UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

ESTUDOS DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS ENVOLVENDO FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): IMUNOLOGIA, INTERAÇÃO PATÓGENOS-HOSPEDEIRO, FISIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO

Elio Gomes Fernandes
Biólogo - UNIMONTES

Fevereiro, 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Catalogação na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

F363e Fernandes, Elio Gomes

Estudos dos parâmetros biológicos envolvendo fungos entomopatogênicos e Musca domestica (Diptera: Muscidae) : imunologia, interação patógenos-hospedeiro, fisiologia e controle biológico / Elio Gomes Fernandes. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação : Prof. Sueli Teresinha van der Sand
Co-orientação : Henrique Maia Valério

1. Musca domestica 2. Fungos 3. Metarhizium anisopliae 4. Controle biológico I. Sand, Sueli Teresinha van der, orient. II. Valério, Henrique Maia, co-orient. III. Título.

CDU 579.62 (043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

ESTUDOS DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS ENVOLVENDO FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): IMUNOLOGIA, INTERAÇÃO PATÓGENOS-HOSPEDEIRO, FISIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO

Elio Gomes Fernandes
Biólogo - UNIMONTES

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand
Co-orientador: Henrique Maia Valério

Porto Alegre, RS, Brasil
Fevereiro, 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Sueli Teresinha Van der Sand pela orientação e confiança para a execução desse trabalho.

Ao professor Carlos Eugênio pela ajuda e ensinamentos.

Aos professores da liga da justiça, Henrique e Magoo, pela amizade e ajuda nas pesquisas.

A Somai Nordeste pelo apoio e por permitir que realizássemos os testes *in sito* no aviário.

A todos os estagiários que me ajudaram no laboratório de micologia ambiental da UFRGS, em especial a Thaisa por salvar minhas férias de julho.

As estagiárias Enila e Louise da Universidade Estadual de Montes Claros, pela ajuda nos testes em campo e triagem dos insetos.

A ITAFORTE Bioprodutos pelas amostras biológicas e em especial ao pesquisador desta empresa, Gabriel Moura Mascarin, pela ajuda nos testes de patogenicidade e de campo.

Aos colegas do laboratório 209, em especial à Mica, pela amizade, brigas e acima de tudo, pela paciência com minhas bagunças.

A Sarah Freitas, pelo companheirismo e paciência nessa reta final do mestrado.

Gustavo Pires Costa pela ajuda nas análises estatísticas aplicadas neste estudo.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais e meus padrinhos Ênio e Guida pelo apoio nos momentos difícieis, onde ofereço e dedico este trabalho.

ESTUDOS DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS ENVOLVENDO FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): IMUNOLOGIA, INTERAÇÃO PATÓGENOS-HOSPEDEIRO, FISIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO[1]

Autor: Elio Gomes Fernandes

Orientador: Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand
Co-orientador: Dr. Henrique Maia Valério

RESUMO

A *Musca domestica* é a principal praga em aviários comerciais e o uso de inseticidas químicos vêm gerando resistência nessas moscas. Portanto, cada vez mais, estudos envolvendo a interação patógeno-hospedeiro visando o controle microbiano dessa mosca são importantes. Foram feitos isolamentos de fungos no aviário, estudos de esporulação e enzimas extracelulares, os processos de infecção, análise da resposta inflamatória e identificação dos hemócitos das larvas de *Musca domestica,* além de bioensaios e controle no aviário com *Metarhizium anisopliae*. Nenhum fungo entomopatogênico foi isolado no aviário. Os fungos *Paecilomyces* sp e *Metarhizium anisopliae* esporularam melhor no meio ágar batata maltose enquanto que *Beauveria bassiana,* o melhor resultado foi obtido com agar batata com 0,1% de glicose. Nos ensaios enzimáticos, protease foi a enzima mais produzida por *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces* sp, e caseinases por *Beauveria bassiana*. A microscopia eletrônica de varredura mostrou as etapas de infecção do *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Musca domestica* ao passo que a resposta imunológica durante as etapas de infecção demonstraram um pico de hemócitos em 48 horas após o início da infecção nessas larvas, os hemócitos identificados foram plasmatócitos, granulócitos, oenocitóides, prohemócitos além de fragmentos celulares como trombocitóides. Nos bioensaios o fungo mais virulento para larvas de 3º instar de *Musca domestica* foi o *Metarhizium anisopliae* CG 46 que após confirmação da patogenicidade foi produzido em arroz cozido e aplicado no aviário, seguido da aplicação do produto comercial Metarril WP. O Metarril não obteve um controle positivo das moscas, enquanto o fungo *Metarhizium anisopliae* CG 312 mostrou um discreto controle.

---

[1] Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (134 p.) Fevereiro, 2010.

STUDIES OF THE BIOLOGICAL PARAMETERS INVOLVING ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): IMMUNOLOGY, HOST-PATHOGEN INTERACTION, PHYSIOLOGY AND BIOLOGICAL CONTROL[2]

Author: Elio Gomes Fernandes

Advisor: Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand
Coadiviser: Dr. Henrique Maia Valério

ABSTRACT

Musca domestica is the major pest in commercial poultry and the constant use of chemical pesticides has induced the development of resistance in these flies. Therefore, studies involving host-pathogen interaction aimed at microbial control of these flies are important. Isolations were made of fungi in the aviary studies of sporulation and extracellular enzymes, the process of infection, analysis of the inflammatory response and identification of hemocytes from larvae of *Musca domestica* as well as bioassays and control in the aviary with *Metarhizium anisopliae*. No entomopathogenic fungus was isolated in cages. The medium potato maltose agar resulted in higher sporulation for *Paecilomyces* sp *Metarhizium anisopliae* and while in *Beauveria bassiana* the best result for esporulation was obtained with potato agar with 0.1% glucose. In the enzyme activity assays the strains *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces* sp, showed the best activity for protease and *Beauveria bassiana* for caseinase. The scanning electron microscopy showed the stages of infection by *Metarhizium anisopliae* on larvae of *Musca domestica* while the immune response during the early stages of infection showed a peak in hemocytes 48 hours after the onset of infection in these larvae. The fungus most virulent for larvae of 3rd instar *Musca domestica* in bioassays was *Metarhizium anisopliae* CG 46. After confirmation of the pathogenicity the fungus was multiplied in cooked rice and applied in the aviary, followed by application of the commercial product Metarril WP. The Metarril did not produced a positive control of the flies, while the fungus Metarhizium anisopliae CG 312 showed a slight control.

[2] Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (134 p.) February, 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS..... ix
LISTA DE FIGURAS..... x
LISTA DE ABREVIATURAS..... xii
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 3
2.1. *Musca domestica*..... 3
2.2. Local de criação de aves poedeiras..... 4
2.3. Fungos entomopatogênicos..... 6
2.3.1. Gênero *Metarhizium* 7
2.3.2. Gênero *Beauveria* 8
2.3.3. Gênero *Paecilomyces*..... 9
2.4. O controle Microbiano de Insetos com fungos entomopatogênicos..... 10
2.5. Controle Biológico na América Latina..... 14
2.6. Produção massal de fungos entomopatogênicos no Brasil..... 16
2.7. Interação patógeno-hospedeiro..... 18
2.8. Sistema imunológico dos insetos..... 21
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 27
3.1. *M. domestica*..... 27
3.1.1. Coleta de larvas e adultos de *M. domestica* para criação em laboratório..... 27
3.1.2. Criação de *M. domestica*..... 28
3.2. Fungos usados nos experimentos de controle biológico..... 29
3.2.1. Coletas de solo para Isolamento de fungos presentes no aviário..... 29
3.2.2. Isolamento dos fungos 30
3.2.3. Identificação dos fungos isolados no solo do aviário..... 30
3.2.4. Fungos entomopatogênicos para testes de bioensaios..... 31
3.3. Protocolo para indução da virulência..... 31
3.3.1 Preparação das cutículas de larvas e adultos de *M. domestica*..... 32
3.3.2. Condições de cultivo dos fungos para indução da virulência..... 32
3.4. Bioensaios com fungos entomopatogênicos em larvas de 3º instar de *M. domestica*..... 33
3.5. Controle biológico no aviário de postura..... 35
3.5.1. Local dos ensaios de controle biológico..... 35
3.5.2. Monitoramento da população de *M. domestica* nos galpões selecionados..... 35
3.5.3. Determinação do teor de umidade e temperatura da cama do aviário... 35
3.5.4. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da cama do aviário.... 37
3.5.5. Produção de conídios de *M. anisopliae* para aplicação no aviário..... 37
3.5.6. Aplicação dos esporos no aviário..... 48
3.6. Microscopia eletrônica de varredura das etapas de infecção..... 39
3.7. Estudos do sistema imunológico das larvas de *M. domestica*..... 40
3.7.1. Manuseio das larvas de *Musca domestica* para retirada da hemolinfa. 40
3.7.2. Descrição morfológica das células do sistema imunológico das larvas de *M. domestica*..... 41

3.7.3. Contagem total de hemócitos durante a infecção por *M. anisopliae*..... 42
3.8. Teste da taxa esporulação sob diferentes condições nutricionais de carbono e nitrogênio..... 42
3.8. Produção de enzimas extracelulares..... 43
3.8.1. Amilases..... 44
3.8.2. Celulases..... 44
3.8.3. Proteases 45
3.8.3.1. Proteases com baixa concentração de substrato..... 45
3.8.3.2. Proteases com cutícula de adultos e larvas..... 45
3.8.4. Pectinases..... 46
3.8.5. Esterase..... 46
3.8.6. Lípases..... 46
3.8.7. Caseinases..... 47
3.8.8. Quantificação da atividade enzimática..... 47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 48
4.1. Coleta de larvas e adultos de *M. domestica* para criação em laboratório..... 48
4.2. Isolamento e identificação dos fungos coletados no solo do aviário..... 49
4.3. Bioensaios com fungos entomopatogênicos em larvas de 3º instar de *M. domestica*..... 51
4.4. Controle biológico no aviário de postura..... 62
4.4.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da cama do aviário... 62
4.4.2. Determinação do teor de umidade e temperatura da cama do aviário.. 63
4.4.3. Aplicação do fungo no aviário..... 65
4. 5. Microscopia eletrônica de varredura das etapas de infecção..... 70
4.6. Descrição morfológica das células do sistema imunológico das larvas de *M. domestica*..... 72
4.7. Contagem total de hemócitos durante a infecção por *M. anisopliae*..... 78
4.8. Teste da taxa esporulação sob diferentes condições nutricionais de carbono e nitrogênio..... 81
4.9.Atividade de enzimas extracelulares..... 86
5. Conclusões..... 95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 97
7. ANEXOS..... 118
8. VITTA..... 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de fungos utilizados nos experimentos seus hospedeiros e locais de origem..... 31

Tabela 2. Espécies fúngicas isoladas em determinado tipo de solo e meio de cultura..... 49

Tabela 3. Percentual da mortalidade de larvas de 3º instar de *M. domestica.* 52

Tabela 4. Porcentagem da eficácia dos isolados em diferentes concentrações sobre a mortalidade de larvas pós-alimentar de *M. domestica*..... 53

Tabela 5. Concentração letal (CL_{50} e CL_{90}) obtidos pela análise de Probit para as concentrações de conídios dos isolados submetidos aos bioensaios para larvas de 3º instar de *M. domestica*..... 54

Tabela 6. Médias das populações de *M. domestica* capturadas nos galpões usados nos testes de controle biológico durante dez semanas consecutivas..... 65

Tabela 7. Médias de hemócitos encontrados na hemolinfa de *M. domestica* infectadas com esporos de *M. anisopliae* CG 46..... 79

Tabela 8. Taxa de esporulação dos isolados em diferentes meios de culturas..... 82

Tabela 9. Resultados obtidos quando submetidos os valores da relação halo/colônia no teste de Tukey ao nível de significânicia de 0,05%..... 90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das respostas imunológicas dos insetos. A ligação de moléculas receptoras na superfície de um microrganismo pode induzir reações diferentes como aglutinação, fagocitose, nodulação e encapsulamento pelos hemócitos. O processo de ativação da cascata de pro-fenoloxidase é necessária para que ocorra a melanização e morte do microrganismos isolados nos nódulos ou cápsulas. A síntese de peptídios antimicrobianos constitui a última fase no combate a um microrganismo invasor (Silva, 2002)..... ... 23

Figura 2: Gaiola entomológica de madeira para criação de *M. domestica*..... 29

Figura 3: Pote contendo vermiculita para empupamento das larvas L3..... 29
.
Figura 4: Armadilhas para monitoramento de *M. domestica* no aviário..... 36

Figura 5: Termohigrômetro utilizado para determinar o teor de umidade e a temperatura da cama do aviário..... 36

Figura 6: Tiras de papel com indicadores de pH..... 37

Figura 7. Imobilização das larvas..... 41

Figura 8. Mortalidade percentual de larvas de terceiro instar de *M. domestica* desafiadas por diferentes concentrações de esporos de fungos entomopatogênicos..... 51

Figura 9. Gráfico referente as médias populacionais obtidas através das coletas de *M. domestica* em armadilhas.O inicio da aplicação do Metarril ocorreu na segunda semana até a quarta.O fungo *M. anisopliae* CG 46 foi aplicado da sexta semana até a oitava..... 66

Figura 10. Comparação entre precipitação pluviométrica e densidade populacional de *M. domestica* nos galpões testados. Dados de precipitação informados pela estação meteorológica da Universidade Estadual de Montes Claros
(UNIMONTES)..... 68

Figura 11. Etapas da infecção de *M. anisopliae* CG 46 em larvas de 3º instar de *M. domestica*. A: Detalhes do início da germinação (seta); B: germinação do conídio seguido da formação do apressório; C e D: Tubo germinativo com formação do apressório; E: conídio emitindo um longo tubo germinativo com um apressório em sua extremidade;,F: extrusão do fungo da cutícula da larva - setas (1510x). CO: conídio. GT: tubo germinativo. AP: apressório..... 72

Figura 12. Hemócitos, fragmentos citoplasmáticos e microagregados de larvas de 3º instar de *M. domesti*ca. (PL: plasmócitos; Gr: granulócitos; PR:

prohemócitos; Oe: oenocitóides; Ma: microagragados;Tb: trombocitóides e Ps: pseudópodes). Barra = 10 µm..... 75

Figura 13. Hemócitos de larvas de 3º instar de *M. domestica*. **A.** As setas mostram projeções citoplasmáticas entre um microagregado e um plasmatócito. **B e D.** Oenocitóide liberando vesículas citoplasmáticas (setas). **C.** Dois microagregados em diferentes estágios de formação, seta branca mostra o microagregados no início da agregação e a seta preta mostra um microagregado já formado. Barra = 10 µm..... 78

Figura 14. Numero total de hemócitos em 1µL de hemolinfa de larvas de *M. domestica* de 3º instar infectados com o fungo *Metarhizium anisopliae* CG 46, durante o período de 0, 24, 36, 72 e 96 horas..... 79

Figura 15. Taxa de esporulação obtidas com os isolados *B. bassiana* CG 470, *Paecilomyces* sp CG 301 e *M. anisopliae* CG 312 em resposta ao crescimento em diferentes condições nutricionais de carbono nitrogênio..... 81

Figura 16. Halos produzidos pela hidrólise dos substratos disponibilizados nos meios de culturas pelas respectivas enzimas. A: amilase; B: caseínase; C: esterase; D: celulase; E: protease e F: lípase..... 86

Figura17. Atividade de enzimas extracelulares para o fungo *Paecilomyces* sp CG 301..... 87

Figura 18. Atividade de enzimas extracelulares para o fungo *M. anisopliae* CG 312..... 87

Figura 19. Atividade de enzimas extracelulares para o fungo *B. bassiana* CG 470..... 88

Figura 20. Comparação entre os resultados de todas as três espécies fúngicas sobre a atividade enzimática extracelular nos meios de culturas contendo apenas os substratos avaliados, sem adição de glicose..... 88

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrometro
µL	Microlitro
g	Grama
ha	Hectare
kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ºC	Grau Celsius
ph	Potencial hidrogeniônico
U.V.	Radiação ultra-violeta
U.R.	Umidade relativa

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos fungos pertencentes à cerca de 100 gêneros e mais de 700 espécies. Normalmente, eles apresentam uma grande variabilidade genética, a qual resulta em variados graus de especificidade ao hospedeiro. Dentre os gêneros mais importantes de fungos entomopatogênicos encontram-se: *Metarhizium, Beauveria, Paecilomyces* e *Entomophtora*.

Os fungos entomopatogênicos mais estudados no Brasil e em outros países são o *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em função de seu amplo espectro de atuação e facilidade de cultivo em laboratório. Entre os agroecossistemas que são beneficiados com o uso destes microrganismos pode-se citar: cana-de-açúcar, banana, algodão, milho, soja, pastagens e outros de similar importância. A sua implementação nos locais de confinamentos de aves pode ser promissor devido aos problemas gerados pela alta população de moscas.

A *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) é de grande importância sanitária, pois atua como vetor mecânico/biológico de diversos agentes patogênicos. É considerado um dos principais problemas em aviários de postura. O controle de populações tem sido predominantemente através de inseticidas, no entanto, os resultados são cada vez menos efetivo devido à resistência desenvolvida por algumas populações de *Musca domestica* a estes produtos.

Nos aviários de postura, a cama favorece o desenvolvimento da *Musca domestica* que se prolifera em um patamar que extrapola os limites populacionais estáveis.

Os fungos entomopatogênicos apresentam como fatores de virulência, a produção de enzimas extracelulares como as proteases, lipases, esterases e quitinases. Essas enzimas são consideradas as principais enzimas envolvidas na instalação da infecção.

Uma barreira para a instalação da infecção via tegumento pelo fungo é a reação inflamatória gerada pelo sistema imunológico dos insetos. Com suas respostas mediadas por células de defesas e peptídios antimicrobianos, nem sempre os agentes infecciosos obtém sucesso na tentativa de infectar seus alvos.

Considerando os fatos aqui levantados, os objetivos deste trabalho foram: identificar a presença ou não de fungos entomopatogênicos no aviário, selecionar através de bioensaios o fungo mais virulento para larvas de *Musca domestica*; Avaliação *in situ* do fungo selecionado e de um bioinseticida comercial para controlar a população de *Musca domestica* em aviário de postura; Avaliar a capacidade fisiológica dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces* sp em produzir diversas enzimas; avaliar a capacidade de esporulação em meios de cultivo com diferentes fontes de carbono e nitrogênio; avaliar as etapas de infecção e reposta imunológica da infecção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Musca domestica*

A *Musca domestica* possui distribuição geográfica mundial, com alto índice de sinantropia e endofilia (Neves, 2005), podendo voar por vários quilômetros, visitando casas, alimentos, excretas e invadindo também aviários e outros locais de criações de animais (Romám *et al*., 2004). A *M. domestica* é um inseto holometábolo, os ovos são brancos, alongados, medindo cerca de menos de 1 mm. São colocados em massas de 75 a 170 ovos de cada vez, num total de 500 a 800, depositados em qualquer matéria orgânica fermentável, como lixo, fezes etc. Em 24 horas, os ovos eclodem à temperatura de 25ºC com um período de embrionamento que dura 8-12 horas liberando então as larvas. Essas passam por três estágios, que em geral, duram cinco a oito dias. As larvas são claras e alimentam-se ativamente de substâncias solubilizadas e bactérias (Keiding, 1980).

Após o 3º estágio larval elas estão prontas para puparem, por isso deslocam-se para ambientes mais secos tais como a parte mais alta dos estercos, permanecendo imóveis e iniciando o processo de pupação. As fases de pupa duram cerca de quatro a seis dias no verão, e no inverno podem prolongar o pupário por várias semanas, emergindo posteriormente, os insetos adultos (Keiding, 1980).

São vários os mecanismos pelos quais a *M. domestica* veicula os patógenos, dentre eles destacam-se: a regurgitação - alimentando-se de fezes, feridas ou animais mortos, depositando posteriormente a saliva contaminada

sobre alimentos, tanto de humanos como de aves ou outros animais; pela veiculação mecânica de patógenos aderidos às patas e cerdas do corpo; através de dejetos de suas fezes e ainda podendo ser hospedeiro intermediário de alguns helmintos de importância veterinária (Greenberg, 1971). Entre os patógenos veiculados pela *M. domestica* se destacam bactérias como *Enterobacter* spp, *Escherichia coli* (Romám *et al*., 2004), *Salmonella* spp, *Shigella* spp (Ugbogu *et al*., 2006), *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* (Banjo *et al.*, 2005), protozoários como *Entamoeba histolytica* e *Giardia intestinalis* (Freitas *et al*., 1981), vírus causadores de polioviroses e hepatites (Service, 1980), entre outros patógenos.

2.2 Local de criação de aves poedeiras

O crescimento contínuo do confinamento de aves para a produção industrial de ovos é uma realidade no Brasil. Só no estado de São Paulo, segundo dados do IBGE de 1993, a produção de ovos passou de 634.935 dúzias em 1989 para 136.845.335 dúzias em 1991, no terceiro trimestre de 2005 a produção nacional já chegava a 1.495.928.000 dúzias de ovos (IBGE, 2005). Dados mais recentes mostram que a produção de ovos de galinha foi de 580,832 milhões de dúzias no 2º trimestre de 2009, refletindo em variação positiva de 2,2% em comparação ao 2º trimestre de 2008 e mantendo certa estabilidade com relação ao trimestre imediatamente anterior em 2009 (IBGE, 2009). A avicultura brasileira de postura – nome dado à atividade de produção de ovos no Brasil - ocupa o sétimo lugar relativo ao número de ovos

produzido mundialmente. A rentabilidade da atividade no ano de 2006/2007 foi um reflexo direto da produção, das cotações de milho e soja e do alojamento de pintos comerciais ao longo deste biênio (Loureiro, 2007).

O setor de granjas de postura, movimenta anualmente no Brasil US$ 2 bilhões com produção de cerca de 22,212 bilhões de unidades de ovos por ano (Loureiro, 2007). No entanto, o método de confinamento utilizado pelos criadores traz sérias conseqüências tanto para a qualidade do produto, quanto para a saúde pública (Gianizella & Prado, 1998).

Atualmente estima-se que aproximadamente 250 mil espécies de insetos possam ser considerados pragas urbanas ou agrícolas. O método mais usado para o controle desses insetos se baseia na utilização de inseticidas químicos, o que vem, cada vez mais, selecionando linhagens de insetos mais resistentes aos inseticidas disponíveis (Alves & Leucona, 1998).

Pinto & Prado (2001), observaram um nível alto de resistência ao inseticida ciromazina em populações de *M. domestica* oriundas da região de Montes Claros. Essa resistência ao inseticida acabou agravando ainda mais os problemas gerados por essas moscas nesta região.

Entre esses insetos-praga, destaca-se a *M. domestica* que ocorrendo em criações de animais, por exemplo em aviários, e com populações elevadas de aves, interferem no ganho de peso e causam quadros de estresse nesses animais podendo afetar a postura de ovos em aves, gerando perdas econômicas significativas (West, 1951).

North & Bell (1990), afirmaram que uma galinha de 1,8 kg em produção, produz por dia 113g de fezes úmidas. Esse esterco serve como

substrato para o desenvolvimento de inúmeras espécies de artrópodos principalmente os dípteros. Entre esses os dípteros muscóides sinantrópicos desempenham um importante papel na baixa sanitização das criações. Cálculos realizados por Ho (1985) mostraram que cada ave pode produzir quantidade de fezes suficiente para sustentar pelo menos 100 larvas de *M. domestica* por dia.

A população de dípteros presentes nos aviários, quando ultrapassam o nível de dano econômico, gera problemas devido ao hábito de defecar e regurgitar sobre as superfícies deixando manchas nos equipamentos da granja o que, nas instalações luminosas, causam uma redução no nível de iluminação. Outro problema é referente à questão da veiculação de contaminantes onde as moscas podem veicular patógenos em ovos recém-colocados (Axtell, 1985; Axtell & Arends, 1990) e por vários locais das instalações (Nmorsi *et al.*, 2007).

2.3 Fungos entomopatogênicos

Aproximadamente 80% das doenças em insetos têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes à cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies (Alves, 1998b). Muitos fungos entomopatogênicos sincronizam seu ciclo de vida com o dos hospedeiros (Shah & Pell, 2003). Esses agentes foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano de insetos e a maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já relatados ocorrem no Brasil. Destes, mais de 20 incidem sobre pragas de importância

econômica. As ações desses fungos, em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente, no Brasil e em outros países, tem sido um fator importante na redução das populações de pragas (Alves, 1998b), e por esses motivos são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de pragas agrícolas de várias espécies em diversas ordens (Alves *et al.,* 2008a).

2.3.1 Gênero *Metarhizium*

O fungo do gênero *Metarhizium* é composto por três espécies e divididas em dez variedades: *M. anisopliae* variedade *anisopliae*, *majus*, *lepidiotum* e *acridum*; *M. flavoviride* variedades tipo E, *flavoviride*, *minus*, *novazealandicum* e *pemphigum*; e *M. album* (Driver *et al.*, 2000). Recentemente, uma nova variedade de *M. anisopliae* foi descrita na China: *dcjhyium* (Dong *et al.*, 2009).

O fungo *Metarhizium* é um deuteromiceto da família Moniliaceae que tem como característica causar patologias em um grande número de espécies de insetos (Alves, 1998b). Possuem uma ampla distribuição na natureza e podem facilmente serem encontrados no solo, onde sobrevive por longos períodos (Lanza *et al.*, 2009). Os insetos atacados por este fungo tornam-se duros e recobertos por uma camada pulverulenta de conídios, onde no final da conidiogênese, possuem colorações que podem variar de verde claro a escuro, acinzentados ou esbranquiçados com pontos verdes. Essa patologia é conhecida como muscardine verde (Alves, 1998b). O *Metarhizium* apresenta conídios uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre

conidióforos simples. Seus conídios geralmente se formam sobre ramificações compostas de um conjunto de micélio (sinema), suas fiálides clavadas ou cilíndricas se originam do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra. A massa estromática é composta de um agrupamento de conídios em cadeias que dão origem a estruturas prismáticas compostas (Tinline, 1971; Driver *et al.*, 2000; Arruda, 2005). Seu desenvolvimento vegetativo ocorre geralmente entre 15 e 32ºC, sendo o ideal 24 e 30ºC e pH ótimo 6,9 (Arruda, 2005; Driver *et al.*, 2005). O *Metarhizium* foi durante muito tempo classificado como Deuteromicetos (Tulloch, 1976). Somente depois do isolamento de *Cordyceps brittlebankisoides*, foi proposta a sua inclusão como Ascomicetos (Liu *et al.*, 2001)

2.3.2 Gênero *Beauveria*

A espécie *B. bassiana* foi descrita pela primeira vez por Bassi, em 1835, como causadora da “moscardina”, uma patologia que atingia o bicho-da-seda (Alves, 1998b). Em 1838, Giuseppe Balsamo Crivelli denominou-a como *Botrytis bassiana*, recebendo posteriormente várias outras denominações, como *Sporotrichum densum*, *Beauveria densa*, *Sporotrichum globuliferum*, *Beauveria globulifera* e *Beauveria bassiana* (Ainsworth, 1973 *apud* Dias, 2005). O gênero *Beauveria*, propriamente dito, foi descrito em 1912 por Vuillemin e, através de análises bioquímicas e caracteres morfológicos, seis espécies foram identificadas: *B. Alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata*, *B. vermiconia* (Mugnai *et al.*, 1989).

O gênero *Beauveria* possui ocorrência generalizada em todos os países, sendo mais freqüente sobre os insetos e em amostras de solos, onde pode sobreviver por longos períodos em saprogênese (Dias, 2005). A doença causada no inseto é denominada muscardine branca. Em condições de laboratório, possui a capacidade de colonizar a maioria dos insetos, sendo que em campo ocorre de forma enzoótica e epizoótica em coleópteros, lepidópteros, hemípteros e em ocorrência enzoóticas sobre dípteros, himenópteros e ortópteros (Alves, 1998b).

Este fungo apresenta duas fases distintas para seu ciclo biológico: a parasítária, onde a penetração tegumentar ocorre através da ação enzimática e ação mecânica, com posterior germinação dos conídios variando entre 16-18 horas após a infecção. A segunda parte do seu ciclo é representada pela fase sapróbia, que acontece depois que os conídios exteriorizam. Suas exigências nutricionais com relação ao crescimento e germinação não são complexos, podendo ser cultivado facilmente em meios naturais quanto sintéticos (Athayde, 2002; Alves, 1998b).

2.3.3 Gênero *Paecilomyces*

O gênero *Paecilomyces* reúne diversas espécies entomopatogênicas, sendo as mais freqüentes *P. farinosus*, *P. tenuipes*, *P. amoeneroseus*, *P. fumosoroseus* e etc (Alves, 1998b). Espécies do gênero *Paecilomyces* podem ser isoladas facilmente da maioria dos solos agrícolas, onde algumas espécies, como *P. lilacinus*, vivem parasitando nematóides; outras espécies parasitam insetos ou realizam antagonismo em outros

microrganismos (Santin, 2008) Seus conídios são simples ou em sinema, verticiliados e sustentando fiálides com pescoço. Os conídios podem ser elípticos unicelulares, hialinos ou levemente pigmentados. As colônias, dependendo da espécie e do meio, possuem colorações que podem ser brancas, amarelas, rosa ou avermelhadas. Sua forma sexual (telemorfa) ascomiceto pode ocorrer como *Cordyceps*, *Torrubiella*. O nome denomindado para essa patologia em insetos é o muscardine amarelo e esse gênero também possui espécies que podem atacar nematóides de plantas (Alves, 1998b).

2.4 O controle Microbiano de Insetos com fungos entomopatogênicos

O controle microbiano de insetos teve sua primeira recomendação de uso no livro Sylva (1664) de John Evelyn, onde se recomendava usar macerados de lagartas (provavelmente atacadas por vírus), para o controle de uma praga de floresta. Em 1865, Pasteur determinou que o protozoário *Nosema bombycis* fosse o agente causal da pebrina do bicho-da-seda e descobriu também que esse microsporídeo poderia ser disseminado pelos ovos por transmissão transovariana, pela ingestão de alimentos contaminados e por contato com o bicho-da-seda doente (Alves, 1998d).

O controle biológico pode ser definido como qualquer atividade envolvendo a manipulação de inimigos naturais (predadores, parasitas ou patógenos) naturais ou modificados geneticamente, visando reduzir ou suprir uma população que represente uma praga (Melo & Azevedo, 1998). Neste sentindo, organismos capazes de inibir o crescimento populacional de outros

podem ser utilizados para controlar populações específicas que possam vir a serem prejudiciais e ser tornarem pragas (Santin, 2008).

Os fungos entomopatogênicos podem ser utilizados em programas de controle biológicos de três formas: (i) controle clássico, quando se usa o inimigo natural para controlar uma determinada praga, (ii) aumentação, onde se introduz no determinado ambiente um inimigo natural, aumentando assim sua população, como um micoinseticida e (iii) conservação, através de modificações do manejo empregado na área afetada a fim de estimular a permanência do fungo (Shah & Pell, 2003).

O controle biológico apresenta uma série de vantagens quanto ao controle químico, entre essas vantagens, pode-se citar o impacto ambiental, custo, especificidade e desenvolvimento de resistência (Alves, 1998d). Algumas desvantagens podem ser encontradas quando se utiliza os biocontroladores, por exemplo, as condições ambientais precisam ser favoráveis para a aplicação dos fungos como a temperatura e umidade. O tempo necessário para o início da morte do hospedeiro é geralmente maior do que usando um inseticida químico. Vários esforços foram realizados para melhorar a produção em massa, no que se refere a estabilidade, a formulação e a aplicação de inóculos destes fungos (Jenkins, 1998; Batta, 2003; Polar *et al*, 2005).

Os fungos se destacam no uso como microrganismos entomopatogênicos, pois diferentemente dos outros, são os únicos que não necessitam serem ingeridos pelos insetos. Devido ao grande número de enzimas extracelulares produzidas pelos fungos como as endoproteases,

aminoproteases, lípases, esterases e quitinases, estes são capazes de causar infecções através da cutícula dos insetos através da degradação da epiderme (Dias, 2005).

No Brasil, o controle microbiano de insetos utilizando fungos entomopatogênicos vem sendo aplicado utilizando-se principalmente as espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Alves & Leucona, 1998). Entretanto, poucos são os estudos direcionados ao controle biológico de moscas por fungos entomopatogênicos avaliando a ação destes sobre diversas formas evolutivas destes dípteros (Nunes *et al*., 2002a).

Para que um programa de controle biológico seja o mais eficiente possível é preciso que sejam usadas linhagens mais apropriadas e que tenham qualidades satisfatórias. Os bioensaios com fungos entomopatogênicos são muito importantes pois mostram as diferenças de mortalidade entre eles, e assim, consegue-se selecionar os melhores isolados, sendo essa fase indispensável para a escolha dos agentes de biocontrole mais eficientes (Alves & Leucona, 1998).

Somente a presença do esporo de um patógeno virulento sobre um hospedeiro suscetível não garante sua colonização. As condições ambientais são determinantes para a germinação e posterior colonização do hospedeiro pelo patógeno. Destacam-se entre essas condições nos aviários a temperatura, o pH da cama, a presença natural de amônia e de outras substâncias químicas e de microrganismos saprofíticos, além da ocorrência de inseticidas, desinfetantes e antibióticos utilizados no manejo dos aviários (Alves & Leucona, 1998). Os patógenos têm sua estabilidade afetada pela temperatura

durante o armazenamento e também em seu ciclo de desenvolvimento sobre o hospedeiro (Alexandre *et al*., 2006). Em geral, a faixa favorável de temperatura para a aplicação de microrganismos entomopatogênicos no campo está entre 20ºC e 30ºC, entretanto, existe uma temperatura ideal para cada fase do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (Alves & Leucona, 1998).

Os fungos em geral, são bem caracterizados pela produção de compostos quimicamente diversos, alguns dos quais são biologicamente muito potentes causando reações adversas e severas em outros organismos. Dentre cerca de 700 espécies entomopatogênicas, distribuídas em cem gêneros, somente uma pequena parte dessas espécies de fungos entomopatogênicos foram pesquisados em relação à produção de metabólitos diretamente tóxicos aos seus hospedeiros (insetos) ou que auxiliam os fungos no estabelecimento de infecção em insetos (Alves, 1998b). Esses compostos incluem vários tipos de enzimas e moléculas que são biologicamente ativas e, as funções desses compostos na patogenicidade incluem a dissolução da cutícula do inseto, supressão do sistema imunológico, interferência com os canais de íons e outras funções celulares no hospedeiro (Screen *et al*., 2001; Freimoser *et al*., 2003)

De modo geral, os fungos produzem enzimas para converter os tecidos dos insetos em nutrientes para o crescimento fúngico. Entretanto, a cutícula esclerotizada dos insetos é utilizada de maneira muito limitada pelos fungos em geral, porém, os fungos entomopatogênicos desenvolveram eficientes enzimas para degradar essa camada protetora dos insetos. Como exemplo, pode-se citar a enzima Pr1, produzida por *M. anisopliae*, que tem um

poder de degradação muito superior a qualquer outra enzima sintetizada por esse grupo de fungos (Dias, 2005).

Os metabólitos secundários dos fungos entomopatogênicos são compostos biologicamente ativos. Essas substâncias são derivadas dos metobólitos primários e incorporam, na maioria das vezes, estruturas que são geralmente produzidas por reações biossintéticas, ocasionalmente envolvendo moléculas de multienzimas capazes de participar de sínteses complexas. Entre esses metabólitos secundários, destacam-se as micotoxinas destruxinas, citocalasinas, viridoxinas, beauvericina, bassianolide, ácido oxálico, efrapeptinas, ciclosporinas, leucinostatinas, hirsutelinas, fomalactona e cordycepina, sendo que várias desses metabólitos secundários atuam como antimicrobiano ou anti-sistema imunológico, eliminando assim a competição por nutrientes ou facilitando o estabelecimento do patógeno (Roberts & Krasnoff, 1998).

2.5 Controle Biológico na América Latina

As condições climáticas encontradas na América Latina favorecem a maioria de seus países no grande arsenal de inimigos naturais de pragas devido as condições favoráveis e de sua rica biodiversidade, representado por seus parasitóides, predadores e patógenos (Alves *et al.*, 2008a).

Para o desenvolvimento de pesticidas químicos, as empresas multinacionais chegam a investir de US$ 70 a US$ 250 milhões para desenvolver e comercializar uma molécula no mercado. Contrariamente a esse quadro, os programas de controle biológico investem valores que dificilmente

atingem US$ 1 milhão na elaboração de um produto a base de microrganismos. Atualmente no Brasil, projetos destinados ao controle biológico estão entre US$ 10.000 e US$ 50.000 por projeto, sendo que a média na América Latina é muito inferior a esses valores. Como resultados a esses baixos investimentos na área de controle biológico, os produtos a base de bactérias, fungos, vírus, nematóides e processos de desenvolvimento necessitam ser melhorados, pois os baixos incentivos financeiros refletem diretamente na qualidade dos produtos disponíveis no mercado (Alves *et al.*, 2008a).

Após várias décadas de estudos e emprego dos fungos em controle de pragas, esse grupo ainda é pouco utilizado quando comparados aos inseticidas químicos, e mesmo em países desenvolvidos, onde são comercializadas formulações mais desenvolvidas de microrganismos para controle biológico, a participação desses bioprodutos ainda é muito reduzida em comparação aos agrotóxicos (Alves *et al.*, 2008b).

Mesmo com as dificuldades enfrentadas na utilização dos produtos a base de fungos, como o receio na nova metodologia alternativa, os produtos a base de fungos tem seu espaço no mercado fitossanitário latino-americano como Brasil, Colômbia, Cuba e Peru. O faturamento na América Latina com a comercialização desses produtos é estimado em US$ 20 milhões por ano, valor este insignificante quando é levado em conta o potencial desses microrganismos para o controle de praga. No Brasil, em 1998, a venda de fungos ficou em torno de US$ 1 milhão, com potencial estimado em US$ 140

milhões. No ano de 2006, o faturamento com a comercialização dos produtos a base de fungos, foi de aproximadamente US$ 10 milhões (Alves *et al.*, 2008c).

2.6 Produção massal de fungos entomopatogênicos no Brasil

Na América Latina, o uso quase que exclusivo de agrotóxicos para o controle de pragas, tem gerado problemas de contaminação do ambiente e dos alimentos, intoxicação do homem e da fauna silvestre, selecionando novas pragas e populações resistentes a esses produtos (Oliveira, 2000). A adoção de práticas menos agressivas aos ecossistemas e ao meio ambiente, torna a agricultura uma prática mais sustentável e racional. Para esses fins, o controle microbiano precisa ser usado como parte indispensável ao manejo integrado de pragas (Alves *et al.*, 2008c).

A maioria dos programas de controle microbiano com fungos na América Latina utiliza estratégias de incrementação e introdução inundativa, onde o patógeno é aplicado em concentrações elevadas na forma de produtos microbianos. Sendo assim, a produção massal desses produtos a base de fungos visa à obtenção econômica de grandes quantidades do patógeno, para atender de forma satisfatória e imediata os produtores rurais, evitando assim quem migrem para formas de controle usando produtos químicos (Alves *et al.*, 2008b).

Para a produção de fungos em larga escala na América Latina utiliza-se processos de fermentação sólida usando como substrato de crescimento sementes cozidas de arroz, cevada, milho entre outros. Com essa forma de produção, os produtores de fungos entomopatogênicos têm

conseguido fornecer aos consumidores grandes quantidades de produto ou de conídios puros em um curto espaço de tempo (Alves *et al.*, 2008b). Outras formas de produção envolvem fermentação em meio líquido, meio semi-sólido e a associação dos meios líquidos e sólidos, conhecida como fermentação bifásica (Wenzel *et al.*, 2006). De qualquer forma, esses substratos fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento e reprodução desses fungos (Pereira & Eira, 1999). Apesar de simples, a fermentação sólida é a mais adequada para os fungos que produzem conídios aéreos, como *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Esses fungos se adaptam muito bem a esse processo devido a suas necessidades nutricionais e metabólicas. Outro ponto positivo da fermentação sólida é o fato dos conídios serem separados com certa facilidade do substrato e normalmente apresentam boa virulência para as pragas alvo (Almeida *et al.*, 2007b; Alves *et al.*, 2008b).

Atualmente no Brasil, os fungos entomopatogênicos são comercializados em sua maioria, nas formulações em grânulos, constituída do fungo mais o substrato (arroz + fungo), e também na forma de pó molhável (WP), resultante da moagem do fungo mais o substrato. Esses produtos compreendem respectivamente 90% e 8,5% dos fungos produzidos no Brasil e suas concentrações finais nos produtos ficam em torno de 5×10^8 conídios/g para *M. anisopliae* e 1×10^9 conídios/g para *B. bassiana* (Alves *et al.*, 2008b).

A produção atual de fungos entomopatogênicos no Brasil é de aproximadamente 3.000 toneladas de massa fúngica (fungo + substrato) por ano, e esses produtos sendo utilizados para tratar cerca de 600.000 ha de

diversas culturas. Dentre essas produções, o fungo *M. anisopliae* representa mais de 90% da produção total de fungos no país (Alves *et al.*, 2008b).

2.7 Interação patógeno-hospedeiro

Vários fatores de virulência estão envolvidos na colonização de insetos por fungos entomopatogênicos (Dias, 2005) e a adesão dos conídios à cutícula do inseto é o primeiro passo no estabelecimento da infecção (Lecuona *et al.*, 1991). Outro determinante de patogenicidade é a capacidade de germinação dos conídios e após iniciada a germinação, os conídios diferenciam-se numa estrutura de infecção denominada apressório, que representa uma adaptação por concentrar energia física e química em uma área muito pequena e assim proporcionar uma penetração bastante eficiente (St. Leger *et al.*, 1991b).

A cutícula dos insetos constitui-se em uma barreira físico-química eficiente contra a penetração de muitos microrganismos entomopatogênicos (Tiago & Furlaneto, 2003). Esse tegumento contém a procutícula e a epicutícula, sendo que esta é composta por lipídios (95%), aminoácidos e aminoaçúcares que servem como fonte de nutrientes para a germinação do fungo. Já na procutícula as proteínas são os principais componentes (61%), seguido de quitina (30%) e lipídios (7%) (Tiago & Furlaneto, 2003). O processo de infecção se inicia com a adesão do esporo mediada com interações hidrofóbica entre proteínas apolares, as hidrofobinas, e a camada lipídica do hospedeiro (Fang *et al.*, 2007). Durante o processo de infecção através do tegumento, o patógeno sofre adaptações e diferenciações adaptativas em suas

estruturas morfológicas. Durante a penetração via tegumento, os tubos germinativos desenvolvem-se em apressórios na superfície da cutícula, na epicutícula ocorre a formação de projeções de infecção e na procutícula desenvolvem-se as hifas (Dias, 2005; Pedrini *et al*., 2007). O apressório acumula açúcares, sendo responsável pela geração da pressão osmótica necessária para a penetração (Wang & St Leger, 2007).

Após a penetração, a hifa sofre um engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente na hemocele. Neste estágio, visando uma possível proteção contra o sistema imunológico do inseto (encapsulação), são formadas estruturas como blastóporos, protoplastos e outros corpos hifais. Depois da morte do inseto, ocorre crescimento das hifas por todo o corpo do inseto. A mumificação do inseto ocorre devido a substâncias antibióticas, como a oosporina, que impede que saprófitas desintegrem o inseto morto. O tempo para ocorrer a colonização pode variar de 72 a 120 horas, dependendo do inseto, patógenos e das condições ambientais (Alves, 1998b).

A reprodução dos fungos após a colonização do inseto pode ser por processo assexual e/ou sexual. Os sintomas iniciais da doença podem aparecer como manchas escuras nas pernas, regiões intersegmentais ou por todo o corpo do inseto. O inseto altera seu comportamento, cessando a alimentação, ficando enfraquecido, apresenta sintomas de paralisia e fica desorientado. Posteriormente, o tegumento torna-se rosado (no caso de *B. bassiana* e *M. anisopliae* infectando lagartas) devido a liberação de oosporina,

para depois o inseto assumir coloração esbranquiçada, devido ao crescimento do micélio (Alves, 1998b).

A morte do inseto ocorre em função de micotoxinas produzidas pelo fungo (Bidochka *et al.*, 1997), mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo e outros danos físicos causados pelo crescimento das hifas do fungo (Alves, 1998b).

As enzimas atuam no processo de penetração dos fungos, inclusive na fase de adesão, antes mesmo da germinação dos conídios. Inicialmente são produzidas e liberadas pelo tubo germinativo, que degrada a cutícula dos insetos, favorecendo o processo nutricional entre o fungo e o hospedeiro (Alves, 1998b).

St. Leger *et al.* (1987) identificaram duas proteases alcalinas do fungo *M. anisopliae* var. *anisopliae*, uma com atividade tipo subtilisina, designada Pr1 e a outra com atividade tipo tripsina, designada Pr2. O papel da Pr1 na produção foi identificado como a principal protease produzida por estruturas infectivas (apressórios e tubos germinativos) durante a penetração e infecção através da cutícula (St. Leger *et al.*, 1989). O papel da Pr2, aparentemente está envolvido na indução e ativação da enzima Pr1 em *M. anisopliae* (Paterson *et al.*, 1994).

St. Leger *et al*. (1986a) relataram que *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *B. bassiana* e *Verticilium lecanii* produziam uma grande quantidade de enzimas extracelulares (endoproteases, aminopeptidases, lipases, esterasese quitinases) quando crescidos em cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. A protease Pr1 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi

capaz de remover 25–30% das proteínas cuticulares, demonstrando que proteases estariam envolvidas na hidrólise da cutícula e assim facilitando a penetração através do tegumento. Em outro estudo, os autores verificaram grandes variações nos níveis de produção enzimática entre os diferentes isolados, e entre as diferentes espécies analisadas, sendo que todos os isolados apresentaram alta produção de endoproteases. A seqüência de produção dos diferentes tipos enzimáticos foi similar para as diferentes espécies, sendo que as primeiras atividades observadas (< 24h) foram as do complexo proteolítico e esterase (St. Leger *et al*., 1986b).

Os fungos entomopatogênicos são capazes de sintetizar toxinas utilizadas no ciclo das relações patógeno-hospedeiro. A beauvericina é produzida por *B. bassiana* e *P. fumosoroseus* e sua ação tóxica atua principalmente sobre larvas de pernilongos e moscas adultas. As destruxinas são encontradas em *M. anisopliae* e possuem efeito tóxico sobre vários insetos (Alves, 1998b).

2.8 Sistema imunológico dos insetos

A grande eficiência dos mecanismos de defesas dos insetos contra competidores potencialmente parasitas e patógenos é o segredo para os insetos se desenvolverem em ambientes tão diversos quanto os que eles colonizaram (Negreiro *et al.*, 2004).

Segundo Gallo *et al.* (2002), a primeira linha de defesa dos insetos contra a ação de patógenos é representada pela cutícula e o mesêntero que formam uma barreira bastante eficiente contra a invasão dos patógenos.

Quando essa falha na proteção do inseto, reações imunológicas começam a ser desencadeadas.

Basicamente, o sistema imunológico dos insetos é capaz de mediar dois tipos de reações contra agentes estranhos. A primeira é responsável pela realização dos processos de coagulação da hemolinfa, melanização e produção de peptídios antimicrobianos. Esta reação ocorre sem a participação direta dos hemócitos, sendo denominadas de reação humoral (Vilmos & Kurucz, 1998). O segundo tipo de reação desencadeada pelo sistema imune dos insetos são as respostas mediadas pelos hemócitos, sendo denominada reação celular e basicamente incluem a fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos e ocorrem em combinação com as defesas humorais (Silva, 2002). Os tipos de respostas podem ser observados na figura 1. Essas células apresentam morfologia e função variadas, atuando com ações como fagocitose, encapsulação e formação de nódulos (Barraco & Menezes, 1984, Lavine & Strand, 2002). Embora na hemocele existam vários tipos de hemócitos, os granulócitos, plasmócitos e os coagulócitos são os que participam mais das defesas celulares e humorais na maioria dos insetos estudados.

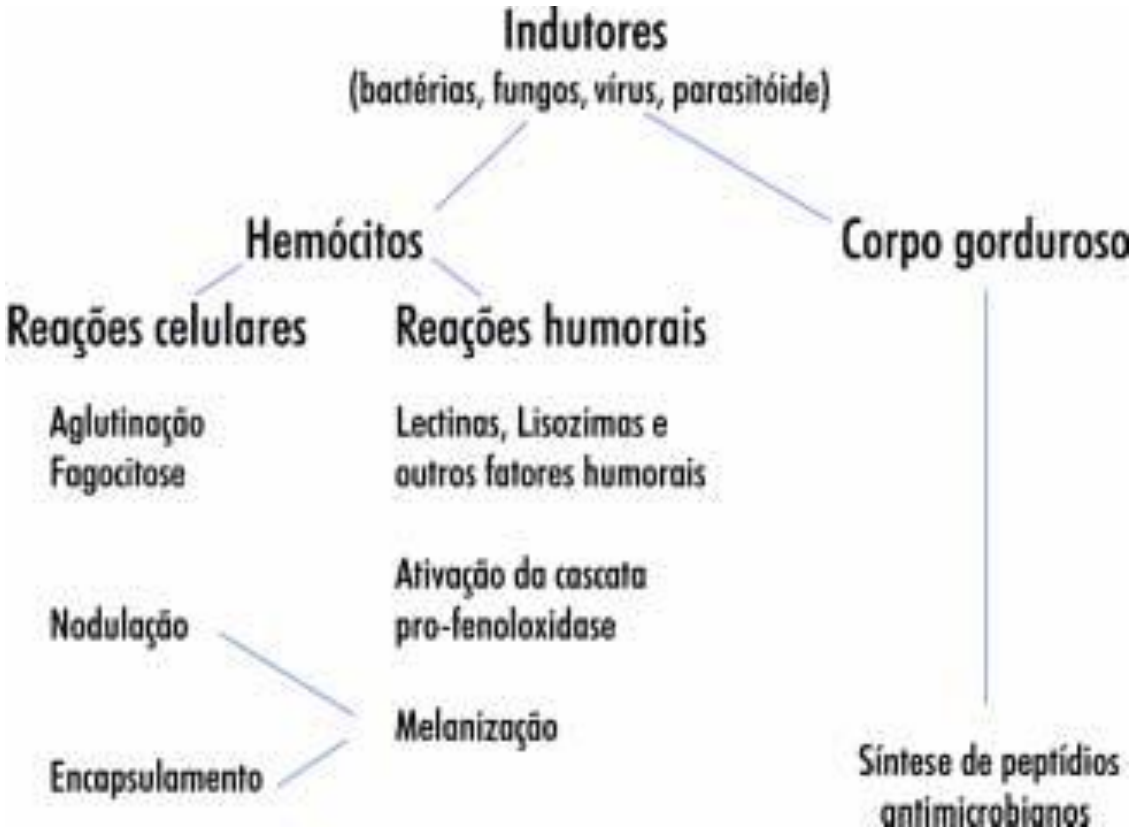

Figura 1. Representação esquemática das respostas imunológicas dos insetos. A ligação de moléculas receptoras na superfície de um microrganismo pode induzir reações diferentes como aglutinação, fagocitose, nodulação e encapsulamento pelos hemócitos. O processo de ativação da cascata de pro-fenoloxidase é necessária para que ocorra a melanização e morte do microrganismos isolados nos nódulos ou cápsulas. A síntese de peptídios antimicrobianos constitui a última fase no combate a um microrganismo invasor (Silva, 2002).

Os hemócitos são elementos celulares presentes no plasma originados de células chamadas prohemócitos. Em geral, os hemócitos permanecem aderidos à superfície dos órgãos. Entretanto, são comumente encontrados circulando livremente na hemolinfa. Apresentam diversos tamanhos, variando entre 0,006 a 0,27 mm e são de aspecto amebóides. A quantidade de hemócitos por unidade de volume varia de espécie a espécie, do estágio de desenvolvimento e do estado fisiológico, situando-se em geral entre 30 000 a 50 000 por ml (Buzzi, 2002).

As pesquisas envolvendo caracterização e purificação de peptídios antimicrobianos em reposta a infecções causadas por fungos têm proporcionado novos conhecimentos sobre a regulação e organização do sistema imunológico dos insetos. Os insetos possuem um sistema de reconhecimento de patógenos capaz de ativar um complexo de moléculas sinalizadoras e de coordenar a expressão de vários genes (Franc & White, 2000).

O reconhecimento e ativação do sistema imunológico dos insetos ainda não estão bem definidos, mas receptores associados à membrana dos hemócitos e outros solúveis na hemolinfa são capazes de reconhecer e aglutinar os patógenos, enquanto outros podem induzir a ativação de cascatas proteolíticas (Silva, 2002).

A enzima fenoloxidase, que é responsável pela cascata pro-fenoloxidase, catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos. Como resultado final dessa dessa reação, ocorre a oxidação da melanina, que participa de três processos fisiológicos importantes: esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesa imunológica (Silva *et al.*, 2000). A fenoloxidase se encontra na forma de uma proenzima, denominada pro-fenoloxidase. É ativada proteoliticamente por uma ou duas serino-protease em resposta a infecções por bactérias, fungos, lipopolissacarídios (moléculas presentes nas paredes celulares de gram-negativas), peptidoglucanas (componentes presentes nas paredes celulares de gram-positvas), β-1,3 glucanas (presentes na parede celular de fungos e algas), enzimas proteolíticas de parasitóides (tripsina e chimotripsina) e injúrias

nos tecidos (Ashida *et al.*, 1983; Silva *et al.*, 2000). Oxidações subseqüentes de fenóis pela fenoloxidase levam à produção de quinonas que polimerizam para formar melanina (Silva, 2002).

Os produtos intermediários da enzima fenoloxidase são bastante tóxicos tanto para os microrganismos invasores quanto para o inseto e sua ativação fica restrita ao local de infecção. A ocorrência de uma melanização generalizada é letal para o inseto. No plasma e nos hemócitos, existem proteínas inibidoras que regulam a atividade das serino-proteases (Kanost, 1999).

Nas defesas celulares, após a invasão de microrganismos os hemócitos migram rapidamente para o local de invasão e eventualmente, fagocitam e destroem os invasores. Quando ocorre da população de patógenos serem muito elevadas dentro da hemocele os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e removê-los da circulação. Contra larvas e ovos de endoparasitóides, que são depositados na hemocele e não podem ser fagocitados e nem isolados em nódulos, o sistema imune do inseto se defende formando cápsulas (Strand & Pech, 1995). Na reação de encapsulação os granulócitos são os primeiros a chegarem ao local de infecção e constatando a infecção, se agregam e liberam uma substância granular na hemolinfa em seguida os plasmócitos chegam e formam uma camada de células que se enrijece e essa formação dessa cápsula é acompanhada pela produção de melanina. Durante a sístese de melanina, moléculas citotóxicas intermediárias (quinonas) são produzidas e inativam ou destruir grande parte dos microrganismos (Silva *et al.*, 2000).

As respostas humorais são realizadas por proteínas solúveis existentes na hemolinfa e normalmente levam algumas horas ou dias para serem expressas. Muitas dessas proteínas inibem o desenvolvimento de fungos e bactérias. As cecropinas pertencem a uma classe de peptídios que tem um amplo espectro bactericida. Em geral esses peptídios são moléculas cilíndricas, anfipáticas, com um polo hidrofóbico e atuam rompendo as bicamadas lipídicas da membrana celular das bactérias. Outra molécula que atua contra bactérias são as cecropinas de carga positiva, que se ligam as proteínas negativas periféricas da membrana fosfolipídicas das bactérias enfraquecendo a estrutura de bicamada de lipídios, enfraquecendo sua estrutura e eventualmente ocasionando o extravasamento do conteúdo citoplasmático da célula bacteriana (Silva, 2002).

Um fato importante sobre as cecropinas é que esse peptídio não atua contra *Bacillus thuringiensis*. Essa bactéria produz uma zinco-protease que degrada essas proteínas (Silva, 2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Musca domestica*

3.1.1 Coleta de larvas e adultos de *Musca domestica* para criação em laboratório

A primeira tentativa de captura de *Musca domestica* (larvas e adultos) foi realizada coletando aproximadamente 3 kg de fezes de suínos da criação de porcos do hospital veterinário da UFRGS, situado no campus da Faculdade de Veterinária da UFRGS em Porto Alegre – RS. Após coletado, esse esterco foi levado ao laboratório de Micologia Ambiental da UFRGS e as pupas de dípteros encontradas no esterco foram coletadas.

A segunda tentativa foi realizada usando armadilhas confeccionadas com garrafas PET de 2 litros, com 4 perfurações na base da garrafa para a entrada das moscas (Figura 4). Essas armadilhas eram pintadas de amarelo para aumentar a atratividade, e em seu interior foram colocadas iscas química com atrativos dentro de potes plásticos, tampado com um fino pano para impedir que as moscas entrassem em contato com a isca. Como isca atrativa, foi usada a isca comercial Quick Bayt® (Bayer). Quatro armadilhas foram colocadas próximo ao local de armazenamento de lixo no prédio do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde (ICBS) no campus do centro da UFRGS, localizado em Porto Alegre - RS

A terceira tentativa foi a coleta de larvas selvagens diretamente na cama de um aviário (esterco das aves), localizado na BR 365- Km 14 no município de Montes Claros, MG. Aproximadamente 2 kg de esterco foram

retirados do aviário e levados ao laboratório de Zoologia da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). No laboratório o material foi selecionado e as larvas de *M. domestica* separadas e transferidas para potes plásticos com meio de cultura para larvas. Após identificação e seleção das larvas, estas foram transferidas para o laboratório de parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foi iniciada a criação das moscas.

3.1.2 Criação de *M. domestica*

As larvas de *M. domestica,* coletadas vivas no aviário, foram levadas ao Laboratório de Parasitologia da UFRGS e criadas em gaiola entomológica de madeira (Figura 2) à temperatura ambiente (25 Cº ± 5). A fim de controlar grandes quedas de temperatura, era usado um aquecedor elétrico para manter uma temperatura por volta de 25 Cº ± 2. Dentro da caixa entomológica foi mantida uma placa de Petri com algodão e água para manter a umidade.

A alimentação dos adultos foi feita com leite em pó acrescido de açúcar *ad libidum* na proporção de 50% cada. Para obtenção das larvas, foram utilizados potes de plásticos contendo um meio de cultura composto de ração avícola de postura mais farelo de trigo na proporção de 50% cada (Paiva, 2001) e este meio de cultura era umedecido diariamente. Quando as larvas se encontravam no estágio L3 de desenvolvimento, os potes plásticos eram retirados da caixa entomológica e colocados dentro de potes plásticos maiores contendo vermiculita e os mesmos eram tampados com tela de nylon fina (Figura 3). Assim as larvas L3 saiam do meio de cultura e se abrigavam no

meio da vermiculita onde empupavam. À medida que ocorriam as pupações, as pupas eram retiradas da vermiculita e colocadas no interior da caixa entomológica para eclosão.

Figura 2: Gaiola entomológica de madeira para criação de *M. domestica*.

Figura 3: Pote contendo vermiculita para empupamento das larvas L3.

3.2 Fungos usados nos experimentos de controle biológico

3.2.1 Coletas de solo para Isolamento de fungos presentes no aviário

Para o isolamento dos fungos foram realizadas coletas de solo do aviário. Três amostras de solo, na região entre os aviários (chão batido), foram coletadas e outras três amostras de solo na região de adjacente aos galpões (região de mato). Essas amostras foram individualizadas e armazenadas em garrafas de vidro esterilizadas e acondicionadas em caixas de isopor. Em seguida transportadas até o laboratório de Micologia Ambiental da UFRGS.

3.2.2 Isolamento dos fungos

As amostras de solos coletadas, tanto do chão batido quanto do solo das matas adjacentes aos galpões, foram homogeneizadas e 5 g de cada solo foram transferidos para 45 mL de água peptonada 1%. A solução foi então agitada para ocorrer o desprendimento dos esporos dos grânulos do solo. Uma vez bem homogeneizada as amostras, diluições seriadas até 10^{-4} foram preparadas e destas 100 µL foram inoculados, em triplicatas, em placas de Petri contendo meio de cultura agar batata dextrose (BDA) e agar Sabouraud dextrose com extrato de levedura (Alves *et al*., 1998c). Ambos os meios de cultura tiveram o acréscimo de bacitracina e cloranfenicol na proporção de 1mg/mL de meio de cultura.

Todas as placas inoculadas foram mantidas em B.O.D. a 28 ºC ± 1 por dez dias. Após esse período, os fungos foram repicados e isolados em placas contendo meio BDA.

3.2.3 Identificação dos fungos isolados no solo do aviário

Os fungos foram identificados através da técnica de microcultivo. Após o crescimento das estruturas reprodutivas os mesmos foram analisados sob microscópio óptico e identificados em nível de gênero utilizando chave taxonômica descrita por Barnett & Hunter (1998); Alves (1998b) e Silveira (1995).

3.2.4 Fungos entomopatogênicos para testes de bioensaios

Os isolados disponíveis para os testes de bioensaio encontram-se discriminados na tabela 1.

.

Tabela 1 – Isolados de fungos utilizados nos experimentos seus hospedeiros e locais de origem.

Isolado	Hospedeiro	Local de coleta
Cladosporium cladosporioides CG 634	*Aleurothrixus aepim*	BA
Metarhizium anisopliae CG 30	*Deois flavopicta*	ES
Metarhizium anisopliae CG 46	*Deois incompleta*	ES
Paecilomyces sp CG 301	*Cerotoma* sp.	RJ
Trichoderma harzianum CG 502	Solo	SP
Trichoderma sp	Solo	MG
Sporothrix insectorum CG 882	*Leptopharsa hevea*	MT
*Beauveria bassiana**	Produto comercial	Não informado
Paecilomyces sp	Solo	MG
Paecilomyces sp	Solo	MG

* Fungo presente no produto Boveril (Itaforte Bioprodutos).

3.3 Protocolo para indução da virulência

Devido às condições desfavoráveis das larvas para a emergência dos fungos após a morte destas e à alta contaminação apresentada nas moscas também após a morte das mesmas pelos patógenos, houve a necessidade de desenvolver um meio de cultura para ativar a virulência dos patógenos**.**

3.3.1 Preparação das cutículas de larvas e adultos de *M. domestica.*

Indivíduos adultos e larvas de *M. domestica* foram obtidos da criação estabelecida do laboratório de Parasitologia da UFRGS. Primeiramente, os insetos foram imobilizados a -20ºC por no mínimo 2 horas, e então os adultos dissecados um a um, com auxilio de lupa e instrumentos cirúrgicos, sendo que somente a cutícula dos adultos foi aproveitada nesse experimento. As larvas tiveram suas cabeças amputadas com auxílio de uma tesoura cirúrgica e o corpo esmagado para que o conteúdo interno fosse expelido. Posteriormente, as carcaças, tanto das larvas quanto dos adultos, foram exaustivamente lavadas com água, autoclavadas a 120ºC durante 15 minutos e secas em estufas a 50ºC por duas horas ou até que ficassem secas. O armazenamento se deu a -20ºC até a sua utilização.

3.3.2 Condições de cultivo dos fungos para indução da virulência.

Os fungos foram cultivados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio mínimo, MM (0,6% de $NaNO_3$; 0,05% de KH_2PO_4 ; 0,05% de $MgSO_4$, pH 6,5) acrescidos de 0,8% de cutículas de larvas e adultos de *Musca domestica*. Como controle foi utilizado o meio mínimo acrescido de 1% de glicose como única fonte de carbono. Após esterilização foram adicionados 2% da solução de sais (2,6% de KCL; 2,6% $MgSO_4$; 7,6%; (p/v) KH_2PO_4) e 0,04% de solução de elementos traços (0,004% de Na_2B4O_7; 0,04% de $CuSO_4$; 0,001% de $FeSO_4$; 0,08% de $MgSO_4$ e 0,08% de $ZnSO_4$) previamente esterilizados. Os frascos foram inoculados com 10^8 esporos/mL, incubados por 10 dias sob agitação de 120 rpm a 28ºC. Os fungos que esporularam nesse meio de cultura foram selecionados para os bioensaios**.**

3.4 Bioensaios com fungos entomopatogênicos em larvas de 3º instar de *M. domestica.*

Os fungos foram multiplicados por meio de semeadura de uma suspensão de conídios, seguida de espalhamento com espátula de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (ALVES, 1998d). Após a semeadura, as placas foram transferidas para incubação em câmara B.O.D. a 27 ± 1º C e fotoperíodo de 12 horas, por um período de 12 dias. Após esse período, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça de níquel-cromo e utilizados para confecção de suspensões, preparadas em solução de água destilada estéril e espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%. A

contagem do número de conídios foi feita em câmara de Neubauer em microscópio ótico.

As larvas L3 foram trazidas da criação de moscas mergulhadas nas suspensões de conídios de $10x^6$, $10x^7$ e $10x^8$ esporos/mL, sendo que para cada tratamento, foram utilizados 60 larvas- triplicatas com 20 larvas para cada suspensão de esporos. Dois controles foram realizados, um apenas com água destilada e o outro com água destilada e Tween 80® a 0,1%.

Posteriormente aos tratamentos, as larvas foram acondicionadas em potes plásticos estéreis contendo um disco de papel estéril no fundo. Diariamente esse papel foi umedecido para manter alta a umidade relativa do ar dentro dos potes. Os potes com os tratamentos foram incubados em BOD a 27 ± 1° C com fotoperíodo de 12 horas. A incubação foi de 10 dias, sendo que diariamente os potes eram observados e eram retiradas as larvas que ocasionalmente vieram a morrer. Essas larvas mortas eram então colocadas em câmara úmida dentro da BOD a 27 ± 1° C com fotoperíodo de 12 horas para posterior confirmação da morte pelo patógeno.

Após o período de avaliação dos bioensaios, a taxa de mortalidade era corrigida aplicando-se a fórmula de Abbott (1925).

$$\textbf{Mortalidade Corrigida} = \frac{\textbf{\% de mortalidade no tratamento - \% de mortalidade na testemunha x 100}}{\textbf{100 - \% de mortalidade na testemunha}}$$

A análise estatística foi realizada através do teste de variância ANOVA (um fator), seguido do teste de médias de Tukey a 5% de significância, para avaliar diferenças significativas entre os fungos. Foi realizada a análise de probit para o estabelecimento da CL 50 e CL 90.

3.5 Controle biológico no aviário de postura.

3.5.1 Local dos ensaios de controle biológico.

Os experimentos de campo foram realizados em dois galpões (14 e 17) em uma granja de postura, localizada na BR 365- Km 14 no município de Montes Claros, MG. A granja possui 19 galpões de postura com capacidade total de alojamento para 1.656.000 aves e a capacidade de 1.150.000 ovos por dia destinados ao consumo.

3.5.2 Monitoramento da população de *M. domestica* nos galpões selecionados.

Foram realizadas coletas semanais, iniciadas do dia 06/10/2009 até 08/12/2009, utilizando armadilhas feitas com garrafas plásticas do tipo PET de dois litros, furadas perto da base para entrada das moscas e pintadas de amarelo para aumentar a atratividade, e estas eram penduradas no teto dos galpões (Figura 4). Como isca atrativa, foi usada a isca comercial Vetor® (Novartis Biociências). Foram colocadas 18 armadilhas, sendo 9 armadilhas para o galpão teste e 9 armadilhas para o galpão controle. O período de coleta foi de 10 semanas consecutivas.

Figura 4: Armadilhas para monitoramento de *M. domestica* no aviário.

3.5.3. Determinação do teor de umidade e temperatura da cama do aviário.

Foram realizadas medições em 10 pontos ao longo da cama do aviário utilizando o aparelho termohigrômetro. Em cada ponto aferido foi introduzido o aparelho numa profundidade de cinco centímetros por cinco minutos, ou até que os valores obtidos se estabilizassem (Figura 5).

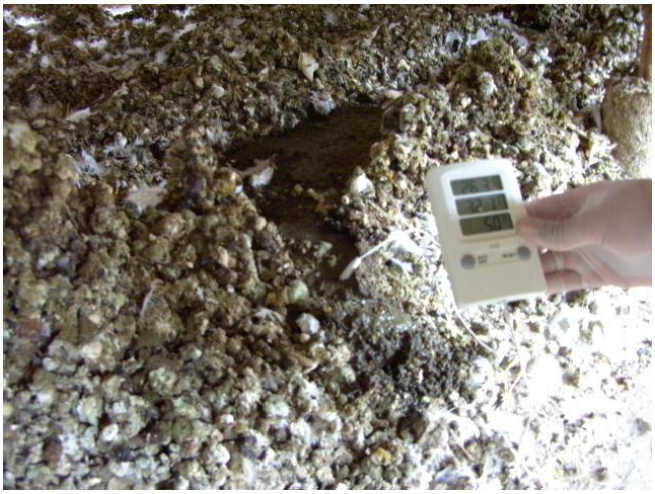

Figura 5: Termohigrômetro utilizado para determinar o teor de umidade e a temperatura da cama do aviário.

3.5.4. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da cama do aviário

Para determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da cama, foram coletados aproximadamente 5 gramas de fezes das aves e este foi diluído em 5 mL de água. Foram coletados fezes em 10 pontos diferentes ao longo do aviário e a determinação foi realizadas por imersão de fitas de papel com indicador universal de pH, com escalas em cores variando de 1 a 14 (Figura 6).

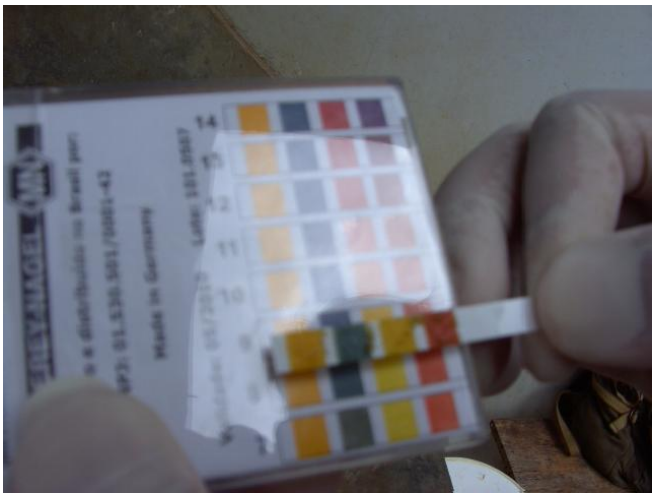

Figura 6: Tiras de papel com indicadores de pH.

3.5.5 Produção de conídios de *M. anisopliae* para aplicação no aviário

O fungo selecionado foi repicado em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas durante dez dias em câmara climatizada BOD (28 ± 1° C e fotofase de 12h) para promover o crescimento e esporulação do fungo. Após 10 dias, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça metálica e então preparados uma suspensão contendo 10^8 esporos/mL com água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% e este serviu de

inoculo. Inicialmente, foi realizado o cozimento do arroz em água fervendo, por cerca de 25 minutos, até que este apresentasse a textura "emborrachada". Após o resfriamento, o arroz foi distribuído em sacos plásticos de polipropileno (35 cm de comprimento x 22 cm de largura). Cada saco continha 1kg de arroz e 25 kg de arroz cozido foram armazenados. Esses sacos foram fechados com grampos de metal, autoclavados por 25 min a 120° C, e resfriados em condição ambiente.

Cada saco de arroz foi inoculado com 80 mL da solução de esporos ($1x10^8$ esporos/mL). A inoculação foi realizada com o auxílio de uma seringa descartável e o orifício foi fechado, em seguida, com uma etiqueta adesiva e agitando-se o recipiente para uma distribuição uniforme do inóculo. Após a inoculação os sacos foram acondicionados por 15 dias em temperatura ambiente para a germinação dos conídios e crescimento do fungo. Após crescimento e esporulação, foram descartados os sacos contaminados. Decorrido este período, os sacos foram acondicionados em estufa BOD a 4°C até seu uso a campo.

3.5.6 Aplicação dos esporos no aviário

Foram realizadas duas tentativas de controle, a primeira constou da aplicação do produto comercial Metarril WP (a base de *M. anisopliae*) da empresa Itaforte bioprodutos. O produto foi diluído em água e todo o conteúdo da calda foi pulverizado, com o auxílio de um pulverizador manual, diretamente na cama (esterco) do aviário na concentração de $2,54 \times 10^5$ esporos/m^2 ($2,54 \times 10^{15}$ esporos/ha). Foi realizada uma aplicação por semana, durante três

semanas consecutivas, sendo utilizados três kg do produto por aplicação. Na segunda tentativa de controle foi aplicado o fungo *M. anisopliae* CG 46, produzido previamente em arroz cozido, onde cada kg do arroz contendo os esporos foi diluído em água e o sobrenadante utilizado na aplicação. Foi aplicado a concentração de 4,56 x 10^5 esporos/m^2 (4,56 x 10^{15} esporos/ha). Foi realizada uma aplicação por semana, durante três semanas consecutivas, sendo utilizados três kg do produto por aplicação. Como controle, foi utilizado um galpão com o mesmo tamanho e tempo de criação das aves, sem qualquer tipo de tratamento.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura das etapas de infecção

As etapas de infecção realizadas pelo *M. anisopliae* foram descritas a partir de imagens capturadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para este experimento foi selecionado o fungo *M. anisopliae* CG 46 e esse foi cultivado em placas contendo meio BDA incubados por dez dias em estufa BOD a 28°C com fotoperíodo de 12 horas. Após o cultivo foi realizado a recuperação dos esporos do fungo adicionando água destilada estéril, seguido de raspagens do micélio com alça de drigalski. As larvas de *M. domestica* foram infectadas *in vitro* com suspensões de conídios na concentração de 10^8 esporos/mL, utilizando água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80. As larvas foram mergulhadas na suspensão por um segundo e em seguida colocadas em potes plásticos e estes foram incubados em estufa BOD a 28°C, fotoperíodo de 12 horas. Foram realizados quatro ensaios da infecção, sendo que o tempo para cada ensaio foi de 24, 48, 72 e

96 horas de tempo decorrido a partir da exposição das larvas com os esporos do fungo.

Após o período de infecção, as larvas infectadas foram preparadas para serem submetidas a microscopia eletrônica de varredura. Para preparação do material foi utilizado um protocolo do próprio Centro de microscopia eletrônica da UFRGS (CME) onde as amostras eram fixadas por no mínimo uma semana em solução de fixação (Anexo 7.2.9) seguido de três lavagens de 30 min cada, em solução tampão fosfato (Anexo 7.2.10). Posteriormente, as amostras foram desidratadas sendo colocadas por 10 minutos em acetona nas concentrações de 30, 50, 70 e 90% e novamente em acetona 90% por mais vinte minutos e duas passagens em acetona 100% por 10 minutos e 20 minutos cada. Com o término do processo de fixação, as amostras eram conduzidas ao aparelho de ponto crítico onde era realizado esse procedimento no aparelho Critical Point Dryer da Balzers CPD030. As amostras foram fixadas nos “stubs” e então realizada a metalização com ouro.

3.7 Estudos do sistema imunológico das larvas de *M. domestica*.

3.7.1 Manuseio das larvas de *M. domestica* para retirada da hemolinfa.

As larvas foram obtidas da criação de *M. domestica* conforme item 3.1.2. As larvas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e em seguida colocadas dentro de uma solução de hipoclorito sódio 1% por 1 minuto

para desinfecção superficial da cutícula. Após a desinfecção, as larvas foram lavadas com água corrente para retirada do excesso de cloro e então acondicionadas em potes plásticos dentro de gelo por no mínimo 15 minutos para imobilização (Figura 7). Após a imobilização, as larvas foram retiradas do gelo e banhadas em álcool 70% por um segundo e então a extremidade anterior (primeiros segmentos larvais) foi amputada com auxílio de uma tesoura oftálmica e 5 µL de hemolinfa foram colhidos com ajuda de um pipetador automático.

.

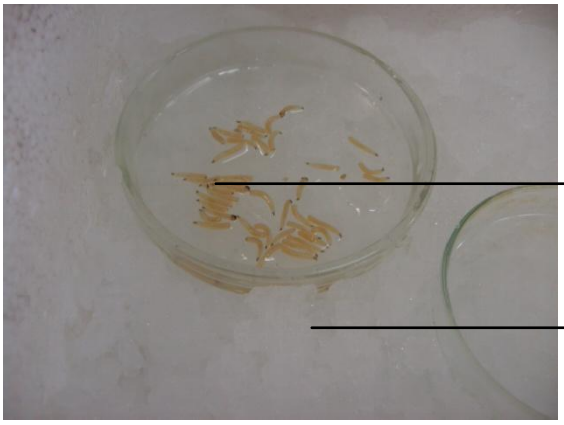

Figura 7. Imobilização das larvas.

3.7.2 Descrição morfológica das células do sistema imunológico das larvas de *M. domestica*.

Larvas de 3º instar de *M. domestica* foram manuseadas conforme item 3.7.2 e a hemolinfa colheitada foi montada entre lâmina e lamínula, rigoramente limpas para minimizar o efeito de pirógenos (Anexo 7.3). As observações foram realizadas sob duas condições de preparação: hemolinfa pura ou hemolinfa adicionada (V/V) de anticoagulante de inseto (Chalk *et al.*,

1998) (anexo 7.2.11). A diferenciação dos hemócitos foi realizada sob microscopia de contraste de fase, utilizando no mínimo cínco lâminas para cada preparação.

3.7.3 Contagem total de hemócitos durante a infecção por *M. anisopliae*.

Larvas L3 de *M. domestica* criadas no laboratório de Parasitologia da UFRGS foram mergulhadas em solução de esporos de *M. anisopliae* CG 46 na concetração de 10^8 esporos/mL mais espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% por um segundo, em seguida foram acondicionadas em potes plásticos e deixadas em estufas climatizadas B.O.D. à 27 ± 1 ºC por 24, 48, 72 e 96 horas. O controle foi composto de larvas não infectadas. Para cada tempo de infecção foi recolhido hemolinfa de 5 larvas (conforme item 3.7.2), sendo cada ensaio composto de 5 repetições totalizando 25 larvas por ensaio. A hemolinfa das 5 larvas foram adicionadas a 25 µL de solução anti-coagulante para hemolinfa de insetos (Anexo 7.2.11), e cada repetição tinha suas células contadas em câmara de Neubauer. A análise dos resultados foram feitos através da análise de variância Anova (fator único) seguido do teste de Tukey a 5% de significância.

3.8 Teste da taxa esporulação sob diferentes condições nutricionais de carbono e nitrogênio

Neste teste, foi selecionado uma espécie de *M. anisopliae* CG 312, *B. bassiana* CG 470 e *Paecilomyces* sp CG 301. Esse ensaio foi realizado

para avaliar o desempenho dos fungos em relação a diferentes condições de cultivo. As fontes de carbono avaliadas foram a glicose, maltose e a ausência de qualquer açúcar. A fonte de nitrogênio foi a batata e a peptona (presente no meio de cultura sabouraud). Cada espécie fúngica foi cultivada em meio de cultura BDA, por 15 dias em BOD a 27 ± 1° C, com fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça de níquel-cromo e as suspensões preparadas em água destilada estéril e espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%. A contagem do número de conídios foi feita utilizando hematímetro (câmara de Neubauer) e as soluções padronizadas na concentração de 10^8 esporos por mL.

Foram preparados sete meios de cultura: BDA, batata maltose ágar; ágar batata com 0,1% de glicose; ágar batata; ágar Sabouraud; ágar Sabouraud com maltose e ágar Sabouraud sem açúcar (anexo 7). Os meios de cultura foram autoclavados a 120ºC por 15 min e em seguida vertidos em placas de Petri. Posteriormente foi adicionado, no centro de cada placa, 100 µL da solução de esporos, de cada espécie fúngica. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A análise estatística foi realizada através do teste de variância ANOVA (um fator), seguida do teste de médias de Turkey a 5% de significância, para avaliar diferenças significativas entre as taxas de esporulações.

3.9 Produção de enzimas extracelulares

Os mesmos fungos selecionados para o experimento descrito no item 3.8, foram utilizados para avaliar a produção de enzimas extracelulares em meio sólido. Para tanto, discos de 5 mm de papel Whatman n°. 1 foram mergulhados em uma solução de esporos, de cada espécie, na concentração de 10^{8} esporos/mL e colocados no centro das placas de petri contendo meio mínimo acrescido do substrato específico para a enzima a ser avaliada. Para avaliar as enzimas esterase e pectinase os meio de cultura foi modificado (Anexo 7.1.11 e 7.1.12). Uma segunda bateria de testes foi realizada com os mesmo meios de cultura, porém acrescidos de 0,1% de glicose a fim de avaliar se uma maior massa micelial melhoraria a produção das enzimas no meio de cultura. As placas foram mantidas por 10 dias a 28ºC em estufa BOD com fotoperíodo de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.9.1 Amilases

A produção de amilases foi observada em meio mínimo acrescentando-se 1% de amido solúvel. Após o crescimento do fungo, foi adicionado lugol a placa de Petri. O halo formado ao redor da colônia, em contraste com o meio escurecido, indicou a atividade amilolítica.

3.9.2 Celulases

Para avaliar a produção de celulases, foi acrescentado 1% de carboximetilcelulose (CMC) ao meio mínimo. Após o crescimento fúngico, a produção de celulase extracelular foi detectada adicionando-se na placa uma solução de vermelho-congo. Após 15 minutos o corante foi removido utilizando-

se uma solução de NaCl 4N. Após 30 minutos a produção de celulase foi detectada pela formação de um halo alaranjado em contraste com o meio avermelhado.

3.9.3 Proteases

Para a produção de proteases foi utilizado 4% de gelatina como substrato adicionado ao meio mínimo. Após o período de incubação, foi adicionada solução saturada de $(NH_4)_2SO_4$, cujo precipitado torna o meio de cultura mais opaco, revelando as zonas claras ao redor das colônias, onde ocorreu a degradação da gelatina.

3.9.3.1 Proteases com baixa concentração de substrato

Neste teste, foram seguidos os mesmos critérios do item 3.9.3, porém adicionando-se ao meio apenas 1% de gelatina.

3.9.3.2 Proteases com cutícula de adultos e larvas.

As cutículas foram preparadas conforme procedimento do item 3.3.1. Os exoesqueletos foram macerados e o pó peneirado. Para obtenção da solução de cutícula (1%), esta foi ressuspendida em uma solução de tetraborato de potássio (1%) e submetida a vapor fluente por 20 minutos (Andersen, 1980, *apud* Tiago & Silva, 2007). Em seguida, essa solução de cutícula foi adicionada ao meio mínimo na concentração final de 1%. Para verificação da atividade proteolítica foi adicionado na placa de Petri, após

crescimento fúngico, solução de ácido tricloacético 10%, para observação do halo de degradação.

3.9.4 Pectinases

Para detectar a atividade pectinolítica foi utilizado meio mínimo modificado (anexo 7.1.12) para pectinases acrescidos de 1% de pectina cítrica. Após o crescimento do fungo, foi adicionado solução de brometo de hexadeciltrimetilamônia a 1%. O halo transparente formado ao redor da colônia, em contraste com o meio esbranquiçado, indicou a atividade pectinolítica.

3.9.5 Esterase

Para análise de esterase foi utilizado o meio de cultura para verificação de atividade de esterase (Anexo 7.1.11) suplementado com 1% de tween 80 (Monooleato de Sorbitano Etoxilado) o qual foi autoclavado separadamente e adicionado ao meio, momentos antes de vertê-lo às placas de petri. Após o crescimento fúngico, as placas foram refrigeradas a 4ºC por 48h. A produção de esterase foi detectada pela formação de um halo esbranquiçado visível devido a formação de cristais de sais de cálcio, em contraste com o meio transparente.

3.9.6 Lipases

Para avaliação da atividade lipásica, o meio foi suplementado com 2,5% de óleo de oliva e solução de Rodamina B a 0,001%. Os isolados

lipolíticos apresentaram uma fluorescência laranja ao redor das colônias ou no interior das mesmas, quando observados sob luz UV de 350 nm.

3.9.7 Caseinases

Para verificar a produção de caseínase foi adicionada ao meio mínimo, caseína a 1%. Após crescimento fúngico, a detecção da atividade foi confirmada adicionando-se uma solução de ácido tricloroacético 10% (TCA) para observação do halo de degradação.

3.9.8 Quantificação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi quantificada pela análise da relação H/C, obtida pela divisão da média do diâmetro do halo (H) nas 3 repetições pela média do diâmetro da colônia (C), exceto pela lípase, onde foi somente observada a produção ou não da enzima. Os resultados foram analisados utilizando-se o teste de análise de variâncias fator único (ANOVA), com um nível de significância (α) de 0,05, seguido do pós-teste de Tukey, com o nível de significância igual a 0,05, quando necessário.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta de larvas e adultos de *M. domestica* para criação em laboratório

Com o objetivo de capturar *M. domestica* foram coletados do esterco de suínos 293 pupas, cuja aparência morfológica poderia pertencer a *Musca domestica*. Somente após a emergência dos adultos oriundos desses pupários foi constatado que se tratava de dípteros da espécie *Stomoxys calcitrans*.

Os pupários de *M. domestica* e *S. calcitrans* são muito parecidas e, portanto de fácil confusão. Ambas as moscas podem viver em locais de criação de suínos e fazerem das fezes desses animais locais de ovipostura e criação de suas larvas (Guimarães, 1984; Skoda *et al.*, 1991). Hewitt (1097), foi uns dos pioneiros em descrever as principais diferenças entre essas moscas. A principal diferença morfológica é distinguida pela proboscide, onde a *M. domestica* possui aparelho bucal lambedor e a *S. calcitrans* aparelho bucal picador, onde realiza a hematofagia (Agnolin, 2009).

Na segunda tentativa de capturar *M. domestica* não foram encontrados nenhum indivíduo capturado nas armadilhas. A *M. domestica* é bastante adaptada ao meio antrópico (sinatropia), facilmente encontrada dentro das cidades (Axtell, 1986) e atraída por lixo (Urquhart *et al.*, 1990). Por esses motivos, deveriam ter sido capturadas com certa facilidade, mas não foi isso que aconteceu neste local.

Somente na terceira tentativa de capturar *M. domestica* foi possível encontrar e capturar larvas e pupas para o início da criação da colônia em laboratório. *Musca domestica* é a maior praga encontrada em criações de aves comerciais (Axtell, 1999). A alta densidade de aves e o grande acúmulo de esterco acabam servindo como um excelente substrato para a proliferação de *M. domestica* (Grrenberg & Povolny, 1971).

4.2 Isolamento e identificação dos fungos coletados no solo do aviário

Após realização do protocolo para isolamento dos fungos do solo, foram isolados os seguintes fungos relatados na tabela 2.

Tabela 2. Espécies fúngicas isoladas em determinado tipo de solo e meio de cultura.

Espécie	Meio de cultura	Tipo de solo
Paecilomyces sp 1	SDAY	Chão batido
Paecilomyces sp 2	SDAY	Solo do mato
Paecilomyces sp 3	BDA	Solo do mato
Penicillium sp	BDA	Solo do mato
Trichoderma sp 1	BDA	Chão batido
Trichoderma sp 2	SDAY	Solo do mato
Trichoderma sp 3	SDAY	Solo do mato
Memnoniella sp	SDAY	Solo do mato
Rizopus sp	SDAY	Chão batido

BDA: Batata dextrose agar, SDAY: Sabouraud dextrose agar com extrato de levedura.

De acordo com Alves (1998b), apenas os gêneros *Paecilomyces* e *Trichoderma* apresentam espécies entomopatogênicas. Entretanto, Nunes *et al.* (2002a) através de bioensaios com adultos de *M. domestica*, obtiveram 100% de mortalidade no sétimo dia de tratamento quando estas moscas foram tratadas com *Penicillium corylophilum* numa concentração de $1x10^8$ esporos/mL. Em outro trabalho os autores, Nunes *et al.* (2002b) realizaram bioensaios com *Penicilium corylophilum* em larvas de *M. domestica*, onde avaliaram a taxa de emergência dos adultos, e neste caso não houve diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle, que era composto de larvas sem nenhum tratamento e larvas mergulhadas em água destilada estéril mais Tween 80 na concentração de 0,01%.

Com o resultado dos isolamentos, ficou claro que se tratando de isolamento de fungos em solos, quanto mais nutrientes estiverem presentes no meio de cultura maior será o número de espécies isoladas daquele local. O meio de cultura SDAY é mais nutritivo que o meio de cultura BDA e por isso foi o mais indicado para isolamentos de fungos no solo.

O isolamento de fungos de solos de chão batido e solo da região de mato foram propostos com o objetivo de avaliar se o grau de compactação do solo interferiria nos isolamentos. Pelos resultados obtidos (Tabela 2) aparentemente não houve diferença entre os solos, mas estudos envolvendo compactação, tipos de solos e isolamentos de fungos entomopatogênicos nestes revelam que existem diferenças significativas quando se tenta isolar

fungos nesses solos, inclusive comprometendo sua sobrevivência em determinados tipos e grau de compactação (Lanza *et al.*, 2004).

4.3 Bioensaios com fungos entomopatogênicos em larvas de 3º instar de *M. domestica*

Todos os fungos foram submetidos ao crescimento em meio de cultura, para indução da virulência, onde se verificou a capacidade de crescimento e esporulação em meio mínimo contendo apenas cutícula de larvas e adultos de *M. domestica* (item 3.3.2), apenas alguns dos fungos conseguiram esporular no meio de indução da virulência (Tabela 1) e estes foram então selecionados para os bioensaios (Figura 8).

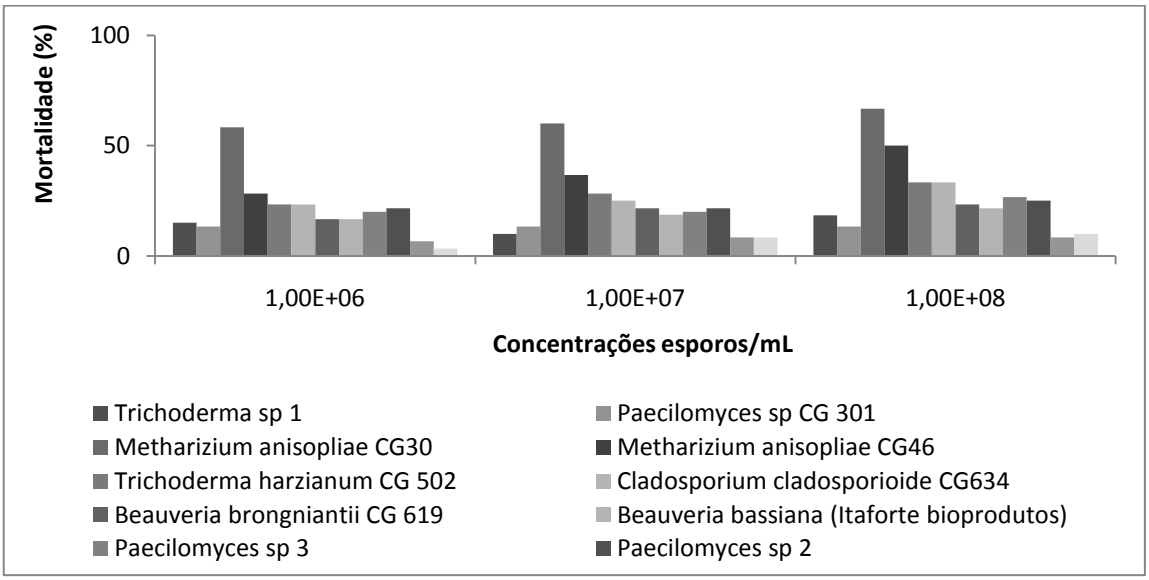

Figura 8. Mortalidade percentual de larvas de terceiro instar de *M. domestica* desafiadas por diferentes concentrações de esporos de fungos entomopatogênicos.

O fungo *Paecilomyces* sp CG 301 e *Paecilomyces* sp 2 e 3 não apresentaram diferenças nas mortalidades com o aumento da concentração de

esporos. Nos demais fungos e tratamentos, o aumento da concentração de esporos/ mL resultou em um aumento da mortalidade larval.

Entre os fungos submetidos aos testes de bioensaios (Tabela 1), observou-se que a taxa de mortalidade larval de *M. domestica* quando

Tabela 3. Percentual da mortalidade de larvas de 3º instar de *M. domestica.*

Isolados	Concentração de esporos/mL		
	10^6	10^7	10^8
Trichoderma sp 3	15 a	10 a	18,33 a
Trichoderma harzianum CG 502	23,33a	28,33a	33,33 a
Metharizium anisopliae CG30	58,33b	60b	66,66 b
Metharizium anisopliae CG46	28,33a	36,66b	50 b
Cladosporium cladosporioide CG634	23,33a	25a	33,33 a
Beauveria brongniantii CG 619	16,66a	21,66a	23,33 a
Beauveria bassiana (Itaforte Bioprodutos)	16,66a	18,66a	21,66a
Paecilomyces sp 3	20a	20a	26,66a
Paecilomyces sp 2	21,66a	21,66a	25a
Paecilomyces sp CG 301	13,33a	13,33a	13,33a
Placebo	6,66a	8,33a	8,33a
Controle	3,33a	8,33a	10a

Taxas de mortalidades seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Não houve diferenças significativas nas linhas analisadas pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

desafiada com os isolados de *M. anisopliae* CG 30 e CG 46 diferiram significativamente quando comparados com os demais tratamentos através da análise de variância e teste de Tukey ($p<0,05$) nas concentrações de 10^8 e 10^7

esporos/mL, apenas os fungo *M. anisopliae* diferiu significativamente dos demais tratamentos na concentração de 10^6 esporos/mL (Tabela 3). Os demais fungos, apesar de terem taxas de mortalidade maiores que a dos grupos controle, não diferiram significativamente destes (p>0,05).

Os valores obtidos quando corrigidos através da fórmula de Abbot (1925) item 3. 4 , são apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem da eficácia dos isolados em diferentes concentrações sobre a mortalidade de larvas pós-alimentar de *M. domestica*.

Isolados	Eficácia obtida em diferentes concentrações de esporos/mL		
	10^6	10^7	10^8
Trichoderma sp 3	8,93 a	1,83a	10,96a
Trichoderma harzianum CG 502	17,85a	21,90a	27,4a
Metharizium anisopliae CG30	55,35b	56,63b	63,93b
Metharizium anisopliae CG46	23,21a	31,05ab	45,67ab
Cladosporium cladosporioide CG634	17,85a	18,27a	26,92a
Beauveria brongniantii CG 619	10,71a	14,61a	16,44a
*Beauveria bassiana**	10,71a	10,96a	14,61a
Paecilomyces sp 3	16,07a	14,61a	18,27a
Paecilomyces sp 2	14,29a	12,79a	20,09a
Paecilomyces sp CG 301	7,14a	5,48a	5,48a

Taxas de mortalidades seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05). Não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey (p>0,05) nas linhas.
Eficácia= mortalidade corrigida pela fórmula de Abbot (1925).
* Fungo utilizado no produto comercial BOVERIL da ITAFORTE BIOPRODUTOS.

Com os resultados dos tratamentos nas diferentes concentrações, foi realizado o teste estatístico de Probit, onde foi verificado a CL_{50} e CL_{90} para os diferentes isolados (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração letal (CL_{50} e CL_{90}) obtidos pela análise de Probit para as concentrações de conídios dos isolados submetidos aos bioensaios para larvas de 3º instar de *M. domestica*.

Isolado	CL_{50}	CL_{90}
Trichoderma sp 3	$4,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
Trichoderma harzianum CG 502	$2,9 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$
Metharizium anisopliae CG30	$9,6 \times 10^7$	$4,8 \times 10^8$
Metharizium anisopliae CG46	$1,0 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
Cladosporium cladosporioide CG 634	$2,6 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$
Beauveria brongniantii CG 619	$5,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$
*Beauveria bassiana***	$4,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
Paecilomyces sp 3	$4,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
Paecilomyces sp 2	$9,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^9$
Paecilomyces sp CG 301*	-	-

*Não foi possível realizar a análise de Probit para esse isolado devido suas médias de mortalidades não terem variado nas diferentes concentrações testadas.
** Fungo utilizado no produto comercial BOVERIL da ITAFORTE BIOPRODUTOS.

Os fungos *M. anisopliae* CG 30 e CG 46 apresentaram os maiores valores de eficácia de mortalidade em relação aos demais fungos. Na concentração de 10^6 os valores de mortalidade para os fungos *M. anisopliae* CG 30 e CG 46 foram 55,35 e 23,21% respectivamente, sendo que apenas o

fungo *M. anisopliae* CG 30 diferiu significativamente dos demais isolados. Nas concentrações de 10^7 e 10^8, os fungos *M. anisopliae* CG 30 e CG 46 diferiram dos demais fungos na mortalidade pela taxa de eficácia, obtendo valores de mortalidade de 56,63 e 31,05% respectivamente na concentração de 10^7 esporos por ml, e 63,93 e 45,67% respectivamente na concentração de 10^8 esporos por ml (Tabela 4).

A análise Probit revelou através da curva de regressão linear, que a concentração de esporos/mL dos fungos *M. anisopliae* CG 30 e CG 46 para a CL_{50} são $9,6x10^7$ e $1x10^8$ esporos/mL respectivamente, enquanto para a CL_{90} esses valores foram $4,8x10^8$ e $3,7x10^8$ esporos/mL respectivamente (Tabela 5).

A eficiência de *M. anisopliae* em controlar larvas e adultos de *Musca domestica* já foi verificada por diferentes autores (Carswell *et al.*, 1998; Bernadi *et al.,* 2006; Barson *et al,* 1994). Bernadi *et al.* (2006); Barson *et al.* (1994) observaram um aumento da mortalidade de *M. domestica* a medida que a aumentava a concentração de esporos. Esses resultados sugerem que *M. anisopliae* é um promissor controlador de larvas de *M. domestica* quando comparado aos demais fungos testados neste experimento. Renn *et al.,* (1999) demonstraram, usando uma isca formulada, com *M. anisopliae* que a mortalidade de *M. domestica* se deu também pela infecção das moscas por indivíduos atingidos por uma dose letal de conídios. Isso se torna relevante, pois através do contato das moscas sadias com moscas infectadas e com o fungo esporulado em sua cutícula ocorrerá a transmissão horizontal do fungo pela população do inseto contribuindo para o decréscimo populacional.

Os fungos *T. harzianum* CG 502 e *Trichoderma* sp. 3 não foram eficientes em controlar as larvas de *Musca domestica* quando comparados com os fungos *M. anisopliae* CG 30 e CG 46. Ambos não diferiram significativamente entre si apesar do *T. harzianum* CG 502 ter conseguido uma mortalidade de 23, 28,33 e 33,33% nas concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 respectivamente, enquanto o fungo *Trichoderma* sp 3 apresentou mortalidade de 15, 10 e 18,33% nas concentrações de esporos de fungos. O aumento da concentração de esporos/mL de cada isolado em questão não apresentou significância quando comparados isoladamente. Sua taxa de mortalidade quando comparados com os grupos controles também não foram significativos (Tabela 3).

A eficácia do fungo *Trichoderma* sp 3 apresentou valores de 8,93; 1,82 e 10,96% nas concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 esporos/mL, valores esses muito abaixo dos obtidos pelo fungo do mesmo gênero *T. harzianum* CG 502 que foram 17,85, 21,90 e 27,4% nas concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 esporos por mL.

Os valores obtidos pela análise de Probit do *Trichoderma* sp 3 foram $4{,}8x10^8$ (CL_{50}) e $1{,}0x10^9$ (CL_{90}) enquanto para *T. harzianum* CG 502 foram $2{,}9x10^8$ (CL_{50}) e $8{,}3x10^8$ (CL_{90}).

Apesar do fungo *T. harzianum* ser denominado de entomopatogênico, sua principal utilidade registrada em pesquisas científicas é como antagonista de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (Almeida, 2007a; Howell, 2003; e *Pythium ultimum* (Harmam *et al.*, 2004b) entre outros. Espécies do gênero *Trichoderma* vêm sendo utilizadas com sucesso no controle de

fitopatógenos de solo, por serem capazes de proteger plantas por meio de diferentes mecanismos de ação (parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência), e por colonizar eficientemente o substrato e o sistema radicular de várias espécies de plantas (Harman *et al.*, 2004a; Harman, 2006; Woo *et al.*, 2006). Porém, com os resultados obtidos nos bioensaios com larvas de *M. domestica* ficou claro que *T. harzianum* tem potencial para controlar esses insetos, talvez seu uso combinado com algum controle químico, poderia mostrar resultados mais satisfatórios no uso como agente de biocontrole entomopatogênico.

Os resultados dos bioensaios obtidos pelo fungo entomopatogênico *C. cladosporioide* CG 634 contra larvas de 3º instar de *M. domestica* foram 23,33; 25 e 33,33% nas concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 esporos/mL respectivamente. Resultados esses idênticos aos registrado para o fungo *T. harzianum* CG 502 nas mesmas concentrações de 10^6 e 10^8 esporos/mL. A eficácia do fungo *C. cladosporioide* CG 634 foi de 17,85; 18,27 e 26,92%, o que apesar de ter causado mortalidades em larvas de *M. domestica*, não apresentaram a mesma eficiência que os fungos *M. anisopliae* CG 30 e CG 46. Os valores obtidos na análise de Probit foram $2,6x10^8$ (CL_{50}) e $7,5x10^8$ (CL_{90}).

O *C. cladosporioide* é um fungo entomopatogênico de ocorrência natural, também usado amplamente no controle biológico de diversas espécies de insetos. Esse fungo foi a espécie que mais ocorria parasitando populações de dípteros em estudo realizado por Greif & Currah, (2007) e o mesmo foi isolado de adultos de *M. domestica* capturadas em depósitos de lixo (Sales *et*

al., 2002). É considerado também um fungo endofítico, vivendo no interior dos grãos de café sem causar danos aos mesmos e está largamente disseminado no ar e em matéria orgânica (Oliveira *et al.*, 2004). Devido a suas característica peculiares, vale ressaltar que em relação a este fungo, há várias discussões no sentido de defini-lo como um entomopatógeno oportunista, simples saprófita, semi-parasita, parasita fraco, bem como, fitopatogênico.

Os fungos entomopatogêncios *B. bassiana* e *B. brongniantii* CG 619 apresentaram resultados bastante parecidos nos testes aos quais foram submetidos. Nos resultados de mortalidade confirmada, *B. bassaiana* obteve 16,66; 18,66 e 21,66% de mortalidade sobre larvas de 3º instar de *M. domestica* respectivamente, enquanto *B. brongniantii* CG 619 obteve 16,66; 21,66 e 23,33% de taxa de mortalidade. Nos resultados da análise estatística não foi encontrado diferença significativa quando se comparou a mortalidade de cada fungo nas diferentes concentrações e também quando se comparou os resultados de mortalidade entre eles (P> 0,05).

O fungo *B. brongniantii* CG 619 se obteve uma eficácia 10,71; 14,61 e 16,44% de mortalidade corrigida nas concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 esporos/mL respectivamente, resultados esses que foram maiores do que os obtidos pelo fungo *B. bassiana,* 10,71; 10,96 e 14,61%, de mortalidade corrigida nas concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 esporos/mL respectivamente.

Na análise de regressão de Probit, o fungo *B. brongniantii* CG 619 obteve de resultado em esporos/mL os valores de $5{,}4x10^8$ (CL_{50}) e $1{,}3x10^9$ (CL_{90}), o fungo *B. bassiana* obteve os valores de $4{,}4x10^8$ (CL_{50}) e $1{,}0x10^9$ (CL_{90}).

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* já foi isolado de indivíduos de *M. domestica* onde obteve sua ocorrência registrada como causador de infecções naturais nesse inseto (Siri *et al.*, 2005, Steinkraus *et al.*, 1990). Greif & Currah (2007) observaram que *Beauveria bassiana* foi a segunda espécie que mais ocorria em dípteros analisados por eles.

Os resultados obtidos nos bioensaios resultando na baixa eficiência de mortalidade do fungo *B. bassiana* para larvas de *M. domestica* também foi obtido por Bernardi *et al.* (2006), enquanto outros pesquisadores relatam registros de uma mortalidade maior que 90% de *M. domestica* quando submetidas ao fungo *Beauveria bassiana* (Barson *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1995; Leucona *et al.*, 2005).

O fungo *B. brongniantii* CG 619 obteve uma baixa taxa de mortalidade, resultados estes também obtidos por Barson *et al.* (1994) que nos bioensaios obtiveram 8% de mortalidade quando testaram a concentração de 10^4 conídios/moscas. Entretanto, resultados obtidos por Cova *et al.,* (2009b), mostraram uma taxa de mortalidade de 99% das moscas submetidas a bioensaios com a concentração de 10^7 esporos/mL durante 9 dias.

Os fungos *Paecilomyces* sp 3, *Paecilomyces* sp 2 e *Paecilomyces* sp CG 301 não foram competentes em controlar larvas de *M. domestica* quando submetidos aos testes de bioensaios. A taxa de mortalidade alcançada pelo *Paecilomyces*. sp 3 foi de 20, 20 e 26,66% nas concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 respectivamente. O fungo *Paecilomyces* sp2 foi um pouco melhor no nível de mortalidade quando testados as concentrações de 10^6 (21,66%) e 10^7 (21,66%), entretanto não conseguiu superar o fungo *Paecilomyces* sp3 nas

concentração de 10^8, onde o fungo *Paecilomyces* sp 2 conseguiu uma taxa de mortalidade de 25%. O fungo *Paecilomyces* sp CG 301 foi o fungo desse gênero que obteve as menores taxas de mortalidades, sendo 13,33% em todas as concentrações testadas.

Quando essas taxas de mortalidades confirmadas foram corrigidas através da fórmula de Abbott (1925), foi observado que esses três fungos obtiveram uma eficiência de mortalidade na concentração de 10^6 esporos/ mL maior do que na concentração de 10^7 esporos/mL, sendo os resultados para a concentração de 10^6 para *Paecilomyces* sp 3 (16,07), *Paecilomyces* sp 2 (14,29)e *Paecilomyces* sp CG 301 (7,14), enquanto na concentração de 10^7 esporos/mL as taxas de eficácia foram de 14,61; 12,79 e 5,48% para *Paecilomyces* sp 3, *Paecilomyces* sp 2 e *Paecilomyces* sp CG 301 respectivamente. Quando analisados as taxas de eficácia entre esses três fungos na concentração de 10^8, observou-se que o fungo *Paecilomyces* sp 2 conseguiu a melhor taxa de eficácia, sendo 20,09%, o fungo *Paecilomyces* sp 3 com 18,27% e *Paecilomyces* sp CG 301 com 5,48%.

Submetendo os valores obtidos com as taxas de mortalidades confirmadas a análise de Probit, foi obtido os valores de CL_{50} onde o fungo *Paecilomyces* sp3 ($4{,}0x10^8$), *Paecilomyces* sp (2 $9{,}3x10^8$) e os valores de CL_{90} foram $1x10^9$ e $2{,}4x10^9$ para *Paecilomyces* sp 3 e *Paecilomyces* sp 2 respectivamente. Não foi possível calcular os valores de CL_{50} e CL_{90} para o fungo *Paecilomyces* sp CG 301 pois os resultados de mortalidade não variaram conforme mudavam as concentrações usadas nos bioensaios.

O gênero *Paecilomyces* reúne diversas espécies entomopatogênicas (Alves, 1998c) e espécies desse gênero já foram isolados de dípteros (Greif & Currah, 2007). Em um trabalho realizado, buscando determinar quais fungos residiam em adultos de *Musca domestica*, Fernandes (2007) isolou, entre outros gêneros de fungos, espécies de *Paecilomyces* em *M. domestica* oriundas de um aviário comercial.

Nos resultados conseguidos neste experimento, as espécies do gênero *Paecilomyces* submetidas aos testes de bioensaios, não foram eficientes em controlar as larvas de *M. domestica*, A análise de Tukey não apresentou diferença significativa ($p<0,05$) quando comparados com os grupos controles. Entretanto, resultados contrários a estes conseguidos neste experimento, foram os apresentados por Barson *et al.* (1994) onde, bioensaios em adultos de *M. domestica* com *P. farinosus* na concetração de $1x10^5$ esporos/mL obteve uma taxa de mortalidade de 100% em nove dias de duração dos bioensaios.

Embora todos os fungos testados nos bioensaios tiveram uma taxa de mortalidade maior que a dos grupos controle, ficou claro aqui neste experimento que alguns fungos possuem a capacidade de controlar a população de *M. domestica* através da mortalidade de larvas de 3º instar , sendo as espécies de *M. anisopliae* as mais competentes para essa função, como já anteriormente confirmada por Barson *et al.* (1994) e Bernardi *et al.* (2006). A seleção do fungo *M. anisopliae* CG 46 para o teste em campo na tentativa de controlar a população de *M. domestica,* se confirmou devido à análise de Probit demonstrar que uma menor concentração de esporos/mL de

Metarhizium anisopliae CG 46 era capaz de matar 90% dos indivíduos (CL_{90} = $3,7x10^8$) enquanto o *M. anisopliae* CG 30 necessita uma concentração $4,8x10^8$ esporos/mL para controlar 90% da população das moscas (CL_{90} = $4,8x10^8$).

Ainda são poucos os trabalhos encontrados na literatura onde se busca formas alternativas de controlar *M. domestica*, inseto este que vem causando vários problemas nos estabelecimento de criações de animais e mesmo dentro das cidades.

A prática do controle biológico está, cada vez mais, ganhando reconhecimento e espaço devido a sociedade estar buscando tratamentos alternativos que promovem a conservação da natureza e assim diminuam a contaminação do meio ambiente com resíduos químicos liberados com os inseticidas, além de evitar outros problemas como o surgimento de resistência por parte dos insetos.

4.4. Controle biológico no aviário de postura

4.4.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH) da cama do aviário

Foram realizados 10 determinações em pontos aleatórios da cama do aviário para avaliar o pH do local. Todos as medições apresentaram o valor de pH igual a 8,0.

Um dos principais critérios a ser previamente averiguado antes de se iniciar uma programa de controle microbiano de insetos é estabelecer em quais paramentos ambientais o fungo será introduzido, a determinação do pH é um desses paramentos. Segundo Alves & Leucona (1998), o pH ideal para desenvolvimento de *M. anisopliae* é pH 6,9, entretanto, este fungo pode tolerar uma ampla variação de pH que vai de 2,0 a 8,5. Segundo Hallsworth & Magan (1996), o fungo *M. anisopliae* consegue regular o seu pH cistólico mais efetivamente do que muitas espécies que tem restrita a faixa de pH para seu desenvolvimento. Ainda, segundo Hallsworth & Magan (1996), *Metarhizium* spp tiveram um ótimo crescimento em pH que variavam entre 5,0 e 8,0, sendo que ocorriam um declínio de crescimento acima ou abaixo desses valores.

Arruda (2005), verificou que diferentes isolados de *Metarhizium* ssp, toleraram bem variações de pH entre 4,0 e 9,0 e que, todos os isolados se desenvolveram não ocorrendo grandes declínios de crescimento ou da esporulação nessa faixa de pH.

4.4.2 Determinação do teor de umidade e temperatura da cama do aviário

A média das temperaturas mensuradas na cama do aviário, no dia do ensaio, foi de 28ºC, sendo que a média do valor referente à umidade relativa da cama do aviário foi de 55%.

Esses fatores ambientais como temperatura e umidade, podem diminuir ou inibir a ação dos fungos entomopatogênicos pelo simples fato de limitarem o seu desenvolvimento na superfície do inseto (Fargues *et al.*, 1997 e

Arthurs & Tomas, 2001). A maioria dos fungos entomopatogênicos necessita de uma umidade relativa de cerca de 90% e uma temperatura adequada para o crescimento e germinação, formação do tubo germinativo e infecção (Inglis *et al.*, 2001).

Segundo Hallsworth & Magan (1996), Ouedraogo *et al*. (1997) e Dimbi *et al*. (2004), a temperatura ideal para o desenvolvimento de *Metarhizium* spp é de 25ºC. Outros pesquisadores já concluíram que a melhor temperatura para crescimento e esporulação de *M. anisopliae*, para a maioria dos isolados testados foi de 28°C (Arruda, 2005). Hallsworth & Magan (1999) relatam pela primeira vez a presença de isolados de *Metarhizium* spp capazes de crescer a 40°C em meio Sabouraud dextrose ágar (SDA).

A umidade determinada pelos pontos aleatórios na cama do aviário (55% U.R.) ficou próxima da ideal para o desenvolvimento do *M. anisopliae* como demonstra Arzumanov *et al.* (2005), onde em estudo realizado com o objetivo de maximizar a taxa de esporulação deste fungo, revelou que o nível de umidade ideal é entre 57-58%. Outros pesquisadores avaliando a taxa de sobrevivência de *M. anisopliae* em diferentes níveis de umidade em solos, mostraram que o maior tempo de sobrevivência de *M. anisopliae* nos solos ocorria quando esse era inoculado em solos com 75% de umidade a 28°C, ficando viável por até 120 dias (Guerra *et al.*, 2009). Resultados semelhantes aos apresentados aqui foram encontrados por Lanza *et al.* (2009). Esses pesquisadores concluíram que o teor de umidade de 65% no solo favorece o rápido crescimento do fungo.

4.4.3 Aplicação do fungo no aviário.

As nebulizações ocorreram durante dez semanas consecutivas durante o período de tratamento nos galpões 14 e 17, sendo que o galpão 14 foi usado para a aplicação dos bioinseticidas enquanto o galpão controle não recebeu nenhum tipo de intervenção para fins de reduzir a população de moscas no local.

Foi realizado durante uma semana antes do início das aplicações dos bioinseticidas, um levantamento populacional de *M. domestica* e nesse primeiro levantamento populacional foi observado uma densidade populacional maior no galpão controle do que no galpão teste, diferindo significativamente entre eles (Tabela 6)

Tabela 6. Médias das populações de *M. domestica* capturadas nos galpões usados nos testes de controle biológico durante dez semanas consecutivas.

Teste/		Metarril®				*M. anisopliae* CG 46				
semanas	1	2▲[1]	3▲[2]	4▲[3]	5	6Δ[1]	7Δ[2]	8Δ[3]	9	10
Fungo	35,78a	116,4a	38,89a	146,56a	842,56a	159,44a	75,89a	47a	41,88a	143,2a
Controle	53,33b	151a	62,44b	241,11b	621,78a	203,11a	105,78b	117,67b	88,67b	229b

Dentro da mesma coluna, as médias seguidas das mesmas letras não se diferem significativamente pelo teste de Tukey (p>0,05).
▲período de aplicação do produto comercial Metarril WP®.
Δ período de aplicação do fungo *M. anisopliae* CG 46.

Na segunda semana após o início do experimento, foi iniciada a aplicação do produto comercial Metarril WP® da empresa ITAFORTE BIOPRODUTOS e estas aplicações aconteceram por três semanas consecutivas. Como observado na tabela 6 e figura 9, o produto comercial Metarril WP apresentou um discreto controle até a 4º semana de teste, ocorrendo então um grande aumento populacional de *M. domestica* na 5º semana, quando a população de moscas no galpão teste ultrapassou a

densidade populacional do grupo controle que até então era superior a do galpão teste.

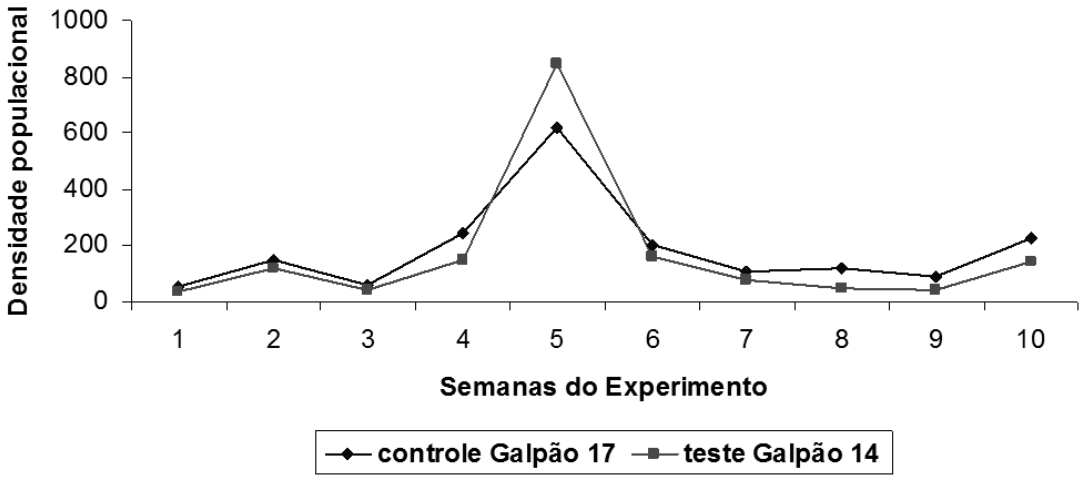

Figura 9. Gráfico referente as médias populacionais obtidas através das coletas de *M. domestica* em armadilhas.
O inicio da aplicação do Metarril ocorreu da segunda semana até a quarta semana. O fungo *M. anisopliae* CG 46 foi aplicado da sexta semana até a oitava semana.

No início da sexta semana, teve então o início da aplicação do fungo *M. anisopliae* CG 46 cultivado em arroz cozido para esse experimento. Conforme mostrado na tabela 6, o fungo reduziu a população de *M. domestica* quando comparado a população do grupo controle a partir da sétima semana (Figura 9) mantendo diferença significativa entre a população do galpão controle (Tabela 6), demonstrando um considerado controle residual após o término da aplicação.

Não foi possível observar moscas com sintomas de infecção por fungos entomopatogênicos devido a elevada população de predadores de moscas existente no local. Quando se observava alguma mosca incapacitada

de voar, logo em seguida ela era predada por aranhas que habitam o local e as demais moscas que eram encontradas mortas no chão não apresentavam nenhum sintoma de infecção por entomopatógenos. Fizeram-se algumas tentativas de isolar o *M. anisopliae* de moscas coletadas no galpão, onde foi realizada, a aplicação do fungo, mas não foi confirmada a presença de *M. anisopliae* quando as moscas eram colocadas em câmaras úmidas.

É interessante notar que a densidade populacional de *M. domestica* teve um pico de crescimento na quinta semana do estudo, onde as populações de moscas do galpão, no qual estava sendo aplicado o Metarril WP chegou a ultrapassar a população do galpão controle. Observando os dados meteorológicos de precipitação pluviométrica para as semanas em que ocorreram os estudos, podemos associar o pico de densidade populacional ao aumento da precipitação na região de Montes Claros-MG (figura 10).

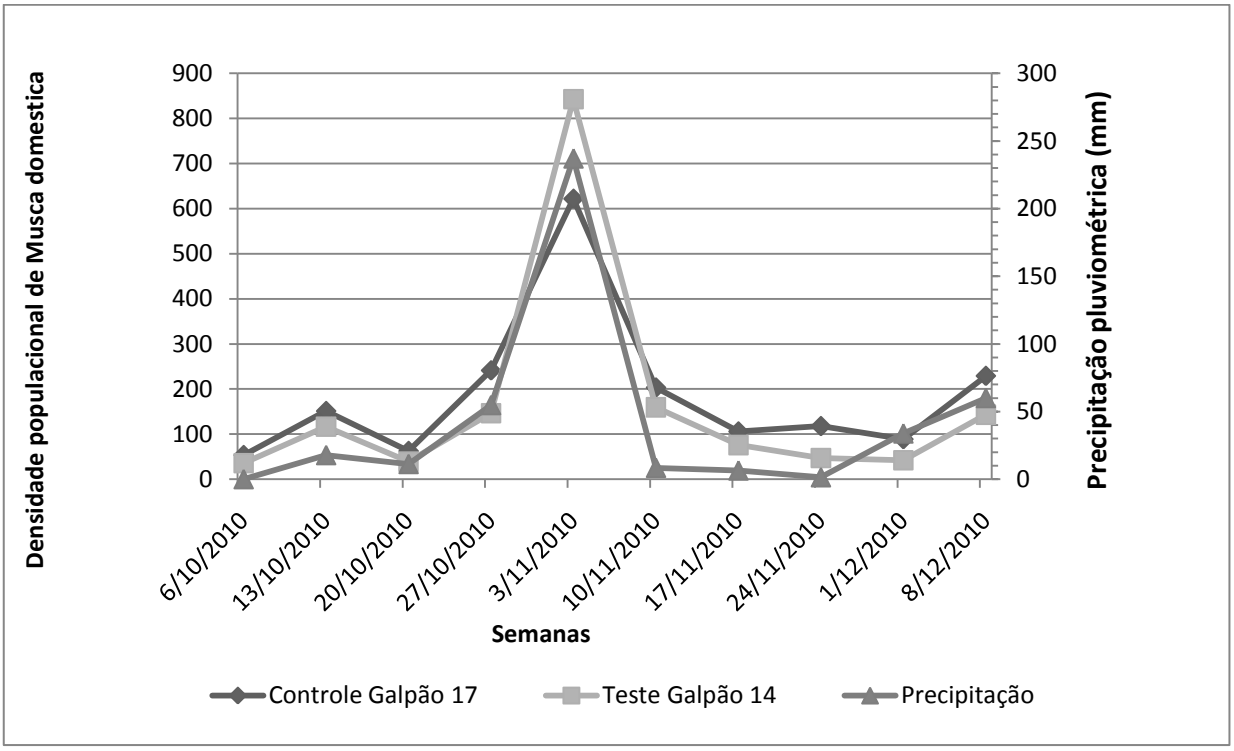

Figura 10. Comparação entre precipitação pluviométrica e densidade populacional de *M. domestica* nos galpões testados. Dados de precipitação informados pela estação meteorológica da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES).

A *M. domestica* é um inseto que tem uma flutuação populacional que oscila dependendo das condições climáticas como temperatura e umidade (Teixiera *et al.*, 2008). Como observado neste experimento a densidade populacional responde de forma positiva aos níveis de precipitações ocorridas na região do aviário. Almeida (1996) e Buralli & Guimarães (1985) também constataram mudanças na densidade populacional de *M. domestica* à medida que ocorriam variações nas precipitações, sendo que a população desta mosca sempre crescia à medida que as precipitações aumentavam e o contrário

também ocorria, isto é, queda nas precipitações ocorre um declínio na densidade populacional de *M. domestica*.

Como mostram os resultados, a tentativa de controle não obteve a eficiência esperada em controlar a densidade populacional das moscas, entretanto, até o momento não foram encontrados no Brasil trabalhos descrevendo o controle de M. domestica com fungos entomopatogênicos. Outros pesquisadores já realizaram esse controle, de forma satisfatória, diminuíndo a população de *M. domestica* em aviários) aplicando *B. bassiana* (Kaufman *et al.,* 2005). Estes autores conseguram reduzir a população de moscas de forma mais satisfatoria do que aplicando um inseticida (piretróide). Do mesmo modo, Cova *et al.* (2009a), pulverizando esporos de *B. bassiana* e *B. brongniartii* na concentração de $9x10^7$ conídios/mL em 1200 m^2, reduziram significativamente a densidade das moscas adultas, sendo que, durante três semanas de aplicações (uma aplicação por semana) as reduções foram de 80, 81 e 100% para *B. bassiana* e 24, 85 e 95% quando se aplicou *B. brongniartii*. Outra tentativa de controle de *M. domestica* em aviários que ocorreu de forma eficiente, foi descrito por Cova *et al.,* (2006), onde aplicaram doses de $9x10^7$ conídios/mL em 15 litros d'água para uma área de 1200 m^2, reduzindo a densidade de *M. domestica* em 100%. Foram feitas uma aplicação por semana durante 3 semanas. Resultados similares foram obtidos por Cova *et al.,* (2009c) onde aplicaram $9x10^7$ conidios/mL em 15 litros d'agua, uma vez por semana durante três semanas e obtiveram uma mortalidade no final do experimento de 100% da população de *M. domestica* em galpões de aves, tanto para *B. bassiana* quanto para *B. brongniartii*.

O manejo integrado de pragas depende da avaliação e implementação de métodos de controle (cultural, químico e biológico) dessas pragas, levando em consideração as conseqüências econômicas, ecológicas e sociológicas. Essa implementação acarreta a tomada de decisões que leva em consideração cada variável em particular, assim como cada ambiente natural e diferem entre si de lugar pra lugar. Prado (2003) destaca que um manejo integrado de moscas deve ser elaborado e executado seguindo os seguintes passos: 1) detecção do problema; 2) monitoramento das populações e sua relação com o tempo e clima; 3) decisão e implementação das medidas de controle (cultural, biológico ou químico) e 4) monitoramento permanente de manutenção. Contudo, nem sempre o uso de apenas uma medida de controle é suficiente para controlar uma população de mosca, devendo alternar métodos de controle como os culturais, biológicos e químicos.

4. 5 Microscopia eletrônica de varredura das etapas de infecção

Foi observado nos exames em microscópio eletrônico de varredura das larvas de 3º instar de *Musca domestica* infectadas com o fungo *M. anisopliae* CG 46, que ocorreram os seguintes eventos: (A) adesão dos conídios na cutícula das larvas e o início da germinação; (B) germinação do conídio com formação do apressório; (C) tubo germinativo com apressório; (D) tubo germinativo e apressório; (E) longo tubo germinativo desenvolvido a partir do conídio com a formação do apressório na extremidade do tubo germinativo;

(F) extrusão do *Metarhizium anisopliae* através do corpo da larva de *M. domestica* (figura 11).

Durante o processo de infecção, foram observados tubos germinativos curtos e longos, com diferenciações das extremidades finais das hifas desenvolvendo-se em apressórios. Não foram observados locais de penetração das hifas, contudo, não pode-se afirmar que a patogenicidade do fungo se deu somente pela formação do apressório e/ou penetração deste na cutícula, mas também de outros fatores, tais como a produção de enzimas. Com essas observações, podemos afirmar que o fungo *M. anisopliae* CG 46 consegue infectar a larva de *M. domestica* de 3º instar. Desta forma a figura 11 descreve o mecanismo de infecção deste fungo em larvas de *M. domestica*.

Alves (1998b) afirma que a penetração mais usual dos fungos entomopatogênicos ocorre via cutícula através de atividade enzimática ou pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo (Alves, 1998b; Madelin *et al.*, 1967; Zacharuk, 1970).

Diante dos resultados alcançados por este experimento, podemos afirmar que a forma de utilização dos produtos formulados a base de *M. anisopliae* para controle de *M. domestica* é por pulverização de conídios viáveis nas larvas de *M. domestica*.

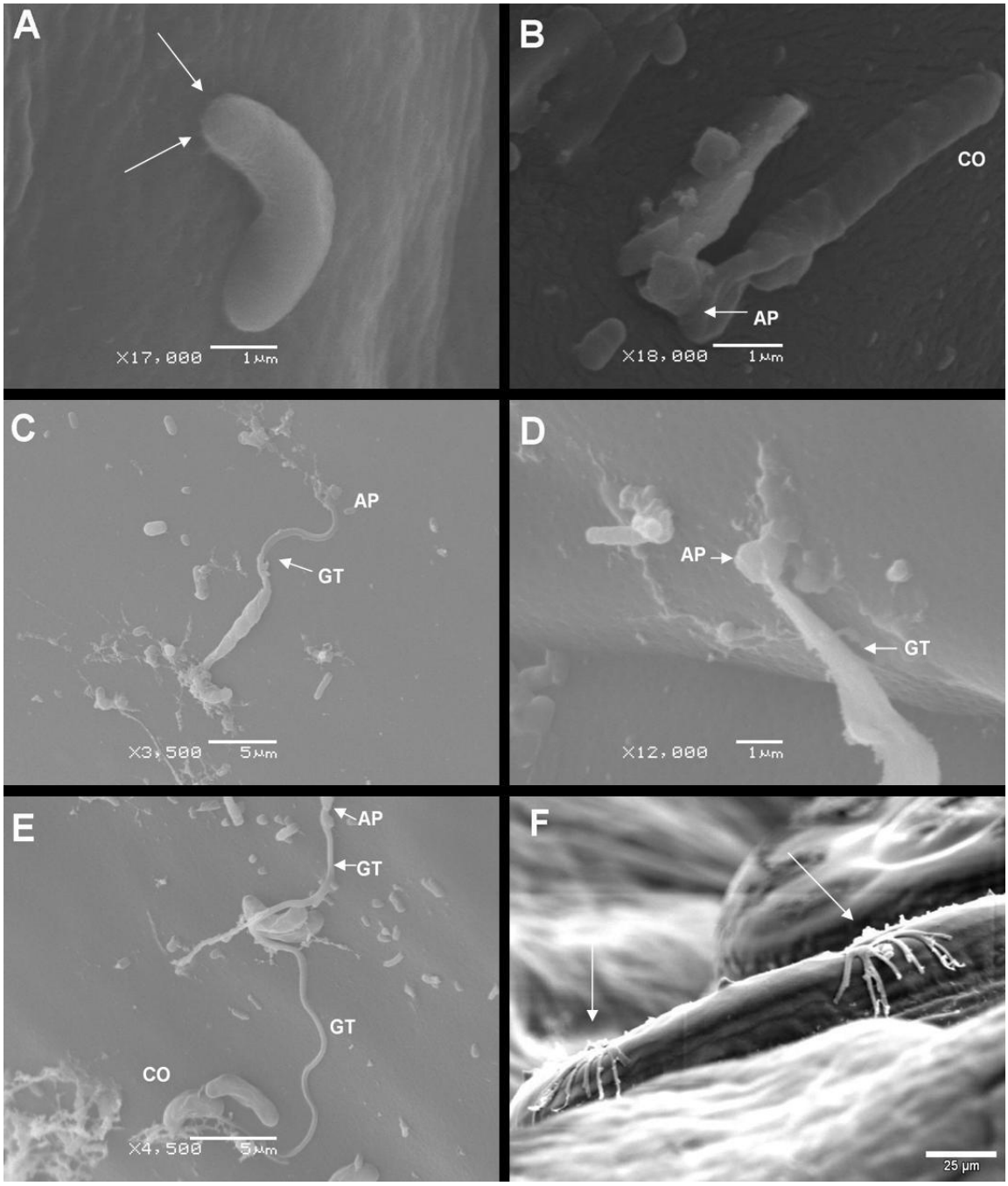

Figura 11. Etapas da infecção de *M. anisopliae* CG 46 em larvas de 3º instar de *M. domestica*. A: Detalhes do início da germinação (seta); B: germinação do conídio seguido da formação do apressório; C e D: Tubo germinativo com formação do apressório; E: conídio emitindo um longo tubo germinativo com um apressório em sua extremidade;,F: extrusão do fungo da cutícula da larva - setas. CO: conídio. GT: tubo germinativo. AP: apressório.

4.6 Descrição morfológica das células do sistema imunológico das larvas de *M. domestica*.

A análise em microscopia de contraste de fase em larvas de 3º instar de *M. domestica* revelou a presença dos seguintes tipos celulares (Figura 12): plasmatócitos (PL), granulócitos (Gr), prohemócitos (Ph), oenocitóides (Oe), além de fragmentos celulares como trombocitóides (Tb) e microagregados (Ma). Os quatro tipos de hemócitos identificados são relatados na literatura como alguns dos principais e mais freqüentes na hemolinfa de insetos, estando presentes em várias ordens (Silva *et al*, 2000 e Silva *et al* 2002), inclusive em dípteros (Kaaya & Ratcliffe, 1982).

Os plasmócitos eram células polimórficas, apresentando projeções citoplasmáticas, citoplasma abundante e contendo vesículas, núcleo central, arredondado ou ovalado (Figura 12 B, C e E).

Os granulócitos apresentaram formato esférico ou oval, tamanho variável, citoplasma com grânulos pequenos, geralmente esféricos e núcleo morfologicamente irregular (Figura 12 A, C, D e E).

Os prohemócitos variaram de esféricos a ovais, sendo as menores células observadas, núcleos volumosos e ocupando quase todo o citoplasma. O citoplasma escasso forma um halo ao redor do núcleo (Figura 12 A).

Os oenocitóides foram as maiores células observadas, com morfologia esférica e tamanho variável, O núcleo é pequeno e excêntrico, sendo observados vesículas e grânulos no citoplasma (Figura 12 B).

Os trombocitóides foram observados sendo estruturas celulares finas, anucleadas (Figura 12 F), que rapidamente se aglutinavam e

desapareciam das preparações citológicas. Somente com a adição de anticoagulante para hemolinfa de insetos, sua visualização foi possível.

Os microagregados celulares foram às maiores estruturas encontradas na hemolinfa das larvas, e apresentavam um grande número de granulócitos dentro ou em sua superfície (Figura 12 D).

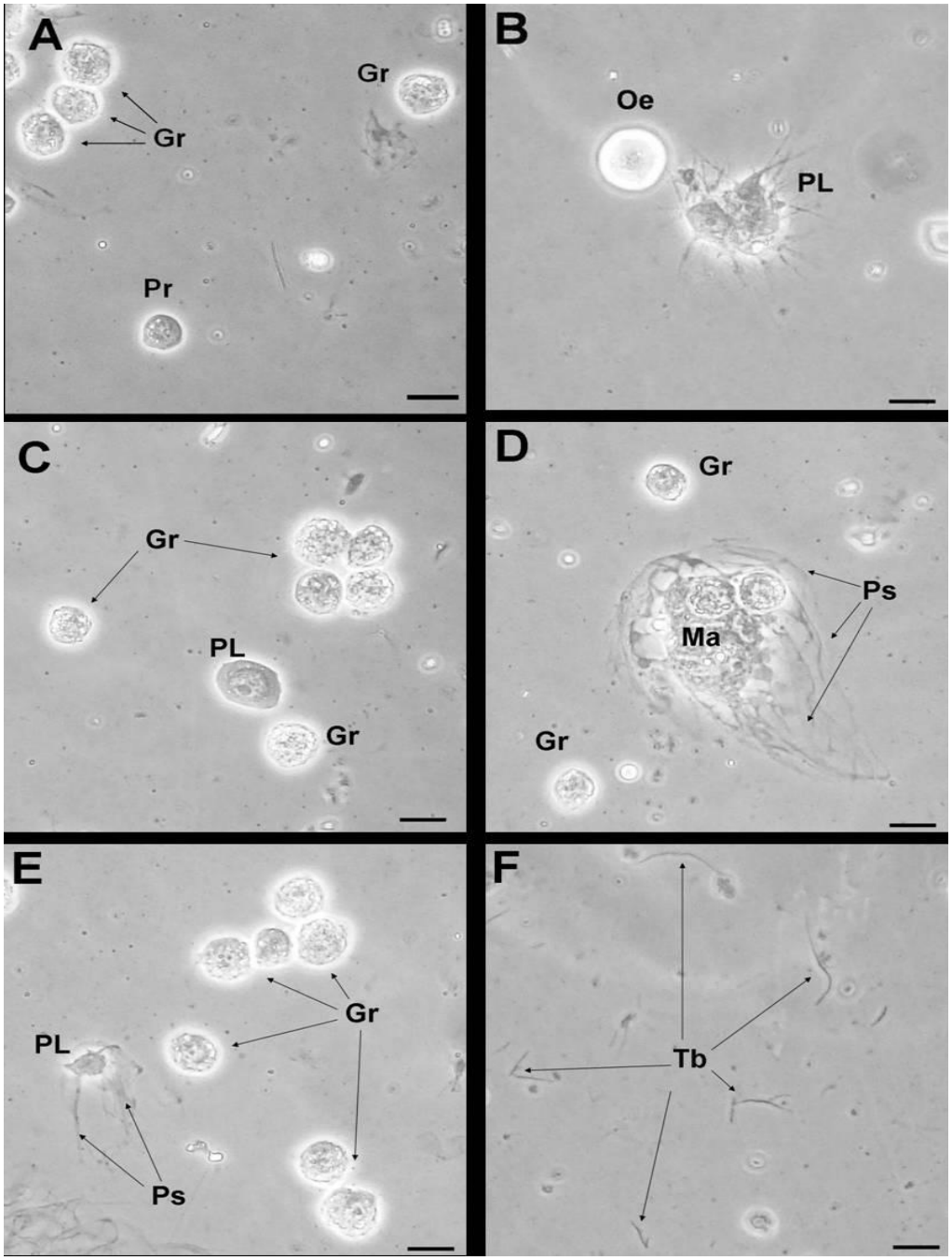

Figura 12. Hemócitos, fragmentos citoplasmáticos e microagregados de larvas de 3º instar de *M. domesti*ca. (PL: plasmócitos; Gr: granulócitos; PR: prohemócitos; Oe: oenocitóides; Ma: microagragados;Tb: trombocitóides e Ps: pseudópodes). Barra = 10 µm.

Os prohemócitos são relatados na literatura como um tipo celular que origina outros tipos celulares, sendo denominados *stem cells* (Lavine &

Strand, 2002; Negreiro, 2004). Estão presentes em maior freqüência nas larvas e pupas do que nos adultos de dípteros (Kaaya & Ratcliffe, 1982). Apresentam alto índice mitótico e após o período embrionário dos hemócitos, sua quantificação na hemolinfa não passa dos 5% do total de células (Gupta, 1979 e 1985). Foram constatados em estudos de diferenciação celular dos hemócitos, que os PR se diferenciam e se transformam em plasmatócitos (Lavine & Strand, 2002) e estes se diferenciam em granulócitos que se diferenciam em diversos tipos celulares presentes na hemolinfa (Gupta, 1979 e 1985; Kaaya & Ratcliffe, 1982) Os prohemócitos possuem um importante papel na manutenção da população de hemócitos em circulação devido a continua diferenciação em cada tipo celular (Lavine & Strand, 2002).

Plasmatócitos ovais ou redondos foram observados em vários dípteros por Kaaya & Ratcliffe (1982). Essas células são capazes de emitir longos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 12 B e Figura 13 A). Os plasmatócitos e granulócitos possuem uma enorme capacidade fagocitária e utilizam de enzimas lisossomais para destruir o invasor (Ratcliffe & Rowley, 1975 e 1987; Falleiros & Gregório, 1995). Essas células participam do processo de encapsulação e formação de nódulos de partículas grandes (Gupta, 1985) ou quando a concentração de patógenos é muito grande (Negreiro *et al.*, 2004). Os granulócitos são requeridos para iniciar, mediar e terminar o processo de encapsulação. Quando detectado um corpo estranho, os granulócitos formam uma monocamada sobre a partícula invasora, sendo seguido pelos plasmatócitos e finalizando com outra monocamada de plasmatócitos agregados, formando assim os microagregados (Figura 13 C). Tanto os

plasmatócitos quanto os granulócitos são incapazes de realizar o processo de encapsulação independentes (Fech & Strand, 1996).

O Oenocitóide é um hemócito responsável pela ativação de um complexo enzimático chamado profenoloxidase (proPO), sendo que a principal enzima ativada é a fenoloxidase, sintetizada e liberada por vesículas pelos oenocitóides (Figura B e D) (Kurihara *et al.*, 1992; Strand & Pech, 1995; Ribeiro *et al*, 1996). A fenoloxidase participa de uma cascata enzimática ativada pelos granulócitos através da exocitose de moléculas que acarretam a síntese de proteínas que aumentam a capacidade de adesão dos plasmatócitos ao corpo estranho ou patógeno, aumentando a ocorrência de exocitose de outros granulócitos e ainda produzindo quinonas tóxicas e/ou o processo de melanização que inativam ou destroem o invasor (Ratcliffe & Rowley, 1979).

Os trombocitóides são fragmentos celulares anucleados que tem um importante papel na aglutinação. Os trombocitóides são hemócitos instáveis que rapidamente se desintegram. Esses fragmentos citoplasmáticos frequentemente se aglutinam em um intrigado sistema de malhas (Kaaya & Ratcliffe, 1982).

Os hemócitos possuem outras funções além dos processos de defesas, são importantes para armazenar e distribuir nutrientes como carboidratos, fosfolipídios e proteínas para todo o corpo do inseto. Durante as ecdises, participam no processo de remodelação dos tecidos, além do transporte de hormônios, metabólitos e da reprodução (Crossley, 1979).

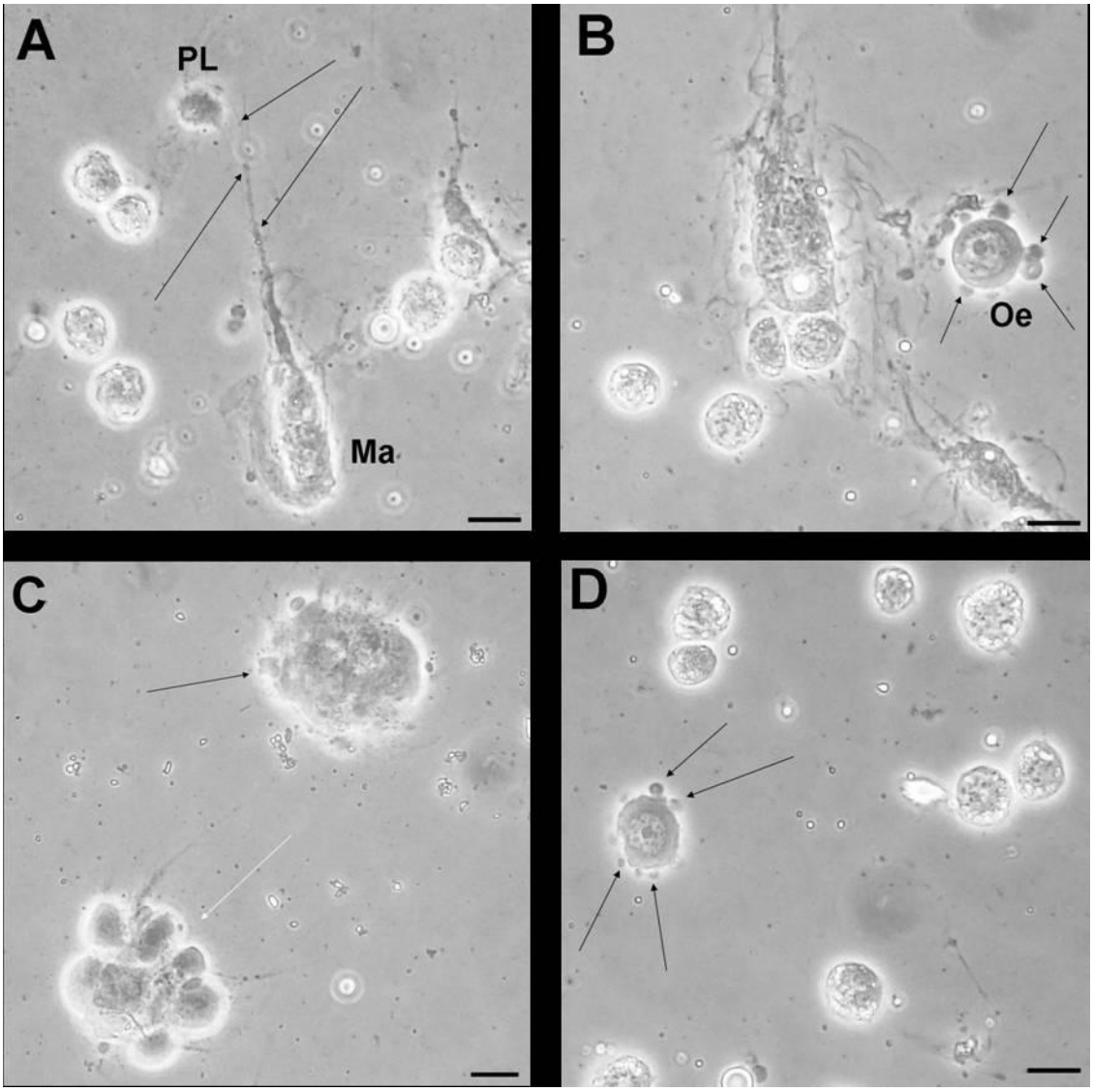

Figura 13. Hemócitos de larvas de 3º instar de *M. domestica*. **A.** As setas mostram projeções citoplasmáticas entre um microagregado e um plasmatócito. **B e D.** Oenocitóide liberando vesículas citoplasmáticas (setas). **C.** Dois microagregados em diferentes estágios de formação, seta branca mostra o microagregados no início da agregação e a seta preta mostra um microagregado já formado. Barra = 10 µm.

4.7 Contagem total de hemócitos durante a infecção por *M. anisopliae*.

Neste experimento, a média total de hemócitos encontrados na hemolinfa de larvas de 3º instar de *M. domestica* tratados com esporos de *M. anisopliae* CG 46 diferiram significativamente entre os tempos de infecções conforme mostrado na tabela 7.

Tabela 7. Médias de hemócitos encontrados na hemolinfa de *M. domestica* infectadas com esporos de *M. anisopliae* CG 46.

Tempo (horas)	0	21	48	72	96
Hemócitos	$4,9x10^4$ ab	$5,7x10^4$ b	$8,7x10^4$ d	$6,8x10^4$ bcd	$3,8x10^4$ a

As médias seguidas das mesmas letras não diferiram entre si no teste de Tukey a nível de significância de 5%.

Foi observado um aumento significativo no número de hemócitos desde o grupo controle até o intervalo de 48h seguido de uma diminuição gradual de hemócitos nos tempos de 72 e 96 horas de infecção (Figura 14).

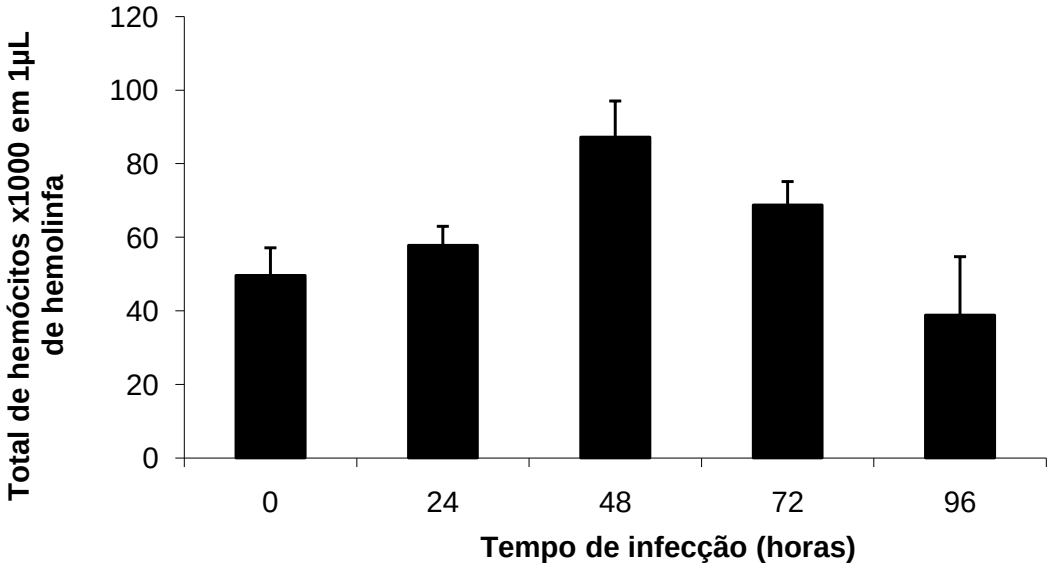

Figura 14. Numero total de hemócitos em 1µL de hemolinfa de larvas de *M. domestica* de 3º instar infectados com o fungo *Metarhizium anisopliae* CG 46, durante o período de 0, 24, 36, 72 e 96 horas.

A quantidade e os tipos de hemócitos encontrados na hemolínfa dos insetos podem revelar se está ocorrendo algum parasitismo nesse inseto. As alterações na contagem dessas células são os primeiros sinais da infecção (Russo *et al.*, 2001).

O aumento significativo na contagem dos hemócitos até o tempo de 48 horas em relação ao grupo controle seguido da redução dessas células até o tempo de 96 horas pode estar relacionado à presença de metabólitos secundários tóxicos produzidos pelo fungo. Dependendo da concentração do inóculo utilizado do fungo entomopatogênico, as células se tornam susceptíveis aos fungos. Um exemplo é o fato de esses fungos inibirem a atividade fagocitária dos plasmatócitos evitando a detecção dos seus corpos hifais, prejudicando a defesa do hospedeiro (Vilcinskas *et al.,* 1997; Fuguet & Vey, 2004; Wang & St. Leger, 2006). O *Metarhizium anisopliae* é um exemplo de fungo que atua liberando uma protease que inibe a atividade de adesão e de fagocitose dos plasmatócitos dos insetos infectados (Silva, 2002).

O estágio de desenvolvimento do inseto pode ter um grande efeito no número total de hemócitos na hemolinfa. Em *M. domestica*, o 1º e 2º instar possuem poucos hemócitos circulando. Mesmo no 3° instar, a hemolinfa desta mosca possui milhares de células por microlitro quando se encontra no 1º ou 2° dia do 3º instar, entretanto, a medida que vai se aproximando da maturidade larval e o inseto vai se preparando para a pupação, as células rapidamente aumentam na circulação, culminando em mais de 30000 células/µL de hemolinfa (Nation, 2001). Neste experimento, foi possível observar uma

resposta celular dos hemócitos até o período de 48 horas, culminando no declínio do número total dos hemócitos até o período de 96h, ficando a contagem das células em número bem menor do que a observada em larvas sem a infecção com o fungo. Com esses resultados, pode-se sugerir que o *Metarhizium anisopliae* CG 46 atuou inibindo a resposta imunológica das larvas após o período de 48 horas de infecção, ocasionando a morte das mesmas após o período de 96 horas de infecção.

4.8 Teste da taxa esporulação sob diferentes condições nutricionais de carbono e nitrogênio.

A figura 15 apresenta a taxa de esporulação observada para cada isolado em diferentes meios de culturas (item 3.5). A tabela 8 apresenta os resultados das comparações observadas entre os isolados para cada meio de cultura e entre eles.

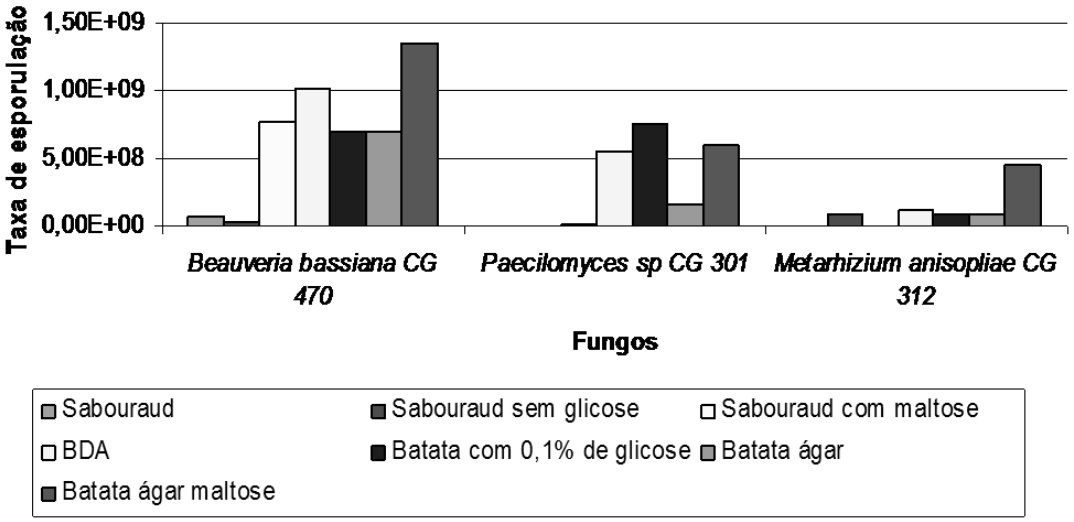

Figura 15. Taxa de esporulação obtidas com os isolados *B. bassiana* CG 470, *Paecilomyces* sp CG 301 e *M. anisopliae* CG 312 em resposta ao crescimento em diferentes condições nutricionais de carbono nitrogênio.

O melhor meio de cultura para a esporulação de *B. bassiana* CG 470 foi o meio de cultura Batata ágar maltose seguido do meio de cultura BDA que não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 7). O meio de cultura Sabouraud sem glicose foi o meio em que o isolado *B. bassiana* CG 470 esporulou menos e este meio apresentou diferença estatística dos demais meios de cultura analisados. Os outros meios de culturas analisados tiveram uma taxa de esporulação intermediária e não diferiram estatisticamente entre eles.

Tabela 8. Taxa de esporulação dos isolados em diferentes meios de culturas.

Meio de cultura	Fungos/ taxa de esporulção		
	CG 470	CG 301	CG 312
Sabouraud	$7,2x10^7$ Cb	$2,9x10^6$ Ba	$8,01x10^4$ Ab
Sabouraud sem glicose	$2,6x10^7$ Ba	$1,37x10^5$ Aa	$9,25x10^7$ Cc
Sabouraud com maltose	$7,7x10^8$ Cb	$7,65x10^6$ Ba	0 Aa
BDA	$1,03x10^9$ Abc	$5,50x10^8$ Ab	$1,20x10^8$ Ac
Batata com 0,1% de glicose	$7,0x10^8$ Ab	$7,60x10^8$ Ac	$9,10x10^7$ Ac
Batata ágar	$7,05x10^8$ Cb	$1,55x10^8$ Ba	$9,30x10^7$ Ac
Batata ágar maltose	$1,35x10^9$ Bc	$5,95x10^8$ Abc	$4,45x10^8$ Ad

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na mesma linha não diferem entre si, ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si, ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Legenda: CG 470: *Beauveria bassiana*; CG 301: *Paecilomyces* sp e CG 312: *Metarhizium anisopliae*.

O fungo *Paecilomyces* sp CG 301 obteve a maior taxa de esporulação no meio de cultura batata com 0,1% de glicose. Esse resultado não diferiu significativamente da taxa de esporulação conseguida no meio ágar batata com maltose onde o isolado teve sua segunda maior taxa de esporulação. No meio de cultura BDA, o fungo obteve a terceira maior taxa de

esporulação e este diferiu significativamente de todos os meios analisados. Nos outros meios de cultura analisados, o isolado apresentou baixa taxa de esporulação, sendo estatisticamente não significante quando comparados entre eles (Tabela 7).

Na avaliação do fungo *M. anisopliae* CG 312, foi observado que a maior taxa de esporulação se deu quando o fungo foi cultivado no meio de cultura ágar batata com maltose e este quando submetido a análise estatística foi significativamente diferente dos demais meios de culturas (Tabela 7). Foi constatado que o isolado não esporulou no meio de cultura Sabouraud com maltose, enquanto que taxa de esporulação obtida no meio de cultura Sabouraud diferiu estatisticamente dos demais meios analisados. Os demais meios analisados não apresentaram diferença significativa entre eles.

Comparando as taxas de esporulações entre os isolados, observamos que não houve diferença significativa entre eles para os meios de cultura BDA e Batata com 0,1% de glicose ($p > 0,05$). O resultado para o meio de cultura ágar batata maltose, mostrou que *Paecilomyces* sp CG 301 e *M. anisopliae* CG 312 não diferiram significativamente entre si enquanto o fungo *B. bassiana* CG 470 foi significativamente diferente quando comparado aos isolados CG 312 e CG 301. Para os demais meios de cultura, todos os isolados diferiram significativamente entre si (Tabela 7).

É interessante observar, pelos resultados exposto aqui, que quando as três espécies foram cultivados nos meio de cultura Sabouraud e BDA, todos os isolados tiveram as maiores taxas de esporulação no meio de cultura BDA (Fig. 15). Jabor *et al*. (2003) obteve resultados semelhantes comparando as

taxas de esporulação de sete isolados de *M. anisopliae* e em seu estudo, somente um isolado obteve maiores taxas de esporulação em meio de cultura Sabouraud, os outros seis isolados, apresentaram maiores taxas de esporulações em meio de cultura BDA e meio de cultura completo. Quando comparando a esporulação obtida pelos isolados nos meio Sabouraud e BDA, mas dessa vez sem adição de glicose, novamente observamos uma maior taxa de esporulação dos três isolados no meio BDA sem adição de glicose. Quando se adicionou glicose na concentração final de 0,1% no meio BDA, os fungos *B. bassiana* CG 470 e *M. anisopliae* CG 312 não apresentaram muita diferença, sendo que esses isolados apresentaram um discreto aumento na esporulação no meio ágar batata do que no meio batata ágar com 0,1% de glicose. Somente o fungo *Paecilomyces* sp CG 301 apresentou uma maior esporulação no meio batata com 0,1% de glicose (Figura15). Na avaliação para a adição de maltose nos meio de cultura BDA e Sabouraud, os fungos *B. bassiana* CG 470 e *M. anisopliae* CG 312 apresentaram as maiores taxas de esporulações quando cultivados no meio ágar batata maltose, demonstrando que de alguma forma esse açúcar influenciou positivamente na esporulação desses fungos. Para o fungo *Paecilomyces* sp CG 301, a adição de maltose no meio ágar batata também significou um aumento na esporulação, sendo o segundo meio de cultura onde ele obteve as maiores taxas de esporulação. Com exceção do isolado *B. bassiana* CG 470 que obteve uma boa esporulação no meio de cultura Sabouraud com maltose, para os demais isolados, a maltose não significou um aumento expressivo nas taxas de esporulação para estes fungos.

Monteiro (1988) *apud* Barbosa *et al.* (2002) demonstrou que glicose e sacarose foram as melhores fontes de carbono para o crescimento e esporulação de *P. marquandii* após dez dias de cultivo enquanto que para *M. anisopliae* e *B. bassiana*, as taxas de produção de esporos foram mais expressivas quando se usavam amido como única fonte de carbono.

Nos resultados aqui apresentados, observamos que quando a fonte de nitrogênio disponibilizada era oriunda da peptona presente no meio de cultura Sabouraud, todos os isolados apresentavam baixas esporulações, com exceção de *B. bassiana* no meio de cultura Sabouraud com maltose. Dados similares foram obtidos por Barnes *et al.* (1975), que quando submetidos os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em meios de cultura contendo a peptona como fonte de nitrogênio orgânico, esses isolados obtiveram os piores resultados de taxa de crescimento fúngico e esporulação entre os meios analisados. Resultados diferentes desses foram apresentados por Li & Holdom (1995), onde estudando fontes de nitrogênio para crescimento e esporulação de *M. anisopliae*, chegaram a conclusão que as maiores taxas de esporulação eram obtidas quando o fungo era crescido em meios que continham peptona da soja em comparação com várias outras fontes simples de nitrogênio como alguns aminoácidos.

Alguns fungos só são capazes de produzir esporos após terminar seu crescimento vegetativo. Quando os fungos são cultivados em meios de cultura, freqüentemente a concentração de nutrientes disponíveis são bem maiores do que seria encontrado por esses fungos na natureza, como conseqüência disso, pode ocorrer uma excessiva produção de metabólitos e

assim se acumular no meio de cultura tornando esse meio de cultura tóxico impedindo esporulação dofungo. Outro fator limitante é a falta de nutrientes disponíveis. Para muitos fungos, a redução do nitrogênio assimilável é um requisito para iniciar o processo de esporulação (Carlile *et al.*, 2001).

4.9 Atividade de enzimas extracelulares

A atividade dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* CG 470, *M. anisopliae* CG 312 e *Paecilomyces* sp CG 301 foram avaliados quanto a capacidade de cada espécie em produzir enzimas extracelulares quando submetidos em meios de culturas contendo o substrato específico para cada enzima avaliada (Figura 16). Os resultados gerais são apresentados na figura 17, 18 e 19 e 20. As análises estatísticas são apresentadas na tabela 9.

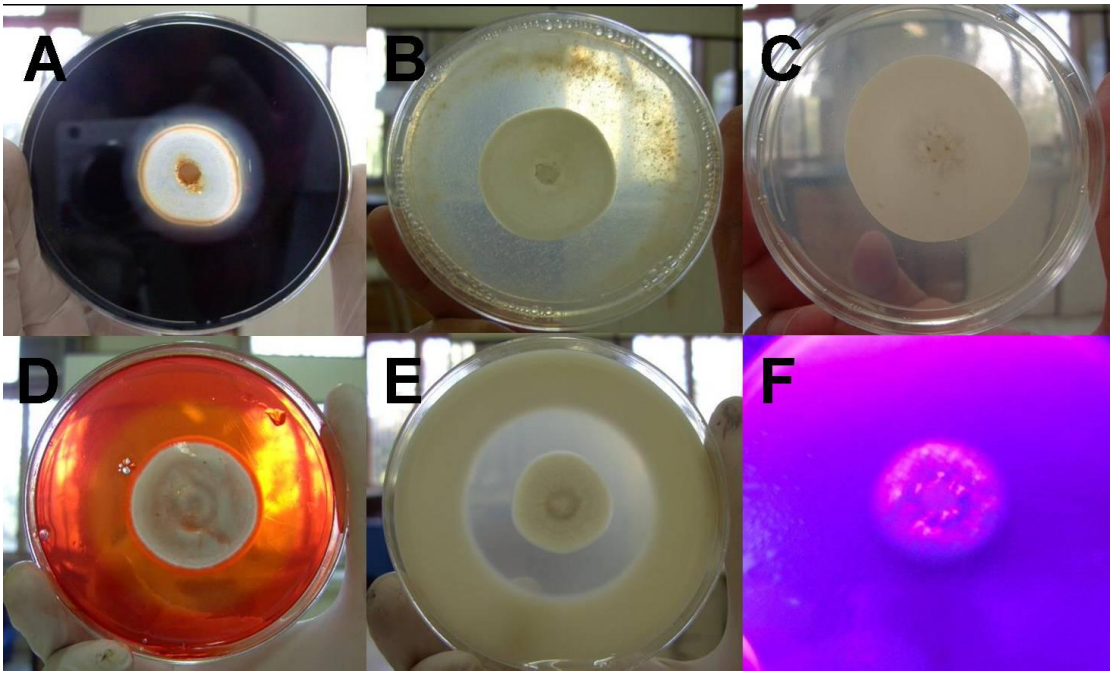

Figura 16. Halos produzidos pela hidrólise dos substratos disponibilizados nos meios de culturas pelas respectivas enzimas. A: amilase; B: caseínase; C: esterase; D: celulase; E: protease e F: lípase.

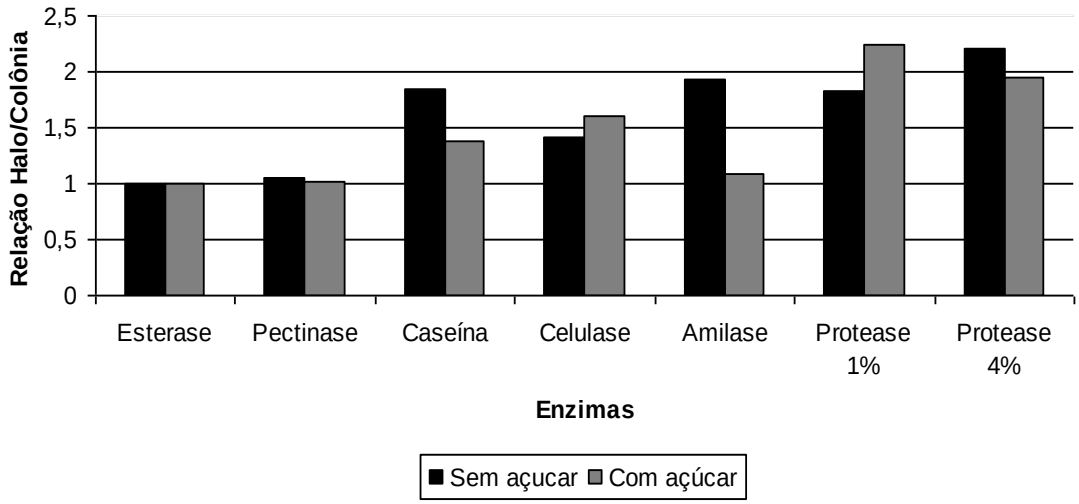

Figura17. Atividade de enzimas extracelulares para o fungo *Paecilomyces* sp CG 301.

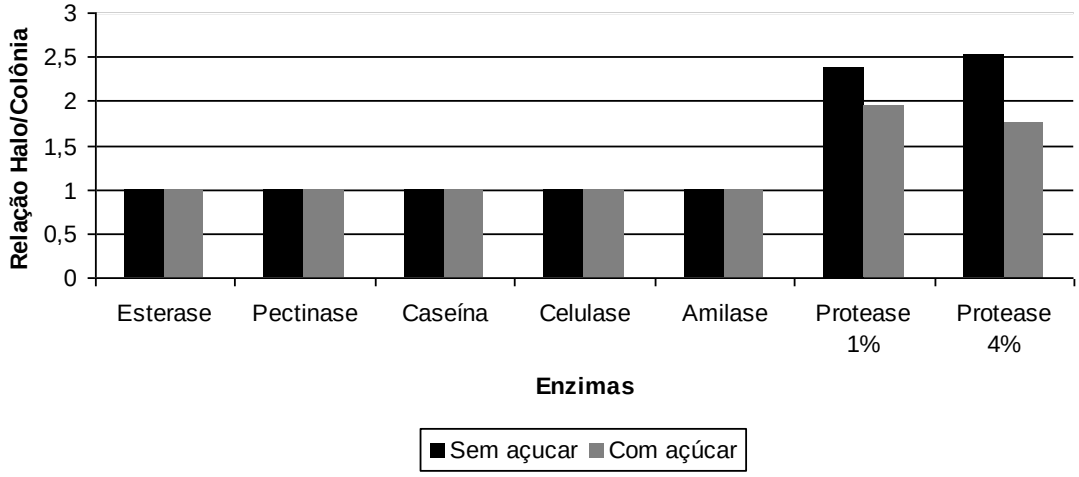

Figura 18. Atividade de enzimas extracelulares para o fungo *M. anisopliae* CG 312.

Na avaliação da atividade amilolítica, os fungos *Paecilomyces* sp CG 301 e *B. bassiana* CG 470 apresentaram uma maior relação H/C, se diferenciando do fungo *M. anisopliae* CG 312 que apresentou baixa atividade amilolítica. Nas análises estatísticas, houve diferença significativa entre os fungos *B. bassiana* e *Paecilomyces* sp em relação ao *M. anisopliae*. A adição

de glicose, mesmo em baixa concentração (0,1%), foi o suficiente para os fungos *B. bassiana* e *Paecilomyces* sp apresentarem uma menor relação H/C, sugerindo que na presença deste carboidrato, eles deixam de degradar o amido ou o deixam em segundo plano.

Os fungos podem utilizar o amido como fonte de energia para o seu desenvolvimento e esporulação (Griffin, 1994) e a quantidade de enzimas

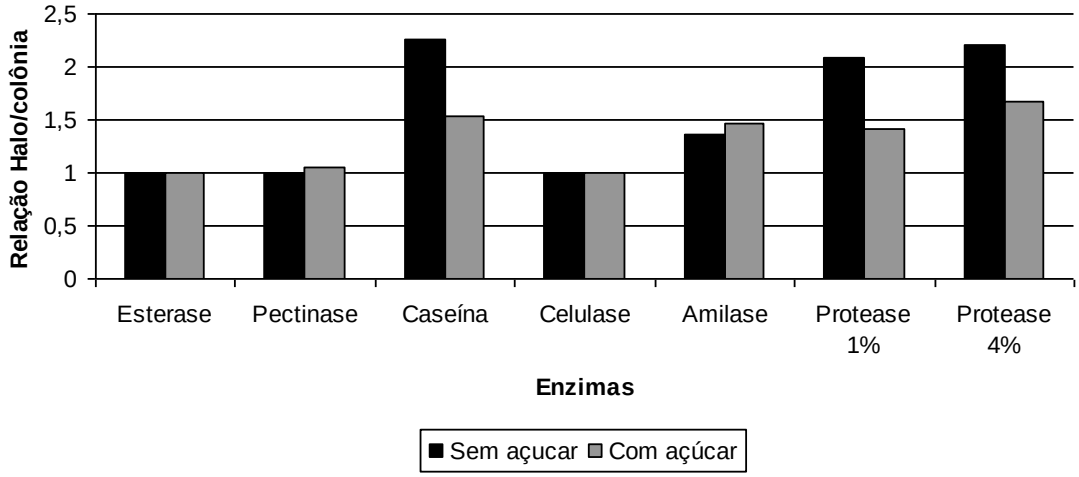

Figura 19. Atividade de enzimas extracelulares para o fungo *B. bassiana* CG 470.

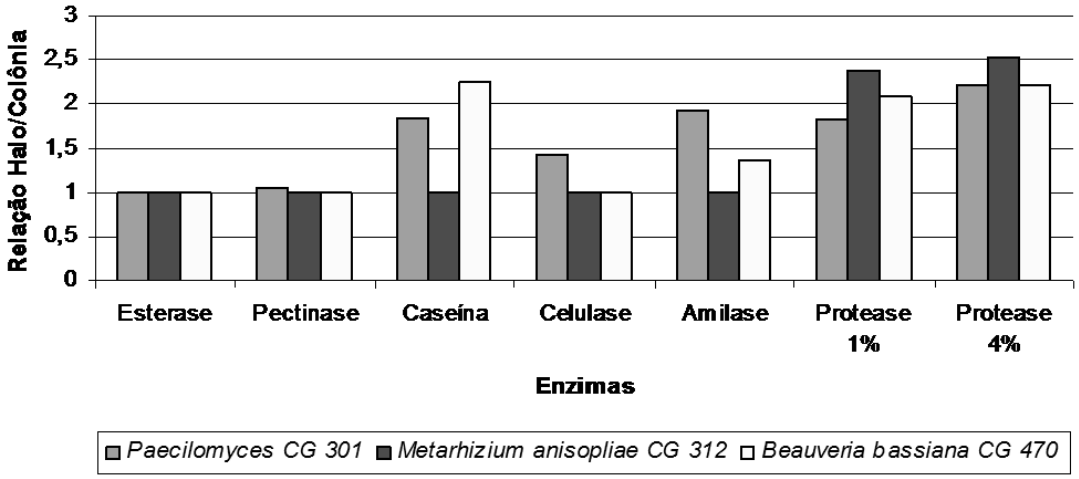

Figura 20. Comparação entre os resultados de todas as três espécies fúngicas sobre a atividade enzimática extracelular nos meios de culturas contendo apenas os substratos avaliados, sem adição de glicose.

detectadas em um meio de cultura pode ser um critério para selecionar e classificar de acordo com o gênero a espécie envolvida (Nwufo & Fajola, 1988).

A atividade observada para a enzima carboximetilcelulase nos meios de cultura, demonstrou que o fungo *Paecilomyces* sp conseguiu produzir bem mais enzimas celulares quando comparados aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, estes que não apresentaram halo evidente, hidrolisando o substrato apenas no local onde houve crescimento do micélio.

Na análise estatística, apenas o fungo *Paecilomyces* sp obteve diferença significativa em relação aos demais fungos quando as médias da relação entre H/C foi considerada (Tabela 8).

Resultados semelhantes com esses foram alcançados por St Leger *et al.* (1997) quando avaliaram vários fungos para detectar a enzima carboximetilcelulase e constataram que *M. anisopliae* e *B.*

Tabela 9. Resultados obtidos quando submetidos os valores da relação halo/colônia no teste de Tukey ao nível de significânicia de 0,05%.

	CG 301	CG 301	CG 470	CG 470	CG 312	CG 312
Enzimas	Δ	▲	Δ	▲	Δ	▲
Esterase	1a	1a	1a	1a	1a	1a
Pectinase	1,05a	1,02a	1a	1,05a	1a	1a
Caseína	1,80a	1,38a	2,25b	1,54a	1a	1a
Celulase	1,44a	1,66b	1a	1a	1a	1a
Amilase	1,85b	1,07a	1,38b	1a	1a	1a
Protease	1,82a	2,26b	2,1b	1,4a	2,38a	2a
Gelatina	1,92b	1,82a	2,21b	1,67a	2,54b	1,77a

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si (p>0,05).
Δ meio de cultura sem açúcar, ▲meio de cultura com açúcar.

bassiana também não apresentaram halo evidente, restringindo a hidrólise enzimática apenas no local onde houve crescimento micelial, enquanto que fungos fitopatogênicos produziram halos evidentes nos meios de culturas contendo celulose. Neste trabalho os autores sugerem o emprego da atividade enzimática extracelular para distinguir fitopatógenos e entomopatógenos.

A análise em placas de Petri da atividade pectinolítica foi a que apresentou as menores relações de H/C. Todas as três espécies fúngicas não diferiram significativamente através do teste de Tukey ao nível de significância de 0,05% (Tabela 8). Os resultados também não apresentaram grandes diferenças quando se comparou a atividade enzimática de cada espécie quando cultivadas em meios de cultura contendo pectina com ou sem açúcar. O fungo *Paecilomyces* sp apresentou uma leve aumento na atividade

enzimática quando inoculado no meio de cultura sem açúcar para esta enzima e o fungo *B. bassiana* mostrou uma leve atividade quando inoculado no meio de cultura com pectina contendo açúcar.

A atividade de pectinase produzida por alguns fungos, provavelmente denota a capacidade fitopatogênica que este microrganismo exibe (Barbosa *et al.*, 2001). St Leger *et al.* (1997), observou em seu experimento que *B. bassiana* e *M. anisopliae* não produziram halos nas placas com meio de cultura contendo substrato para a enzima pectinase, resultados este que corroboram com os apresentados neste trabalho. Apesar de o gênero *Paecilomyces* apresentar algumas espécies fitopatogênicas, pelos resultados exposto aqui, este não parece ser o caso da espécie testada neste experimento. Barbosa *et al.* (2001) relacionaram o processo de infecção do fitopatógeno *Cladosporium herbarum* a produção de pectinases, sendo essa enzima participante no processo de infecção do hospedeiro vegetal.

Os testes para avaliação da atividade dos fungos para a esterase, foi a única onde nenhum dos três fungos apresentaram diferenças entre si. Nenhuma das espécies de fungos analisados apresentou halos no meio de cultivo, tendo por tanto, registrado a atividade apenas no local de crescimento do micélio.

Embora a enzima esterase não tenha sido quantificada nesse estudo, ela é muito importante na etapa de adesão do esporo na cutícula do inseto. O processo de adesão depende das enzimas (esterase e proteases) que ocorrem na superfície do esporo não germinado e que alteram a superfície

da cutícula do inseto, favorecendo assim a nutrição e germinação do conídio (St. Leger *et al*., 1991a).

A enzima lípase foi detectada através da emissão de fluorescência alaranjada sobre o micélio, sendo os fungos apenas classificados como positivo ou não para a detecção de lípases. Todos os três fungos apresentaram fluorescência quando submetidos a luz U.V.

St. Leger *et al*. (1986a, b) verificaram que enzimas extracelulares (lípases entre outras) eram produzidas em grandes quantidades por *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando estes eram cultivados em meio de cultura contendo cutícula de gafanhoto. A capacidade de infecção que atua de forma sinérgica para transpor a barreira da cutícula e assim iniciar o processo infeccioso é reflexo da possível capacidade de secreção de hidrolases, como a lípase na presença da cutícula do inseto (Staats, 2007).

Na avaliação da enzima extracelular que hidrolisa a caseína, pode-se observar que os fungos *B. bassiana* e *Paecilomyce*s sp foram bons produtores dessa enzima, enquanto que *M. anisopliae* degradou o substrato apenas no local onde ocorreu o crescimento micelial. Entre as médias da relação H/C, apenas no resultado apresentando pelo *Paecilomyces* sp quando cultivado em meio de cultura contendo caseína acrescentado de 0,1% de glicose diferiu significativamente dos demais resultados apresentados pra esse teste (Tabela 8).

Tiago & Silva (2007) em um estudo sobre atividade de enzimas extracelulares de *M. anisopliae*, constataram que todos os isolados dessa espécie analisadas sobre a presença de halo em meios contendo caseína

como única fonte de carbono, descreveram que todos os isolados apresentaram halos demonstrando a hidrólise da caseína, sendo que alguns produziram mais enzimas do que outros. Resultados este contraditórios aos alcançados por este experimento onde não se observou a formação de halos no meio de cultura. Esses resultados são explicados através da variabilidade genética encontrado em cada isolado. Pinto *et al.* (2002) também observaram diferenças em ensaios enzimáticos com meio de cultura líquido onde a única fonte de nitrogênio era a caseína.

Nos ensaios avaliando a produção de enzimas extracelulares usando como substrato gelatina 4%, foi evidente a ação das enzimas proteolíticas nos meios de cultura degradando os substratos. Todos as três espécies apresentaram uma alta relação H/C, sendo que nos meios contendo somente o substrato ocorreram as maiores áreas degradadas (Fig. 17, 18, 19 e 20) e para os fungos analisados, a produção de proteases nos meios de cultura contendo somente o substrato para a protease diferiu significativamente da produção de proteases nos meios contendo 0,1% de glicose (Tabela 08) .

Nos testes de proteases contendo baixa concentração de gelatina (1%), também foi observado uma alta relação H/C nos meios de cultura. Quando comparados a produção de proteases entre o cultivo somente com o substrato e o cultivo contendo 0,1% de glicose, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* obtiveram as maiores taxas de H/C nos meios de cultura somente com o substrato, inclusive obtendo diferença significativa entre os meios de cultura. O fungo *Paecilomyces* sp apresentou maior relação H/C no meio de

cultura contendo 0,1% de glicose, e na análise entre as médias foi identificados diferenças significantes entre os meios de cultura.

Nos resultados para a produção de proteases quando o substrato foram a cutícula de *M. domestica* de larvas e adultos, não houve resultados muito evidentes. Os fungos cresceram pouco e não houve formação de halos de degradação.

Neste resultado onde se avaliou a degradação dos substratos cuticulares de *M. domestica*, a não formação de halos de degradação também foi observada por Tiago & Silva (2007) quando esses autores analisaram o comportamento de *M. anisopliae* em cultivos cuticulares (cutícula de *Mahanarva fimbriolata* e *Deois flavopicta)* e não cuticulares, e neste estudo, também não houve formação de halos e esses autores sugeriram que sob essas condições testadas, esse protocolo não demonstra ser o ideal para a obtenção de halos de degradação em placas. Proteases extracelulares (Pr1 e Pr2) têm sido obtidas por isolados de *M. anisopliae* quando cultivados em meios líquidos contendo cutículas de diversos insetos, como as dos gafanhotos *Schistocerca pallens*, *Rhammatocerus schistocercoides* e *Schistocerca gregaria* e as da mariposa *Manduca sexta* (Paterson *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 2002 e Tiago *et al.*, 2002).

As proteínas são componentes estruturais presentes em maior número na cutícula dos insetos (60%) e para transpor a barreira da cutícula é preciso que os fungos entomopatogênicos liberem proteases durante as primeiras fases da invasão e penetração da cutícula, sendo então as proteases um importante fator de virulência (St. Leger *et al.*, 1988).

5 CONCLUSÕES

1) Os isolados *M. anisopliae* CG 30 e CG 46 foram os mais virulentos quando comparados aos demais fungos testados em bioensaios para larvas de *M. domestica* de 3º instar.

2) O produto comercial a base de *M. anisopliae* (Metarril) não conseguiu controlar a população de *M. domestica*, enquanto que o fungo *M. anisopliae* CG 46 conseguiu um discreto controle na população no aviário.

3) O fungo *M. anisopliae* CG 46 infecta as larvas de *M. domestica* de 3º instar através da cutícula, onde desenvolve estruturas de infecção como apressório para penetrar através da cutícula.

4) As células do sistema imunológico das larvas de *M. domestica* são compostas pelos tipos celulares: plasmatócitos, granulócitos, prohemócitos e oenocitóides, além de fragmentos celulares como trombocitóides e microagregados celulares.

5) O fungo *M. anisopliae* CG 46 alterou a contagem de células do sistema imunológico de larvas de *M. domestica*, sendo que a resposta imunológica atingiu o máximo de hemócitos por µL de hemolinfa após 72 horas de infecção.

6) Os fungos *Paecilomyces* sp CG 301 e *M. anisopliae* CG 312 esporularam melhor no meio agar batata maltose enquanto que *B. bassiana* CG 470 obteve uma esporulação mais expressiva em ágar batata com 0,1% de glicose.

7) Nos ensaios enzimáticos protease foi a enzima mais produzida por *M. anisopliae* CG 312 e *Paecilomyces* sp CG 301, e caseinases por *B. bassiana* CG 470.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265-266, 1925.

Agnolin, C. A. **Óleo de citronela no controle de ectoparasitas de bovinos.** 2009. 64p. (Dissertação de mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, Santa Maria-RS, 2009.

Ainsworth, G. C. Introduction and keys to higher taxa: In: Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., Sussman, A. S. (eds). **The fungi: an advanced treatise**. New York : Academic Press, v. IVA, 1973.

Alexandre, T. M. *et al*. Efeito da Temperatura e Cama do Aviário na Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o Controle do Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**., Londrina, v. 35, n. 1, jan/fev, 2006.

Almeida, F. B. R., Cerqueira, F. M., Silva, R. N., Ulhoa, C. J., Lima, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett**, v.29, p.1189–1193, 2007a.

Almeida, J. E. M.; Rocha, T.C.; Filho, A. B. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. **Arquivos do instituto biológico**. São Paulo, v.74, n.4, p. 369-371, out-dez. 2007b.

Almeida, M. A. F. **Abundância relative e sazonal de Musca domestica L. 1758 (Díptera: Muscidade) e de seus parasitóides em microhabitats de um curral de gado bovino, em Pirassununga, SP.** 1996. (dissertação de mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Programa de pós-graduação do instituto de biologia, Campinas-SP, 1996.

Alves, L. F. A. *et al*. Ocorrência Natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) Sobre o Cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleóptera : Tenebrionidae), em Aviário Comercial de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v.34, n.3, p.507-510, mai/jun 2005.

Alves, S. B.; Moino JR, A.; Almeida, J. E. M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. *In*: Alves, S. B. **Controle Microbiano de Insetos.** Piracicaba: Fealq, 1998a. p. 1143-1163

Alves, S.B. Fungos entomopatogênicos, *In:* Alves, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, Fealq, 1998b. p.289-381.

Alves, S. B.; Almeida, J. E. M.; Moino JR, A.; Alves, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: Alves, S. B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998c. p.637-711.

Alves, B.S. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba, Fealq, 1998d. p.21-37.

Alves, S. B.; Lopes, R. B.; Pereira, R. M.; Tamai, M. A. O controle microbiano na América Latina, p.21-48. *In*: Alves, S. B.; Lopes, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latína: abanicos e desafios**. Piracicaba, Fealq, 2008a. p.21-48.

Alves, S. B.; Leite, L. G.; Filho, A. B.; Almeida, F. E. M.; Marques, E. J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina, *In*: S. B. Alves, S. B.; Lopes, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latína: avanços e desafios.** Piracicaba, Fealq, . 2008b. p.215-237.

Alves, S. B.; Lopes, R. B.; Vieira, S. A.; Tamai, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina,. *In*: S. B. Alves, S. B.; Lopes, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latína: avanços e desafios.** Piracicaba, Fealq, . 2008c. p.69-110

Alves, S. B.; Leucona R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, *In*: Alves, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, Fealq, 1998. p.97-169.

Andaló, V. *et al*. Seleção de Isolados de Fungos e Nematóides Entomopatogênicos para a Cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.181-187, abr/jun 2004.

Andersen, S.O. Cuticular sclerotization. *In*: MILLER, T.A. **Cuticle techniques in arthropods**. New York: Springer-Verlag, 1980. p.185-217.

Arruda, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*.** 2005**.** 145 p. (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM). Porto Alegre, 2005.

Arthurs, S.; Thomas, M. B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. acridum in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria.* **J. Invertebr. Pathol***.,*v. 78, p.59-65, 2001.

Arzumanov, T.; Jenkins, N.; Roussos, S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Process Biochemistry, v. 40, n. 3-4, p. 1037-1042, March 2005.

Ashida, M.; Ishizaki, Y.; Iwahana, H. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or β-1,3 gulcans in plasma of the silkworm, Bombyx mori. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.113, n.2, p. 562-564, 1983.

Athayde, A. C. R. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e teleóginas de *Boophilus microplus* da região semi-árido paraibana**. 2002. 138p. (Tese de doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Programa de pós graduação em Ciências Biológicas- PPGCB, Recife 2002.

Avancini, R. P. M.; Ueta, M. T. Manure Breeding Insects (Diptera and Coleoptera) Responsable for Cestoidosis in Caged Layer Hens. J. **Appl. Ent**. V.110, p. 309-312, 1990.

Axtell, R. C.; Arends, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.35, p.101-126, 1990.

Axtell, R. C. Arthropod pests of poultry. *In*: Williams, R. E.; Hall, R. D. *et al.* **Livestock Entomology**. New York, Willey Interscience, 1985, p.269-295.

Axtell, R. C. **Fly control in confined livestock and poultry production**. Greensboro,CIBA-GEIGY, 1986. 59 p.

Axtell, R.C. Poultry integrated pest management: status and future. **Integrated Pest Manage**. v. 4, n. 1 / March 1999.

Banjo, A. D.; Laeal, O. A.; Adeduji, O. O. Bacteria and Fungi Isolated from Housefly (*Musca domestica* l.) Larvae. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.8, p.708-704, aug 2005.

Barbosa, C. C.; Monteiro, A. C.; Correia, A. C. B.; Pereira, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesq. agropec. bras**. v.37, n.6, p. 821-829, 2002.

Barbosa, M. A. G.; Rehn, K. G.; Menezes, M.; Mariano, R. L. R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzimatic characterization. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 32, n. 2, June 2001 .

Barnett, H. L.; Hunter, B. B. **llustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4. ed. Minnesota: Burgués Publishing Company. 1998. 218p.

Barracco, M.A.; Menezes, H. Mecanismos celulares de defesa em insetos. **Cienc. Cult**. v..37, p. 237-250, 1984.

Barnes, G. L.; Boethel, D. J.; Eikenbary, R. D.; Criswell, J. T.; Gentry, C. R. Growth and sporulation of *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of invertebrate pathology** v. 25, n. 3, p. 301-305, 1975.

Barson, B.; Renn, N.; Bywater, A. F. Laboratory evaluation of six species of Entomopathogenic fungi for the control of the house fly (Musca domestica L.), a pest of intensive animal units. **Journal of invertebrate pathology**, v.64, p.107-113, 1994.

Batta, Y. A, 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Crop Protection**. v. 22, n. 2, p. 415-422, March 2003.

Bernardi, E. *et al*. Efeito dos Fungos Entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* Sobre o Desenvolvimento de *Musca domestica l.* (Díptera: Muscidae) em Laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.127-129, jan/mar, 2006.

Bicho, C. L.; Almeida, L. M.; Ribeiro, P. B.; Silveira Júnior, P. Flutuação de Diptera em granja avícola, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia, v.** 94, p. 205-210. 2004.

Bidochka, M.J.; St. Leger, R.J.; Roberts, D.W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.171, p.213-224, 1997.

Buralli, G. M.; Guimaraes, J. H.. Controle de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera, Muscidae) em área de manejo de vinhaça (Macatuba, São Paulo, Brasil). **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v. 3, n. 1, 1985.

Buzzi, Z. J. **Entomologia didática**. 4.ed. Curitiba: Ed. UFPR, 2002. 348p.

Carlile, M.J.; Watkinson, S. C.; Gooday, G. W. Spore dormancy and dispersal. *In:* Carlile, M.J.; Watkinson, S. C., Gooday, G. W. **The fungi**. 2.ed. San Diego: Academic, 2001. Cap.4, p.185-243.

Carswell, I., Hart, R. S., Milner, R. Laboratory susceptibility of Musca domestica L. (Diptera: Muscidae) and Bactrocera tryoni (Frogatt) (Diptera: Tephritidae) to an isolate of Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. **Australian Journal of Entomology**, v. 37: 3, p. 281 – 284, 1998.

Chalk, R.; Suliamam, W. Y. Antimicrobial peptides from small insects: methods for insect culture and for the detection, visualization, isolation and sequencing of active hemolymph peptides. *In*: Wiesner, A.; Dunphy, G.B.; Marmaras, V.J.; Morishima, I.; sugumaran, M.; Yamakawa,M. **techniques in insect immunology**, SOS Publications, 1998. p.347.

Clark, C. U. On the Certain Dung and Carrion Beetles. J. N. Y. **Entomol. Soc**. V. 3. n.61. 1895.

Cova O, L. J.; Scorza-Dagert, J. V. Control temporal de moscas caseras (*Musca domestica*) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria bassiana*. **Bol. Mal. Salud. Amb.**, v.46, n.2, p.131-136, 2006

Cova, L. J.; Scorza, J. V.; García, D. E.; Cañizales, L. M.; Guedez, C. C., Avendaño, M. L.; Medina, M. G. Efecto de *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* y La aplicación de gasoil en el control de moscas caseras em galpones avícolas. **AVANCES EN INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA**. v. 13,n.2, p.41-53, 2009a.

Cova, L. J.; Scorza, D.; José, V.; Garcia, D. E *et al*. Patogenicidad in vitro de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch en *Musca domestica* (L.) como posible estrategia de control biológico en áreas ganaderas**. Zootecnia Trop**., v.27, n.2, p.113-120, 2009b.

Cova, L. J.; Scorza-Dagert, J. V.; Garcia, D. E. *et al*. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii* en el control de moscas (*Musca domestica*) en condiciones de laboratorio y en galpones avícolas. **Bol. Mal. Salud. Amb.**, v.49, n.1, p.151-160, jul. 2009c.

Criswell, J. T.; Gentry, C. R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 25, p. 301-305, 1975.

Crossley, A. C. S. Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage, and secretion in hemocytes. *In*: Gupta, A. P. **Insect hemocytes: development, forms, function and techniques**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. p.423-473.

Dias, B. A. **Estudo de Proteases Degradadoras de Cutícula Produzidas Pelo Fungo Entomopatogênico *Beauveria bassiana*. 2005.** 70p. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

Dimbi, S.; Maniania, N.; Lux, S. A.; Mueke, J. M. Effect of Constant temperatureson germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **BioControl***,* v. 49, p.83-94, 2004.

Dong, C.; Zhang, J.; Huang, H. ; Chen, H.; Hu, Y. Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. Anisopliae* var*. Dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. **Microbiological Research** v.164, p. 27-35, 2009.

Driver, F.; Milner, R. J.; Trueman, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological research**, v. 104. n. 2, p. 134-150, 2000.

Estação meteorológica da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). **Dados referentes aos meses de setembro, outubro, novembro e dezembro de 2009.** disponível em: <http://www.unimontes.br/pagina.php?param=meteoroDados> acessado em 26/01/2010.

Falleiros, A. M. F.; Gregório,E. A. Hemócitos fagocitários em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.12, n.4, p.751-758, 1995.

Fang, W,; Pei, Y.; Bidochka, M. j. A regulator of a G protein signaling (RGS) gene, cag8, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. **Microbiology**, v.153, p.1017-1025, 2007.

Fargues, J.; Goettel, M. S.; Smits, N.; Ouedraogo, A.; Rougier, M.
Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, v.89, p.383-392, 1997.

Fernandes, E. G. **Isolamento, Identificação e Bioensaios com Fungos Entomopatogênicos em Larvas de *Musca domestica* Capturadas em Aviário no Município de Montes Claros, MG**. 2007. 50p. (Monografia de conclusão de curso). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, 2007.

Franc, N. C.; White, K. Innate recognition in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. **Microbes and infection**. v.2:3, p.243-250, 2000.

Freimoser, F. M.; Screen, S.; Bagga, S.; Hu, G.; St. Leger, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two species of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology,** v.149, p.239-247, 2003.

Freitas, M. G.; Costa, H. M. A.; Costa, J.; Iide, P. **Entomologia e Acarologia Médica e Veterinária**, 5 ed., Precisa Editora Gráfica Ltda, Belo Horizonte, 1981, 253 p,

Fuguet, R; Vey, A. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. **J. Invertebr. Pathol.** V.85, p. 152-167, 2004.

Gallo, D., O. *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 2002, 920p.

Georghiou, G. P.; Hawley, M. K.; Loomis, E. C. Pesticide Resistance in the Fly Complex of California Poultry Ranches. **Cali. Agric**. p.9-11, 1967.

Gianizella, S L.; Prado, A P. Levantamento e sazonalidade de coleópteros (Histeridae) em criação de aves poedeiras. **An. Soc. Entomol. Bras.**, Londrina, v. 27, n. 4, Dec. 1998 .

Goettel, M. S.; Johnson, D. L.; Inglis, G. D. The Role of Fungi in the Control of Grasshoppers. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p. 71-75, 1995.

Greenberg, B. **Flies and Disease: Ecology, Classification and Biotic Associations**. Princeton Univ. Press. v. 1, 1971. 856p.

Greenberg, B.; Povolny, D. Bionomics of flies. *In*: Greenberg, B. **Flies and disease. Ecology, classification and biotic association**. Princeton: Princeton Univ. Press, 1971, p.56-83.

Greif M. D.; Currah R. S. Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. **Mycologia**, v. 99, n.1, p. 7–19 , 2007.

Greif, M.D.; Currah, R.S. Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. **Mycologia,** v. 99, p. 7-19, 2007.

Griffin, D. H. **Fungal physioly**. 2º e.d. New York: John Wiley & Sons, 1994, 458p.

Guerra, D. M. S.; Pires, A. P. D.; Lima, E. A. L. A. persistência de *Metarhizium anisopliae* spp no solo sob diferentes condições de temperatura e umidade. **Caatinga (Mossoró)**, v.22, n.1, p.50-54, abril/junho de 2009.

Guimarães, J. H. Mosca dos estábulos - Uma importante praga do gado. Rio de Janeiro, **Agroquímica Ciba – Geigy**, p.10–14. 1984.

Gupta, A.P. Hemocyte types; their structures, synonymies, interrelationships and taxonomic significance. *In:* Gupta, A.P. **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques.** Cambridge, Cambridge University Press, 1979, p. 85-127.

Gupta, A.P. Cellular elements in the hemolymph, *In:* G.A. Kerkut & L.I. Gilgert. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology.** Oxford. Pergamon Press, 1985, vol. 3, p. 402-444.

Hallsworth, J. E.; Magan, N. Culture age, temperature, and ph affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 62, n. 7, p. 2435-2442, Jul 1996.

Hallsworth, J. E.; Magan, N. Water and temperature relations of growth of entomogenous fungi *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinous*. **J. Invertebr. Pathol.**, v.74, p. 261-266, 1999.

Harman, G. E.; Petzoldt, R.; Comis, A.; Chen, J. Interactions between *trichoderma harzianum* strain t22 and maize inbred line mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology.** v.94, n.2, p.147-53. 2004b.

Harman, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.96, p.190-194, 2006.

Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Natural Reviews. Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004a.

Hewitt, C. G. Memoirs: The Structure, Development, and Bionomics of the House-fly, *Musca domestica*, Linn: Part I. The Anatomy of the Fly**. Quarterly Journal of Microscopical Science** , v.2, p. 395-448, 1907.

Ho, C. C. **Mass production of predaceous mite *Machrocheles musccadomesticae* (Acarina, Machrochelidae) and its potencial use as biological control agent of house fly *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae).** 1985, 186p. (PhD dissertation), University of Florida, 1985.

Howell, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Dis,** v. 87, p. 4–10, 2003.

IBGE (2005). **Produção de ovos de galinha, segundo os meses - Brasil - 3º Trimestre de 2005.** Disponível em : <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate03t200504.shtm>. Acesso em: 20 jan. 2008.

IBGE (2009). **Indicadores IBGE: estatística da produção pecuária. Setembro, 2009.** Disponível em : <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm#ovos>. Acesso em: 09 dez. 2009.

Inglis, G. D.; Goettel, M. S.; Butt, T. M.; Strasser, H. Use of Hyfomicetous fungi for managing insect pests. *In*: Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. **Fungi as Biological Agents: Progress, Problems and Potential**. CABI Publishing, 2001,p. 23-69.

Jabor, I. A. S.; Pamphile, J. A.; Rodrigues, S. B.; Marques-Silva, G. G.; Rocha, C. L. M. S. C. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta. Scientiarum. Agonomy,** Maringá, v. 25, n. 8, p. 497-501. julho, 2003.

Jenkins, N, E.; Heviefo, G.; Langewald, J.; Cherry, A., J. Lomer, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol,** News and Information v. 19 n. 1, p. 21 – 31. 1998.

Kaaya, G. P.; Ratcliffe, N. A. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. **Journal of Morphology**. v.173, n.3, p.351-365. Sep 1982.

Kanost, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 291-301, 1999.

Kaufman, F. E.; Reasor, C.; Rutz, D. A.; Ketzis, J. K.; Arends, J. J. Evaluation of *Beauveria bassiana* applications against adult house fly, *Musca domestica*, in commercial caged-layer poultry facilities in New York state. **Biological Control**, v.33, p. 360-367, 2005.

Keiding. J. **The House Fly: Biology and control**. W.H.O./VBC/76.650. p.81. 1980.

Kucera M. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* for *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.35, p. 304-310. 1980.

Kurihara, Y.; Shimazu, T.; Wago, H. Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae): I-phase microscopic study. **Applied Entomology and Zoology**, Tokio, v.27, p.225-235, 1992.

Lanza, L. M.; Monteiro, A. C.; Malheiros, E. B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Cienc. Rural.** V.34, n.6, 2004.

Lanza, L. M.; Monteiro, A. C.; Malheiros, E, B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, Feb. 2009.

Lavine, M. D.; Strand, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.32, p. 1295-1309, 2002.

Lecuona, R. E.; Turica, M.; Tarocco, F.; Crespo, D. C. Microbial Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with Selected Strains of *Beauveria bassiana*. **J. Med. Entomol**. V.42, n.3, p. 332-336, 2005.

Leucona, R.; Riba, G.; Cassier, P.; Clement, J. L. I. Alterations of insect epicuticular hidrocarbon during infection with *Beauveria bassiana* or *Beauveria brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.10-18, 1991.

Leucona, R.E.; Papierok, C.; Riba, G. Hongos Entopatogênicos. *In*: **Leucona, R. E. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires, 1996, p. 35-60.

Li, D. P.; Holdom, D. G. Effects of Nutrients on Colony Formation, Growth, and Sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 65, n. 3, p.253-260, May 1995.

Liu, Z. Y.;Liang, Z. Q.; Whalley, A. J. S.; Yao, Y. J.; Liu, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. majus. **Journal of invertebrate pathology**. v. 78, p. 178-182, 2001.

Lomer, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol,** News and Information, v. 19, n. 1, p. 21 – 31, 1998.

Loureiro, R. R. S. **Utilização do Farelo de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) na Alimentação de Pordeiras Comerciais**. 2007. 30p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

Madelin, M. F.; Robinson, R. K.; Williams, R. J. Appressorium-like structures in insect-parasitizing deuteromycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n. 3, p. 404-412, September 1967.

Maranhão, E. A. A. **Utilización de Hongos Entomopatógenos para el Control de "Moscas Blancas" (Homoptera: Aleyrodidae) em Cultivo Hortícolas**.2003. 289p. (Tese Doutorado) Universidad de Córdoba. Córdoba. 2003.

Mattos, M. R. **Macroquelídeos Associados a Fezes Acumuladas em Granja de Aves Poedeiras no Município de Monte Mor, SP: Levantamento, Taxonomia e Estudos Populacionais (Acari, Gamasida, Machrochelidae)**. 1994. 72 p. (Tese de mestrado). UNICAMP, Campinas, SP, 1994.

Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Controle Biológico**, v. I. EMBRAPA,1998, p. 262.

Monteiro, A.C. **Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus)**. 1988. 233p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1988.

Monteiro, M. R. **Microhimenópteros (Insecta, Hymenoptera) Parasitóides e Insetos Predadores de Moscas Sinantrópicas (Insecta, Diptera) na Granja Capuavinha, Monte Mor, SP**. 1995. 147p. (Dissertação de mestrado). UNICAMP, Campinas, SP, 1995.

Mugnai, Z.; Bridge, P. D.; Evans, H. C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveri*a. **Mycological Research**, v.92, n.2, p. 199-209, 1989.

Nation, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. CRC Press, 1°e.d. 2001, 470p.

Negreiro, M. C. C.; Andrade, F. G.; Falleiros, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v.25, n.4, p.293-308, out-dez 2004.

Neves, D. P. *et al*. **Parasitologia humana***.* 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Nmorsi, O.P.G.; Agbozele, G.; Ukwandu N.C.D. Some Aspects of Epidemiology of Filth Flies: *Musca domestica, Musca domestica vicina, Drosophilia melanogaster* and Associated Bacteria Pathogens in Ekpoma, Nigeria. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n.2, p. 107-117, June 2007.

North, M. O.; Bell, D. D. **Comercial Chicken Production Manual**. 4th ed., New York, Van Nostrand Reihnold,1990. 422 p.

Nunes, M. S.; Costa, G.; Bittencourt, V. R. E. P.; Souza, E. J. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Parasitol. latinoam.**, Santiago, v. 57, n. 1-2, p.9-14, 2002a .

Nunes, M. S.; Costa, G.; Bittencourt, V. R. E. P.; Souza, E. J. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Parasitol. latinoam.**, Santiago, v. 57, n. 3-4, p.134-140, 2002b .

Nwufo, M. I.; Fajola, A. O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Betryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corns rots of *Colocasia esculenta*. **Acta Microbiologica Hungarica**, v.35, p.371-378, 1988.

Oliveira, J. S.; Souza S. E.; Oliveira, L. L.; Carvalho, D. A.; Moreira, D. M. O. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia. **Bahia Agríc**., v.6, n.3, nov. 2004.

Oliveira, S. M. C. de. **Exigências físicas e nutricionais para produção de Sporothrix insectorum em meios de cultura líquidos**. 2000. 45p. (Dissertação Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

Ouedraogo, A.; Fargues, J.; Goettel, M. S.; Lomer, C. J. Effect of temperature on vegetative grwth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride.* **Mycopathologia***,* v.137, p.37-43, 1997.

Paiva, D. P. Produção de Larvas de Moscas Para Alimentação de Galinhas e Passáros. **EMBRAPA Suínos e Aves**. p.1-4, fevereiro 2001.

Paterson, I. C.; Charnley, A. K.; Cooper, R. M.; Clarkson, J. M. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading proteases from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p.3153-3159, 1994.

Paterson, I.C. *et al*. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v.140, p.185-189, 1994.

Paula, A. R. **Seleção de Isolados de Fungos Entomopatogênicos, Visando o Controle de Adultos do Mosquito *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)**. 2007. 54p .(Dissertação de mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 2007.

Pech, L. L.; Strand, M. R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes, **Journal of Cell Science**, Vol 109, Issue 8, p.2053-2060, 1996.

Peck, J. H.; Anderson, J. R. Arthropod Predator Of Immature Diptera Developing In Poultry Droppings In Northen California. Part I. Determination, Seasonal Abundance And Natural Cohabitation With Prey. **J. Med. Entomol**. V.6, p. 163-167, 1969.

Pedrini, N.; Crespo, R.; Juarez M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by enomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v.146, p. 124-137, 2007.

Pereira, S. R. M.; Eira, A. F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculant. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, Sept. 1999.

Pinto, F. G. S.; Fungaro, M. H. P.; Ferreira, J. M.; Valadares-Inglis, M. C.; Furlaneto, M. C. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.2, p.231-234, 2002.

Pinto, M. C.; Prado, A. P. Resistance of *Musca domestica* L. populations to Cyromazine (Insect Growth Regulator) in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.5, p.729-732, jul 2001.

Polar, P.; Kairo, M. T.; Moore, D.; Pegram, R.; John, S. A. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus***. Mycopathologia.** V.160, n. 2, p.151-7. 2005 Sep.

Pontecorvo G.; Roper, J. A.; Hemons, L. M.; Macdonald, K. D.; Bufton, A. W. J. **The genetics of *Aspergillus nidulans***. Adv.Genet. v. 5, p.141-238,1953.

Prado, A. P. Controle das principais espécies de moscas em áreas urbanas. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.95-97, jan./dez., 2003.

Prette, N. *et al.* Patogenicidade de Isolados de *Beauveria bassiana* para Ovos , Larvas e Ninfas Ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.855-861, jul/ago 2005.

Ratcliffe, N. A.; Rowley, A. F. Cellular defence reations of insect hemocytes *in vitro*: phagocytosis in a new suspension culture system. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v.26, p.225-233, 1975.

Ratcliffe, N. A.; Rowley, A. F. Insect responses to parasites and other pathogens. *In:* Joulsby, E. J. L. **Immune responses in parasitic infection: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, protozoa, arthropods and invertebrate**. Florida: C. R. C. Press, 1987. p.123-254.

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

Ribeiro, C.; Simões, N.; Brehélin, M. Insect immunity: the haemocytes of armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role defence reactions *in vivo* and *in vitro* studies**. Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.42, n.9, p.815-822, 1996.

Roberts, D. W.; Krasnoff, S. B. Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos, *In:* Alves, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2º ed. Piracicaba, Fealq. 1998. p.967-985.

Rodrigues, S.; Marques-Silva, G.; Rocha, C. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.25, n.2, p.497-501, 2008.

Román, E. M., Tkachuk, O., Roman, R. Detección de Agentes Bacterianos en Adultos de *Musca domestica* (Díptera: Muscidae) Recolectadas em Maracay, estado Aragua, Venezuela. **Entomotropica**, v.19, n.3, p.161-164, dez, 2004.

Ruiu, L.; Delrio, G.; Ellar, D. J.; Floris, I.; Paglietti, B.; Rubino, S.; Satta, A. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the house fly (*Musca domestica*). **Entomol. Exp. Appl**. v.118, p. 137-144, 2006.

Russo, J.; Brehélin, M.; Carton, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.47, p.167-172, 2001.

Sales, M. S. N.; Costa, G. L.; Bittencourt, V. R. E. P. Isolation of fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) captured at two natural breeding grounds in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** vol.97, n.8, p. 1107-1110, 2002.

Santin, R. C. M. **Potencial do uso dos fundos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2001. 92p. (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF). Porto Alegre- RS, 2008.

Screen, S.E.; Hu, G.; St Leger, R.J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. anisopliae overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. acridum secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiol**. v.149, p.239-247, 2001.

Service, M. V. **A Guide to medical Entomology**. The MacmillanPress Ltd. London. p. 102 –109, 1980.

Shah, P. A.; Pell, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control. **Applied microbiology and biotechnology**, v.61, p. 413-423, 2003.

Silva, C.; Gary, B. D.; Rau, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v.24, p. 367-379, 2000.

Silva, C.C.A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnol. Ciênc. Desenv.** v. 24, p. 68-72, 2002.

Silva, J. E. B.; Boleli, I. C.; Simões, Z. L. P. Hemocytes types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Díptera, Tephritidae) larvae. **Braz. J. Biol**, v. 62, p. 689-699, 2002.

Silveira, V. D**. Micologia**. 5º e.d. Editora: Âmbito Cultural Edições LTDA, 1995, 332 p.

Siri, A.; Scorsetti, A. C.; Dikgolz, V. E.; Lastra, C. C. L. Natural infections caused by the fungus *Beauveria bassiana* as a pathogen of *Musca domestica* in the neotropic. **Biocontro**l, v. 50, p. 937-940, 2005.

Skoda, S. R. *et al*. Developmental sites and relative abundance of immature stages of the stable fly (Diptera : Muscidae) in beef cattle feedlot pens in eastern Nebraska**. Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 84, n. 1, p. 191-197, feb. 1991.

St Leger, R. J.; Joshi L.; Roberts, D. W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, v.143, p.1983-1992. 1997.

St. Leger, R. J.; Butt, T. M.; Staples, R. C.; Roberts, D. W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v.13, p.253-262, 1989.

St. Leger, R. J.; Johs, L.; Roberts, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.709-713, 1988.

St. Leger, R. J.; Roberts, D. W.; Staples, R. C. A. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.57, p.299-310, 1991b.

St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.253, p.221-232, 1987.

St. Leger, R.J.; Charnley, A.K.; Cooper, R.M. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Synthesis in Culture on Cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.85-95, 1986b.

St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.167-177, 1986a.

St. Leger, R.J.; Goettel, M.; Roberts, D.W.; Staples, R.C.; Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.168-179, 1991a.

Staats, C. C. **Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico metarhizium anisopliae.** 2007. 254p. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, 2007.

Steinkraus, D. C.; Geden, C. J.; Rutz., D. A.; Kramer, J. P. First Report of the Natural Occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 3, p. 309-312, May 1990.

Strand, M. R.; Pech, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationships. **Annual Review Entomology**, v.40, p. 31-56, 1995.

Teixeira, A. F. M.; Filho, A. A. A.; Quintaes, B. R.; Santos, E. C. L.; Surliuga, G. C. Controle de mosca doméstica em área de disposição de resíduos sólidos no Brasil. **Eng. sanit. ambient**. v.13, n. 4, p. 365-370, out/dez 2008.

Tiago, P. V.; Furlaneto, M. C. O. Papel de Proteases Degradadoras de Cutícula Produzidas por Fungos Entomopatogênicos. **Alta Floresta**, v.2, n.1, p.40-51, 2003.

Tiago, P. V.; Silva, R. J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não-cuticulares. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, Feb. 2007.

Tiago, V.P. *et al*. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. **Leters in Applied Microbiology**, London, v.34, p.91-94, 2002.

Tinline, R. D. Nuclear distribuition in *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**. v.63, p. 713-721, 1971.

Tulloch, M. The genus *Metarhizium*. **Transaction of the british mycological society**. v. 66, n.3, p. 407-411, 1976.

Ugbogu. O. C.; Nwachukwu, N. C.; Ogbuagu, U. N. Isolation of *Salmonella* and *Shigella* Species from House flies (*Musca domestica* l.) in Urutu, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n.11, p. 1090-1091, junho 2006.

Urquhart, G. M. **Parasitologia Veterinária.** Rio de janeiro: Guanabara Koogan. 1990, 305 p.

Vilcinskas, A.; Matha, V.; Gijtz, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. **J Insect Physiol**, v. 43, p. 415-483. 1997.

Vilmos, P.; Kurucz, E.. Insect immunity: evolucionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunol. Lett.** v.62, p. 59-66, 1998.

Wang, C.; St Leger, R. J. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 21110-21115, 2007.

Wang, C.; St Leger, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **PNAS**, v. 103, n. 17, p. 6647-6652, 2006.

Watson, D. W.; Geden, C. J.; Long, S. J.; Rutz, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for Controlling the House Fly and Stable Fly (Diptera: Muscidae). **Biological Control**, v. 5, n. 3, , Pages 405-411, September 1995.

Wenzel, I., M.; Monteiro, A. C.; Pereira, G. T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.7-14, 2006.

West, L S. **The housefly its natural history, medical importance and control**. Comstock Publishing Company, Ithaca, New York, 1951, 584 p.

Wheeler, M. B.; Stuart, G.; Hapner, K. D. Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). **J. Insect Physiol.** v. 39, p. 477-483, 1993.

Wilson, R.; Chen, C.; Ratcliffe, N. A. Innate immunity in insects – the role of multiple endogenous serum lectin in the recogtion of foreign invaders in the cockroach Blaberus discoidalis. **J. Immunol.** v.162, p. 1590-1596, 1999.

Woo, S.L.; Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v.96, p.181-185, 2006.

Zacharuk, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera) II. Conidial Germ tubes and appressoria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, n. 1, p. 81-91, January 1970.

7 ANEXOS

7.1 Meio de cultura utilizados

7.1.1 Sabouraud dextrose ágar com extrato de levedura – modificado (SDAY)

Dextrose	40g/L
Peptona	10g/L
Extrato de levedura	10g/L
Ágar	15g/L

7.1.2 Batata dextrose ágar

Infusão de batata	4g/L
Dextrose	20g/L
Ágar	15g/L

7.1.3 Batata dextrose (0,1%) ágar

Infusão de batata	4g/L
Dextrose	2g/L
Ágar	15g/L

7.1.4 Batata ágar maltose

Infusão de batata	4g/L
Maltose	20g/L
Ágar	15g/L

7.1.5 Batata ágar

Infusão de batata	4g/L
Ágar	15g/L

7.1.6 Sabouraud

Dextrose	20g/L
Peptona	10g/L
Ágar	15g/L

7.1.7 Sabouraud maltose

Maltose	20g/L
Peptona	10g/L
Ágar	15g/L

7.1.8 Sabouraud sem açúcar

Peptona	10g/L
Ágar	15g/L

7.1.9 Meio Mínimo – MM

$NaNO_3$ 0,6%	6g/L
KH_2PO_4 0,05%	0,5g/L
$MgSO_4$ 0,05%	0,5g/L

Preparar esta solução acima, ajustar o pH para 6,5, autoclavar e reservar. Em seguida adicionar 2% de solução de sais e 0,04% de solução de elementos traços.

Solução de Sais

KCL	26g/L
$MgSO_4$	26gL
KH_2PO_4	76g/L

solução de Elementos Traços

Na_2B4O_7	0,04g/L
$CuSO_4$	0,4g/L
$FeSO_4$	0,01g/L
$MgSO_4$	0,8g/L
$ZnSO_4$	0,8g/L

7.1.10 Meio de cultura para larvas de moscas (Paiva, 2001)

Farelo de trigo	50%
Ração para aves poedeiras	50%

7.1.11 Meio de cultura para avaliação de esterase

Peptona	5g/L
Extrato de levedura	1g/L
NaCl	5g/L

Cloreto de cálcio	0,01%
Extrato de carne	1g/L
Ágar	15g/L
Tween 80	1%

7.1.12 Meio mínimo modificado para produção de pectinase

K_2HPO_4	7g/L
KH_2PO_4	2g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,1g/L
Ágar	15g/L

7.2 Listagem e composição de soluções utilizadas

7.2.1 Brometo de hexadeciltrimetilamônia a 1%

brometo de hexadeciltrimetilamônia	1g
Água destilada	100 mL

7.2.2 Vermelho congo a 0,1%

Vermelho congo	1g
Água destilada	100 mL

7.2.3 Lugol

Iodeto de potássio	10g
Cristais de iodo	5g
Água destilada	100 mL

7.2.4 solução saturada de $(NH_4)_2SO_4$

$(NH_4)_2SO_4$	7,7g
Água destilada	10 mL

7.2.5 Rodamina B a 0,001%

Rodamina B	0,01g
Água destilada	1 L

7.2.6 Tetraborato de potássio

Ácido bórico (0,8M)	2,47g
Água destilada	40 mL

Ajustar o pH para 9.1, adicionando KOH. Completar o volume para 50 mL com água destilada.

7.2.7 Água peptonada

Peptona	1%
Água destilada	100 mL

7.2.8 Tampão fosfato 0,2M

KH_2PO_4	2,72g
Água destilada	100 mL

7.2.9 Solução de fixação para MEV

Glutaraldeído 25%	1,2 mL
Tampão fosfato (KH_2PO_4)	5,0 mL
Água destilada	3,8 mL

7.2.10 Solução de lavagem para MEV

Tampão fosfato 0,2M	10 mL
Água destilada	10 mL

7.2.11 Solução anticoagulante para insetos modificado.

NaOH	0,392g
NaCl	0,853g
EDTA	0,632g
Ácido cítrico	1,206g
Bmercaptanol	1:499 de anticoagulante

Completar para 100 mL de água destila, pH 4,5.

7.3 Limpeza das lâminas e lamínulas usadas nos ensaios imunológicos.

As lâminas e lamínulas usadas nos testes imunológicos foram preparadas segundo protocolo que se segue:

A) As lâminas e lamínulas foram fervidas por 5 minutos em água com detergente para retirada de gorduras;

B) verteu-se a solução ainda quente;

C) As lâminas e lamínulas foram lavadas em água corrente por no mínimo 10 minutos para eliminar resíduos de detergente;

D) Enxaguou-se com água destilada 5 vezes;

E) Água bidestilada 5 vezes;

F) Água mili-Q 5 vezes, para remoção de toxinas;

G) Foram embaladas e esterilizadas em forno de Pasteur, para remoção de pirógenos.

8. VITTA

8.1 Dados Pessoais

Nome: Elio Gomes Fernandes
Filiação: Elio de Oliveira Fernandes e Maria Aparecida Solero Gomes Fernandes
Nascimento: 10/02/1981 - Uba/MG - Brasil
Email: eliogomesfernandes@hotmail.com

8.2 Formação acadêmica Titulação

2008 – 2010 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

2003 – 2007 - Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado.
Universidade Estadual de Montes Claros, UNIMONTES, MG, Brasil.

1999 – 2002 - Ensino Médio (2° Grau).
Colégio Razão, Montes Claros, MG, Brasil.

1988 – 1998 – Ensino Fundamental (1º Grau).
Colégio Indyu, Montes Claros, MG, Brasil

8.3 Experiência Profissional

2005 – 2007 - Universidade Estadual de Montes Claros
Estagiário de iniciação científica no Laboratório de Biotecnologia.

2003 – 2005 - Universidade Estadual de Montes Claros
Estagiário do Laboratório de Ecologia de Microrganismos.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo