

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação Experimental de *Lecanicillium lecanii* no  
Controle Biológico de *Stomoxys calcitrans***

**Paula Sant'ana Alves**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Lecanicillium lecanii* NO  
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Stomoxys calcitrans*.**

**PAULA SANT'ANA ALVES**

*Sob a orientação do professor*  
**Avelino José Bittencourt**

*e Co-orientação da professora*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

589.2

A474a

T

Alves, Paula Sant'ana, 1984-

Avaliação experimental de *Lecanicillium lecanii* no controle biológico de *Stomoxys calcitrans* / Paula Sant'ana Alves - 2010.  
43 f.: il.

Orientador: Avelino José Bittencourt.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 37-43.

1. Fungos - controle biológico - Teses.
2. Fungos entomopatogênicos - Controle - Teses. I. Bittencourt, Avelino José, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

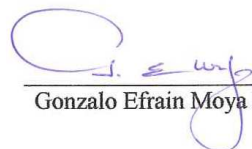
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**


**PAULA SANT'ANA ALVES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2010.

  
Avelino José Bittencourt (Ph.D.) UFRRJ  
(Orientador)

  
Gonzalo Efraim Moya Borja (Ph.D.) UFRRJ

  
Áurea Maria Lage de Moraes (Ph.D.) FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter guiado os meus passos e permitido que eu conquistasse mais esta vitória.

Ao professor Avelino José Bittencourt pela orientação, amizade, confiança, e por tudo que me ensinou ao longo destes anos. A professora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pela co-orientação e por ter cedido seu laboratório para a realização deste projeto.

Ao meu pai pelo apoio incondicional, carinho e paciência. A minha mãe, minhas irmãs e meus sobrinhos pelo carinho e incentivo. Ao Charles e a Florence, pelo carinho único e especial.

Ao amigo Dandy Ralph de Oliveira Brandão, pelo carinho, paciência, incentivo, por ter sempre acreditado em mim e me apoiado nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

As amigas da turma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal, pela amizade, estímulo durante as disciplinas, companheirismo, apoio nas dificuldades e pelos momentos divertidos de descontração.

Ao amigo Wilson Franklim de Vasconcelos Filho pela amizade, carinho, incentivo, apoio em todos os momentos e por toda a ajuda prestada para a conclusão deste curso.

A amiga Ana Paula Rodrigues Moraes pelos ensinamentos compartilhados, e ajuda para a execução deste projeto.

A amiga Vanilla Gomes do Carmo, pela amizade, carinho, apoio nos momentos difíceis e ajuda prestada para a realização deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Controle Microbiano de dípteros hematófagos, pelo estímulo e pela ajuda oferecida em muitos momentos e que contribuíram para a conclusão deste projeto.

Aos amigos da Primeira Igreja Batista em Seropédica, por terem sido uma família nestes dois anos, me incentivando e apoiando.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro que foi primordial para a execução deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Paula Sant'ana Alves, filha de Edna Maria Sant'ana Alves e José Carlos Ferreira Alves, nascida em 15 de Janeiro de 1984, Município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro. Coursou a primeira e segunda série do ensino fundamental no Instituto Castro e Silva, e a terceira série no colégio Santa Mônica, enquanto o restante do curso foi realizado no Colégio Imaculado Coração de Maria, tendo concluído no ano de 1998. Coursou o ensino médio no Colégio Integrado do Méier, concluindo no ano de 2001.

Em Abril de 2003 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído em 06 de Março de 2008. Durante a graduação foi estagiária no Hospital Veterinário de Pequenos animais da UFRRJ no período de 04/2003 a 03/2004. Foi estagiária na área de Medicina e Cirurgia Veterinária, no instituto de Veterinária, sob orientação do Professor Avelino José Bittencourt, no período de 03/2005 a 12/2007.

Em 2008, foi aprovada no processo de seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração Sanidade Animal ao nível de Mestrado, sob a orientação do Professor Dr. Avelino José Bittencourt.

## RESUMO

ALVES, Paula Sant'ana. **Avaliação experimental de *Lecanicillium lecanii* no controle biológico de *Stomoxys calcitrans***. 2010. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

*Stomoxys calcitrans* é um díptero hematófago cujo parasitismo ocasiona perdas econômicas relacionadas à redução da produção leiteira e ganho de peso, além de estar associado à disseminação e transmissão de agentes patogênicos. Devido ao elevado grau de resistência da mosca dos estábulos a uma diversidade de inseticidas químicos, torna-se necessário a busca por alternativas para o seu controle, e uma delas seria a utilização de fungos entomopatogênicos. Todavia, poucas pesquisas relacionadas ao controle microbiano desta mosca foram realizadas. O objetivo deste estudo foi verificar a capacidade do fungo *Lecanicillium lecanii* em inviabilizar ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans* em condições laboratoriais e verificar a formação de halo de inibição em meio de cultivo sólido, em decorrência de substâncias presentes no muco e no macerado total de larvas não expostas e previamente sensibilizadas ao fungo. A colônia de *S. calcitrans* foi mantida no Laboratório de Dípteros Hematófagos, UFRRJ. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes, UFRRJ. Nos ensaios foram utilizadas suspensões aquosas do isolado CG 420 de *L. lecanii* nas concentrações de  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  con.mL<sup>-1</sup>, além do controle positivo. Nos ensaios com ovos, estes foram imersos nas suspensões fúngicas, e transferidos para placas de Petri com papel filtro, meio de desenvolvimento larval e 3 mL de sua respectiva suspensão. A mortalidade foi avaliada cinco dias após a exposição. Não foi observada diferença significativa na eclosão dos ovos tratados frente ao controle. As larvas foram submetidas ao mesmo tratamento dos ovos, e a mortalidade foi avaliada dez e quinze dias após a exposição. Não foi observada diferença significativa na mortalidade de larvas expostas ao fungo quando comparados com o grupo controle, entretanto, o fungo *L. lecanii* reduziu significativamente a emergência de adultos provenientes das larvas expostas à concentração máxima testada ( $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>) sendo observado um percentual de emergência de 25,45% e 41,82 %, em comparação com 63,64% e 90,91% do grupo controle. As pupas também foram imersas nas suspensões fúngicas, e transferidas para placas de Petri com papel filtro e sua respectiva suspensão. A mortalidade foi avaliada dez dias após a exposição. Não foi observada diferença significativa na mortalidade das pupas expostas às diferentes concentrações fúngicas. Discos de papel filtro foram embebidos em amostras de muco e macerado total proveniente de larvas de *S. calcitrans* não expostas e previamente sensibilizadas ao fungo *L. lecanii* e colocados em placas de Petri semeadas com o mesmo fungo ( $1 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>). Não foi verificada a formação de halo de inibição ao redor dos discos. O fungo *L. lecanii* foi incapaz de inviabilizar ovos, larvas ou pupas de *S. calcitrans* nas concentrações fúngicas testadas, no entanto, reduziu significativamente a emergência de adultos quando suas larvas de terceiro estágio foram expostas a concentração  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>.

**Palavras chave:** *Stomoxys calcitrans*, *Lecanicillium lecanii*, controle biológico

## ABSTRACT

ALVES, Paula Sant'ana. **Experimental evaluation of *Lecanicillium lecanii* in biological control of *Stomoxys calcitrans***. 2010. 43p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Veterinary Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

*Stomoxys calcitrans* is a hematophagous fly of which parasitism causes economic losses related to the reduction of milk production and weight gain. Due to the high level of resistance of the stable fly to most of chemical insecticides, it is necessary to search for new alternatives for their control, and one of them would be the use of entomopathogenic fungi. However, few researches related to microbial control of this fly were carried out. The objective of this study was to assess the ability of the *Lecanicillium lecanii* fungus in to make unfeasible eggs, larvae and pupae of the stable fly under laboratory conditions and verify the formation of inhibition zone in agar solid due to the presence of substances in the mucus and total homogenized larvae not previously exposed and sensitized to the fungus. The *S. calcitrans* colony was maintained in the Laboratório de Dípteros Hematófagos, UFRRJ. The tests were performed in the Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes, UFRRJ, where the strain CG 420 of *L. lecanii* was used to prepare the water suspensions. In assays with eggs, larvae and pupae of *S. calcitrans*, fungal suspensions were used at  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  con.mL<sup>-1</sup> concentrations, besides the positive control. In assays with eggs, they were immersed in different fungal suspension and transferred to Petri dishes with paper filter, which were added larval rearing medium and its respective suspension. Mortality was assessed five days after exposure, where it was observed whether stage change occurred. There was no significant difference in the hatching of eggs exposed to different fungal concentrations against the control. Larvae were subjected to the same treatment of eggs, and mortality was assessed ten to fifteen days after exposure. There was no significant difference in mortality of larvae exposed to the fungus when compared with the control group, however, the fungus *L. lecanii* was significantly able to reduce adult emergence from larvae exposed to the highest tested concentration and there was a percentage of emergence of 25,45% and 43,64% compared to 63,64% and 90,91% of the control group. The pupae were also immersed in different fungal suspensions, and transferred to Petri dishes with paper filter, added to its respective suspension. Mortality was assessed ten days after exposure. There was no significant difference in mortality of pupae exposed to different fungi concentrations. Filter paper discs were soaked in mucus samples and total homogenized from larvae of *S. calcitrans* not exposed and previously sensitized to the fungus *L. lecanii* and placed in petri dishes sown with the same fungus. It was not observed the formation of inhibition zone around the discs. The *L. lecanii* fungus was unable to make unfeasible eggs, larvae or pupae of *S. calcitrans* in tested fungal concentrations, however, was significantly able to reduce the emergence of adults when their third larvae stage were exposed to  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup> concentration.

**Key words:** *Stomoxys calcitrans*, *Lecanicillium lecanii*, biological control.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Primeiro ensaio para avaliação da eclosão de ovos de <i>S. calcitrans</i> , expostos a diferentes concentrações das suspensões aquosas de <i>L.</i> <i>lecanii</i> .....	24
<b>Tabela 2.</b> Segundo ensaio para avaliação da eclosão de ovos de <i>S. calcitrans</i> , expostos a diferentes concentrações das suspensões aquosas de <i>L.</i> <i>lecanii</i> .....	24
<b>Tabela 3.</b> Mortalidade de <i>S. calcitrans</i> , provenientes de larvas expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L. lecanii</i> (Após 15 dias da exposição-Primeiro ensaio).....	26
<b>Tabela 4.</b> Mortalidade de <i>S. calcitrans</i> , provenientes de larvas expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L. lecanii</i> (Após 15 dias da exposição-Segundo ensaio).....	26
<b>Tabela 5.</b> Primeiro ensaio para avaliação da mortalidade de larvas de <i>S.</i> <i>calcitrans</i> , expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L.</i> <i>lecanii</i> .....	27
<b>Tabela 6.</b> Segundo ensaio para avaliação da mortalidade de larvas de <i>S.</i> <i>calcitrans</i> , expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L.</i> <i>lecanii</i> .....	27
<b>Tabela 7.</b> Primeiro ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas provenientes de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> , expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L. lecanii</i> (Após 15 dias).....	29
<b>Tabela 8.</b> Segundo ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas provenientes de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> , expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L. lecanii</i> (Após 15 dias).....	29
<b>Tabela 9.</b> Primeiro ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas de <i>Stomoxys</i> <i>calcitrans</i> , expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L.</i> <i>lecanii</i> .....	31
<b>Tabela 10.</b> Segundo ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas de <i>Stomoxys calcitrans</i> , expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de <i>L. lecanii</i> .....	31

**Tabela 11.** Comparação entre a inviabilidade de pupas, provenientes de larvas imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de *L. lecanii* e de pupas expostas ao mesmo método (Primeiro-ensaio)..... 32

**Tabela 12.** Comparação entre a inviabilidade de pupas, provenientes de larvas imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de *L. lecanii* e de pupas expostas ao mesmo método (Segundo-ensaio)..... 32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gaiola para transporte de adultos de <i>S. calcitrans</i> e acondicionamento de pupas em câmara climatizada.....	13
<b>Figura 2.</b> Gaiola para criação de adultos da mosca dos estábulos em condições laboratoriais.....	13
<b>Figura 3.</b> Preparo das suspensões fúngicas de <i>L.lecanii</i> , adição de espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% em frasco com água destilada estéril.....	16
<b>Figura 4.</b> Preparo das suspensões fúngicas de <i>L.lecanii</i> , retirada da superfície das colônias com auxílio de Bisturi para a obtenção de conídios.....	16
<b>Figura 5.</b> Suspensão de <i>L. lecanii</i> na concentração $2 \times 10^8$ Con.mL <sup>-1</sup> .....	16
<b>Figura 6.</b> Exposição de ovos de <i>S. calcitrans</i> ao fungo <i>L. lecanii</i> , imersão dos ovos por dois minutos na suspensão fúngica.....	17
<b>Figura 7.</b> Exposição de ovos de <i>S. calcitrans</i> ao fungo <i>L. lecanii</i> , transferência dos ovos para placa de Petri umedecida com suspensão fúngica, acrescida de 3g de meio de desenvolvimento para larval.....	17
<b>Figura 8.</b> Método de exposição de ovos e larvas da mosca dos estábulos, placas de Petri sendo umedecidas com 3mL de água destilada (controle).....	18
<b>Figura 9.</b> Método de exposição de ovos e larvas de <i>S. calcitrans</i> , adição de mistura para desenvolvimento larval.....	18
<b>Figura 10.</b> Método de exposição de ovos e larvas, placas de Petri cobertas por Parafilm®, onde foram realizados orifícios para entrada de ar.....	18
<b>Figura 11.</b> Crescimento fúngico na placa de Petri contendo ovos expostos a concentração $2 \times 10^7$ Con.mL <sup>-1</sup> de <i>L. lecanii</i> dez dias após a exposição.....	23
<b>Figura 12.</b> Crescimento fúngico na placa de Petri contendo ovos expostos a concentração $2 \times 10^8$ Con.mL <sup>-1</sup> de <i>L. lecanii</i> dez dias após a exposição.....	23
<b>Figura 13.</b> Larvas de <i>S. calcitrans</i> com presença de hifas e conídios de <i>L. lecanii</i> e pupa apresentado má formação devido à exposição de larvas a	

concentração $2 \times 10^7$ Con.mL <sup>-1</sup> .....	28
<b>Figura 14. A.</b> Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no muco produzido por larvas de <i>S. calcitrans</i> não expostas ao isolado CG 420 de <i>L. lecanii</i> .....	34
<b>Figura 14. B.</b> Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.....	34
<b>Figura 15. A.</b> Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no muco produzido por larvas de <i>S. calcitrans</i> expostas ao isolado CG 420 de <i>L. lecanii</i> .....	34
<b>Figura 15. B.</b> Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.....	34
<b>Figura 16. A.</b> Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no macerado de larvas de <i>S. calcitrans</i> não expostas ao isolado CG 420 de <i>L. lecanii</i> .....	35
<b>Figura 16. B.</b> Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.....	35
<b>Figura 17. A.</b> Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no macerado de larvas de <i>S. calcitrans</i> expostas ao isolado CG 420 de <i>L. lecanii</i> ....	35
<b>Figura 17. B.</b> Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>02</b>
2.1 Caracterização de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	02
2.2 Ciclo Biológico.....	02
2.3 Efeito Sobre os Animais.....	04
2.4 Importância Econômica.....	04
2.5 Transmissão de Agentes Patogênicos.....	05
2.6 Controle.....	05
2.7 Fungos Entomopatogênicos.....	07
2.8 Tolerância de Insetos a Patógenos.....	09
2.9 <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	09
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 Localização do Experimento.....	12
3.2 Criação de <i>Stomoxys calcitrans</i> em Condições Laboratoriais.....	12
3.2.1 Obtenção de exemplares de moscas adultas.....	12
3.2.2 Manutenção da colônia de <i>S. calcitrans</i> .....	12
3.2.3 Obtenção de ovos e larvas, pupas e adultos.....	12
3.3 Fungo Entomopatogênico <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	14
3.3.1 Obtenção e manutenção das amostras fúngicas.....	14
3.3.2 Suspensões fúngicas.....	14
3.4 Viabilidade Conidial das Suspensões Fúngicas.....	15
3.5 Delineamento Experimental.....	15
3.5.1 Ensaio com ovos.....	15
3.5.2 Ensaio com larvas.....	19
3.5.3 Ensaio com Pupas.....	19
3.6 Contagem de Indivíduos Expostos as Suspensões Fúngicas.....	19
3.7 Confirmação da Ação Fúngica sobre os Indivíduos Expostos.....	19
3.8 Verificação de Halo de Inibição.....	19
3.9 Análise Estatística.....	20
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
4.1 Avaliação Morfológica dos Isolados.....	22
4.2 Viabilidade dos Conídios.....	22
4.3 Ensaio com Ovos de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	22
4.4 Ensaio com Larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	25
4.5 Ensaio com Pupas de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	30
4.6 Verificação de Halo de inibição.....	33
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Stomoxys calcitrans*, comumente conhecida como “mosca dos estábulos”, é um díptero hematófago, de distribuição mundial que parasita preferencialmente bovinos e eqüinos (GUIMARÃES, 1984; SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). Este díptero está associado à disseminação e transmissão de diferentes agentes patogênicos, seja por via mecânica ou biológica. Outro fator que favorece a transmissão de agentes é o padrão alimentar, que é do tipo interrompido. A interrupção pode ocorrer pela reação dos animais à picada, que ocasiona grande desconforto aos animais, ou pelo fato desta mosca se alimentar na parte inicial da manhã e final da tarde (CARN, 1996; BITTENCOURT, 1998). Durante os períodos de grande infestação, os animais não conseguem alimentar-se adequadamente, emagrecem, perdem sua resistência física e se tornam susceptíveis a doenças (GUIMARÃES, 1984). O efeito de seu parasitismo sobre bovinos resulta em perdas econômicas relacionadas à redução da produção leiteira (MATTOS-JUNIOR, 1986), diminuição no ganho de peso dos animais, e aumento do tempo necessário para que os animais alcancem o peso comercial desejado (WIEMAN, et al., 1992).

O controle químico foi empregado ao longo dos anos visando um controle eficaz destas moscas, porém o uso incorreto e indiscriminado de tais produtos tem favorecido o desenvolvimento de resistência (GUIMARÃES, 1986; PAIVA, 1994). O interesse em formas alternativas para o controle de ectoparasitas tem crescido na medida em que os problemas de resistência de pragas às substâncias químicas tem aumentado, bem como para minimizar os danos ao meio ambiente e restringir a aplicação de inseticidas químicos. A redução no uso de produtos químicos traz conseqüências benéficas para a qualidade dos produtos de origem animal e vegetal, com reflexos diretos na qualidade de vida e saúde dos agricultores e consumidores. A busca por alimentos orgânicos tem reforçado a utilização e interesse por estes métodos, uma vez que tais alimentos apresentam preços diferenciados de mercado (ALVES, 1998; HOGSETTE, 1999).

Os fungos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano, e a maioria daqueles já relatados, também foi descrita no Brasil. Tais fungos foram considerados como importantes agentes para redução de pragas. Fungos do gênero *Lecanicillium* são patógenos de insetos, que têm sido utilizados como biopesticidas comerciais (ALVES, 1998; DE FARIA; WRIGHT, 2007).

Alguns insetos respondem ao contato com patógenos através da produção de substâncias capazes de evitar sua penetração por ação mecânica ou antibiótica (ALVES, 1998). Além disso, foram verificadas larvas e adultos de dípteros secretando peptídeos antimicrobianos ativos contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (BOULANGER et al., 2002; CANDIDO-SILVA et al., 2007).

Devido ao elevado grau de resistência da mosca *S. calcitrans* a diversos inseticidas químicos, torna-se necessário à busca por alternativas para o seu controle, e uma das alternativas seria a utilização de fungos entomopatogênicos. Além disso, poucas pesquisas relacionadas ao controle microbiano desta mosca foram realizadas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos, verificar a capacidade do fungo *Lecanicillium lecanii* em inviabilizar ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans* em condições laboratoriais e verificar a formação de halo de inibição em meio de cultivo sólido em decorrência de substâncias presentes no muco e no macerado total de larvas não expostas e previamente sensibilizadas ao fungo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Caracterização de *Stomoxys calcitrans*

A mosca *Stomoxys calcitrans* pertence à subfamília Stomoxydinae, família Muscidae, seção Calyptatae, divisão Schyzophora, infraordem Muscomorpha, subordem Brachycera e ordem Diptera (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). Dentre as principais características morfológicas destacam-se a probóscida proeminente, projetada horizontalmente para diante da cabeça, corpo escuro revestido de polinosidade acinzentada, tórax com quatro faixas longitudinais castanho-escuras no mesonoto, abdome com três manchas no segundo e terceiro segmentos, extremidade da quarta veia longitudinal (M 1+2) suavemente curvada, arista plumosa somente no dorso e palpos muito curtos (SOULSBY, 1987; SERRA-FREIRE; MELLO, 2006).

É um díptero hematófago, cosmopolita, de hábitos diurnos, que parasita preferencialmente bovinos e eqüinos, porém pode se alimentar em praticamente todas as espécies de animais de sangue quente, e em determinadas situações no homem (GUIMARÃES, 1984; SOULSBY, 1987; SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). No campo podem ser identificadas nos animais devido à posição que assumem durante a alimentação, isto é, de cabeça para cima (BITTENCOURT, 2007). Adultos podem ser encontrados pousados em vários locais nas fazendas, tendendo a ser encontrados repousando nas instalações rurais, em cercas, cochos, muros, superfícies de cor clara (GUIMARÃES, 1984; LYSYK, 1993), arbustos e árvores (BITTENCOURT, 2007). Alimentam-se nos animais nas horas em que o a temperatura não esta muito elevada (CARRERA, 1991), e quando esta se eleva, buscam abrigo do sol para digerir o sangue ingerido (BITTENCOURT, 2007).

Avaliando os locais do corpo preferidos por *S. calcitrans* para se alimentar, Bittencourt e Moya-Borja (2002) constataram que os membros torácicos apresentavam o maior número de moscas, seguido pelos membros pélvicos e tórax.

### 2.2 Ciclo Biológico

A abundancia de *S. calcitrans* depende amplamente dos meios disponíveis para desenvolvimento de suas larvas (FOIL; HOGSETTE, 1994), podendo utilizar fezes de bovinos, eqüinos e ovinos, desde que estejam misturados a feno ou forragem seca (GUIMARÃES, 1983; HOGSETTE et al., 1987; MEYER; PETERSEN, 1983).

Uma grande variedade de substratos encontrados próximos aos estábulos, como alfafa, grãos, grama cortada, preferencialmente fermentados ou amolecidos, constituem meios de criação para esta mosca. A maioria destes materiais apresentam em comum a presença de matéria orgânica em decomposição, que fornece habitação, proteção e fonte de alimento para larvas (GUIMARÃES, 1983; HOGSETTE et al., 1987). Fezes de aves também podem servir como substrato de criação, devido à presença de amônia que atrai moscas adultas e estimula sua postura (GUIMARÃES, 1983). Bittencourt (1998) verificou que em 42,3% das propriedades onde era realizado cultivo de café, a casca e a palha provenientes da secagem do café eram devolvidas ao cafezal como forma de adubação orgânica, podendo servir para desenvolvimento desta mosca, principalmente quando associada a esterco de animais e principalmente a cama de frangos, que é muito utilizada como adubo orgânico, sendo um dos mais importantes substratos para desenvolvimento de *S. calcitrans*. Outros substratos podem servir para o desenvolvimento de seus estágios imaturos, como o bagaço de cana e outros

resíduos sólidos da indústria sucro-alcooleira adicionados ou não do restilo de usina de açúcar, também conhecido como vinhoto (BURALLI et al., 1987).

O ciclo de vida da mosca dos estábulos é composto de quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. A fêmea deposita seus ovos em grupos sobre o substrato, colocando em média entre 25 e 50 ovos por postura, que pode variar de 4 a 20 posturas, podendo atingir 632 ovos durante seu período de vida. O período de incubação varia de dois a cinco dias estando relacionado à temperatura, onde temperaturas mais elevadas resultam em um período de incubação mais curto (GUIMARÃES, 1983; GUIMARÃES, 1984). As larvas recém-eclodidas penetram no meio em busca de abrigo da luz, desidratação e menor vulnerabilidade a predadores e parasitas (GUIMARÃES, 1983; MCPHERON; BROCE, 1996). A duração do período de desenvolvimento larval apresenta dependência direta e inversamente proporcional à temperatura (MELLO, 1989), durando em média entre 14 e 26 dias, a temperatura entre 21°C e 26° C (GUIMARÃES, 1983). Esta é a fase em que este inseto se apresenta mais vulnerável as condições adversas do ambiente, sendo menos resistente a baixas temperaturas (MELLO, 1989; BAYOH; LINDSAY, 2004; GILLES et al., 2005).

A pupação ocorre nas partes mais secas do substrato de desenvolvimento (MATTOS-JUNIOR, 1986; SOULSBY, 1987) e o período pupal se apresenta sensível as variações climáticas, tendo duração de 6 a 26 dias à temperatura entre 21°C e 26° C (GUIMARÃES, 1983). Diferentemente das larvas, nesta fase o inseto é mais resistente as condições do ambiente apresentando, portanto, menor mortalidade, entretanto, esta fase é mais susceptível a altas temperaturas se comparado ao estágio larval, o que pode estar relacionado aos efeitos nocivos do calor em seu processo de metamorfose (MELLO, 1989; BAYOH; LINDSAY, 2004; GILLES et al., 2005). Em estudo para avaliar a profundidade de empupação e presença de microhimenópteros parasitoides nas pupas de *S. calcitrans*, Neves e Faria (1988) verificaram um maior número de pupas em até 5 centímetros de profundidade, e associaram a profundidade de empupação com a capacidade de sobrevivência aos inimigos naturais, onde pupas localizadas em profundidade acima de 5 centímetros estariam mais protegidas, entretanto, aquelas localizadas a mais de 10 centímetros de profundidade teriam dificuldade na emergência, em virtude das barreiras que teriam que atravessar.

A duração do ciclo de vida desta mosca ocorre em aproximadamente 30 dias (SOUSBY, 1987) e sua longevidade está diretamente relacionada à temperatura, sendo maior em temperaturas mais baixas e menor em temperaturas mais elevadas. Em locais mais quentes a mosca dos estábulos cria-se continuamente, não apresentando interrupção no seu ciclo de vida (GUIMARÃES, 1983; MELLO, 1989). Em estudos sobre a influência da temperatura no desenvolvimento de *S. calcitrans* vários autores determinaram que temperaturas próximas a 25 °C foram as mais adequadas para seu desenvolvimento, uma vez que nesta faixa térmica se obtém o maior percentual de viabilidade (BAILEY et al., 1975; AGUIAR-VALGODE; MILWARD-DE-AZEVEDO, 1992; MCPHERON; BROCE, 1996; GILLES et al., 2005). A umidade relativa para desenvolvimento desta mosca deve permanecer acima de 50%, sendo 55-60% de U.R. uma faixa considerada satisfatória (JONES, 1966). Bittencourt (1998) verificou que no período em que a quantidade de *S. calcitrans* por animal mais se elevou nos seus dois anos de estudo, a temperatura estava compreendida em um intervalo de 18°C a 27°C e a umidade relativa de 50 a 80%, determinando que estas condições climáticas favoreceram o desenvolvimento desta mosca.

Adultos de ambos os sexos se alimentam de sangue, iniciando sua alimentação de seis a oito horas após a sua emergência, sendo capazes de ingerir até três vezes seu peso médio (25,8 mg) de cada vez (GUIMARÃES, 1984). Seu período de pré-postura varia de 8 a 12 dias após a emergência do pupário (MELLO, 1989) e segundo Killough e Mckinstry (1965) a



fêmea não é capaz de realizar postura até que possua oito dias de emergida. Ao avaliar a eficiência da alimentação com sangue de diferentes animais na atividade reprodutiva de fêmeas de *S. calcitrans*, Mello (1989) determinou que o sangue de suíno foi o mais eficaz, pois reduziu o período de pré-postura e aumentou o período de postura, assim como o número de ovos depositados.

Bittencourt e Moya-Borja (2000) estudando a flutuação sazonal da mosca dos estábulos em Espírito Santo do Pinhal – SP, determinaram que o período do ano onde foi observado maior número de moscas foi aquele compreendido entre outubro e março, tendo seu pico no mês de dezembro e em seguida entrando em declínio. No período de maio a setembro a quantidade de moscas foi muito menor que aquela verificada nos demais meses do ano. E destacaram que a pluviosidade parece ter sido o fator climático que mais influenciou a população de moscas, podendo interferir de forma positiva ou negativa. Em um primeiro momento a pluviosidade elevada auxiliaria no incremento da população de moscas, porém a saturação do solo com água possivelmente afetaria negativamente os estágios imaturos. O que está de acordo com Neves e Faria (1988) que citaram que nos meses quentes e chuvosos (outubro a março) espera-se um maior número de pupas e moscas adultas.

### **2.3 Efeito Sobre os Animais**

Machos e fêmeas de *S. calcitrans* parasitam diversas espécies como bovinos, eqüinos, caprinos, ovinos, suínos, cães, gatos (GUIMARÃES, 1984), aves e répteis (SOULSBY, 1987). Este díptero possui uma picada dolorosa que causa incômodo nos animais parasitados (BITTENCOURT, 1998), o que os leva a buscar proteção, como penetrar em riachos, lagoas, águas represadas e lama, permanecendo nestes locais, para evitar as picadas.

Bittencourt (1998) observou que os animais parasitados respondiam à infestação com movimentação da cabeça e da cauda, bater das orelhas, bater dos cascos ou unhas no solo, principalmente dos membros torácicos, e tremor cutâneo. No campo, os animais se agrupam e se esfregam uns aos outros, congregando-se em abrigos (capoeiras, matas, cursos d'água), quando estes estão acessíveis, deixando de sair para pastar (GUIMARÃES, 1984). Este comportamento de agrupamento pode afetar a termodinâmica de transferência de calor, sendo responsável pela redução no consumo de alimento e levando a perda de peso (WIEMAN, et al., 1992). Durante os períodos de grande infestação, os animais não conseguem alimentar-se adequadamente, emagrecem, ficam enfraquecidos, perdendo sua resistência física e se tornando susceptíveis a enfermidades (GUIMARÃES, 1984).

### **2.4 Importância Econômica**

O parasitismo pela mosca dos estábulos leva a um prejuízo anual de 398,9 milhões de dólares, nos Estados Unidos (DRUMMOND et al., 1987), e no Brasil estimam-se perdas superiores a 100 milhões de dólares por ano (GRISI et al., 2002). Tais prejuízos são decorrentes dos hábitos hematófagos da mosca dos estábulos, uma vez que sua picada gera irritação nos animais, o que resulta em baixa produção leiteira, redução da vitalidade (MATTOS-JUNIOR, 1986), redução no ganho de peso, e aumento do tempo necessário para que os animais alcancem o peso comercial desejado (WIEMAN et al., 1992).

Campbell et al. (1977) determinaram que o parasitismo por *S. calcitrans* em uma proporção de 50 moscas por bezerro, reduziu o ganho de peso destes animais em 90 gramas por dia, e a eficiência alimentar em 12,9%, em comparação aos não parasitados. Ao elevar o número de moscas para 100 por bezerro, verificaram que os bovinos livres de moscas

obtiveram um ganho de 220 gramas por dia a mais do que aqueles parasitados, e a eficiência alimentar foi 10,9%.

Um estudo realizado com objetivo de avaliar os efeitos de baixos níveis populacionais deste díptero no ganho de peso e eficiência alimentar de bovinos demonstrou que animais com uma quantidade média de 2,58, 5,21 e 7,07 moscas por membro, apresentaram redução significativa no ganho de peso e eficiência alimentar, e que a presença de aproximadamente 35 moscas no membro dianteiro implicaria em uma redução de 20% no ganho de peso e 12% na eficiência alimentar (CAMPBELL et al., 1987).

Bruce e Decker (1958) avaliaram a relação entre quantidade de moscas e a produção de leite nos Estados Unidos, e relataram uma redução na sua produção de 0,7% por cada mosca infestando as vacas leiteiras. No Brasil, Guimarães (1984) verificou perdas da ordem de 20% a 60% na produção leiteira em áreas de alta incidência de *S. calcitrans*.

## 2.5 Transmissão de Agentes Patogênicos

Como a mosca dos estábulos possui picada dolorosa, os animais reagem tentando livrar-se das moscas, o que as leva a buscar um novo hospedeiro (BITTENCOURT, 1998; CARN, 1996). Este comportamento favorece a transmissão de agentes patogênicos de um animal infectado a outro saudável (TERRY; CARROLL, 1988). Diferentes agentes patogênicos foram relacionados à *S. calcitrans*, a exemplo de vírus, bactérias e protozoários. Entre eles destacam-se o vírus da Anemia Infecciosa Equina, as bactérias *Borrelia recurrentis*, *Bacillus anthracis*, *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *Erysipelothrix insidiosa* e o protozoário causador do “mal das cadeiras” *Trypanosoma evansi* (GUIMARÃES, 1984). Também foi citado por Sousby (1987) como hospedeiro intermediário de *Habronema majus*.

Castro et al. (2008) relataram o isolamento de 28 espécies diferentes de enterobactérias em segmentos de *S. calcitrans* coletadas em propriedades rurais de dois municípios do Estado do Rio de Janeiro - Brasil, entre elas, *Enterobacter amnigenus*, *Serratia odorífera*, *Edwardsiella ictaluri*, *Hafnia alvei*, *Cedecea lapagei*, *Serratia ficaria*, *Erwinia quercina* e *E. stewartii*, e *Edwardsiella hoshinae*, e destaca que algumas destas espécies apresentam potencial patogênico ao homem e aos animais.

Förster et al. (2009) em estudo para avaliar a ocorrência e distribuição de microorganismos patogênicos carreados por moscas sinantrópicas verificaram que as espécies de moscas mais frequentemente observadas nos locais de coleta foram a *Musca domestica* (51%) seguida pela mosca dos estábulos (24%), e que estes dípteros foram encontrados carreando bactérias e fungos patogênicos para humanos, entre eles *Campylobacter jejuni*, cepas de *Escherichia coli* (EHEC, EPEC e ETEC), *Candida albicans*, *C. tropicalis*, entre outros.

## 2.6 Controle

As principais medidas para o controle da mosca dos estábulos estão relacionadas aos seus locais de criação e consistem na remoção de excrementos, palhas, restos de ração e urina dos animais dos estábulos, cochos e currais, sendo conduzidos para esterqueiras, se possível diariamente, enquanto, plantas, restos de culturas, grama cortada, entre outros, devem ser queimados ou enterrados.

Nos aviários o esterco acumulado que será utilizado posteriormente como adubo orgânico deve ser submetido à secagem, estocado em galpões cobertos para proteção das chuvas, e coberto por plástico de cor preta por um período mínimo de um dia, em intervalos

não superiores a uma semana, já que a temperatura atingida nestes locais, associada a grande quantidade de amônia, evita o desenvolvimento de larvas de dípteros neste material (GUIMARÃES, 1984; GUIMARÃES, 1986; SKODA et al., 1991).

O controle químico consiste na aplicação de inseticidas nos currais, estábulos, abrigos das moscas, e nos próprios animais, buscando eliminar as moscas adultas e formas jovens, e foi empregado ao longo dos anos visando um controle eficaz destas moscas, porém o uso incorreto, contínuo e indiscriminado destas formulações tem favorecido o desenvolvimento de resistência (GUIMARÃES, 1986; PAIVA, 1994). A mosca dos estábulos apresenta resistência a diversos compostos como o DDT, metoxicloro, lindane, clordano, eldrin, dieldrin, malathion e toxafeno, e mais recentemente aos diclorvos, piretróides e stirifós (KUNZ; KEMP, 1994; CILEK; GREENE, 1994). Além disso, o uso de inseticidas nos animais geralmente tem um nível moderado de eficácia já que as moscas têm contato limitado com o hospedeiro enquanto se alimentam (CRUZ-VÁZQUEZ et al., 2005). Outro ponto desfavorável seria a aplicação de inseticidas organo-sintéticos como larvicidas diretamente no esterco. Neste caso, ocorreria eliminação de quase 100% da fauna de inimigos naturais das moscas (predadores e parasitóides) e a sua restauração poderia levar de seis a doze meses. Em condições naturais os predadores e parasitóides podem controlar até 90% da população de moscas (GUIMARÃES, 1986).

O interesse em formas alternativas para o controle de ectoparasitas tem aumentado, visando à redução dos danos ao meio ambiente, e ainda minimizar o problema da resistência destas pragas às substâncias químicas. (HOGSETTE, 1999).

O arsenal de patógenos naturalmente disponíveis constitui-se numa alternativa eficiente e econômica para o controle das pragas agrícolas e domésticas em todo o mundo, e incluem bactérias, nematóides, protozoários, vírus, fungos, e parasitóides. Os métodos químicos podem determinar a redução rápida e temporária dos prejuízos econômicos causados por um complexo de pragas, enquanto que, os produtos microbianos alcançam mais lentamente resultados semelhantes, porém de forma duradoura (ALVES, 1998).

Devido à facilidade de produção, eficácia e relativa segurança, as bactérias são consideradas promissoras para serem usadas no controle biológico de pragas, e dentre elas destacam-se as do gênero *Bacillus* e *Serratia*. Ruiu et al. (2008) em experimento com estágios imaturos de *M. domestica*, verificaram que uma formulação de *Brevibacillus laterosporus* na concentração de  $10^8$  esporos/mL e uma dose correspondente a  $2 \text{ L/m}^2$ , foi capaz de matar larvas e reduzir a emergência de adultos desta mosca em meio de desenvolvimento larval em laboratório, e o mesmo tratamento também reduziu a emergência da mosca doméstica no esterco em gaiolas ao ar livre, que reproduziam o habitat natural destas moscas.

Cerca de dezenove famílias de nematóides reúnem membros que são parasitos obrigatórios ou facultativos de insetos, e dentre eles os mais utilizados para controle de insetos pertencem à família Steinernematidae (ALVES, 1998).

Neves e Faria (1988) estudando a presença de microhimenópteros parasitóides nas pupas de *S. calcitrans*, verificaram a presença de *Spalangia endius* (11,18%), *Nasonia vitripennis* (4,21%) e *Muscidifurax raptor* (0,64%), e sugeriram que *S. endius* por ter sido encontrada em maior frequência, deveria ser a mais adaptada ao meio e, portanto, a espécie mais eficiente num controle biológico programado. Em levantamento dos parasitóides de pupas de *M. domestica*, *S. calcitrans* e *Muscina stabulans* em uma granja de galinhas poedeiras no estado de São Paulo, Costa et al. (2004) verificaram a presença de *Tachinaephagus zealandicus*, *Spalangia cameroni*, *S. endius*, *S. gemina*, *Pachycrepoideus vindemiae* e *Eurytoma* sp., e ainda *S. drosophilae* e *S. nigroaenea* em pupas da mosca dos estábulos. Birkemoe et al. (2009) estudando a utilização de *S. cameroni* para controle

biológico de *M. domestica* e *S. calcitrans* sugeriram que este parasitóide pode reduzir a densidade destas moscas em granjas de porcos, onde existam locais de criação para estes dípteros.

Mais de 700 espécies de fungos já foram encontradas parasitando insetos ou mantendo com estes outros tipos de interações, estes fungos podem ser específicos ou causar doenças em grande número de hospedeiros, como algumas cepas de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (ALVES, 1998). Este mesmo autor descreve inúmeras vantagens da utilização de patógenos como fungos, vírus e bactérias, quando comparado aos produtos químicos: especificidade e seletividade dos entomopatógenos, o que evita a ocorrência de desequilíbrio biológico de importância no ecossistema; efeitos secundários, pois além da mortalidade direta, os patógenos podem afetar as gerações seguintes, reduzindo a oviposição, viabilidade dos ovos, entre outros efeitos; controle mais duradouro quando a doença estabelecida pelo patógeno assume caráter enzoótico; os insetos dificilmente se tornam resistentes aos patógenos devido às aplicações normais nas culturas; e controle associado com produtos químicos seletivos visando uma ação sinérgica e conseqüentemente um controle mais rápido e eficaz da praga.

O controle integrado de pragas é uma estratégia de controle que utiliza várias medidas, em harmonia com o ambiente, integrando-as nas diferentes fases da cultura ou do sistema considerado, e tem como objetivo manter os insetos a níveis populacionais que não afetem economicamente a cultura. A utilização do controle biológico forma a base deste manejo, que pode ser complementado com a utilização de inseticidas químicos ou outras formas de controle de pragas. A utilização do potencial de controle natural de pragas permite, em muitos casos, uma redução drástica na aplicação de inseticidas químicos, com conseqüências benéficas para a qualidade ambiental e dos produtos obtidos (ALVES, 1998). No controle integrado de moscas, a principal medida a ser adotada é o controle mecânico, pois é a forma de combate mais duradoura, barata e simples, permitindo um controle de até 90% da população de moscas. Sem isto as outras medidas tornam-se ineficientes, uma vez que se descuidando do manejo da matéria orgânica, ocorre um aumento no número de moscas, dificultando o controle químico e o biológico (PAIVA, 1994).

## 2.7 Fungos Entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano e a maioria daqueles já relatados ocorrem no Brasil, sendo que desses, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica. A ocorrência desses fungos, em condições naturais, seja enzoótica ou epizooticamente, tem sido no Brasil e em outros países, um fator importante na redução da população de pragas. Esses entomopatógenos vêm sendo estudados há mais de 60 anos no Brasil, entretanto, somente após a ocorrência epizoótica de *Metarhizium anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, que os fungos receberam mais atenção dos pesquisadores. Estudos têm sido desenvolvidos no Brasil com vários fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* para controle da broca-da-bananeira, percevejos da soja e carrapatos. Já o fungo *Zoophthora radicans* foi empregado no controle de *Empoasca kraemeri* (cigarrinha verde) em feijoeiro, e *Nomuraea rileyi* para o controle de lagarta da soja, entre outros (ALVES, 1998; MONTEIRO et al., 2003; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Na Inglaterra, fungos do gênero *Lecanicillium* têm sido utilizados em condições de estufa para o controle dos pulgões *Macrosiphoniella sanboni*, *Brachycaudus helichrysi*, *Mysus persicae* e *Aphis gossypii*, e das moscas brancas *Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia tabaci*, além de adultos e larvas de tripes, com as formulações comerciais Vertalec® e

Mycotal®, que são aplicadas a intervalos de sete dias (ALVES, 1998). O *L. muscarinum* foi isolado de uma ampla gama de substratos, principalmente de insetos, e é comercializado como o biopesticida Micotal® contra moscas brancas e tripes, e Verticillim® contra moscas brancas, pulgões e ácaros. Isolados de *L. longisporum* são comercializados contra pulgões como Vertalec® e contra moscas brancas como Vertirril®. Pelo menos, 15 produtos baseados em *Lecanicillium spp.* são ou estão em processo de serem comercializados com vários nomes comerciais, para uso contra vários insetos praga em vários países em todo o mundo (DE FARIA; WRAIGHT, 2007).

Kim (2007) estudando a influência de *L. attenuatum* no desenvolvimento e reprodução do pulgão do algodão, *A. gossypii*, concluiu que a aplicação da suspensão fúngica nas ninfas deste pulgão não influenciou seu desenvolvimento, período pré-reprodutivo e idade da primeira larvipostura, entretanto, reduziu a fecundidade total e longevidade, sugerindo que o tratamento com este fungo pode suprimir a população da próxima geração. Cuthbertson e Walters (2005) em experimento para avaliar a patogenicidade de *L. muscarium* para a mosca branca da batata doce *B. tabaci* concluiu que este fungo, quando aplicado sob ótimas condições, pode resultar em alta mortalidade de larvas de segundo estágio, tanto sob condições laboratoriais quanto em estufa de plantas, demonstrando que este entomopatógeno tem potencial para ser um importante agente de controle biológico de moscas brancas.

Angel-Sahágun et al. (2005) avaliaram em condições laboratoriais a susceptibilidade de ovo, pupa e adulto de *Haematobia irritans* a isolados dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*, e concluíram que estes estágios são susceptíveis aos diferentes isolados, uma vez que, reduzem a emergência de adultos quando aplicados em grupos de ovos e pupas, e causam mortalidade quando aplicados em adultos. Porém, o efeito patogênico varia entre os diferentes fungos testados e entre os diferentes isolados de cada fungo.

Lecuona et al. (2005) em experimento para avaliar a capacidade de isolados do fungo *B. bassiana* em inviabilizar larvas, pupas e adultos de *M. domestica* verificaram que nenhum dos isolados testados foi capaz de controlar larvas e pupas, e sugeriram que o isolado Bb72 tem potencial para se tornar um micoinseticida promissor, uma vez que possui alta virulência para adultos deste díptero e eficiente produção de conídios.

Em estudo para avaliar a patogenicidade de *B. bassiana* sobre larvas e adultos de *M. domestica* e adultos de *S. calcitrans*, em condições laboratoriais, Watson et al. (1995) determinaram que este fungo foi eficaz no controle de larvas e adultos da mosca doméstica, e também nos adultos da mosca dos estábulos, entretanto, verificaram que *S. calcitrans* era menos susceptível a ação fúngica que *M. domestica*, e somente suspensões com altas doses ( $1 \times 10^8$  conídios por  $\text{cm}^3$ ) foram capazes de eliminar 70 e 84% das moscas expostas aos isolados P89 e L90, respectivamente.

Avaliando o efeito de *M. anisopliae* sobre os estágios imaturos da mosca dos estábulos, Moraes et al. (2008) relataram que altas concentrações fúngicas foram capazes de inviabilizar os ovos, porém o mesmo resultado não foi obtido com larvas e pupas. Entretanto, apesar de não ter sido verificado mortalidade significativa das larvas, foi observada má formação pupal, quando estas eram provenientes de larvas expostas à suspensão fúngica na concentração  $2 \times 10^8$  conídios por  $\text{mL}^{-1}$ .

Steenberg e Humber (1999) isolaram e identificaram os fungos *Verticillium lecanii*, *V. fuisporum*, *V. psalliotae*, *V. lamellicola* e espécies de *Acremonium* de uma ampla variedade de insetos e realizaram ensaios para avaliar a entomopatogenicidade destes fungos contra a mosca branca da batata doce (*B. tabaci*) e adultos da mosca doméstica, verificando que os isolados testados foram patogênicos para a mosca doméstica adulta com exceção de três

isolados de *V. fusisporum*, além de terem constatado que o fungo *V. lecanii* foi o mais patogênico dentre as espécies testadas. Entretanto estes autores destacam que a mortalidade destas moscas, em geral, ocorreu muito tarde, e que nenhum dos fungos testados pareceu ter qualquer potencial para controle de adultos desta mosca.

## 2.8 Tolerância de Insetos a Patógenos

A susceptibilidade dos hospedeiros aos fungos está relacionada à natureza e quantidade dos componentes de seu tegumento. A quantidade de ácidos graxos com ação antibiótica presente no tegumento pode variar em função das condições abióticas, espécie do inseto e seu estágio de desenvolvimento, onde alguns insetos reagem à presença de patógenos com elevada produção desses materiais, evitando a penetração por ação mecânica ou antibiótica (ALVES, 1998).

Boulanger, et al. (2002) identificaram um peptídeo antimicrobiano secretado no intestino anterior de *S. calcitrans* adultas, e verificaram que este foi ativo contra bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas, fungos filamentosos e leveduras.

Fu et al. (2009) isolaram uma substância antifúngica na hemolinfa de larvas de *M. domestica*, posteriormente denominada como *Musca domestica* peptídeo antifúngico-1 (MAF-1), e verificaram que este peptídeo apresentava uma forte atividade contra *Candida albicans*.

Candido-Silva et al. (2007) verificaram a presença do gene BhSGAMP-1 em *Bradysia hygida* (Diptera:Sciaridae), codificando um peptídeo antimicrobiano. Este gene é expresso exclusivamente nas glândulas salivares de larvas desta mosca, próximo a mudança de estágio de larva para pupa. Em testes funcionais, foi verificado que este peptídeo apresentou amplo espectro de atividade antibiótica, tendo sido capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*), gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e leveduras (*C. albicans*). A secreção de BhsGAMP-1 na saliva poderia ajudar a prevenir infecção microbiana durante a mudança de fase. Os autores sugeriram que este peptídeo revestia a superfície da larva, criando uma zona de inibição de crescimento de microorganismos patogênicos ao seu redor, mantendo-a protegida durante a mudança de fase para pupa.

## 2.9 *Lecanicillium lecanii*

A maior parte das espécies de fungos classificadas como *Verticillium* seção Prostata foram transferidas para o gênero *Lecanicillium*, e quatro delas, distantes da clade de *Lecanicillium* foram classificadas como um novo gênero, *Simplicillium* (ZARE; GAMS, 2001). Fungos do gênero *Lecanicillium* foram descritos causando epizootia natural em populações de pulgões e cochonilhas, nas regiões tropicais e subtropicais, e foi o primeiro gênero estudado e desenvolvido para uso como micoinseticida inundativo em estufas de plantas (SHAH; PELL, 2003).

Fundamentadas em análises moleculares, a espécie *Verticillium lecanii* foi agrupada no gênero *Lecanicillium*, logo sua classificação atual é *Lecanicillium lecanii* (GAMS; ZARE, 2001). Este fungo ocorre frequentemente sobre pulgões e cochonilhas nas regiões tropicais e subtropicais, e também já foi relatado sobre insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e sobre ácaros eriofídeos. Este fungo também foi descrito no município de Nova Campina - SP, reduzindo consideravelmente os pulgões-do-pinus, *Cinara atlantica*, demonstrando que apresenta alto potencial de controle, principalmente em viveiros de produção de mudas e no campo (LOUREIRO et al., 2004). A presença de insetos doentes é

determinada em função do aparecimento de um halo branco em volta do inseto atacado e associado à estrutura característica do conidióforo (forma de furador) e conídios elípticos do fungo (ALVES, 1998). Prade et al. (2007) em estudo para determinar a ocorrência de fungos filamentosos associados as cochonilhas-com-escudo em pomar de citrus no Município de Taquari – RS, isolaram e identificaram o fungo *L. lecanii*, entre outros fungos. Em estudo para seleção de fungos entomopatogênicos visando controle de pulgões, tais como *Mysus persicae* e *Aphis gossypii*, pôde ser verificado que o isolado 41185 de *L. lecanii* foi o mais virulento dentre os testados, além de ter germinado e crescido em uma ampla variação de temperaturas, o que é importante para sua aplicação na agropecuária (VU et al., 2007).

Steenberg et al.(2001) avaliando a presença de fungos entomopatogênicos em moscas associadas ao gado verificaram a presença do fungo *L. lecanii*, entre outros. Scorsetti et al. (2008) relataram a infecção natural das moscas brancas *Trialeurodes vaporariorum* pelos fungos entomopatogênicos *L. lecanii*, *L. muscarium* e *L. longisporum* na Argentina. As condições favoráveis para o desenvolvimento deste fungo são umidade elevada (acima de 85%) e temperatura entre 20 a 25°C (faixa suportável de 18 a 35°C) (HALL, 1981).

O fungo *L. lecanii* possui conídios envolvidos por uma substância transparente, mucilaginoso, e aparentemente viscosa que, além de proteger contra a dessecação, facilita a adesão desses conídios à superfície do hospedeiro (ALVES, 1998), o que também foi observado por Askary et al. (1999) através de microscopia eletrônica, realizada com o objetivo de observar a cronologia dos eventos de interação entre o fungo, na época denominado *V. lecanii* e o pulgão da batata, *Macrosiphum euphorbiae*.

Em condições favoráveis o fungo germina sobre o inseto, produzindo um tubo germinativo, e a germinação bipolar pode ocorrer neste fungo. A velocidade do processo germinativo depende do isolado e das condições ambientais (ALVES, 1998). Askary et al. (1999) observaram em microscopia de luz que 24 horas após a inoculação do fungo os conídios germinaram e as hifas começaram a se desenvolver na superfície do pulgão. A penetração ocorre com a ausência de apressório. Na penetração estão envolvidos dois processos principais, o físico, devido à presença da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas e o químico resultante da elaboração de enzimas, as quais facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo (ALVES, 1998). A partir da penetração inicia-se a colonização do hospedeiro pelo fungo, o tempo para colonização pode variar de 72 a 120 horas, dependendo do inseto, patógeno e condições ambientais. (ALVES, 1998).

Askary et al. (1999) observaram que dois dias após a inoculação do fungo ocorria a invasão do hospedeiro por penetração direta da cutícula do pulgão, e 96 horas após o tratamento, concomitantemente a colonização do tegumento do pulgão, numerosas hifas, invadiam a hemocele do hospedeiro, se reproduzindo rapidamente e se proliferando pelos tecidos e órgãos, incluindo a hemolinfa, corpos gordurosos e sistema digestivo. Após 120 horas, o tegumento e outros tecidos do pulgão foram quase inteiramente invadidos por hifas do fungo. Os eventos cronológicos da interação entre o fungo *L. lecanii* e o pulgão da batata *M. euphorbiae* observados neste experimento foram aderência dos conídios a cutícula do hospedeiro, germinação do conídio e produção de micélio que coloniza a superfície do hospedeiro, penetração dos tubos germinativos na cutícula do pulgão 24 horas após a aplicação do patógeno, amplo desenvolvimento lateral de hifas acompanhado de acentuada degradação da cutícula, produção de blastosporos, invasão massiva dos tecidos internos do pulgão (a penetração e colonização da cutícula pelo fungo resulta de uma hidrólise enzimática localizada, assim como pela ação sinérgica de quitinases e pressão mecânica), assimilação de

nutrientes e acúmulo de lipídeos pelas células fúngicas, produção de conidióforos e liberação do fungo dos cadáveres.

Angelo (2007) em experimento para avaliar os efeitos de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *L. lecanii* *in vitro* sobre *Boophilus microplus* concluiu que o isolado CG 420 do fungo *L. lecanii* interfere na biologia de fêmeas ingurgitadas, tendo sido o segundo isolado que causou maior percentual de controle mediante bioensaio *in vitro* desta fase. Este isolado também é patogênico para os ovos deste carrapato em condições laboratoriais, e causa mortalidade em larvas não alimentadas sob condições ideais de temperatura e umidade.

Barson et al. (1994) em estudo para avaliar seis espécies de fungos entomopatogênicos, entre eles três isolados do fungo *V. lecanii*, para controle de *M. domestica* verificaram que os isolados 1979 e 176391 reduziram a porcentagem de emergência de adultos, em relação ao controle, quando larvas foram expostas a concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL e causaram alta mortalidade quando adultos foram expostos a concentração de  $1 \times 10^5$  deste fungo.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Localização do Experimento

A colônia de *S. calcitrans* foi formada e mantida no Laboratório de Pesquisa de Dípteros Hematófagos, enquanto que o processo de isolamento, multiplicação, preparação das suspensões fúngicas e ensaios foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, ambos localizados na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### 3.2 Criação de *Stomoxys calcitrans* em Condições Laboratoriais

#### 3.2.1 Obtenção de exemplares de moscas adultas

As moscas adultas de *S. calcitrans* foram capturadas em bovinos pertencentes ao Hospital Veterinário de Grandes Animais, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A escolha deste local foi feita devido à presença de moscas se alimentando nos animais, facilidade de acesso e manejo dos animais, sendo capturadas com auxílio de rede entomológica (BRITO, 2000) e armazenadas em gaiolas plásticas para transporte (Figura 1). A identificação das moscas capturadas foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, de acordo com Furman e Catts (1982).

#### 3.2.2 Manutenção da colônia de *S. calcitrans*

No laboratório, as moscas adultas identificadas foram transferidas para gaiolas plásticas de criação de acordo com Moraes (2007). Um termômetro digital foi colocado na porção anterior da gaiola, com a finalidade de verificar se a temperatura e umidade (mínima e máxima diária) na qual as moscas foram mantidas situavam-se dentro dos limites tolerados (Figura 2). Para a manutenção da temperatura das gaiolas de criação no dias mais frios e mesmo durante a noite, foi utilizada lâmpada incandescente de 200W, que ficava próxima às gaiolas de criação.

As moscas adultas foram alimentadas com sangue suíno citratado 5%, proveniente do setor de Suinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e era transportado ao laboratório em garrafas plásticas, para em seguida, ser transferido para pequenos sacos plásticos e armazenado em freezer (-22° C). O sangue a ser fornecido era retirado do freezer no dia anterior e colocado em refrigerador, onde descongelava lentamente. Diariamente, pela manhã (entre 8:00 e 9:00 horas), uma alíquota era retirada, aquecida em banho Maria a 37° C e oferecida em almofada de tecido de algodão colocada no interior de uma metade de placa de Petri com nove centímetros de diâmetro, simulando a temperatura corporal do animal parasitado (MELLO, 1989). Uma folha de papel pardo foi colocada no fundo da gaiola, para facilitar a coleta de ovos e limpeza da gaiola, sendo trocada diariamente.

#### 3.2.3 Obtenção de ovos, larvas, pupas e adultos

Os ovos foram coletados diariamente das almofadas de algodão e do papel pardo colocado sob a gaiola de criação, no momento da troca dos mesmos, com auxílio de pincel



**Figura 1.** Gaiola para transporte de adultos de *Stomoxys calcitrans* e acondicionamento de pupas em câmara climatizada.



**Figura 2.** Gaiola para criação de adultos da mosca dos estábulos em condições laboratoriais.

Acrilex® 050 e água destilada.

Os ovos coletados foram acondicionados em placas de Petri estéreis (60x15 mm) contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril e um microlitro de sangue em seu interior, sendo cobertas com Parafilm®, onde foram feitos orifícios com agulha hipodérmica 26½ G para a entrada de ar, e colocadas em câmara climatizada tipo BOD a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e 70-80% de umidade relativa. A temperatura e umidade relativa do interior da câmara climatizada tipo BOD era verificada utilizando-se termo-higrometro digital. Os ovos permaneciam nestas placas por dois dias, quando as larvas recém emergidas eram transferidas para tubos de ensaio de vidro (200mm X 25mm) contendo meio de desenvolvimento larval como descrito por Christmas (1970) e adaptado por Moraes (2007). Anteriormente a sua utilização, os tubos contendo a mistura para desenvolvimento larval foram fechados com rolhas de algodão hidrófobo, revestidos com tecido fino e autoclavados ( $120^\circ\text{C}/20$  minutos). Após seu resfriamento, foram armazenados em refrigerador ( $9^\circ\text{C}$ ) até o momento de serem utilizados.

No décimo dia, o conteúdo dos tubos (dieta e larvas) foi despejado em bandeja plástica, e as larvas foram coletadas com auxílio de pinça entomológica e pincel, para realização do ensaio. Quando as larvas não eram utilizadas para o ensaio, permaneciam nos tubos por cerca de 15 dias, até a formação de pupas, que eram retiradas e transferidas para placas de petri, no interior de gaiolas plásticas de 15 cm X 15cm X 20 cm e mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. na mesma faixa de temperatura e umidade utilizada para larvas até sua emergência (BRITO, 2000). Os adultos que emergiam foram transferidos diariamente para uma nova gaiola de criação.

Para a realização do ensaio com pupas, estas foram retiradas da dieta 14 dias após a transferência das larvas para os tubos contendo mistura para desenvolvimento larval, com auxílio de pinça entomológica.

### **3.3 Fungo Entomopatogênico *Lecanicillium lecanii***

#### **3.3.1 Obtenção e manutenção das amostras fúngicas**

Nos experimentos foi utilizado o isolado CG 420 do fungo *L. lecanii*, isolado previamente do solo em Aracajú – Sergipe/ Brasil, cedido pelo Centro Nacional de Recursos Genéticos -CENARGEN/ EMBRAPA ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária. Este isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (B.D.A) com 1% de extrato de levedura, e incubado em câmara climatizada com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70-80% de umidade relativa, por 15 dias, para favorecer o crescimento e produção de conídios.

#### **3.3.2 Suspensões fúngicas**

As suspensões fúngicas foram preparadas a partir do cultivo do isolado do fungo em placas de Petri contendo B.D.A com 1% de extrato de levedura. A superfície das colônias foi raspada com auxílio de bisturi para retirada dos conídios, que foram adicionados a 10 ml de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% (LUZ et al., 1998). A suspensão conidial foi homogeneizada, uma amostra foi colocada em Câmara de Neubauer e examinada sob microscópio óptico para a quantificação dos conídios. A média da contagem por campo (n) foi multiplicada por um fator fixo ( $n \times 4 \times 10^6$ ), que determina o número de conídios existentes na suspensão (ALVES, 1998). A partir da concentração  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>, as

concentrações  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  conídios por  $\text{mL}^{-1}$  foram preparadas por diluição seriada, onde 1 ml da concentração  $10^8$  con. $\text{mL}^{-1}$ , foi adicionado a 9 mL de água destilada estéril com espalhante adesivo Tween 80 (0,01%) (LECUONA et al., 2005). Este procedimento foi realizado para as diluições subsequentes (WATSON et al., 1995; SENNA-NUNES, et al., 2002) (Figuras 3, 4 e 5).

### 3.4 Viabilidade Conidial das Suspensões Fúngicas

Após o preparo das suspensões conidiais, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão  $10^7$  conídios por  $\text{mL}^{-1}$  foi transferida para placa de Petri contendo B.D.A e antibiótico (500 mg de Cloranfenicol: 1 L de meio de cultura). As placas foram incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\geq 80\%$  U. R. Após 24hs, foi efetuada a leitura da viabilidade, através da visualização direta em microscópio óptico, onde se fez a contagem dos conídios germinados e dos não germinados em faixas correspondentes ao diâmetro vertical e horizontal do campo observado. O resultado foi obtido em porcentagem de germinação, onde o número de conídios germinados foi dividido pelo total de conídios contados e o resultado multiplicado por 100 (ALVES, 1998).

### 3.5 Delineamento Experimental

O tratamento para os diferentes estágios de desenvolvimento de *S. calcitrans* foi formado pelo grupo controle e por quatro diferentes concentrações ( $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^6$  e  $2 \times 10^5$  con. $\text{mL}^{-1}$ ). O grupo controle foi exposto ao diluente utilizado nas suspensões fúngicas, ou seja, água destilada e Tween 80 a 0,01% para avaliar a possível influência do diluente nas diversas fases imaturas das moscas. O controle foi mantido nas mesmas condições que os grupos experimentais expostos ao fungo (SENNA-NUNES et al., 2002). Foi realizada dupla exposição (ovos, larvas e pupas foram expostos a 0,5 mL da suspensão fúngica por dois minutos e em seguida transferidos para placas com 2,5 mL da mesma suspensão) nos ensaios para aumentar o tempo de contato entre os estágios imaturos e o fungo *L. lecanii*.

Os ensaios com ovos, larvas e pupas foram repetidos em momentos distintos para aferir confiabilidade aos resultados obtidos.

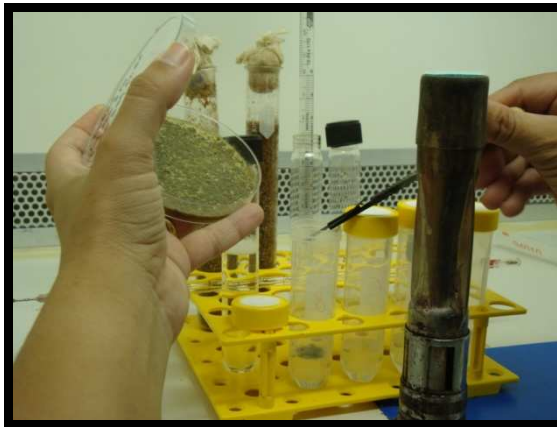
Para facilitar a transferência de ovos e larvas para suas respectivas placas foi utilizado um pincel fino, enquanto que as pupas foram transferidas com auxílio de pinça entomológica. As placas de Petri, contendo estágios imaturos de *S. calcitrans*, foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70 - 80% U. R., até que fosse realizada a contagem de larvas, pupas e adultos formados.

#### 3.5.1 Ensaio com ovos

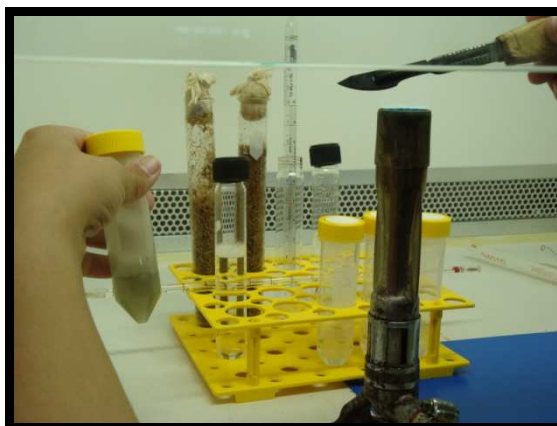
Foram utilizados grupos de 55 ovos, e cada grupo foi imerso por dois minutos nas diluições citadas (Figuras 6 e 7). Em seguida, os grupos foram transferidos para placas de Petri (90 X 15 mm) forradas com papel de filtro estéril umedecido com 3 mL de sua respectiva suspensão fúngica, exceto o grupo controle, em que as placas foram umedecidas com 3 mL de água destilada estéril. Três gramas de mistura para desenvolvimento larval foi adicionada em cada placa. Estas foram cobertas com Parafilm®, onde foram feitos orifícios com agulha hipodérmica 26½ G para entrada de ar (Figuras 8, 9 e 10). Após cinco dias de exposição ao fungo a contagem das larvas formadas foi realizada, adaptando-se a metodologia descrita por Watson et al. (1995) e Senna-Nunes et al. (2002) à espécie estudada (MORAES, 2007).



**Figura 3.** Preparo das suspensões fúngicas de *Lecanicillium lecanii*, adição de espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% em frasco com água destilada estéril.



**Figura 4.** Preparo das suspensões fúngicas de *Lecanicillium lecanii*, retirada da superfície das colônias com auxílio de Bisturi para a obtenção de conídios.



**Figura 5.** Suspensão de *Lecanicillium lecanii* na concentração  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 6.** Exposição de ovos de *Stomoxys calcitrans* ao fungo *Lecanicillium lecanii*, imersão dos ovos por dois minutos na suspensão fúngica.



**Figura 7.** Exposição de ovos de *Stomoxys calcitrans* ao fungo *Lecanicillium lecanii*, transferência dos ovos para placa de Petri umedecida com suspensão fúngica, acrescida de 3g de meio de desenvolvimento para larval.





**Figura 8.** Método de exposição de ovos e larvas da mosca dos estábulos, placas de Petri sendo umedecidas com 3 mL de água destilada (controle)



**Figura 9.** Método de exposição de ovos e larvas de *Stomoxys calcitrans*, adição de mistura para desenvolvimento larval



**Figura 10.** Método de exposição de ovos e larvas, placa de Petri coberta por Parafilm®, onde foram realizados orifícios para a entrada de ar

### **3.5.2 Ensaio com larvas**

Nesta etapa do estudo foram utilizadas larvas de dez dias, tendo em vista que Moraes (2007) observou que larvas de *S. calcitrans* com menos de dez dias eram frágeis, e que sua manipulação resultava em alta mortalidade. Desta forma, grupos de 55 larvas foram imersos por dois minutos na suspensão fúngica de  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup> e suas diluições, enquanto que, outro grupo foi destinado ao controle. Após a exposição das larvas, estas foram transferidas para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo papel filtro umedecido com 3 mL de sua respectiva suspensão, onde foram adicionados três gramas de mistura para desenvolvimento larval. As placas de Petri com as larvas foram cobertas por Parafilm®, onde foram feitos pequenos orifícios semelhantes aos realizados no ensaio com ovos (Figuras 8, 9, 10). As pupas e adultos formados foram contados 10 e 15 dias após a exposição das larvas.

### **3.5.3 Ensaio com pupas**

Neste ensaio, 50 pupas formadas no 14º dia foram imersas por dois minutos na concentração  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>, assim como para as respectivas diluições (BARSON et al., 1994). Foram utilizadas 250 pupas neste ensaio e após a exposição, todas as pupas foram transferidas para placas de Petri (90 x 15 mm) com papel filtro umedecido com 3 mL da respectiva suspensão e cobertas por Parafilm®, onde foram feitos orifícios semelhantes aos realizados nos ensaios com ovos e larvas. A contagem de moscas adultas foi realizada no décimo dia após exposição (LECUONA et al., 2005).

## **3.6 Contagem de Indivíduos Expostos as Suspensões Fúngicas**

Em todos os ensaios realizados, foram considerados indivíduos vivos aqueles que, expostos as diferentes concentrações fúngicas, foram capazes de passar para o estágio de desenvolvimento seguinte, e ainda das larvas que se tornaram pupas e quantas destas se tornaram adultas. Sendo assim, as placas foram descobertas e os indivíduos separados e contados com auxílio de estilete e pinça entomológica. Uma segunda contagem foi realizada em microscópio estereoscópico, para que nenhuma larva permanecesse na mistura. Para a contagem de pupas o equipamento não foi utilizado, pois estas são facilmente visualizadas.

## **3.7 Confirmação da Ação Fúngica Sobre os Indivíduos Expostos**

Os indivíduos mortos encontrados foram imersos em hipoclorito de sódio (1%) por três minutos, e em seguida lavados por duas vezes em água destilada estéril (um minuto em cada lavagem), como realizado por Senna-Nunes (2000). Após a lavagem estes foram incubados em câmara úmida para proliferação fúngica. Observado o crescimento, o fungo foi semeado entre lamina e lamínula contendo B.D.A., e mantido em câmara climatizada por 10 dias, para observação do micélio e identificação da espécie utilizada no ensaio (RIVALIER; SEYDEL; 1932 apud SENNA-NUNES, 2000).

## **3.8 Verificação de Halo de Inibição**

Neste ensaio foram utilizados dois grupos de nove larvas de nove dias de eclodidas. O primeiro grupo de larvas foi exposto a concentração fúngica de  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>, preparada a partir do isolado CG 420 do fungo *L. lecanii* em placas de Petri contendo Ágar Batata



Dextrose (B.D.A) com 1% de extrato de levedura. As larvas foram imersas por dois minutos em 0,5mL da suspensão fúngica e posteriormente (larvas e suspensão) transferidas para placa de Petri (90 x 15 mm) com papel filtro umedecido com 2,5mL da suspensão, onde foi adicionado três gramas de mistura para desenvolvimento larval. Estas placas foram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70 - 80% U. R. por três dias. O mesmo procedimento foi realizado para o segundo grupo, porém a suspensão fúngica foi substituída pela mesma quantidade de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%.

Após três dias de incubação, as larvas foram retiradas das placas, lavadas em água destilada estéril e colocadas em cryotubos (1,5 mL) estéreis Axygen® para possibilitar a produção de muco. Após uma hora, foram transferidas para microtubos Eppendorff®. Em seguida, foram adicionados 100 µL/larva da solução tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Salino - PBS) nos cryotubos com as amostras de muco, e estes foram mantidos em gelo para evitar a degradação do material. Este procedimento foi realizado em fluxo laminar após limpeza com álcool 70% e exposição à luz U.V por 15 minutos.

Os microtubos Eppendorff® com as larvas foram acrescidos de 100 µL/larva da solução tampão para favorecer a maceração destas com bastão cônico plástico, este macerado também foi mantido em gelo até a realização dos experimentos para verificar a formação dos halos de inibição.

Foram preparadas quatro placas de Petri contendo meio B.D.A. (39g), E.L. (1%) e Cloranfenicol (500 mg/L), sendo utilizado “swab” estéril para que a suspensão fúngica ( $10^8$  con.mL<sup>-1</sup>) fosse espalhada homoganeamente sobre placas. Discos de papel filtro de nove milímetros, previamente imersos em solução de Cloranfenicol (500 mg/L) foram autoclavados (120°C/ 20 min) e secos em forno Pasteur.

Dois discos foram utilizados para cada amostra de muco e macerado obtido das larvas (uma amostra proveniente das larvas previamente expostas ao fungo *L. lecanii* e outra proveniente das larvas não expostas ao fungo). Com auxílio de pinça estéril, estes foram imersos nas amostras e colocados nas placas previamente semeadas com fungo. As placas foram incubadas por três dias em câmara climatizada tipo B.O.D. a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70 - 80% U. R.. Este procedimento foi repetido em momentos diferentes, tanto para as amostras de muco, quanto para o macerado total de larvas sensibilizadas ou não ao isolado CG 420 de *L. lecanii*.

Após a incubação, as placas foram examinadas para observar a formação de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no muco e macerado de larvas de *S. calcitrans*, com intuito de verificar se algum elemento presente no muco ou no macerado de larvas seria capaz de inibir ou minimizar a germinação de conídios, pela formação de zonas de inibição ou zonas mais claras de proliferação fúngica ao redor dos discos (HUNT, 1986).

### 3.9 Análise Estatística

A mortalidade dos grupos expostos relacionada aos efeitos do fungo nos ensaios foi determinada pelo ajuste da mortalidade natural dos controles utilizando a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925).

Fórmula de Abbott:

$$\text{Porcentagem de controle corrigida} = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

X = Porcentagem de indivíduos vivos no controle

Y = Porcentagem de indivíduos vivos no grupo tratado

Foi utilizado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (Bioestat 4.0), com 95% de significância, com o objetivo de avaliar o percentual de mortalidade dos grupos expostos às diferentes concentrações fúngicas, assim como no grupo controle e a ocorrência de diferença significativa entre estes tratamentos. Também foi utilizado para comparar a ocorrência de diferença entre a emergência de adultos provenientes de pupas expostas às suspensões fúngicas e de pupas provenientes de larvas expostas ao fungo. (SAMPAIO, 2002; LECUONA et al., 2005).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação Morfológica dos Isolados

O isolado CG 420 de *Lecanicillium lecanii* utilizado no presente estudo apresentou colônia de coloração branca amarelada, reverso creme e 3,4 cm de diâmetro, o que foi compatível com as características descritas por Zare e Gams (2001). De acordo com a chave para identificação das espécies de *Lecanicillium* sp., descrita por estes autores, *L. lecanii* apresenta fiálides curtas, conídios curtos-elipsoides a subcilíndricos, medindo 2,5 - 3,5 x 1,0 - 1,5  $\mu\text{m}$ . Estas características foram observadas no isolado CG 420 de *L. lecanii* utilizado no ensaio. Portanto, sendo as características macro e micromorfológicas dos isolados testados, compatíveis com as descritas na literatura, pode-se afirmar que não houve contaminação da colônia de *L. lecanii* utilizada neste experimento.

### 4.2 Viabilidade dos Conídios

Os conídios presentes nas suspensões de *L. lecanii* apresentaram 100% de germinação, após 24 horas de incubação em câmara climatizada tipo B.O.D sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e U.R.  $\geq 80\%$ , o que demonstra a qualidade dos conídios utilizados nos ensaios.

### 4.3 Ensaio com Ovos de *Stomoxys calcitrans*

O método de exposição de ovos adotado foi uma adaptação da metodologia utilizada por Moraes et al. (2008), que concluiu que o método de imersão de ovos na suspensão fúngica com subsequente transferência para tubos de ensaio contendo meio de desenvolvimento larval, foi a metodologia de exposição mais efetiva.

Os tubos de ensaio com dieta no seu interior foram substituídos por placas de Petri, nas quais foram colocadas papel filtro e sobre estes, mistura para desenvolvimento larval, sendo ainda acrescentado três mililitros de cada diluição da suspensão fúngica, para que os ovos permanecessem por mais tempo em contato com o fungo depois de incubados. Nas duas repetições realizadas, apesar dos ovos terem ficado em contato permanente com o fungo, e de ter sido observado crescimento fúngico nas placas, exceto naquelas dos grupos controle, não foi observada diferença significativa na eclosão dos ovos expostos as diferentes concentrações e o controle ( $P \leq 0,05$ ) (Figuras 11 e 12) (Tabelas 1 e 2).

Os resultados obtidos diferem de estudo realizado por Moraes (2008), no qual foi utilizado o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, onde foi observado que este fungo foi capaz de inviabilizar 100% dos ovos de *S. calcitrans* expostos às concentrações  $2,3 \times 10^8$  e  $2,1 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup> demonstrando, portanto, potencial para o controle dos ovos desta mosca, desde que seja utilizado nos seus locais de oviposição.

Angel-Sahagúm et al. (2005) verificaram que os ovos de *Haematobia irritans* foram susceptíveis aos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*, pois afetaram a emergência de adultos e os isolados Ma2, Ma3, Ma15, Ma25, Pfr1 e Pfr8 reduziram a emergência para menos de 7% em comparação com o controle. No presente estudo não foi possível verificar emergência de adultos provenientes dos ovos expostos às diferentes concentrações de *L. lecanii*, uma vez que ocorria mortalidade elevada em todos os grupos, inclusive do controle. Quando larvas foram expostas as diferentes concentrações fúngicas, foi verificada a emergência de adultos, embora, tenha ocorrido redução apenas na



**Figura 11.** Crescimento fúngico na placa de Petri contendo ovos expostos a concentração  $2 \times 10^7$  con.mL<sup>-1</sup> de *Lecanicillium lecanii* dez dias após a exposição.



**Figura 12.** Crescimento fúngico na placa de Petri contendo ovos expostos a concentração  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup> de *Lecanicillium lecanii* dez dias após a exposição.

**Tabela 1.** Primeiro ensaio para avaliação da eclosão de ovos de *Stomoxys calcitrans*, expostos a diferentes concentrações das suspensões aquosas de *Lecanicillium lecanii*

Resultados Absolutos				
Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Ovos expostos	Eclosão (%)	Inviabilidade (%)	Inviabilidade corrigida (Abbott)
Controle	55	70,91	29,09 <sup>a</sup>	-
10 <sup>5</sup>	55	70,91	29,09 <sup>a</sup>	0
10 <sup>6</sup>	55	65,45	34,55 <sup>a</sup>	7,69
10 <sup>7</sup>	55	58,18	41,82 <sup>a</sup>	17,95
10 <sup>8</sup>	55	54,55	45,45 <sup>a</sup>	23,07

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Segundo ensaio pra avaliação da eclosão de ovos de *Stomoxys calcitrans*, expostos a diferentes concentrações das suspensões aquosas de *Lecanicillium lecanii*:

Resultados Absolutos				
Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Ovos expostos	Eclosão (%)	Inviabilidade (%)	Inviabilidade corrigida (Abbott)
Controle	55	69,09	30,91 <sup>a</sup>	-
10 <sup>5</sup>	55	67,27	32,73 <sup>a</sup>	2,63
10 <sup>6</sup>	55	69,09	30,91 <sup>a</sup>	0
10 <sup>7</sup>	55	58,18	41,82 <sup>a</sup>	15,79
10 <sup>8</sup>	55	49,09	50,91 <sup>a</sup>	28,95

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ).

maior concentração fúngica (Tabelas 3, 4), diferindo dos baixos valores de emergência observados por Angel-Sahagúm et al. (2005).

Mochi et al. (2009) em experimento para avaliar a eficiência de fungos entomopatogênicos no controle de ovos de *H. irritans* e ainda, a influencia destes fungos na emergência de adultos provenientes dos ovos expostos, verificaram que isolados de *M. anisopliae* não inviabilizaram os ovos desta mosca, mas foram capazes de causar mortalidade das larvas eclodidas, resultando em redução na emergência de adultos. Em outro ensaio, verificaram que *B. bassiana* não causou qualquer ação patogênica nos ovos da mosca do chifre ou em suas fases subseqüentes de desenvolvimento. Já os isolados de *Isaria fumosorosea* promoveram mortalidade em ovos e pupas, causando um aumento na mortalidade total. Após tratamento dos ovos com *I. farinosa* foi observada redução significativa da emergência de adultos em todas as concentrações fúngicas testadas, embora este fungo não tenha causado mortalidade dos ovos, este foi capaz de inviabilizar suas larvas e pupas, resultando em aumento da mortalidade total.

A diferença observada entre os resultados do presente estudo e daqueles verificados por outros autores poderia estar relacionada ao isolado fúngico utilizado, como observado por outros autores (ANGEL-SAHAGÚM et al., 2005; MOCHI et al., 2009).

A ineficácia do fungo utilizado no presente estudo sobre ovos pode ter ocorrido pelo fato de que os ovos foram expostos 24 horas após a postura, por isso, a eclosão da larva poderia ter ocorrido antes que o fungo pudesse penetrar e colonizar os ovos. Uma vez que isto tenha ocorrido, o fungo utilizado também teria sido incapaz de inviabilizar as larvas recém eclodidas, durante o período que estas permaneceram incubadas com o fungo.

#### 4.4 Ensaio com Larvas de *Stomoxys calcitrans*

Embora as larvas de *S. calcitrans* expostas tenham permanecido incubadas por até quinze dias em contato com o fungo, e tenham visivelmente ingerido seus conídios, não foi observada diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) na mortalidade dos grupos expostos ao fungo utilizado no presente estudo, quando comparados com o grupo controle (Tabelas 5 e 6)(Figura 13).

Este resultado é semelhante ao obtido por Moraes (2008), onde a maioria das larvas da mosca dos estábulos expostas a diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae* realizou pupação.

Lecuona et al. (2005) verificaram que a concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL do fungo *B. bassiana* não alterou a mortalidade de larvas de *M. domestica* quando comparada ao grupo controle, o que está de acordo com os resultados do presente estudo.

Entretanto o fungo *L. lecanii* utilizado no presente estudo, foi capaz de reduzir significativamente a emergência de adultos ( $P \leq 0,05$ ) provenientes das larvas expostas à concentração máxima testada ( $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>) sendo observado um percentual de emergência de 25,45% e 41,82 %, em comparação com 63,64% e 90,91% do grupo controle (Tabelas 3, 4, 7 e 8). Este resultado está de acordo com Barson et al. (1994) que ao utilizarem larvas de terceiro estágio de *M. domestica* verificaram que a porcentagem de emergência de adultos após exposição das larvas aos isolados 1979 e 176391 do fungo *V. lecanii* foi de 6% e 15% na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL, respectivamente, reduzindo a emergência desta mosca quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,01$ ).

Mochi et al. (2009) verificaram que o isolado E9 de *M. anisopliae*, na concentração de  $10^7$  conídios/mL, inviabilizou 37,7% das larvas expostas e causou 38,3% de mortalidade nas pupas provenientes destas larvas. Enquanto que, a concentração de  $10^8$  conídios/mL do

**Tabela 3.** Mortalidade de *Stomoxys calcitrans*, provenientes de larvas expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii* (Após 15 dias da exposição-Primeiro ensaio):

Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Larvas expostas	Emergência (%)	Mortalidade (%)
Controle	55	63,64	36,36 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	55	61,82	38,18 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	55	56,36	43,64 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	55	74,55	25,45 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	55	25,45	74,55 <sup>b</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

**Tabela 4.** Mortalidade de *Stomoxys calcitrans*, provenientes de larvas expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii* (Após 15 dias da exposição-Segundo ensaio):

Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Larvas expostas	Emergência (%)	Mortalidade (%)
Controle	55	90,91	9,09 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	55	83,64	16,36 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	55	90,91	9,09 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	55	72,73	27,27 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup>	55	41,82	58,18 <sup>b</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

**Tabela 5.** Primeiro ensaio para avaliação da mortalidade de larvas de *Stomoxys calcitrans*, expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii*:

Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Larvas expostas	Pupação (%)	Mortalidade (%)
Controle	55	76,36	23,64 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	55	74,55	25,45 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	55	74,55	25,45 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	55	85,45	14,55 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	55	72,73	27,27 <sup>a</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

**Tabela 6.** Segundo ensaio para avaliação da mortalidade de larvas de *Stomoxys calcitrans*, expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii*:

Tratamentos (Com.mL <sup>-1</sup> )	Larvas expostas	Pupação (%)	Mortalidade (%)
Controle	55	94,55	5,45 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	55	83,64	16,36 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	55	94,55	5,45 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	55	83,64	16,36 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	55	81,82	18,18 <sup>a</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )





**Figura 13.** Larvas de *Stomoxys calcitrans* com presença de hifas e conídios de *Lecanicillium lecanii* e pupa apresentado má formação devido à exposição de larvas a concentração  $2 \times 10^7$  con.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 7.** Primeiro ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas provenientes de larvas de *Stomoxys calcitrans*, expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii* (Após 15 dias):

Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Pupas recuperadas	Emergência (%)	Inviabilidade (%)
Controle	42	83,33	16,67 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	41	82,93	17,07 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	41	75,61	24,39 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	47	87,23	12,77 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	40	35	65,00 <sup>b</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

**Tabela 8.** Segundo ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas provenientes de larvas de *Stomoxys calcitrans*, expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii* (Após 15 dias):

Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Pupas recuperadas	Emergência (%)	Inviabilidade (%)
Controle	52	96,15	3,85 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	46	100	0 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	52	96,15	3,85 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	46	86,96	13,04 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	45	53,33	46,67 <sup>b</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

mesmo fungo inviabilizou 100% das larvas de *H. irritans*. Os fungos *B. bassiana* e *I. farinosa* não foram patogênicos para larvas desta mosca, enquanto o fungo *I. fumosorosea* foi capaz de inviabilizar estas larvas. Watson et al. (1995) observaram que larvas de segundo instar da mosca doméstica expostas a *B. bassiana*, na concentração  $1 \times 10^8$  conídios/mL, alcançaram a fase adulta com mortalidade mínima (16% para o isolado L90 e 20% para o P89), entretanto, a concentração de  $1 \times 10^{10}$  con.mL<sup>-1</sup> foi mais eficaz, com 56% e 48% de mortalidade das larvas expostas aos isolados L90 e P89, respectivamente. Estes autores verificaram ao expor moscas adultas a concentração  $1 \times 10^8$  conídios/cm<sup>2</sup> do fungo *B. bassiana* que a mortalidade da mosca dos estábulos foi mais baixa (70 e 84% com os isolados P89 e L90, respectivamente) que a observada na mosca doméstica ( $\geq 90\%$ , com os isolados P89 e L90) e sugere que *S. calcitrans* é menos susceptível a ação fúngica que *M. domestica*. Logo, os resultados do presente estudo, associados à literatura indicam que a susceptibilidade das larvas pode estar diretamente relacionada ao isolado fúngico e díptero estudado. Os resultados do presente estudo demonstraram que as larvas de *S. calcitrans* são tolerantes ao isolado CG 420 de *L. lecanii*, o que poderia estar relacionado aos mecanismos de defesa produzidos por estas larvas no decorrer de sua evolução (WATSON, et al. 1995), uma vez que se desenvolvem em ambientes com diferentes microorganismos, como fungos e bactérias, o que pode tê-las forçado a se adaptar aos meios em que vivem.

#### 4.5 Ensaio com Pupas de *Stomoxys calcitrans*

Nesta parte do estudo não foi observada diferença significativa na mortalidade das pupas expostas às diferentes concentrações de *L. lecanii* e o grupo controle ( $P \leq 0,05$ ) (Tabelas 9, 10, 11 e 12). O que está de acordo com o experimento de Moraes et al. (2008) onde o fungo *M. anisopliae* também se mostrou incapaz de inviabilizar pupas da mosca dos estábulos, e de Lecuona et al. (2005) que ao exporem pupas de mosca doméstica à concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ mL de *B. bassiana* não observaram aumento da mortalidade em relação ao controle. Entretanto, o resultado do presente estudo diverge daquele encontrado por Angel-Sahagúm et al. (2005), que verificaram que a exposição de pupas de *H. irritans* aos isolados Ma2 e Ma25 de *M. anisopliae* e ao isolado Pfr10 de *P. fumosoroseus* na concentração de  $1 \times 10^8$  ocasionou uma mortalidade que variou de 50% a 71,3%. Estes resultados podem estar relacionados com o díptero estudado e com a espécie do fungo envolvidos nestes estudos.

Mochi et al. (2009) verificaram mortalidade de 31,6% e 23,3% nas pupas de *H. irritans* expostas a concentração de  $10^7$  conídios/mL dos isolados IBCB425 e E9 de *M. anisopliae*, respectivamente, e mortalidade de 30% e 23,3% das pupas expostas aos mesmos isolados na concentração  $10^8$  con.mL<sup>-1</sup>, enquanto o controle apresentou apenas 10% de mortalidade. O fungo *B. bassiana* afetou significativamente a taxa de mortalidade das pupas, apresentando efeitos significativos para os isolados e concentrações utilizadas. Os isolados AM09 e o JAB07 de *B. bassiana* causaram mortalidade de 36,6% e 25%, respectivamente, na concentração de  $10^8$  conídios/mL. Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* testados não apresentaram efeito sobre os adultos emergidos das pupas tratadas. Os isolados de *I. farinosa* foram os mais efetivos considerando a mortalidade de pupas, tendo o isolado CG195 apresentado mortalidade de 56,6% na concentração de  $10^8$  conídios/mL, resultados que também diferem daqueles verificados no presente estudo.

Não foi verificado crescimento fúngico sobre o pupário, embora o fungo utilizado no ensaio tenha apresentado 100% de viabilidade. A baixa mortalidade de pupas, verificada no presente estudo, pode ter ocorrido devido à proteção exercida pelo pupário, o que impediria

**Tabela 9.** Primeiro ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas de *Stomoxys calcitrans*, expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii*:

Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Pupas expostas	Emergência (%)	Inviabilidade (%)
Controle	50	80	20 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	50	84	16 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	50	78	22 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	50	86	14 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	50	64	36 <sup>a</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

**Tabela 10.** Segundo ensaio para avaliação da inviabilidade de pupas de *Stomoxys calcitrans*, expostas às diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii*:

Tratamentos (Con.mL <sup>-1</sup> )	Pupas expostas	Emergência (%)	Inviabilidade (%)
Controle	50	90	10 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	50	88	12 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	50	82	18 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	50	94	06 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	50	78	22 <sup>a</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

**Tabela 11.** Comparação entre a inviabilidade de pupas, provenientes de larvas imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii* e de pupas expostas ao mesmo método (Primeiro ensaio):

Estágio de exposição à suspensão fúngica (Con.mL <sup>-1</sup> )	Pupas avaliadas	Inviabilidade (%)
<u>Larva (Terceiro instar)</u>		
10 <sup>5</sup>	41	17,07 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	41	24,39 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	47	12,77 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	40	65,00 <sup>b</sup>
<u>Pupas</u>		
10 <sup>5</sup>	50	16,00 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	50	22,00 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	50	14,00 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	50	36,00 <sup>a</sup>

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

**Tabela 12.** Comparação entre a inviabilidade de pupas, provenientes de larvas imersas em diferentes concentrações da suspensão aquosa de *Lecanicillium lecanii* e de pupas expostas ao mesmo método (Segundo ensaio):

Estágio de exposição à suspensão fúngica (Con.mL <sup>-1</sup> )	Pupas avaliadas	Inviabilidade (%)
<u>Larva (Terceiro instar)</u>		
10 <sup>5</sup>	46	0,00 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	52	3,85 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	46	13,04 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	45	46,67 <sup>b</sup>
<u>Pupas</u>		
10 <sup>5</sup>	50	12,00 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	50	18,00 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	50	06,00 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	50	22,00 <sup>a</sup>

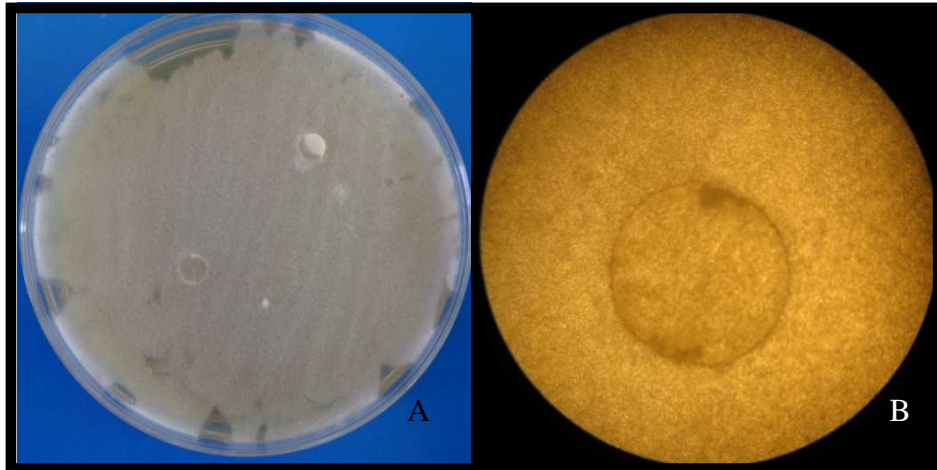
Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )

colonização das pupas pelo fungo *L. lecanii*. Outro fator seria o tempo necessário para que o fungo penetrasse e colonizasse as pupas. Em linhas gerais, Alves (1998) citou que seriam necessários de três a cinco dias para que os fungos pudessem penetrar a cutícula de insetos, não especificando o estágio de vida do mesmo. Entretanto, este período poderia ser suficiente para que o fungo penetrasse no pupário, mas não ser o suficiente para afetar a mosca em seu interior, que demora aproximadamente quatro dias para emergir.

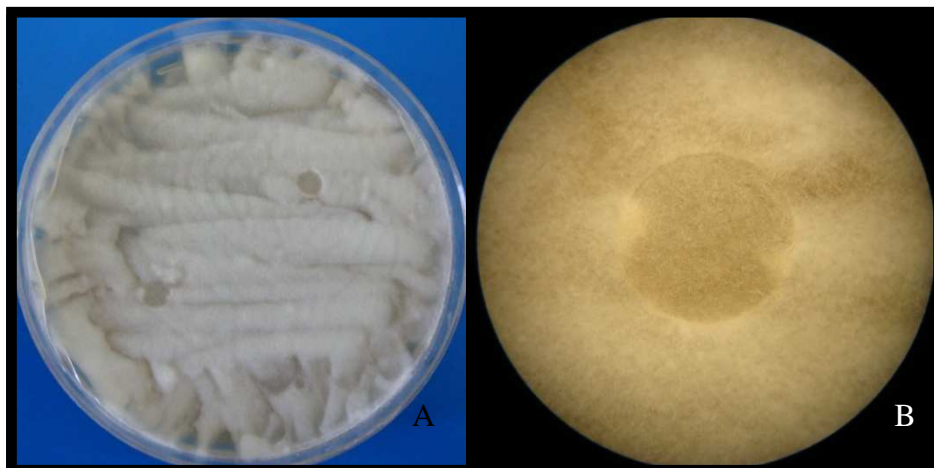
#### **4.6 Verificação de Halo de Inibição**

A tolerância das larvas de *S. calcitrans* ao fungo *L. lecanii* pode estar relacionada à produção de substâncias antimicrobianas capazes de inviabilizar ou dificultar a germinação dos conídios. Segundo Boulanger, et al. (2002) foi verificado em moscas dos estábulos adultas, que peptídeos antimicrobianos produzidos no intestino anterior destes dípteros foram ativos contra bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas, fungos filamentosos e leveduras, entretanto, não são encontrados na literatura trabalhos relacionados aos mecanismos antimicrobianos produzidos pelos estágios imaturos da mosca.

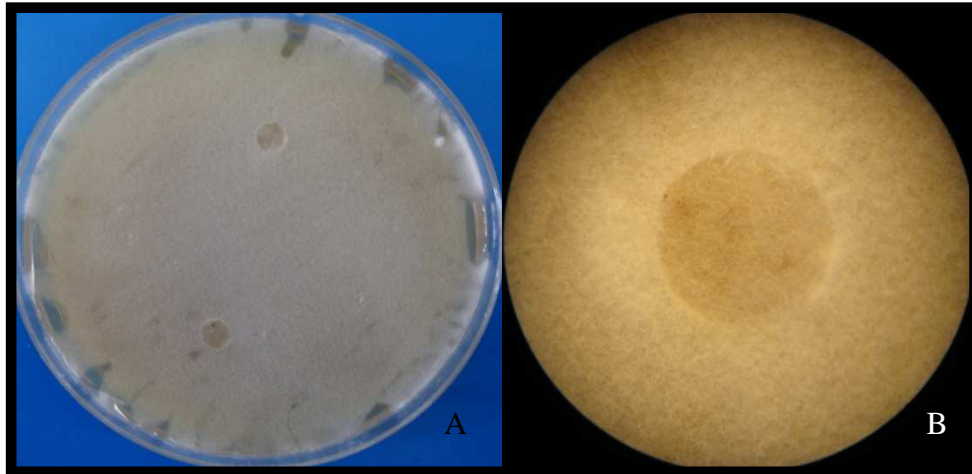
No presente estudo, não foi verificada a formação de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no muco e macerado obtidos a partir de larvas de *S. calcitrans* (Figuras 14, 15, 16 e 17), ou seja, ainda que as larvas desta mosca produzam substâncias que impeçam a germinação dos conídios, nas condições utilizadas neste experimento, estas foram incapazes de formar halo de inibição. A ausência de halo de inibição não exclui a possibilidade de que as larvas de *S. calcitrans* produzam substâncias antimicrobianas, uma vez que o mecanismo pelo qual estas substâncias são produzidas é desconhecido, e talvez seja necessário a permanência do indivíduo vivo em contato constante com o fungo, para que tal substância seja produzida e atue de forma eficaz. Outro fator poderia ser a inativação de enzimas ou outras substâncias necessárias para este processo, pois embora o procedimento tenha sido realizado em baixa temperatura, os discos embebidos no muco e macerado das larvas foram incubados em câmara climatizada à temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Esta temperatura pode ter inviabilizado o material em questão. O terceiro ponto seria o fato de ter sido utilizado meio de cultura sólido enriquecido, pois nestas condições é oferecido ao fungo um ambiente ótimo para seu desenvolvimento, o que pode não ser encontrado sobre a cutícula do inseto. E o quarto ponto seria a elevada concentração fúngica utilizada sobre as placas, pois a aplicação de  $10^8$  con.ml<sup>-1</sup> pode ter contribuído para elevada proliferação fúngica, não permitindo desta forma a visualização do halo de inibição.



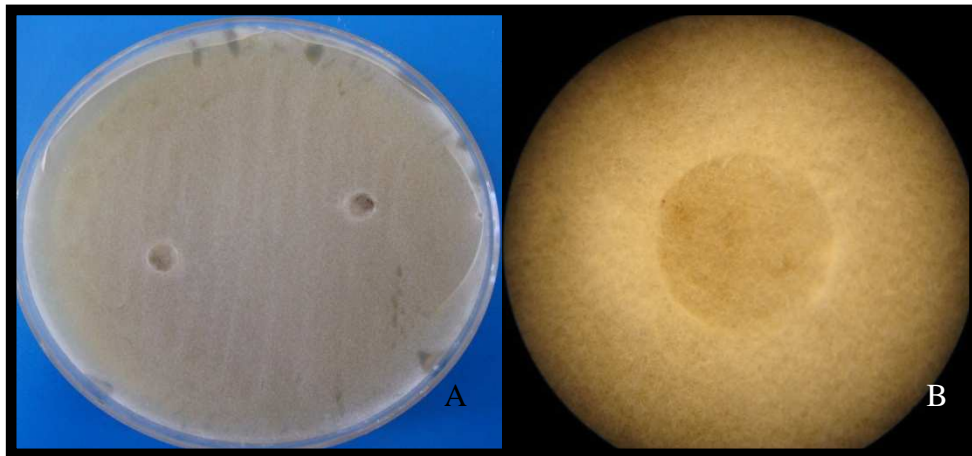
**Figura 14.** **A.** Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no muco produzido por larvas de *S. calcitrans* não expostas ao isolado CG 420 de *L. lecanii*; **B.** Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.



**Figura 15.** **A.** Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no muco produzido por larvas de *S. calcitrans* expostas ao isolado CG 420 de *L. lecanii*; **B.** Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.



**Figura 16.** **A.** Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans* não expostas ao isolado CG 420 de *Lecanicillium lecanii*; **B.** Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.



**Figura 17.** **A.** Ausência de halo de inibição ao redor dos discos embebidos no macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas ao isolado CG 420 de *Lecanicillium lecanii*; **B.** Visualização da placa com auxílio de microscópio estereoscópico.



## 5 CONCLUSÕES

Após avaliação do experimento em condições controladas de laboratório, pode-se concluir que:

1. O fungo *L. lecanii* foi incapaz de inviabilizar ovos, larvas ou pupas de *S. calcitrans* nas concentrações fúngicas testadas, quando estas fases foram avaliadas individualmente, entretanto, foi capaz de interferir no desenvolvimento desta mosca, reduzindo a emergência de adultos;
2. O muco e macerado total de larvas de *S. calcitrans* previamente expostas e não expostas ao isolado CG 420 de *L. lecanii* não impedem ou reduzem o desenvolvimento fúngico em meio de cultura sólido enriquecido.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- AGUIAR-VALGODE, M.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. Determination of thermal requirements of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae) under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, Suplemento 1, p.11-20, 1992.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed., São Paulo: FEALQ, 1998, 1163p.
- ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRRES, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO- DOMÍNGUEZ, O.; CRUZ-VARQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S.R.; FOSTER, J. E. **Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans* to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes)**. 2005. Disponível em: <<http://www.insectscience.org>>. Acesso em: abril de 2009.
- ANGELO, I. C. Avaliação *in vitro* dos efeitos de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *Lecanicillium lecanii* sobre *Boophilus microplus*. 2007. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- ASKARY, H.; BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Ultrastructural and Cytochemical Characterization of Aphid Invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, n. 1, p. 1-13, 1999.
- BAILEY, D. L.; WHITFIELD, T. L.; LA BRECQUE, G. C. Laboratory biology and techniques for mass producing the stable flie, *Stomoxys calcitrans* (L.) (DIPTERA: MUSCIDAE). **Journal of Medical Entomology**, v. 12, n. 2, p. 189-193, 1975.
- BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of House Fly (*Musca domestica*, L.) a pest of intensive animal units. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, n. 2, p. 107-113, 1994.
- BAYOH, M. N.; LINDSAY, S. W. Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, p. 174–179, 2004.
- BIRKEMOE, T.; SOLENG, A.; AAK, A. Biological control of *Musca domestica* and *Stomoxys calcitrans* by mass releases of the parasitoid *Spalangia cameroni* on two Norwegian pig farms. **Biocontrol**, v. 54, n. 3, p. 425-436, 2009.
- BITTENCOURT, A. J. Aspectos clinico - epidemiológicos de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em bovinos e eqüinos em Espírito Santo do Pinhal – SP. 1998. 120 f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

BITTENCOURT, A. J.; MOYA-BORJA, G. E. Flutuação sazonal de *Stomoxys calcitrans* em bovinos e eqüinos no município de Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brasil. **Revista da Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v. 22, p. 101-106, 2000, Suplemento.

BITTENCOURT, A. J.; MOYA-BORJA, G. E. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1958) (Diptera, Muscidae): preferência por locais do corpo de bovinos para alimentação. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 4, n. 1, p.75-83, 2002.

BITTENCOURT, A. J. **Stomoxys calcitrans - A Mosca dos Estábulos**. 1 ed., Seropédica: Avelino José Bittencourt, 2007. v. 1.

BOULANGER, N.; MUNKS, R. J. L.; HAMILTON, J. V.; VOVELLE, F.; BRUN, R.; LEHANE, M. J.; BULET, P. Epithelial Innate Immunity- A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49921-49926, 2002.

BRITO, L. G. Flutuação sazonal de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1981) (Diptera: Cuterebridae) através de peles de bovinos recém abatidos no matadouro do município de Pirai-RJ e infestação artificial do berne em suínos e eqüinos. 2000. 77 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

BRUCE, W. N.; DECKER, G. C. The relationship of *Stomoxys calcitrans* abundance to milk production in dairy cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 51, n. 3, p. 269-274, 1958.

BURALLI, G. M.; BORN, R. H.; GEROLA, O.; PIMONT, M. P. Soil disposal of residues and the proliferation of flies in the state of São Paulo. **Water Science and Technology**, v. 19, n. 8, p. 121-125, 1987.

CAMPBELL, J.B.; WHITE, R.G.; WRIGH, J.E.; CROOKSHANK, R.; CLANTON, D.C. Effects of Stable flies on weight gains and feed efficiency of calves on growing or finishing rations. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 5, p. 592-594, 1977.

CAMPBELL, J.B.; BERRY, I.L.; BOXLER, R. L.; CLANTON, D.C.; DEUTSCHER, G. H. Effects of Stable flies (Diptera:Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 80, n. 1, p.117-119, 1987.

CANDIDO-SILVA, J. A.; ZANAROTTI, G. M.; GALLINA, A. P.; ALMEIDA, J. C. Developmental Regulation of BhSGAMP-1, a Gene Encoding an Antimicrobial Peptide in the Salivary Glands of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). **Genesis**, v. 45, p. 630-638, 2007.

CARN, V. M. The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal virus. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 4, p. 377-391, 1996.

CARRERA, M. **Insetos de Interesse Médico Veterinário**. Curitiba: Editora da UFPR, 1991, 228p.

CASTRO, B. G.; SOUZA, M. M. S.; BITTENCOURT, A. J. Isolamento de espécies enterobacterianas em *Stomoxys calcitrans*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2654-2657, 2008.

- CHRISTMAS, P. E. Laboratory rearing of the biting fly *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), p. 446-449, 1970. Disponível em: [http://www.ento.org.nz/nzentomologist/free\\_issues/volume%204-4-45-49.pdf](http://www.ento.org.nz/nzentomologist/free_issues/volume%204-4-45-49.pdf). Acesso em: 13 mar. 2005.
- CILEK, J. E.; GREENE, G. L. Stable fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, n. 2, p. 275-279, 1994.
- COSTA, V. A.; BERTI-FILHO, E.; SILVEIRA-NETO, S. Parasitóides (Hymenoptera: Chalcidoidea) de moscas sinantrópicas (Diptera: Muscidae) em aviários de Echaporã, SP. **Arquivos do Instituto biológico de São Paulo**, v.71, n. 2, p. 203-209, 2004.
- CRUZ-VÁZQUEZ, C.; GARCÍA-VÁZQUEZ, Z.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; GEORGE, J. E. Susceptibility of *Stomoxys calcitrans* to permethrin in dairy farms of Aguascalientes, México. **Veterinaria México**, v.36, n. 4, p. 485-490, 2005.
- CUTHBERTSON, A. G. S.; WALTERS, K. F. A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Lecanicillium muscarium*, against the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* under laboratory and glasshouse conditions. **Mycopathologia**, v. 160, n. 4, p. 315-319, 2005.
- DE FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. T. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.
- DRUMMOND, R.O.; BRAM, R. A.; KONNERUP, N. Animal pests and world food production. In: LEANING, H. D; GUERRERO, J. (Ed.) The economic impact of parasitism in cattle, **Proceedings of the MSD AGVET Symposium**, p. 9-24, 1987.
- FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, n. 1-4, p. 71-93, 2008.
- FOIL, L. D.; HOGSETTE, J. A. Biology and control of tabanids, Stable flies and horn flies. **Revue scientifique technique - International Office of Epizootics**, v.13, n. 4, p. 1125-1158, 1994.
- FÖRSTER, M.; SIEVERT, K.; MESSLER, S.; KLIMPEL, S.; PFEFFER, K. Comprehensive study on the occurrence and distribution of pathogenic microorganisms carried by synanthropic flies caught at different rural locations in Germany. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n.5, p.1164-1166, 2009.
- FU, P.; WU, J.; GUO, G. Purification and Molecular Identification of an Antifungal Peptide from the Hemolymph of *Musca domestica* (housefly). **Cellular & Molecular Immunology**, v. 6, n. 4, p. 245-251, 2009.
- FURMAN, D. P.; CATTS, E. P. **Manual of Medical Entomology**. 4 Ed, Cambridge: University Press, 1982, 207 p.
- GAMS, W.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v. 72, n. 3-4, p. 329-337, 2001.

- GILLES, J.; DAVID, J. F.; DUVALLET, G. Temperature effects on development and survival of two stable flies *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* (Diptera: Muscidae), in la Réunion Island. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 260-265, 2005.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- GUIMARÃES, J. H. Moscas- Biologia, ecologia e controle. **Agroquímica Ciba-Geigy**, n.21, p. 20-26, 1983.
- GUIMARÃES, J. H. Mosca dos estábulos- Uma importante praga do gado. **Agroquímica Ciba-Geigy**, n.23, p. 10-14, 1984.
- GUIMARÃES, J. H. Moscas sinantrópicas – Perspectivas de manejo integrado em aviários no estado de São Paulo. **Agroquímica Ciba-Geigy**, n.28, p. 10-15, 1986.
- HALL, R.A. Laboratory studies on the effects of fungicides acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 29, p. 39-48, 1981.
- HOGSETTE, J. A. Management of ectoparasites with biological control organisms. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 147-151, 1999.
- HOGSETTE, J. A.; RUFF, J. P.; JONES, C. J. Stable fly biology and control in northwest Florida. **Journal of Agricultural Entomology**. v. 4, n. 1, p. 1-11, 1987.
- HUNT, D. W. H. Absence of fatty acid germination inhibitors for conidia of *beauveria bassiana* on the integument of the bark beetle *dendroctonus ponderosae* (coleoptera: scolytidae). **The Canadian Entomologist**, v. 118, p. 837-838, 1986.
- JONES, C. M. Stable Flies. In: SMITH, C.N. **Insect Colonization and Mass Production**. New York: Academic Press, 1966, p. 145-152.
- KILLOUGH, R. A.; MCKINSTY, D. M. Mating and oviposition studies of the Stable fly. **Journal of economic entomology**, v. 58, n. 3, p.489-491, 1965.
- KIM, J. J. Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. **BioControl**, v. 52, n. 6, p. 789-799, 2007.
- KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 13, n. 4, p. 1249-1286, 1994.
- LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TAROCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera:Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 332-336, 2005.
- LOUREIRO, E. S.; OLIVEIRA, N.C. ; WILCKEN, C.F.; BATISTA FILHO, A.; PESSOA, L.G.A. Primeiro relato de epizootia de *lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* (zimm.) Viègas (classe-forma: hyphomycetes) ao pulgão-do-pinus *Cinara atlantica* (Hemiptera: Aphididae)

no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.71, n.4, p. 515-516, 2004.

LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 839-846, 1998.

LYSYK, T. J. Adult resting and larval developmental sites of Stable flies and House flies (Diptera: Muscidae) on dairies in Alberta. **Journal of Economic Entomology**, v.86, n. 6, p.1746-1753, 1993.

MATTOS-JUNIOR, D. G. O impacto econômico causado pela ação das principais moscas que atacam o gado brasileiro. **A hora veterinária**, v. 6, n. 34, p.55-60, 1986.

MCPHERON, L. J.; BROCE, A. B. Environmental components of pupariation-site selection by the Stable fly (Diptera: Muscidae). **Environmental Entomology**, v. 25, n.3, p. 665-671, 1996.

MELLO, R. P. Estudos de alguns aspectos de desenvolvimento biológico e do comportamento, em laboratório, de *Stomoxys calcitrans*, (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae). 141f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1989.

MEYER, J. A.; PETERSEN, J. J. Characterization and seasonal distribution of breeding sites of stable flies and house flies (Diptera: Muscidae) on Eastern Nebraska feedlots and dairies. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, n. 1, p. 103-108, 1983.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, A. C. R. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). **Veterinary Parasitology** (2009)<sup>a</sup>, doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.046.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, A. C. R.; YOSHIDA, L. Entomopathogenic fungal activity against pupae and adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). **Veterinary Parasitology** (2009)<sup>b</sup>, doi: 10.1016/j.vetpar.2009.10.002.

MONTEIRO, S. G.; BAHIENSE, T. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuilleemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937(Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 559-563, 2003.

MORAES, A. P. R. *Stomoxys calcitrans*: Estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

MORAES, A. P. R.; ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E.P.; BITTENCOURT, A. J. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to Eggs and Immature Stages of *Stomoxys calcitrans*. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 384–387, 2008.

NEVES, D. P.; FARIA, A. C. Profundidade de empupação de *Stomoxys calcitrans* (Diptera, Muscidae) e presença de microhimenópteros parasitóides nas pupas. **Revista Brasileira de Biologia**, v.48, n. 4, p. 911-913, 1988.

PAIVA, D. P. Controle integrado de moscas em criações de suínos. **Suinocultura dinâmica**, n. 12, 1994.

PRADE, C. A.; DAL SOGLIO, F. K.; WOLFF, V. R. S.; ROMERO, M. Y. Ocorrência de fungos filamentosos associados às cochonilhas-com-escudo (Hemiptera:Diaspididae) em pomar de citrus no município de Taquari – RS. **Biociências**, v. 15, n. 1, p. 68-72, 2007.

RIVALIER, E.; SEYDEL, S. Nouveau procede de culture sur lames gélosées appliqué a létude microspique dès champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v. 10, p. 444-452, 1932 apud SENNA-NUNES, M. S. Isolamento, identificação e avaliação da patogenicidade *in vitro* de fungos em *Musca domestica*, Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae), capturadas em dois criadouros no município de Seropédica. 2000. 79f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

RUIU, L.; SATTA, A.; FLORIS, I. Immature House Fly (*Musca domestica*) Control in Breeding Sites With a New *Brevibacillus laterosporus* Formulation. **Environmental Entomology**, v.37, n. 2, p. 505-509, 2008.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2 Ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SCORSETTI, A. C.; HUMBER, R. A.; DE GREGORIO, C.; LASTRA, C. C. L. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pests of horticultural crops, in Argentina. **Biocontrol**, v. 53, p. 787-796, 2008.

SENNANUNES, M. S. Isolamento, identificação e avaliação da patogenicidade *in vitro* de fungos em *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Díptera: Muscidae), capturadas em dois criadouros no município de Seropédica. 2000. 79 f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

SENNANUNES, M. S. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophylum* em larvas de *Musca domestica* (Díptera:Muscidae). **Parasitologia latinoamericana**, v. 57, n. 3-4, p. 134-140, 2002.

SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. **Entomologia e acarologia**. 1 Ed. Rio de Janeiro: L.F Livros, 2006. 200p.

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

SKODA, S. R.; THOMAS, G. D.; CAMPBELL, J. B. 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**, v. 84, n.1, p. 191-197, 1991.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y Enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. 7. Ed. México: Nova Editorial Interamericana, 1987. 823p.

STEENBERG, T.; HUMBER, R. A. Entomopathogenic potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 309-314, 1999.

STEENBERG, T.; JESPERSEN, J. B.; JENSEN, K.-M. V.; NIELSEN, B. O.; HUMBER, R. A. Entomopathogenic Fungi in Flies Associated with Pastured Cattle in Denmark. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.77, p.186–197, 2001.

TERRY, D. W.; CARROLL,P.J. Summer mastitis: transmission by blood feeding flies. **The Veterinary Record**, v. 123, n. 11, p. 304, 1988.

VU, V. H.; HONG, S.; KIM, K. Selection of entomopathogenic Fungi for Aphid control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 498-505, 2007.

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, p. 405-411, 1995.

WIEMAN, G.A.; CAMPBELL, J. B.; DESHAZER, J. A.; BERRY, I. L. Effects of Stable flies (Diptera: Muscidae) and heat stress on weight gain and feed efficiency of feeder cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 5, p.1835-1842, 1992.

ZARE, R.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* IV. The genera *Lecanicillium* and *Siplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, n. 1-2, v. 73, p. 1-50, 2001.