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. **Boletim Epidemiológico - SVS - Ministério da Saúde**, v. 48, n. 28, p. 1–22, 2017a.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v. 48, n. Tabela 2, p. 1–9, 2017b.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. **Boletim Epidemiológico - SVS - Ministério da Saúde**, v. 49, n. 2, p. 1–13, 2018.
- CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Revista de Saude Publica**, v. 37, n. 4, p. 523–527, 2003.
- CANTUÁRIA, M. F. **Ecologia de culicídeos (Diptera: Culicidae) da área de proteção ambiental do rio Curiaú, Macapá, Amapá**. Macapá: Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical, 2012.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998.

CUNHA E SILVA, S. L. et al. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79, 2014.

DABIRÉ, K. et al. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 188, 2008.

DAOUST, R. A.; ROBERTS, D. W. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107–117, jul. 1982.

DAOUST, R. A.; WARD, M. G.; ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, n. 2, p. 228–236, 1982.

DARBRO, J. M. et al. Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 656–664, 1 abr. 2012.

DE PAULA, A. R. et al. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 10, p. 1017–1025, 2008.

DE SENNA-NUNES, M. et al. Avaliação in vitro dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Parasitología latinoamericana**, v. 57, n. 1–2, p. 9–14, 2002.

DINIZ, M. M. C. DE S. L. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 775–782, 2014.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 10–15, 2017.

DU, Y. et al. Sodium Channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 7, n. 4, p. 60, 31 out. 2016.

FERNANDES, E. G. et al. Isolamento e seleção de fungos para controle de larvas de terceiro instar de *Musca domestica*. **Arq. Inst. Biol**, v. 77, n. 2, p. 317–322, 2010.

FIOCRUZ. **Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório**. Rio de Janeiro: [s.n.].

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica - Identificação, biologia e epidemiologia**. [s.l.: s.n.]. v. 2.

GOMES, C. R. P. **Estratégias de controle biológico de larvas de mosquito *Aedes aegypti***

com fungos entomopatogênicos. [s.l.] Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2009.

LECUONA, R. E. et al. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 172–179, 2001.

LELES, R. N. **Efeito de fungos entomopatogênicos na mortalidade de adultos, oviposição e eclosão de larvas de *Aedes aegypti*.** [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2009.

LELES, R. N. et al. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1271–1274, 3, 2010.

LIU, N. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 537–559, 7, 2015.

LOPES, J. et al. *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. e a culicidaeofauna associada em área urbana da região sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 326–333, 1993.

LOZOVEI, A. L. Culicídeos. In: ATHENEU (Ed.). **Entomologia Médica e Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: [s.n.]. p. 432.

LUZ, A. C. et al. Ovicidal Activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 799–804, 2007.

LUZ, C.; BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. p. 51–62, 2005.

MACORIS, M. DE L. DA G. et al. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 573–578, 2014.

MARCOMBE, S. et al. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. **PLoS one**, v. 7, n. 2, p. e30989, 21, 2012.

MARIO VARGAS, V. Sexual dimorphism of larvae and pupae of *Aedes aegypti* (LINN.). **Mosquito News**, v. 28, n. 3, p. 374–379, 1968.

MIRANPURI, G. S.; KHACHATOURIANS, G. G. Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 155–162, 1990.

MNYONE, L. L. et al. First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 59, 2009.

MUNGUÍA, A. M. G. **Hongos entomopatogênicos (mycota: deuteromycetes) aislados en el noroeste de México: impacto sobre la longevidad, fecundidad, fertilidad y tasas de cópula e inseminación en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** [s.l.] Universidad Autónoma de

Nuevo México., 2011.

OLIVEIRA, V. C. DE; ALMEIDA NETO, L. C. DE. Ocorrência de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em bromélias cultivadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 1–7, 2017.

PAULA, A. R. et al. Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 91, 2011.

PRADO, G. P. et al. Influence of shading and pedestrian traffic on the preference of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) for oviposition microenvironments. **Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology**, v. 42, n. 1, p. 155–160, 2017.

RIBA, G. et al. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 4, p. 469–473, 1986.

ROCHA, H. D. R. et al. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. **Acta Tropica**, v. 152, p. 66–73, 2015.

SAMUELS, R. I.; CHARNLEY, A. K.; REYNOLDS, S. E. The role of destruxins in the pathogenicity of strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Mycopathologia**, v. 104, n. 1, p. 51–58, 1988.

SAMUELS, R. I.; CORACINI, D. L. A. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for the control of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae). **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 271–275, 2004.

SANTOS, A. H. et al. Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v. 50, n. 1, p. 37–42, 2009.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 6, p. 4–9, 2004.

SCHOLTE, E.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. v. 102, p. 151–158, 2007.

SILVA, R. O.; SILVA, H. H. G.; LUZ, C. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil of the central brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. **Revista de patologia tropical**, v. 33, n. 2, p. 207–216, 2004.

SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 1–12, 2016.

SOARES-PINHEIRO, V. C. et al. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 396–401, 2017.

SOFTWARE, L. POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - (WHO). Global vector control response 2017–2030.
[s.l.] World Health Organization, 2017.

ANEXO III-1



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

Número do Protocolo: 014/2014	Data de Entrada: 06/07/2014
Pesquisador Responsável: GRAFE OLIVEIRA PONTES	
Título do Projeto: Bioprospecção de fungos de solos da Amazônia e avaliação do potencial biotecnológico contra larvas e adultos de <i>Anopheles Darling Root</i> e <i>Aedes aegypti</i> L – Malária e Dengue, em Manaus/AM, Brasil.	
Instituição Responsável: INPA	

RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 17.11.2014.

Atenciosamente,


Maridete de Farias Nairi
Vice-Presidente CEUA/INPA
PO Nº 008/2013