

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

TESE

Ação de *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 e *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (BOÚCHE, 1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE)

Denise Ribeiro de Melo

2006



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

AÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 E *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLLEMIN, 1912 SOBRE *Ctenocephalides felis felis* (BOÚCHE, 1806) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE)

DENISE RIBEIRO DE MELO

Sob a Orientação da Professora:

Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

e Co-orientação de

Dra. Gisela Lara da Costa e Dr. Fábio Barbour Scott

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Agosto de 2006

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

DENISE RIBEIRO DE MELO

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 23/08/2006

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Ph.D. UFRRJ
(Orientadora)

Gonzalo Efrain Moya Borja. Ph.D. UFRRJ

Claudia Lucia Guimarães da Silva Ph.D. (FEUC)

Gisela Lara da Costa Ph.D. FIOCRUZ/RJ

Margareth Maria de Carvalho Queiroz. Ph.D. FIOCRUZ/RJ

“Assim é o caminhar de todas as coisas: Ordem – desordem – interação – nova desordem. O caos nunca é absoluto e a ordem jamais estável. Tudo esta em processo permanente e aberto, em busca de um equilíbrio dinâmico”.

(Leonardo Boff)

Toda dedicação, companheirismo e carinho que recebi e recebo da minha família me fez ver que o alicerce que foi por nós edificado é o maior presente da minha vida. Por isso dedico todas as minhas realizações a eles:

*Meu eterno paizinho e minha mãe Nilcéa.
Aos meus irmãos Willian, Marcia e Rogério.
Aos sobrinhos Vanessa, Fernanda e Bruninho.
Ao companheiro e amigo Roberto.*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, pois sei que a cada passo Ele estava comigo, me dando forças para superar os obstáculos que, aliás, não foram poucos, como o falecimento do meu pai, o corte indevido da Bolsa-Capes, as dificuldades em padronizar uma metodologia, as dificuldades em obter material de estudo, entre outras. Mas Deus me deu determinação e esperanças.

A professora e orientadora VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT e a equipe do laboratório LCM, em especial ao ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES que é uma pessoa de excelente caráter, trabalhador e digno de tudo que ele conquistou e certamente conquistará.

A ROSANA COLATINO SOARES REIS pela amizade, carinho, companheirismo, que compartilhamos desde o início da graduação dentro da UFRRJ e que agora compartilhamos profissionalmente dentro da Universidade Federal de Roraima.

As companheiras do curso em Parasitologia Veterinária, que participaram diretamente desta fase da minha vida, apoiando-me e incentivando-me: HELOÍSA HELENA M. SOARES, SANDRA BORGES DA SILVA e ANA CRISTINA BARROS CARDOSO.

A Embrapa-agrobiologia, em especial a GERALDO BAÊTA DA CRUZ, que não canso de dizer que estendeu um “tapete vermelho” me recebendo com muito profissionalismo e carinho, dando-me todo apoio e participação na parte experimental.

Ao professor FÁBIO SCOTT e toda equipe do Laboratório de Estudos Parasitocidas, com especial agradecimento à THAÍS RIBEIRO CORREIA pela orientação na manutenção da colônia.

Aos professores, alunos e funcionários do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinária - Parasitologia Veterinária que contribuíram para a realização deste trabalho. Com especial agradecimento ao professor GONÇALO ENFRAIN MOYA BORJA por permitir o acesso à lupa para as fotografias.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante a realização desse trabalho.

Por fim agradeço ao meu gatinho de estimação PETRUCHIO, por ter me cedido as pulgas para os experimentos piloto.

BIOGRAFIA

DENISE RIBEIRO DE MELO, filha de Ivanir Souza de Melo & Nilcéa Ribeiro de Melo, nascida a 31 de dezembro de 1970 na cidade de Nilópolis no Estado do Rio de Janeiro.

Completo o Primeiro grau no Centro Educacional Nilopolitano e o Segundo Grau em Formação Geral no Colégio Hélio Alonso, ambos no Estado do Rio de Janeiro.

No segundo semestre de 1993, ingressou no Curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tendo concluído no primeiro semestre de 1999. Durante o curso de Zootecnia fez vários estágios nas áreas de Bovinocultura, Nutrição de Ruminantes, Manejo de Equinos, Extensão Rural e outros pelo SINTEEG. Em abril de 1998, iniciou o estágio supervisionado no Laboratório de Controle Microbiano, onde teve a oportunidade de publicar vários resumos em Congresso até ingressar no curso de Mestrado.

Em Março de 2000, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária do Instituto de Veterinária da UFRRJ, sob a orientação da professora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Depois da defesa da dissertação ingressou para o doutorado no mesmo curso e sob mesma orientação, agora com o desafio de testar os fungos sobre a pulga. Durante o curso participou de vários Congressos e publicou trabalhos na área.

Em setembro de 2005, foi aprovada no concurso público para professora na Universidade Federal de Roraima - Departamento de Zootecnia, para atuar na área de Equinos e Ezoognózia, onde exerce sua função desde dezembro de 2005.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Biologia.....	3
2.2 Importância.....	4
2.3 Controle.....	6
2.3.1 Controle mecânico.....	7
2.3.2. Controle químico.....	8
2.3.3. Controle biológico.....	9
2.4 Mecanismo de Ação dos Fungos Entomopatogênicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Local do Experimento.....	12
3.2 Obtenção dos Fungos.....	12
3.3 Multiplicação dos Isolados Fúngicos.....	12
3.4 Elaboração das Suspensões.....	12
3.5 Quantificação do Inóculo.....	13
3.6 Manutenção da Colônia.....	13
3.6.1 Obtenção dos ovos.....	13
3.6.2 Obtenção dos adultos.....	14
3.7 Bioensaios com <i>Ctenocephalides felis felis</i>.....	14
3.7.1 Ovos.....	14
3.7.2 Adultos.....	14
3.8 Reisolamento dos Isolados Fúngicos Utilizados.....	15
3.9 Análise Estatística e Próbites.....	15
3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	15
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Bioensaios com <i>Ctenocephalides felis felis</i>.....	17
4.1.1 Bioensaios com ovos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e o fungo <i>Beauveria bassiana</i>	17
4.1.2 Bioensaios com ovos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e o fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
4.1.3 Mortalidade das larvas oriundas dos bioensaios com ovos de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	22
4.1.4 Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas nos bioensaios com ovos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> tratados com <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
4.1.5 Bioensaios com adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e o fungo <i>Beauveria bassiana</i>	23
4.1.6 Bioensaios com adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e o fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	24
4.1.7 Avaliação do tempo médio de mortalidade observado para adultos tratados com <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	25
4.1.8 Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas nos bioensaios com adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> tratados com <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	26

4.2. Microscopia de Varredura em Adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i>.....	27
4.3. Considerações Gerais.....	30
5. CONCLUSÕES.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de eclosão das larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> tratados com as diferentes concentrações dos isolados Bb 986 e Bb 747 do fungo <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) nos diferentes períodos após o tratamento (horas), mantidos sob temperatura de 25 ± 1 °C = 75% UR.....	18
Tabela 2 - Percentual de eclosão das larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> tratados com as diferentes concentrações dos isolados Ma E9 e Ma 959 do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) nos diferentes períodos após o tratamento (horas), mantidos sob temperatura de 25 ± 1 °C = 75% UR.....	19
Tabela 3 - Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas em ovos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , tratados com os isolados do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	23
Tabela 4 - Percentual de adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> mortos em diferentes horários após tratamento com diferentes concentrações dos isolados Bb 747 e Bb 986 do fungo <i>Beauveria bassiana</i> (Bb), mantidos sob temperatura de 25 ± 1 °C = 75% UR.....	23
Tabela 5 - Percentual de adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> mortos em diferentes horários após tratamento com diferentes concentrações dos isolados Ma E9 e Ma 959 do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma), mantidos sob temperatura de 25 ± 1 °C = 75% UR.....	25
Tabela 6 – Tempo médio letal, em horas e em dias, observado em adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , tratados com os isolados do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	26
Tabela 7 - Concentrações letais (CL 50 e CL 90), em adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , tratados com os isolados do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) e avaliados 36 horas após o tratamento.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , após o tratamento com as diferentes concentrações do fungo <i>Beauveria bassiana</i> isolado Bb 986.....	20
Figura 2 - Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , após o tratamento com as diferentes concentrações do fungo <i>Beauveria bassiana</i> isolado Bb 747.....	21
Figura 3 - Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , após o tratamento com diferentes concentrações do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado Ma E9.....	21
Figura 4 - Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , após o tratamento com as diferentes concentrações do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado Ma 959.....	22
Figura 5 - Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, demonstrando o desenvolvimento dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> Ma 959 (A, C, E e G) e do fungo <i>Beauveria bassiana</i> Bb 986 (B,D,F e H) sobre a cutícula da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> . (A e B) duas horas após infecção fúngica, demonstrando a adesão dos conídios a cutícula; (C e D) germinação dos conídios, 15h após a infecção; (E e F) Crescimento e ramificação das hifas, após 24h do tratamento; (G e H) crescimento micelial, com a formação de colônia e conidiogênese.....	29

RESUMO

MELO, Denise Ribeiro. **Ação de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae).** Seropédica: UFRRJ. 2006. 50p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária).

As pulgas são ectoparasitas comumente encontrados em cães e gatos, sendo a espécie *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835), a mais encontrada nestes animais. O ciclo de *Ctenocephalides felis felis* é influenciado pela temperatura, umidade e a alimentação se completa em aproximadamente 30 dias. A sua picada pode acarretar manifestação de dermatites alérgicas, como também transmitir diversos agentes etiológicos aos animais domésticos e aos homens. O objetivo do trabalho foi de verificar a patogenicidade *in vitro* dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre ovos e adultos de *C. felis felis* e o desenvolvimento do fungo sobre a cutícula da pulga, através da microscopia eletrônica de varredura. Os isolados testados foram o *M. anisopliae* 959 e *B. bassiana* 986 na concentração 10^8 conídios/mL. Os ovos e os adultos utilizados nos experimentos foram obtidos a partir da colônia de onde foram aspirados em número de dez para os tubos de ensaios. Nos testes de eficácia, os bioensaios foram constituídos de dois grupos controle e quatro grupos tratados com as suspensões nas concentrações 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹, e para cada tratamento foram feitas dez repetições. Cada grupo recebeu, um mililitro da suspensão a ser testada, permanecendo imersos por três minutos. A leitura foi realizada a cada 12h e durante toda a fase experimental os tubos ficaram acondicionados em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e = 75 % UR. Os resultados demonstraram que a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ das duas espécies avaliadas se destacou das demais devido ao efeito deletério observado sobre larvas e adultos. Para a observação do desenvolvimento do fungo, as pulgas foram processadas em diferentes períodos após a infecção, estipulados em 2, 15, 26 e 96 horas. O fixador utilizado foi o glutaraldeído 2,5 % e o material foi processado, segundo protocolo rotineiro para a microscopia eletrônica de varredura. Com a obtenção das eletromicrografias, pode-se observar que com 2 horas os conídios estavam aderidos por toda a cutícula, situando-se preferencialmente nas membranas intersegmentais do abdome. Com 15 horas observou-se a formação do tubo de germinação e a cabeça do apressório. Após 26 horas foi possível observar as ramificações e o engrossamento das hifas sobre a cutícula das pulgas, indicando que os fungos testados foram capazes de se desenvolver sobre a cutícula das mesmas.

Palavras chave: *Ctenocephalides felis felis*, microscopia de varredura, controle biológico.

ABSTRACT

MELO, Denise Ribeiro. **Action of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 on *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae).** Seropédica: UFRRJ. 2006. 50p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária).

Fleas are ectoparasites commonly found in dogs and cats and the species *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) are the most found in these animals. *Ctenocephalides felis felis* life cycle is influenced by temperature and humidity. This haematophagous insect feeds for approximately 30 days; its bite can cause allergic dermatitis and also can transmit several etiologic agents to domestic animals and humans. The objectives of the work were verifying the *in vitro* pathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on eggs and adults of *C. felis felis* and investigated by scanning electron microscopy the development of entomopathogenic fungi on flea cuticle. Fleas were exposed to conidia (10^8 mL^{-1}) of *Metarhizium anisopliae* (isolate 959) or *Beauveria bassiana* (isolate 986). The eggs and the adults used in the experiments were obtained from the colony, and were aspirated for the tubes (10 each). In the tests of effectiveness, the bioassays were constituted of two groups control and four groups treated with the suspensions in the concentrations 10^5 , 10^6 , 10^7 and $10^8 \text{ conidia.mL}^{-1}$, and for each treatment they were made ten repetitions. Each group received a milliliter of the suspension to be tested, staying immersed by three minutes. The observations were done on each 12 hours and during the experimental phase the tubes were conditioned in acclimatized chamber in $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $= 75 \%$ of relative humidity. The results demonstrated that the concentration $10^8 \text{ conidia.mL}^{-1}$ of the two species inhibited the larval eclosion and caused the mortality of adults. Following standard protocols for electron microscopy, the specimens were prepared 2, 15, 26 and 96 h after infection. Glutaraldehyde 2.5% was used as a fixative. The electromicrography revealed that 2 h after fungus exposure, conidia attachments encompassed the entire flea cuticle, especially on abdominal intersegmental membranes. The emergence of germ tubes and appressoria formation occurred at 15 h, thickening and branching of hyphae on the flea cuticle was noted at 26 h. Therefore, both of these fungal isolates were able to develop on cuticular surfaces of *Ctenocephalides felis felis*.

Words key: *Ctenocephalides felis felis*, scanning electron microscopy, biological control.

1. INTRODUÇÃO

As pulgas são insetos ápteros, holometabólicos, de corpo comprimido lateralmente e com cerdas voltadas para trás ao longo de seu corpo, apresentam aparelho bucal sugador pungitivo e cor castanha (LINARDI; GUIMARÃES, 2000). A alternância entre vida livre e parasitária envolvendo os estágios larvários e adultos faz com que estes insetos participem de diferentes elos na cadeia epidemiológica de inúmeros organismos. Vários pesquisadores já comprovaram que esses parasitas podem transmitir diversos agentes etiológicos aos animais domésticos e aos seres humanos.

Segundo Dryden (1993) o gênero *Ctenocephalides* é constituído por várias espécies e subespécies, porém no continente americano somente a subespécie *C. felis felis* é verificada. Esta espécie é popularmente conhecida como a “pulga do gato”, mas também é frequentemente encontrada em cães. Essa espécie possui ampla distribuição geográfica e se adapta as várias condições ecológicas.

O ciclo biológico de *C. felis felis* se completa em aproximadamente 30 dias, os estágios imaturos desenvolvem-se no ambiente, estando mais expostos aos fatores abióticos que podem influenciar no tempo de desenvolvimento do ciclo, assim como a alimentação obtida pelas larvas. Somente os adultos fazem a hematofagia, o que relaciona a importância desta espécie na transmissão de patógenos aos animais e aos homens.

A picada desses insetos pode ocasionar ao hospedeiro, reações de aflição, irritação e até a manifestação de dermatites alérgicas, que é uma doença imunológica na qual uma hipersensibilidade é produzida em um hospedeiro, de qualquer espécie, com o resultado da injeção natural de antígenos das glândulas salivares das pulgas (DRYDEN; RUST, 1994). Para o restabelecimento do animal, frequentemente é necessário tempo, paciência, habilidade clínica e principalmente a eliminação da pulga do corpo do hospedeiro e do ambiente.

Estes insetos são hospedeiros intermediários de *Dipylidium caninum* (Pugh, 1987) (SILVERMAN et al., 1981) e de doenças causadas por filariídeos, como *Dipetalonema reconditum* (PÊSSOA; MARTINS, 1988). A *Bartonella henselae*, agente causador da doença da arranhadura do gato para o homem, foi isolada, ainda que esporadicamente, na hemolinfa da pulga *C. felis* (BERGH et al., 2002). Segundo Galvão et al. (2004), houve duas comunicações de rickettsioses causadas por *Rickettsia felis* (Azad e Cols, 1992) na América Latina.

O controle desse parasito é importante, entretanto sua eliminação é um problema que consome tempo e dinheiro. Segundo Carlotti e Jacobs (2000), atingir esta meta não é fácil, já que a pulga tem uma capacidade reprodutiva alta e um ciclo de vida complexo, pois a maior parte das pulgas encontra-se no ambiente.

Os métodos de controle podem ser mecânicos, químicos, biológicos ou integrados. Durante os últimos anos, vários produtos para controle de pulgas, sendo eles tópicos ou sistêmicos, foram introduzidos no mercado mundial.

Os inseticidas químicos, geralmente com amplo espectro de ação e tóxicos, podem trazer conseqüências graves ao homem e ao meio ambiente. O alto custo dos inseticidas e das suas aplicações pode favorecer ao aparecimento de populações de insetos resistentes. Portanto, é necessário reduzir o uso desses produtos mediante o emprego de alternativas mais seguras de controle (VALADARES-INGLIS et al., 1998; BOSSARD et al., 1998).

Atualmente há varias opções de organismos para o controle biológico, tais como insetos, nematóides, protozoários, bactérias, fungos e vírus (HOGSETTE, 1999). O controle com a bactéria *Bacillus thuringiensis*, apesar de ter demonstrado êxito para controlar diferentes pragas de importância no setor Agropecuário e no setor de Saúde

Pública, seus produtos representam apenas uma fração pequena no mercado global de inseticidas (BENINTENDE et al., 2005). Segundo Alves (1998), os fungos, quando comparados com outros grupos de patógenos, levam vantagem, porque a maioria deles é altamente especializada na penetração via tegumento do inseto, além de serem capazes de infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros.

Os objetivos deste trabalho foram: verificar a patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, difundidos sob forma de suspensão conidial, sobre as fases de ovos e adultos de *C. felis felis* e observar as diferentes fases do desenvolvimento do fungo sobre a cutícula da pulga, através do estudo das eletromicrografias obtidas em microscopia eletrônica de varredura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia

As pulgas são insetos holometabólicos, apresentando de forma geral três íntares larvários. O ciclo, de ovo a adulto, é completado em aproximadamente 30 dias, podendo ser influenciado pela temperatura, umidade e alimentação obtida pelas larvas (LINARDI & GUIMARÃES, 2000).

Segundo Lima (1943), o desenvolvimento de uma pulga, em ótimas condições, pode efetuar-se em cerca de duas semanas e em condições extremamente desfavoráveis, pode prolongar-se por um ano ou mais.

O gênero *Ctenocephalides* é constituído de 12 espécies e subespécies. A espécie *C. felis* apresenta quatro subespécies: *C. felis damarensis*, *C. felis strongylus*, *C. felis orientis* e *C. felis felis*. Desta espécie, no continente americano encontra-se somente a subespécie *C. felis felis*, que é popularmente conhecida como a pulga do gato, mas que também é freqüentemente encontrada em cães. Esta possui ampla distribuição geográfica se adaptando às varias condições ecológicas (DRYDEN, 1993).

Uma vez sobre o hospedeiro, a *C. felis felis* iniciará a hematofagia, que é feita pela introdução do aparelho sugador através da pele. Após sua repleção, cerca de cinco minutos de sucção, a pulga prolonga sua alimentação até que gotículas de sangue começam a sair pela extremidade anal. Esse extravasamento de sangue serve de alimento às larvas (LIMA 1943, LINARDI e GUIMARÃES, 2000).

Segundo Linardi e Guimarães (2000), o acasalamento ocorre dentro das primeiras oito horas, até trinta e duas horas após a saída do pupário, com as fêmeas copulando com vários machos.

As fêmeas fazem a postura dos ovos na pelagem do hospedeiro. Cerca de 70% destes caem no substrato em até oito horas, onde sofrem incubação de um a seis dias, dependendo da temperatura ambiente e da umidade relativa. São extremamente sensíveis à dessecação, sendo 33% de umidade relativa letal às mesmas. No entanto, são capazes de tolerar temperaturas acima de 27°C se a umidade relativa estiver superior a 50%, o que demonstra a dependência de seu desenvolvimento a este fator (DRYDEN; RUST, 1994). Geralmente a ovoposição ocorre no mesmo dia do aprisionamento das fêmeas grávidas, podendo também ocorrer até dois dias após a captura (LINARDI; NAGEM, 1972).

Segundo Lima (1943), o período larval varia influenciado principalmente pelas condições de temperatura, umidade e maior ou menor fartura de alimentos.

Por possuírem geotaxia positiva e fototaxia negativa, as larvas buscam a base dos carpetes onde se desenvolvem (JOSEPH, 1981; BRYON, 1987, citado por DRYDEN, 1994). Elas podem rastejar vários centímetros para evitar a luz, o que confirma o fato dos primeiros instares não se moverem para longe do local de eclosão. As larvas escapam da maioria dos tratamentos adulticidas porque o tratamento não as atinge na base das fibras do tapete e, porque para matá-las são necessárias duas vezes e meio a mais, a quantidade de inseticida utilizada para adultos (DRYDEN; RUST, 1994). O período de pré-pupação ocorre de três a quatro dias após a última fase larvária (LINARDI; NAGEM, 1972).

A pupa se desenvolve em um casulo feito de seda pegajosa, onde fragmentos de poeira grudam sobre ele. Os casulos podem ser encontrados em diferentes locais, como no solo, na vegetação, no tapete, ou na cama do animal. Se a larva for perturbada antes de completar seu casulo, ela sai dele e pode desenvolver-se em outro, ou ainda permanecer nua, não sendo o casulo essencial ao seu desenvolvimento. O estágio de pupa dura de seis a sete dias e é mais resistente à dessecação (DRYDEN; RUST, 1994).

O tempo de emergência do adulto é comparado por sexo, isto é, o ciclo das fêmeas é mais curto que dos machos, o que aumenta a probabilidade do ciclo das fêmeas se completarem. As formas imaturas que originam machos estariam mais sujeitas às intempéries, embora a probabilidade teórica de emergência de determinado sexo, seja de 50% (LINARDI; NAGEM, 1972).

Os limites de temperatura mínima e máxima para o desenvolvimento da pulga do gato, *C. felis*, de ovo a adulto, são 13 e 32°C, respectivamente. O período de desenvolvimento pode variar de 14 a 140 dias nessas temperaturas respectivamente. O desenvolvimento completo ocorre entre 50 e 92% de umidade relativa. A 27°C, a umidade relativa mínima necessária para as larvas é de 50% e para pupas 2%. A longevidade dos adultos é maior com o aumento da umidade relativa e com o decréscimo da temperatura ambiente (SILVERMAN et al., 1981). Segundo Thiemann et al. (2003), a captação ativa de água das larvas é 53%, de pré-pupas 75-93%, já os adultos perderam essa habilidade de captação ativa de água.

As pulgas não alimentadas morrem em duas semanas. As que sugam sangue, pelo menos uma vez, morrem antes do décimo dia de jejum, sendo na sua maioria no quinto ou no sexto dia (LIMA, 1943).

Um estudo realizado na Flórida, fora do ambiente doméstico, constatou que a sobrevivência maior ocorre no outono, quando a temperatura e a umidade relativa são moderadas, e até 84,6% das pulgas sobrevivem. No inverno, a mortalidade larval é alta 91,7 a 100%, sendo o tempo de desenvolvimento mais longo no ambiente externo à casa, isto se explica devido à temperatura e umidade relativa baixas associadas à passagem de frentes frias nesta época do ano (KERN et al., 1999).

No Brasil, Linardi e Nagem (1972) estudando o ciclo evolutivo de *C. felis*, no laboratório, observaram que a umidade relativa acima de 90 % retarda ou impede a eclosão das larvas e temperaturas superiores a 25°C favorecem a eclosão das mesmas.

2.2 Importância

Vários pesquisadores já comprovaram que as pulgas podem transmitir diversos agentes etiológicos aos animais domésticos, animais silvestres e aos seres humanos. As pulgas são ectoparasitos que podem acarretar desde desconforto à sua picada até a manifestação de dermatites alérgicas.

A alternância entre vida livre e parasitária nos estágios larvários e adultos faz com que as pulgas participem de diferentes elos na cadeia epidemiológica de inúmeros organismos, tais como: vetores biológicos, parasitos e hospedeiros invertebrados (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

Em nove anos de estudo foram feitas coletas mensais de pulgas em cães domésticos de diferentes habitats. Foram coletados 2518 espécimes pertencentes a oito espécies de pulgas. A espécie *C. felis* foi a pulga mais freqüentemente recuperada (n = 1537). Esta espécie de pulga foi aproximadamente três vezes mais abundante que *C. canis* (Curtis, 1826)(n = 535) e aproximadamente cinco vezes mais abundante que *Pulex* spp.(L.) (n = 319). Em alguns estudos prévios já havia sido provado que ambas as espécies, *C. felis* e *C. canis* coexistem freqüentemente dentro da mesma região geográfica e às vezes, até mesmo no mesmo hospedeiro (DRUDEN et al., 2005). Documentar as diferentes espécies de pulgas que parasitam animais domésticos, inclusive cachorros, em diferentes regiões geográficas é importante, pois poderia influenciar o controle da pulga, a prevalência de dermatites e o risco de transmissão de patógenos para os animais e o homem.

As pulgas são hospedeiros intermediários da tênia *Dipylidium caninum* (L), cestóide comumente encontrado no intestino delgado dos cães e gatos e, acidentalmente, do homem (LIMA, 1943; SILVERMAN, 1981). Também são hospedeiros

intermediários de doenças causadas por filarídeos, como *Dipetalonema reconditum* (PÊSSOA, 1988). Em determinadas condições também podem transmitir zoonoses (PEREIRA, 1998). Este fato é ainda mais relevante quando se associa que cães e gatos são animais de companhia que estabeleceram um estreito convívio com o homem, freqüentando sua moradia ou habitando lugares muito próximos a esta (DRYDEN, 1993).

Infecções causadas por *Bartonella* spp. têm sido foco de interesse considerável durante a última década. As espécies de *Bartonella* são consideradas por serem transmitidas por vetores hematófagos. O vetor tem preferência de hospedeiro e isso provavelmente explica porque várias espécies são associadas mais frequentemente com certos hospedeiros. Na Noruega, a *Bartonella henselae* agente causador da doença da arranhadura do gato para o homem, foi isolada, ainda que esporadicamente, na hemolinfa da pulga *C. felis* (BERGH et al., 2002). Esse patógeno foi transmitido experimentalmente a gatos por pulgas e podem ser considerados como reservatórios para o homem (CHOMEL et al., 1986). Em outro experimento, os gatos receberam injeção contendo fezes provenientes de pulgas infectadas por *B. henselae*, apresentando-se soropositivos para esse microrganismo após uma ou duas semanas da infecção experimental e permanecendo soropositivos ou bacterêmicos após a vigésima semana (FOIL et al., 1998).

De acordo com Beard et al. (1990), um estudo na Flórida avaliou os endossimbiontes existentes em 403 amostras de *C. felis*, 194 de *Pulex simulans* e 44 de *Echidnophaga gallinacea*. Após a dissecação das pulgas foram encontrados baculovírus, bactérias gram-negativas, organismos semelhantes a riquetsias, flagelados tripanosomatídeos, amebas, gregarinas, microsporídios, nematóides entomofílicos e da espécie *Dirofilaria immitis* (Leidy) e metacestóides de *D. caninum*. Alguns desses endossimbiontes são conhecidos patógenos de diversos mamíferos, o que demonstra uma possível capacidade das pulgas em transmitir agentes patogênicos.

A presença das pulgas *P. irritans*, *C. canis* e *C. felis felis*, parasitando a raposa *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1789) (Canidae) na área endêmica de leishmaniose visceral em Jacobina, Bahia, pode sugerir a existência de uma possível conexão eco-epidemiológica do referido hospedeiro silvestre de *Leishmania chagasi* (Cunha e Chagas, 1936) com o ambiente doméstico, uma vez que esta espécie de raposa foi encontrada naturalmente infectada pela *L. chagasi* nesta região, ainda que o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) seja o vetor comprovado da protozoose (CERQUEIRA et al., 2000).

Lima (1943) admitiu que as pulgas pudessem transmitir leishmanioses (Calazar e botão do Oriente), uma vez que as pulgas têm sido pouco investigadas como possíveis transmissores de leishmaniose.

Investigando a pulga, como potencial vetor da leucemia felina, verificou-se que o vírus pode ser ingerido pela pulga e pode ser excretado com as fezes, mas também pode ocorrer a transmissão direta, através da picada e sucção de sangue (VOBIS et al., 2003).

A infecção por rickettsia causa importantes doenças e morte no mundo, principalmente em focos endêmicos. Esses patógenos são altamente especializados para sobreviverem dentro das células dos hospedeiros vertebrados e invertebrados. As relações patógeno-hospedeiros são caracterizadas por multiplicação eficiente, transmissão transtadial e transovariana e ampla distribuição geográfica e ecológica (AZAD; BEARD, 1998).

Depois da descoberta e caracterização inicial da *Rickettsia felis*, houve duas comunicações de rickettsioses causadas por *R. felis* na América Latina. Na comparação e discussão desses dois artigos, Galvão et al. (2004) descreveram os principais sinais e sintomas de pacientes da América Latina com rickettsioses. Os pacientes tiveram

sintomas sistêmicos como febre, dor de cabeça e mialgia. Todos os casos apresentaram erupções cutâneas, dor abdominal, náusea, vômito e diarreia. Alguns pacientes apresentaram fotofobia e outros apresentaram conjuntivite. No Brasil, um paciente chegou a ficar em coma.

Outro fato importante em relação a pulgas é a Dermatite Alérgica às Pulgas (DAP) que é uma doença imunológica na qual uma hipersensibilidade é produzida em um hospedeiro, de qualquer espécie, com o resultado da injeção natural de antígenos das glândulas salivares das pulgas (DRYDEN; RUST, 1994). Uma vez ocasionada a sensibilização, pode ocorrer a reincidência das lesões, com apenas algumas picadas, isso irá depender da sensibilidade de cada indivíduo à picada da pulga. O restabelecimento do animal, frequentemente requer tempo, paciência, habilidade clínica e principalmente a eliminação da pulga. O objetivo do controle sempre deve ser a eliminação total da população de pulga dentro da casa. Esta meta não é fácil de atingir, já que a pulga tem uma capacidade reprodutiva alta e um ciclo de vida complexo (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

Nos Estados Unidos, estima-se que anualmente milhões de dólares são gastos para tratar animais com DAP. Calcula-se que U\$ 28 bilhão estão sendo gastos com veterinários para tratar animais com doenças relacionadas a pulgas (ZENTKO; RICHMAN, 1997).

Infestações por pulgas em um rebanho bovino mestiço de 180 animais no Estado do Mato Grosso, Brasil, revelou que quatro, dos quarenta bezerros examinados, apresentaram altas infestações, mesmo não tendo sido feita a quantificação. Na inspeção, foi descoberto um grande número de pulgas no chão do estábulo, onde eram feitas as ordenhas. Os animais adultos e outros animais da fazenda, como porcos e galinhas não foram infestados. Um bezerro fêmea de três meses de idade morreu devido a alta infestação por *C. felis felis*, os sintomas observados foram letargia, perda de peso, palidez nas membranas das mucosas e desidratação (ARAÚJO et al., 1998).

A diversidade de hospedeiros e o poli-hematofagismo é um parâmetro importante no estudo de questões epidemiológicas, relativas à transmissão de alguns patógenos (CERQUEIRA; LINARDI, 1976). Em um estudo realizado por Yeruham et al. (1996) observaram que cavalos de dois estábulos, apresentaram infestações por *C. felis felis*. Esses animais eram mantidos com ovelhas e cabras, contudo os potros foram mais severamente infestados por pulgas. Devido a diversidade de hospedeiros onde é encontrada a espécie *C. felis felis* pode-se considerar que a baixa especificidade dessa espécie por hospedeiros, podem servir como uma fonte potencial de infestação de pulgas em cavalos.

O controle desse parasito é importante, por ser a pulga um parasito potencial na transmissão de diversos agente patogênicos ao homem e aos animais.

2.3 Controle

O controle de pulgas pode ser feito por métodos mecânicos, químicos e biológicos. Os programas de controle integrado de pulgas devem ter como objetivo principal a redução das infestações a níveis toleráveis nos hospedeiros e no ambiente. Esses níveis são subjetivos e devem ser determinados com base nas características próprias de cada sistema de criação em que se integram o hospedeiro, o parasito e o ambiente comum a ambos (DRYDEN, 1995).

Durante os últimos anos, vários produtos para controle de pulga, tópico e sistêmico, foram introduzidos no mercado mundial. Porém, muitos donos de animais continuam usando uma variedade de combinações não inseticidas na tentativa de controlar pulgas, embora haja dados escassos para substanciar a validade do uso destes. O uso do fermento de cervejarias, vitaminas do complexo-B e produtos de enxofre

elementares são práticas comuns como repelentes de pulgas (DRYDEN et al., 2000). Também soluções de fumo, de fruta do conde (*Annona squamosa*), de cravo-de-defuntos (*Tagetes* sp.) ou de mamona (*Ricinus comunis*) são eficientes no controle de pulgas e piolhos (BURG; MAYER, 1999).

De acordo com Hinkle et al. (1997), os métodos alternativos de controle integrados devem incluir técnicas de controle biológico, sanitárias, mecânicas e genéticas.

2.3.1 Controle mecânico

Linardi e Guimarães (2000) utilizaram como controle mecânico sobre os animais domésticos, como cães e gatos de pêlo curto, a catação manual e a penteação frequente. No interior de habitações pode-se fazer uma varrição cuidadosa, usar aspirador de pó e lavar o piso e a cama do animal. No ambiente peridomiciliar varrer o canil, manejar a vegetação, impedir a circulação de biomassas para adubo, manejar o solo e evitar o contato do animal com animais externos ao domicílio.

Um estudo foi realizado para testar a eficiência do hábito de higiene em gatos domésticos *Felis felis* (L.), de pêlo curto, infestados com um determinado número de pulgas da espécie *C. felis felis*. O hábito de higiene dos gatos pode ser de grande valia no controle de pulgas segundo Hinkle et al. (1998).

Também no intuito de avaliar a eficácia desse hábito de higiene dos gatos na remoção de pulgas, um experimento foi montado com nove gatos utilizando colares Elizabetanos e nove gatos sem colares. Esses animais foram colocados em ambiente infestado com pulgas por três semanas. Decorrido esse período o número de pulgas foi contado e comparado entre os grupos. Os gatos que tinham colares apresentaram duas vezes mais o número de pulgas que os gatos do grupo controle, tal fato pode ser atribuído à inabilidade dos gatos com colares em realizar a higiene (ECKSTEIN; HART, 2000).

Osbrink et al. (1986) verificaram que um maior número de pulgas adultas se localiza nos cômodos em que os animais de estimação passam a maior parte do tempo, indicando uma associação íntima com o comportamento de repouso animal. Um estudo demonstrou que o uso de aspirador de pó é excelente para recolher amostras de pulgas em cômodos.

Um experimento realizado para determinar o espectro de luz visível que mais atrai a pulga *C. felis* foi desenvolvido com o objetivo de se criar uma armadilha para capturar esses insetos em ambiente doméstico. Um filtro verde-amarelo atraiu mais pulgas que a luz branca. Esta informação foi utilizada para preparar uma armadilha contendo uma fonte de luz e um filtro nesta cor específica, que alternadamente permanecia por 10 minutos acesa e por 5 segundos apagadas. Essa armadilha coletou aproximadamente 86% das pulgas soltas em um cômodo carpetado (3,1 x 3,3 m) durante um período de 20 horas, enquanto os três tipos de armadilhas convencionais existentes no mercado atraíram aproximadamente 13% das pulgas (DRYDEN; BROCE, 1993).

Penteando o animal por cinco minutos têm-se uma estimativa de populações de pulga. A inspeção de animais infestados revelou que a cabeça e regiões de pescoço têm os maiores números de pulgas: 29,4% e 26,6%, respectivamente (HSU et al., 2002). Partindo dessa observação admitiu-se que ao pentear o animal, as pulgas que ficam aderidas ao pente-fino podem ser eliminadas, consolidando assim uma forma de controle.

2.3.2 Controle químico

Durante os últimos dez anos, o controle de pulga em gatos e cães foi revolucionado com a utilização de inseticidas sistêmicos e tópicos como lufenuron, fipronil, imidacloprid e, recentemente, selamectin. Antes da introdução deles, a recomendação para o controle de pulgas consistia em tratamentos com produtos químicos em ambientes fechado e ao ar livre - onde o ovo, larva e pupas residem. Dentro de alguns anos da introdução destes inseticidas, o paradigma mudou, passando a só usarem os tratamentos sobre os animais. (HSU et al., 2002).

Várias espécies de pulgas, especialmente as que transmitem a peste, têm sido notificadas por haver adquirido resistência a inseticidas: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas e piretróides (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

Inseticidas químicos são altamente tóxicos e de amplo espectro de ação com conseqüências graves ao homem e ao meio ambiente, além de causar o aparecimento de populações de insetos resistentes. Muitos casos de resistências em pulgas podem ser atribuídos a efeitos dos solventes, substratos, umidade, temperaturas, colonização e idade das pulgas.

O desenvolvimento de resistência aos produtos químicos é o principal fator de falha no controle destes. Atualmente, há poucos pesticidas para se escolher em um programa de controle. Outra razão para o aumento de interesse pelo controle biológico é o custo dos pesticidas e de suas aplicações (EL-GAZAR et al., 1986; SHIPSTONE; KENNETH, 1995; BOSSARD et al., 1998; DRYDEN et al., 1997; HOGSETTE, 1999). Portanto, é necessário reduzir o uso desses produtos mediante o emprego de alternativas mais seguras de controle. Assim, os agentes de controle biológico são uma alternativa econômica e ecologicamente viável (VALADARES-INGLIS et al., 1998; BOSSARD et al., 1998).

Os inibidores ou reguladores de crescimento desempenham papel principal na regulação da alimentação e reprodução de *C. felis* adultas. Estudos histológicos demonstraram que o hormônio juvenil III estimula a diferenciação celular do epitélio das glândulas salivares, do epitélio intestinal e de células do corpo gorduroso, aumentando a habilidade de pulgas adultas para digerir o sangue e sintetizar vitelogenia para maturação dos oócitos. Contudo, em uma concentração de 12.500 ppm, o hormônio juvenil matou 45% dos adultos e causou autólise e reabsorção da gema no desenvolvimento dos oocistos. Assim, em altas concentrações, o hormônio juvenil parece ter um efeito farmacológico em pulgas, o que é raro em inseto (MEOLA et al., 2001).

Com o uso dos reguladores de crescimento methoprene e fenoxycarb, houve uma redução na emergência dos adultos de *C. felis* em 99%. No entanto, a duração do período de emergência das pulgas dependerá do grau de infestação no animal, dos fatores físicos, e de outros estímulos do ambiente desencadeadores da sua emergência. O methoprene só pode ser utilizado em ambientes internos, por ser altamente fotodegradável (EL-GAZZAR et al., 1986; GORTEL, 1993).

O inibidor de crescimento fluazuron se mostrou eficaz na redução da carga de pulgas em uma aplicação mensal (SLOWIK et al., 2001). O regulador de crescimento, pyriproxyfen é conhecido por impedir o desenvolvimento dos ovos e dos outros estágios juvenis da pulga *C. felis felis* (STANNECK et al., 2002).

2.3.3 Controle Biológico

Atualmente há varias opções de organismos para o controle biológico, tais como insetos, nematóides, protozoários, bactérias, fungos e vírus (HOGSETTE, 1999).

Alguns autores desenvolveram trabalhos sobre o controle biológico de *C. felis felis* Silverman et al. (1982) utilizaram nematóides para o controle desta espécie de pulga; Fox e Garcia-moll (1961) e Silverman e Appel (1984) citaram a predação por formigas. Trabalhos desenvolvidos por Cerqueira e Linardi (1976), citaram a associação de algumas espécies de ácaros predando pulgas.

Em uma infecção experimental por nematóides do gênero *Aphanitylenchus* em pulgas *Ceratopsyllus consimilis*, os pesquisadores observaram que fêmeas não infectadas por estes parasitas, quando copulavam com machos infectados, apresentavam redução da taxa de fecundidade. Por outro lado, às fêmeas infectadas quando copulavam com machos não infectados, ocorria a interrupção da reprodução (KOZLOV et al., 1985).

Silverman et al. (1982) desenvolveram um estudo em laboratório para determinar a susceptibilidade de *C. felis* a infecção pelo nematóide *Neoplectana carpocapsae*. O percentual de mortalidade em 24 horas das larvas de *C. felis* infectadas na areia varia de acordo com a umidade do substrato. Aumentando a umidade do substrato em 2 a 7%, a mortalidade larval da pulga aumenta significativamente. Esse fato também deve ser considerado na aplicação, pois quando aplicadas em substrato úmido, às larvas dos nematóides podem sobreviver para infestar mais de uma geração de pulgas.

No desenvolvimento de um bioinseticida a base de nematóides, deve-se considerar a possibilidade de produzi-lo a um custo viável e em quantidade suficiente para permitir a comercialização do produto (LEITE et al., 2005).

Tem-se conhecimento que certas formigas são benéficas por atacarem insetos nocivos, e em alguns casos elas foram até mesmo deliberadamente usadas para o controle biológico de pragas como *Musca domestica* (L.). Formigas da espécie *Paratrechina longicornis* (Latreille) ocorrem em residências, terrenos arenosos ou úmidos e sombreados. Uma colônia, em laboratório de *Xenopsylla cheopis* (Rothschild, 1903) foi observada sendo infestada por formigas. As larvas apreendidas morreram em meia hora e as pulgas adultas em aproximadamente duas horas (FOX; GARCIA-MOLL, 1961).

Silverman e Appel (1984) expuseram ovos, larvas de segundo instar, pupas expostas e pupas dessecadas de seus casulos, pupas com casulos parcialmente abertos, e pupas completamente fechadas de *C. felis* a formigas argentinas, *Iridomyrmex humilis*. Observou-se que ovos, larvas, pupas dessecadas e pupas parcialmente abertas, foram atacados pelas formigas e as pupas completamente fechadas não foram afetadas mostrando que o pupário serve como barreira de proteção natural contra a predação das formigas.

Um outro estudo observou que besouros da espécie *Alphitobius laevigatus* (Coleoptera: Tenebrionidae) estavam se alimentando das colônias de *X. cheopis* e de *C. felis*, ambas mantidas no laboratório. Esse besouro é uma praga de alimentos secos armazenados e ainda não havia sido registrado como predador de pulgas. Várias experiências provaram que a produtividade das pulgas diminuiu, com a predação da fase adulta desses besouros (FOX; BAYONA, 1968).

Segundo Cerqueira e Linardi (1976), algumas espécies de ácaros têm sido encontradas em associação com certas espécies de pulgas, infestações naturais de *Pulex tripus* por *Rhizoglyphus echinopus* foram constatadas.

Dentre as bactérias utilizadas no controle biológico, *Bacillus thuringiensis* (Berliner) é responsável por 90%–95% do mercado de bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998). Apesar do êxito demonstrado por esta espécie para controlar diferentes pragas de grande importância no setor Agropecuário e no de Saúde Pública, seus produtos representam apenas uma fração pequena no mercado global de inseticidas (BENINTENDE et al., 2005). Essa bactéria produz duas toxinas conhecidas, a beta-exotoxina, que é liberada para o desenvolvimento durante o crescimento vegetativo e a delta-endotoxina, que se acumula durante a esporulação. A beta-exotoxina é eficaz contra dípteros e outras ordens de insetos, mas é proibida em alguns estados norte americanos devido à sua toxicidade a mamíferos e aves. Estudos provaram que esse componente não é tóxico a *X. cheopis* nas concentrações testadas. Mesmo nos tratamentos iniciados com os primeiros instares, o percentual de emergência de imagos foi de 80 a 96%, quando comparado com o grupo controle 92 a 97 % (MACIEJEWSKA et al., 1988).

As toxinas chamadas de cristais, ao serem ingeridas pelas larvas dos insetos, sofrem ação do pH intestinal e de proteases, que o solubilizam e o ativam. Estas toxinas se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino da larva, ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que se intumescce e rompe, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele do inseto. Em consequência, a larva para de se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição ou septicemia. Não há atividade de *B. thuringiensis* nas fases de pupa e de adulto dos insetos (MONNERAT; BRAVO, 2000).

2.4 Mecanismo de ação dos Fungos Entomopatogênicos.

Os fungos são patógenos capazes de infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo esta característica bastante desejável. Quando comparados com outros grupos de patógenos, os fungos levam certa vantagem, pois a maioria deles é altamente especializada na penetração via tegumento do inseto, diferentes dos outros que só penetram via oral (ALVES, 1998).

Segundo o mesmo autor, o gênero *Beauveria* parasita um grande número de artrópodes, insetos e ácaros. A espécie *B. bassiana* foi o primeiro fungo a ser estudado e em condições de laboratório, esta espécie pode colonizar a maioria dos insetos. A infecção ocorre normalmente via tegumento, onde o fungo germina em 12 a 18 horas.

O fungo *M. anisopliae* é capaz de ultrapassar a barreira cuticular dos insetos, e essa penetração é facilitada, quando a virulência deste fungo inclui a hidrólise secretora, particularmente proteinases (ST. LEGER et al., 1999).

Segundo Freimoser et al. (2005), esse fungo infecta uma variedade de insetos, através da penetração direta da cutícula do hospedeiro. Ao explorarem a base molecular desse processo, inspecionaram as respostas de expressão gênica para cutículas de diversos insetos. Este estudo demonstrou que essa espécie fúngica pode ajustar seus padrões de expressão gênica rapidamente, dando respostas específicas a cutículas diferentes.

Segundo Roberts e Humber (1981), fungos como *Beauveria*, *Metarhizium* e *Entomophthora* são entomopatogênicos eficazes no uso de controle de insetos susceptíveis, provocando mortalidade através dos processos de penetração e colonização de órgãos e tecidos, devido a toxinas liberadas por tais microorganismos.

Kaaya et al. (1996) citam que o tegumento dos insetos constitui-se de uma barreira físico-química altamente eficiente contra a penetração de grande número de bactérias, vírus e outros agentes entomopatogênicos, podendo ser ineficiente em

condições ambientais adversas ao inseto. Muitos fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* infectam a cutícula dos hospedeiros via conídios que se aderem e germinam formando uma série de estruturas durante a penetração. Esta espécie fúngica produz uma variedade de enzimas degradantes de cutícula durante a penetração no hospedeiro (St. LEGER, 1991).

Segundo Alves (1998), a penetração normal dos fungos é via tegumento, através de atividade enzimática ou pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório. O ciclo desta relação apresenta-se de um modo geral pelas fases de: adesão, germinação, formação de apressórios, formação de grampo de penetração, penetração, colonização e ainda, reprodução e disseminação do patógeno.

Apesar de se considerar a cutícula como uma barreira de proteção à infecção fúngica, Bittencourt et al. (1995) demonstram a patologia de *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus*, enfatizando que a via normal de penetração fúngica é pelo tegumento/cutícula do ixodídeo.

O mecanismo de infecção de *M. anisopliae*, isolado E9, em carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* foi verificado por Garcia et al. (2004), no qual os autores observaram a aderência de conídios na cutícula dos carrapatos uma hora após a infecção.

Na presença de nutrientes e níveis ideais de umidade, o fungo forma tubos germinativos na superfície cuticular do hospedeiro, formando um apressório, e logo após forma um grampo de penetração onde enzimaticamente penetra na epicutícula do carrapato, estabelecendo uma relação nutricional com o hospedeiro (St. LEGER, 1991).

St. LEGER et al. (1987) verificaram a atividade de duas endoproteases, uma aminopeptidase e uma esterase, localizadas principalmente no apressório e conídio após sua germinação, e não encontrou produção de endoquitinase antes ou durante a penetração das hifas na cutícula.

A penetração fúngica no tegumento do inseto alvo seguido de colonização e infecção generalizada e posterior morte do inseto, geralmente ocorrem entre três a dez dias após contato. Este processo porém, é dependente de fatores limitantes como componentes nutricionais da cutícula, reações químicas e ação de micotoxinas (CHANDLER et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do Experimento.

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz (EPPWON), onde foram realizados os bioensaios e a manutenção dos isolados fúngicos. No Laboratório de Estudos Parasiticidas, convênio Embrapa-UFRJ, foi feita a manutenção da colônia de *Ctenocephalides felis felis* e no Laboratório de Microscopia da Embrapa-Agrobiologia, onde foram preparadas as amostras para microscopia. Os experimentos foram realizados no período de dezembro de 2002 a janeiro 2005.

3.2. Obtenção dos Fungos.

Os isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma) e de *Beauveria bassiana* (Bb) utilizados no experimento foram cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP). Os isolados testados foram Ma 959 (isolado de carrapato, Seropédica/RJ), Ma E9 (isolado padrão), Bb 986 (isolado de carrapato) e Bb 747 (isolado de formiga). Estes isolados foram reproduzidos e são mantidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária.

3.3. Multiplicação dos Isolados Fúngicos.

Cada isolado a ser testado foi primeiramente desenvolvido em placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). Em seguida, os fungos foram produzidos em meio de arroz, onde sacos de polipropileno contendo 60 gramas de arroz e 30mL de água destilada estéril foram amarrados com barbante e levados para autoclave durante 20 minutos a 120°C. Após o resfriamento, estes sacos contendo o arroz estéril, foram inoculados com os isolados a serem testados, identificados e homogeneizados. Para o crescimento fúngico, estes sacos foram acondicionados em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e = 80 % UR por aproximadamente 15 dias.

De cada saco contendo arroz e fungo, prepararam-se lâminas, que foram coradas com Lactofenol de Amann com Azul de Algodão e levadas ao microscópio estereoscópio para a confirmação do gênero fúngico.

3.4. Elaboração das Suspensões.

As suspensões conidiais de cada isolado foram preparadas em fluxo laminar a partir do meio de arroz com fungo mais água destilada estéril e espalhante adesivo, de nome comercial Tween 80[®]. No preparo de cada suspensão, o arroz com o fungo foi homogeneizado em bécher contendo 100mL de água destilada estéril e 0,1mL do espalhante adesivo de nome comercial Tween 80. Após agitação e desprendimento dos conídios, fez-se a separação dos grãos, através da filtragem da solução em gaze estéril e conseguinte descarte dos grãos. Uma amostra da suspensão conidial foi colocada na câmara de Neubauer e levada ao microscópio óptico para contagem direta do número de conídios.

Através da realização de uma diluição seriada, as suspensões seguintes foram preparadas a partir da suspensão com 10^8 conídios.mL⁻¹. Para preparar a suspensão 10^7

conídios.mL⁻¹, 10 mL da suspensão 10⁸ foi colocada em 90 mL de água destilada estéril. A suspensão 10⁶ conídios.mL⁻¹ foi preparada a partir da concentração 10⁷, e a concentração 10⁵ conídios.mL⁻¹ a partir da 10⁶ seguindo o mesmo procedimento descrito acima. No grupo controle foi utilizado apenas 100 mL de água destilada estéril e 0,1% de Tween 80.

3.5. Quantificação do Inóculo.

Os conídios foram quantificados através do método de contagem direta em microscópio estereoscópio, com o auxílio da câmara de Neubauer. O número médio de conídios contados em dez campos (n) foi multiplicado pelo fator fixo desse campo (n x 4 x 10⁶), calculado em função do seu volume, o que determinou o número de conídios existentes na suspensão (ALVES; MORAES, 1998).

Utilizando esta metodologia, foram preparadas as suspensões fúngicas nas concentrações: Ma 959 1,84 x 10⁸ conídios.mL⁻¹, Ma E9 2,05 x 10⁸ conídios.mL⁻¹, Bb 986 x 1,92 10⁸ conídios.mL⁻¹ e Bb 747 x 3,18 x 10⁸ conídios.mL⁻¹ para os bioensaios realizados com adultos.

As concentrações fúngicas utilizadas nos bioensaios com ovos foram: Ma 959 1,43 x 10⁸ conídios.mL⁻¹, Ma E9 1,6 x 10⁸ conídios.mL⁻¹, Bb 986 1,9 x 10⁸ conídios.mL⁻¹ e Bb 747 x 10⁸ conídios.mL⁻¹.

3.6. Manutenção da Colônia de *Ctenocephalides felis felis*.

Os ovos e adultos a serem utilizados nos experimentos foram obtidos de uma colônia de *C. felis felis* mantida nas dependências do Laboratório de Estudos Parasitocidas.

A colônia foi mantida segundo a metodologia de Santos (2000). Os gatos da colônia foram mantidos em gaiolas de metal com bandeja removível. Semanalmente os gatos foram infestados com pulgas e diariamente as bandejas das gaiolas foram varridas com o auxílio de uma vassoura de mão. O material coletado das bandejas foi peneirado, em peneira com malha de 2mm e colocado em potes plásticos com tampa de tecido fino de poliéster e acondicionado em câmara climatizada com temperatura e umidade controlada a 25 ± 1 °C = 75% UR.

3.6.1 Obtenção dos ovos.

Para a obtenção dos ovos para o experimento, uma infestação artificial com 100 pulgas/gato foi feita em seis gatos adultos 24 horas antes da coleta do material da bandeja a fim de obter um número maior de ovos. O material coletado foi levado ao laboratório e peneirado. Em pequenas quantidades, por vez, o material coletado foi distribuído em placa de Petri e com o auxílio de um microscópio simples (Lupa) e um pincel número 2, os ovos foram separados e aspirados por um aspirador de baixa potência (Mini Super Cleaner - PET) adaptado para este fim.

3.6.2 Obtenção dos adultos.

Os adultos foram obtidos da colônia, aproximadamente 30 dias após a coleta do material das bandejas, onde potes plásticos contendo o material peneirado foram fechados com tampa de tecido fino de poliéster, adaptados para a colônia. Estes potes foram acondicionados em temperatura e umidade controlada a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} = 75\% \text{ UR}$, até a imersão dos adultos.

3.7 Bioensaios com *Ctenocephalides felis felis*.

A metodologia utilizada nos bioensaios foi adaptada das metodologias empregadas para o controle do carrapato, utilizadas no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária da UFRRJ, citados nos trabalhos de BITTENCOURT et al. (1996), MONTEIRO et al. (1998), SOUZA, et al. (1999), REIS, et al. (2001), MELO (2002). O método de imersão empregado baseou-se numa adaptação às citações feitas por Torrado & Gutierrez (1969) e Stendel (1980) e o isolamento dos fungos, baseado no estudo de BITTENCOURT et al. (1995), visto que não há uma metodologia recomendada para avaliação de fungos entomopetogênicos para *C. felis felis*.

Cada bioensaio foi composto de quatro diferentes tratamentos nas concentrações 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios.mL⁻¹, e dois grupos controles para cada isolado, sendo um total de seis tratamentos, para os quais foram feitas dez repetições. O grupo controle 1 não recebeu nenhum tratamento e o grupo controle 2 foi tratado com uma solução de água destilada estéril com 0,1% Tween 80. Todos os bioensaios para os testes de eficácia foram mantidos em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de 75 %.

O parâmetro observado para os tratamentos com ovos foi o percentual de eclosão e no tratamento com adultos o parâmetro avaliado foi a mortalidade.

3.7.1 Ovos.

Para a realização dos bioensaios com ovos, em cada tubo de ensaio, de cada tratamento, foram colocados dez ovos. Esses tubos foram vedados com tecido fino de poliéster, de cor preta para facilitar a visualização e um chumaço de algodão hidrófilo. Estes tubos contendo os ovos, receberam um mililitro da suspensão a ser testada e os ovos permaneceram imersos por três minutos. Decorrido esse tempo os tubos foram invertidos para eliminar o excesso de suspensão, através da absorção do líquido pelo algodão. Após esse procedimento os tubos foram levados para câmara climatizada e o percentual de eclosão larval observado a cada doze horas, pelo período de 120 horas.

3.7.2 Adultos.

Os adultos foram aspirados dos potes da colônia por um aspirador de baixa potência adaptado para o experimento. Foram distribuídos em número de cinco pulgas por tubo de ensaio. Em cada tubo havia uma tira de papel filtro para apoio dos espécimes. Estes tubos foram fechados com pano fino de poliéster de cor branca e um chumaço de algodão hidrófilo. O tecido branco teve o objetivo de melhorar a visualização e evitar que as pulgas ficassem presas no algodão. Após a inoculação com um mililitro de suspensão por três minutos, os tubos foram invertidos para que o algodão absorvesse o excesso de suspensão. Decorrido este período, os tubos com as pulgas foram acondicionados em câmara climatizada com temperatura e umidade já citadas.

O número de adultos mortos foi avaliado em intervalos de 12 horas, pelo período de 120 horas.

3.8 Reisolamento dos Isolados Fúngicos Utilizados.

Amostras de ovos não eclodidos e adultos mortos nos bioensaios foram esterilizadas superficialmente, através da imersão em solução de hipoclorito a 1% e água destilada estéril, pelo período de um minuto. Em seguida foram imersos em água destilada estéril por mais um minuto, secos em papel absorvente, distribuídas em placa de Petri, contendo meio de cultura do tipo BDA, e acondicionados em câmara climatizada a $(28 \pm 1^\circ\text{C}$ e $= 80\%$ UR). Após o crescimento do fungo sobre os espécimes, prepararam-se lâminas, as quais foram coradas com Lactofenol de Amann e Azul de Algodão e levadas ao microscópio estereoscópio para confirmação dos gêneros fúngicos testados nesses experimentos.

3.9 Análise Estatística e Próbites.

O teste estatístico utilizado foi o não paramétrico de Kruskal-Wallis, devido os resultados obtidos serem de caráter qualitativo. Para verificar entre quais tratamentos houve diferença significativa a $p < 0,05$, aplicou-se o teste de Dunn's, onde foram verificadas diferenças significativas existentes entre as diferentes concentrações testadas para cada isolado, quando comparado ao grupo controle positivo e negativo dentro das condições de temperatura $25^\circ\text{C} \pm 1$ e de umidade relativa 75%.

O tempo médio de mortalidade foi calculado para comparação entre os isolados, indicando o menor e o maior tempo de atuação dos fungos sobre os adultos de *C. felis felis*.

Para calcular a concentração letal CL 50 para a eclosão larval, foi usada a análise de próbites, segundo LITCHFIELD & WILCOXON (1949).

3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura.

Os isolados de fungos testados foram o Ma 959 e o Bb 986, nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ e $2,4 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹, respectivamente. Para cada isolado testado foi realizada a infecção de um grupo tratado com a suspensão fúngica e um grupo controle, sendo um total de quatro tratamentos, e para cada tratamento foram feitas dez repetições. O grupo controle foi tratado com solução de água destilada estéril com 0,1% Tween 80. Até a fixação os experimentos foram mantidos em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 75 %.

Cada tubo com as pulgas recebeu um mL de suspensão fúngica ou da solução de tween 0,1% a ser testada, permanecendo imersos por três minutos. Depois os tubos foram invertidos e o excesso de suspensão absorvido pelo algodão.

Para a observação do desenvolvimento do fungo em microscopia eletrônica de varredura, as pulgas foram fixadas em diferentes períodos de tempo após a infecção, sendo com dois, 15, 24 e 96 horas após o tratamento. O fixador utilizado foi o glutaraldeído 2,5 %, em tampão de fosfato de potássio a 0,05M e pH 7,4 por 24h. Em seguida, as amostras foram desidratadas, primeiramente em solução crescente de álcool etílico e água destilada por 15 minutos, depois em soluções crescentes de acetona em álcool etílico, também por 15 minutos. A secagem das amostras realizou-se em ponto crítico com dióxido de carbono.

A metalização em ouro foi realizada no aparelho BAL-TEC modelo SCD 050 por 240 segundos. O material metalizado foi fotografado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM 962.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioensaios com *Ctenocephalides felis felis*

De forma geral, os dados obtidos nos bioensaios com ovos e adultos de *C. felis felis* demonstraram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* induziram uma diminuição do percentual de eclosão das larvas e um aumento na mortalidade dos adultos, à medida que a concentração fúngica foi se elevando. Segundo Alves (1998), os fungos são patógenos capazes de infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros e que devido a esta característica a utilização desses microrganismos em programas de controle biológico é bastante desejável. Os resultados dos bioensaios realizados com ovos e adultos de *C. felis felis* mostram que estes estágios são susceptíveis aos tratamentos por imersão com os fungos entomopatogênicos avaliados.

4.1.1 Bioensaios com ovos de *Ctenocephalides felis felis* e o fungo *Beauveria bassiana*.

Nos bioensaios realizados com o isolado Bb 986 pôde-se observar 48h após a infecção, que houve diferença significativa para os grupos tratados com a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹. Todos os grupos tratados com esta suspensão apresentaram diferenças significativas, quando comparadas ao controle. Os dados encontrados foram 47% de eclosão de larvas no grupo tratado com a suspensão fúngica, e 79% de eclosão para o grupo controle. Notou-se que a partir de 48h após os tratamentos, a eclosão larval nos grupos que receberam suspensão fúngica, não ultrapassou os 53%, enquanto a eclosão larval do grupo controle variou de 82 a 88%. Esses dados demonstraram o efeito inibitório da concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ do isolado Bb 986, sobre a eclosão larval (Tabela 1). Monteiro et al, (1998) e Souza et al (1999), utilizaram o mesmo isolado desse fungo sobre ovos dos carrapatos *Anocentor nitens* e *Amblyomma cajennense*, respectivamente, onde verificaram uma redução significativa no percentual de eclosão das larvas, também, quando a concentração utilizada foi a de 10^8 conídios.mL⁻¹, o que demonstrou que a ação patogênica do fungo ocorreu sobre os ovos de diferentes espécies de artrópodes parasitos.

Nos tratamentos com o isolado Bb 747 foram observadas diferenças estatísticas 36h após a infecção. O percentual de eclosão encontrado variou de 22 a 51%, para o grupo tratado com a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, aumentando de acordo com o tempo após o tratamento. De forma coincidente verificou-se para ambos isolados de *B. bassiana*, que apenas a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ apresentou diferenças significativas, quando comparada aos outros tratamentos, não havendo diferenças estatísticas entre os outros tratamentos (Tabela 1). Os autores acima citados, mesmo trabalhando com ovos de carrapatos, obtiveram resultados similares ao do presente estudo, talvez a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, seja a mais adequada para ser utilizada no controle da eclosão larval.

Tabela 1. Percentual de eclosão das larvas de *Ctenocephalides felis felis* tratados com as diferentes concentrações dos isolados Bb 986 e Bb 747 do fungo *Beauveria bassiana* (Bb), nos diferentes períodos após o tratamento (horas), mantidos sob temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} = 75\% \text{ UR}$.

Trat. Horas	Bb 986						Bb 747					
	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
12	10 ^a	10 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	10 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
24	10 ^a	10 ^a	20 ^a	0,0 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	10 ^a	0 ^a
36	49 ^a	39 ^a	53 ^a	44 ^a	37 ^a	31 ^a	49 ^a	45 ^a	47 ^a	42 ^{ab}	34 ^{ab}	22 ^b
48	79 ^a	70 ^a	76 ^a	75 ^a	64 ^{ab}	47 ^b	79 ^a	75 ^a	86 ^a	66 ^{ab}	71 ^{ab}	46 ^b
60	88 ^a	82 ^a	84 ^a	76 ^{ab}	70 ^{ab}	51 ^b	88 ^a	81 ^a	90 ^a	80 ^{ab}	73 ^{ab}	51 ^b
72	88 ^a	82 ^a	84 ^a	78 ^{ab}	70 ^{ab}	53 ^b	88 ^a	81 ^a	90 ^a	80 ^{ab}	73 ^{ab}	51 ^b
84	88 ^a	82 ^a	84 ^a	78 ^{ab}	70 ^{ab}	53 ^b	88 ^a	81 ^a	90 ^a	80 ^{ab}	73 ^{ab}	51 ^b
96	88 ^a	82 ^a	84 ^a	78 ^{ab}	70 ^{ab}	53 ^b	88 ^a	81 ^a	90 ^a	80 ^{ab}	73 ^{ab}	51 ^b
108	88 ^a	82 ^a	84 ^a	78 ^{ab}	70 ^{ab}	53 ^b	88 ^a	81 ^a	90 ^a	80 ^{ab}	73 ^{ab}	51 ^b
120	88 ^a	82 ^a	84 ^a	78 ^{ab}	70 ^{ab}	53 ^b	88 ^a	81 ^a	90 ^a	80 ^{ab}	73 ^{ab}	51 ^b

Médias seguidas de mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Dunn's.

4.1.2 Bioensaios com ovos de *Ctenocephalides felis felis* e o fungo *Metarhizium anisopliae*.

Ao examinar o percentual de eclosão das larvas em ovos tratados com o fungo *M. anisopliae* observou-se que com 36 horas após a infecção, todos os grupos que receberam o isolado Ma E9, nas distintas concentrações fúngicas, apresentaram diferenças altamente significativas, quando comparado aos grupos controle. Nota-se que o percentual de eclosão das larvas, tratadas com o isolado Ma E9, foi menor que os percentuais de eclosão dos outros grupos tratados com o isolado Ma 959 e que estes percentuais foram inversamente proporcionais à concentração da suspensão fúngica utilizada. Nos grupos controles observou-se os percentuais de eclosão variando de 92 a 94 %, após 84 h da postura, (Tabela 2).

Linardi e Nagem (1972) avaliando a biologia de *C. felis felis*, constataram 54,5% de eclosão larval em 1300 ovos, onde 709 eclodiram para larvas de primeiro instar, posteriormente Linardi et al. (1997) encontraram 74,2% de eclosão larval. Estes resultados são semelhantes aos encontrados nos grupos controles do presente experimento. Estes autores também utilizaram sangue de alguns hospedeiros, tais como camundongos, pombos e cães na alimentação das larvas e verificaram que não houve alteração na duração do ciclo biológico. No presente trabalho, a dieta larvária não foi

variada, já que o objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos entomopatógenos sobre o percentual de eclosão larval, através da imersão dos ovos em suspensão conidial.

MELO (2002) verificou após o tratamento de ovos do carrapato *Boophilus microplus* com o isolado Ma E9, diferenças significativas nos grupos tratados com as concentrações fúngicas, quando comparados aos controles. O que chama a atenção nesses resultados é, que mesmo trabalhando com espécies de parasitos diferentes, as respostas aos tratamentos com as mesmas concentrações conidiais são semelhantes. Esses fatos sugerem que os percentuais de eclosão observados nos experimentos, possam estar relacionados à virulência dos isolados fúngicos, ou ainda estar associado ao ínstar testado.

Tabela 2. Percentual de eclosão das larvas de *Ctenocephalides felis felis* tratados com as diferentes concentrações dos isolados Ma E9 e Ma 959 do fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma) nos diferentes períodos após o tratamento (horas), mantidos sob temperatura de 25 ± 1 °C = 75% UR.

Trat. Horas	Ma E9						Ma 959						
	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
12	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
24	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	—	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
36	71 ^a	69 ^a	28 ^b	32 ^b	13 ^b	29 ^b	—	71 ^a	69 ^a	59 ^a	67 ^a	59 ^a	62 ^a
48	72 ^a	71 ^a	28 ^b	38 ^b	22 ^b	32 ^b	—	71 ^a	69 ^a	59 ^a	75 ^a	62 ^a	63 ^a
60	78 ^a	82 ^a	39 ^b	38 ^b	22 ^b	32 ^b	—	78 ^a	82 ^a	66 ^a	81 ^a	63 ^a	64 ^a
72	84 ^a	83 ^a	39 ^b	38 ^b	25 ^b	32 ^b	—	84 ^a	83 ^a	74 ^a	81 ^a	64 ^a	64 ^a
84	92 ^a	91 ^a	40 ^b	38 ^b	27 ^b	32 ^b	—	92 ^a	92 ^a	74 ^{ab}	81 ^{ab}	64 ^b	64 ^b
96	94 ^a	91 ^a	40 ^b	39 ^b	27 ^b	32 ^b	—	94 ^a	92 ^a	74 ^{ab}	81 ^{ab}	64 ^b	64 ^b
108	94 ^a	91 ^a	40 ^b	39 ^b	27 ^b	32 ^b	—	94 ^a	92 ^a	74 ^{ab}	81 ^{ab}	64 ^b	64 ^b
120	94 ^a	91 ^a	40 ^a	39 ^b	27 ^b	32 ^b	—	94 ^a	92 ^a	74 ^{ab}	81 ^{ab}	64 ^b	64 ^b

Médias seguidas de mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Dunn's.

Nos tratamentos com o isolado Ma 959 observou-se que 60 h após a infecção o percentual de eclosão larval foi de 64% para a concentração fúngica 10^8 conídios.mL⁻¹. O baixo percentual de eclosão dos grupos controle nas primeiras observações, podem ter contribuído para não haver diferenças significativas entre o tratamento e os grupos controle. Com o aumento do percentual de eclosão dos grupos controles, pode-se observar diferenças significativas dos grupos tratados com as concentrações 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹, coincidentemente, ambas concentrações apresentaram 64% de eclosão das larvas.

Utilizando os mesmos isolados do presente estudo, sobre ovos do carrapato *R. sanguineus*, Monteiro et al. (1998) avaliaram o percentual médio de eclosão das larvas, tratados com diferentes concentrações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* e Bittencourt et al. (1994 e 1996), analisaram a ação do fungo *B. bassiana*, sobre ovos do carrapato *B. microplus*. Estes autores observaram que quanto maior a concentração fúngica utilizada nos tratamentos, menor era o período de eclosão das larvas. Estes dados afirmam os dados encontrados no presente trabalho, ainda que as espécies estudadas sejam totalmente diferentes, cabendo aqui frizar que as espécies de fungos e as condições experimentais foram semelhantes.

As figuras 1, 2, 3 e 4 ilustram os dados demonstrados nas tabelas 1 e 2. Observa-se na figura 1 que de 12 a 24 horas praticamente não houve eclosão das larvas para nenhum tratamento, porém a partir das 24 horas observa-se que os tratamentos com a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ destaca-se das demais concentrações, tal fato pode ser atribuído à ação inibitória do fungo *B. bassiana*, isolado Bb 986 sobre a eclosão das larvas.

Coincidentemente o isolado Bb 747 apresentou-se de forma semelhante ao isolado Bb 986, onde a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ se destaca dos demais tratamentos, (Figura 2). Segundo Alves, (1998) esta espécie de fungo é mais frequentemente encontrada sobre os insetos e amostras de solos. Esta afirmação é bastante desejável, uma vez que os estágios imaturos desenvolvem-se no ambiente externo ao animal, estando mais expostos aos fatores abióticos e apenas na fase adulta das pulgas estão sobre o animal.

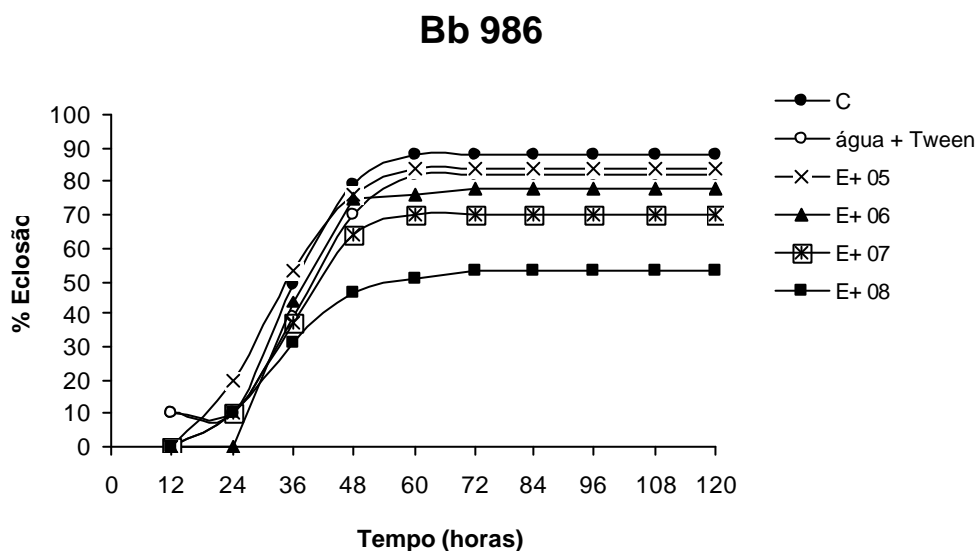


Figura 1. Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de *Ctenocephalides felis felis*, após o tratamento com as diferentes concentrações do fungo *Beauveria bassiana* isolado Bb 986.

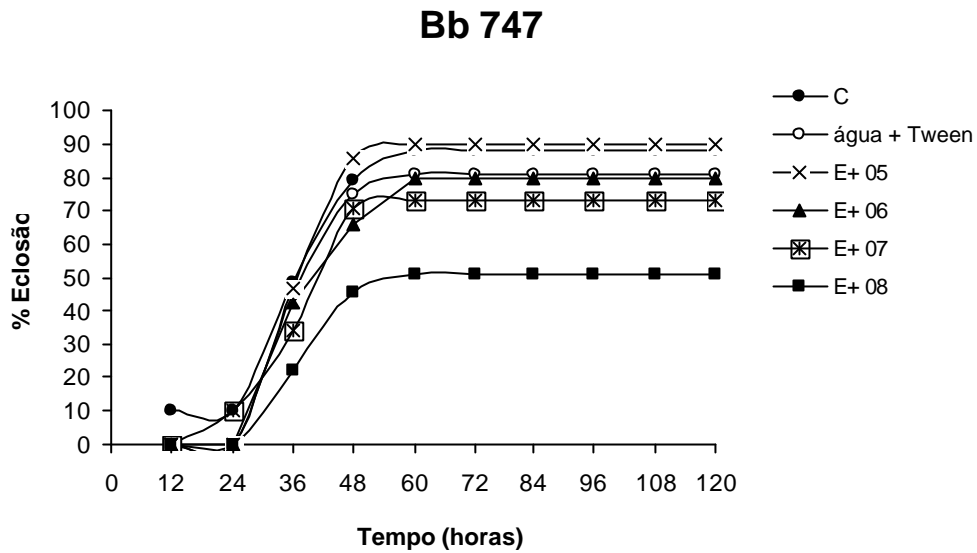


Figura 2. Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de *Ctenocephalides felis felis*, após o tratamento com as diferentes concentrações do fungo *Beauveria bassiana* isolado Bb 747.

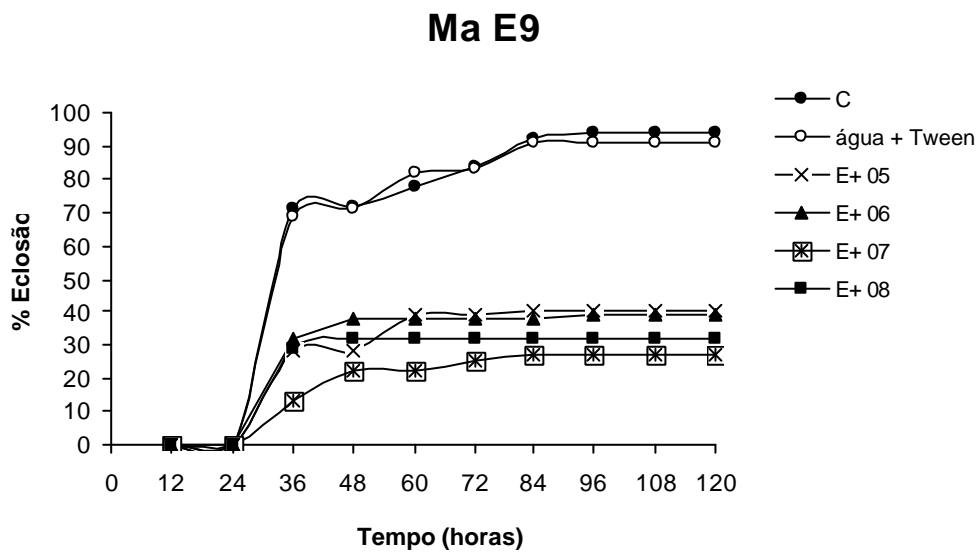


Figura 3. Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de *Ctenocephalides felis felis*, após o tratamento com diferentes concentrações do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado Ma E9.

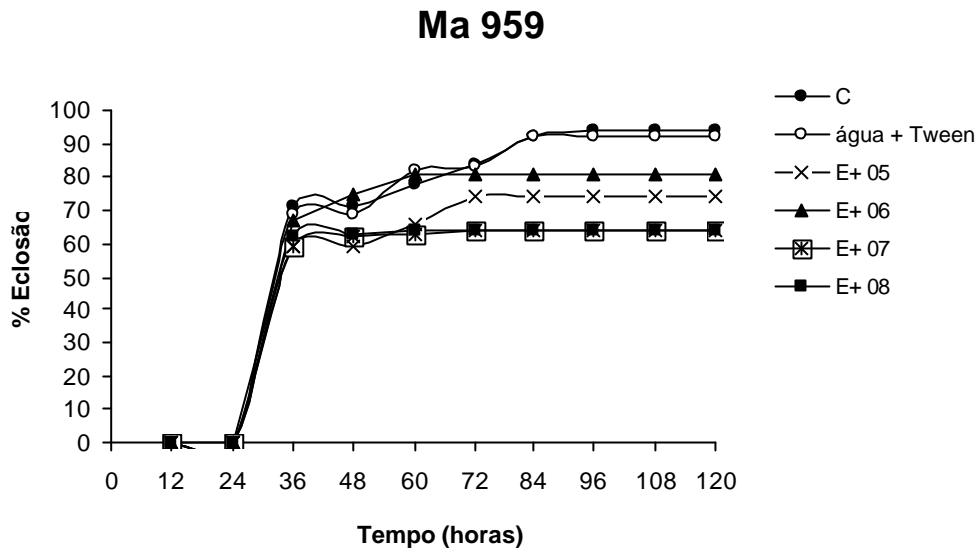


Figura 4. Tempo (horas) do percentual de eclosão das larvas de *Ctenocephalides felis felis*, após o tratamento com as diferentes concentrações do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado Ma 959.

4.1.3. Mortalidade das larvas oriundas dos bioensaios com ovos de *Ctenocephalides felis felis*.

A avaliação do percentual de mortalidade das larvas oriundas dos ovos tratados não foi possível ser analisada, devido ao elevado número de larvas mortas nos grupos controles. Essa mortalidade pode ser atribuída ao fato de não ter sido ofertado alimentação artificial as larvas após a eclosão.

Pode-se associar como fator de interferência na visualização dos espécimes a coloração esbranquiçada das larvas associadas à turbidez do tubo de ensaio, devido os resíduos das suspensões. Um outro fator que dificultou a visualização foi o ressecamento das larvas. Também pode-se levar em consideração as características morfológicas das larvas, segundo Pereira et al. (1998), as larvas de *C. felis felis*, assim que eclodem, são quase translúcidas e muito pequenas (2-5mm).

4.1.4. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas nos bioensaios com ovos de *Ctenocephalides felis felis* tratados com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Para efetuar o cálculo das concentrações letais (CL 50 e 90) o grupo controle negativo foi o selecionado. Como pode ser verificado na tabela 3, após o cálculo da CL para inibir 50 e 90% da população de *C. felis felis*, observou-se que o fungo *M. anisopliae* isolado Ma E9 apresentou CL 50 mais baixa que todos os isolados testados, sendo a mesma de $5,31 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹. Porém, a CL 90 mais baixa foi obtida com o fungo *B. bassiana*. O isolado Bb 747 apresentou a CL 90 de $2,42 \times 10^{10}$ conídios.mL⁻¹

Tabela 3. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas em ovos de *Ctenocephalides felis felis*, tratados com os isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

ISOLADOS	ECLOSÃO DAS LARVAS	
	CL 50 ¹	CL 90 ¹
Ma E9	5,31 x 10 ³	1,15 x 10 ¹⁰
Ma 959	7,43 x 10 ¹⁰	5,25 x 10 ¹¹
Bb 747	6,34 x 10 ⁸	2,42 x 10 ¹⁰
Bb 986	9,65 x 10 ⁸	6,33 x 10 ¹⁰

¹ Concentrações em conídios.mL⁻¹

4.1.5. Bioensaios com adultos de *Ctenocephalides felis felis* e o fungo *Beauveria bassiana*.

Os resultados dos bioensaios realizados com adultos de *C. felis felis* mostraram que este estágio também foi susceptível ao tratamento por imersão com os fungos entomopatogênicos avaliados (Tabela 4).

Os percentuais de mortalidade dos adultos observados para o isolado Bb 986, demonstraram, já na primeira observação, com 12 horas após o tratamento, diferenças significativas para os grupos tratados com a concentração 10⁸ conídios.mL⁻¹, com 36 horas após o tratamento, observou-se que os grupos tratados com as concentrações fúngicas 10⁶, 10⁷ e 10⁸ conídios.mL⁻¹, já apresentavam 100% de mortalidade e diferenças altamente significativas, quando comparadas com os grupos controle e 10⁵.

Tabela 4. Percentual de adultos de *Ctenocephalides felis felis* mortos em diferentes horários após tratamento com diferentes concentrações dos isolados Bb 747 e Bb 986 do fungo *Beauveria bassiana* (Bb), mantidos sob temperatura de 25 ± 1 °C = 75% UR.

Trat. Horas	Bb 747						Bb 986					
	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
12	2 ^a	22 ^a	14 ^a	16 ^a	8 ^a	14 ^a	0 ^a	6 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	36 ^b
24	6 ^a	32 ^a	18 ^a	18 ^a	10 ^a	32 ^a	4 ^a	6 ^a	22 ^a	4 ^a	76 ^b	70 ^b
36	8 ^a	36 ^a	20 ^a	20 ^b	34 ^{ab}	74 ^b	20 ^a	10 ^a	80 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
48	14 ^a	38 ^a	26 ^a	34 ^b	76 ^{ab}	96 ^b	32 ^a	20 ^a	90 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
60	16 ^a	42 ^a	28 ^a	44 ^{ab}	86 ^{ab}	100 ^b	36 ^a	22 ^a	98 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
72	26 ^a	46 ^a	38 ^a	80 ^{ab}	98 ^b	100 ^b	40 ^a	26 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
84	38 ^a	50 ^a	54 ^a	92 ^{ab}	98 ^b	100 ^b	48 ^a	28 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
96	54 ^a	62 ^a	82 ^a	98 ^b	100 ^b	100 ^b	52 ^a	28 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
108	68 ^a	78 ^a	84 ^a	98 ^b	100 ^b	100 ^b	56 ^a	30 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
120	68 ^a	90 ^a	92 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	58 ^a	36 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b

Médias seguidas de mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Dunn's.

Com 60 horas após a infecção das pulgas, com isolado Bb 747, observou-se que os grupos tratados com a concentração fúngica 10^8 conídios.mL⁻¹, já apresentavam morte de todos os espécimes utilizados no experimento. Situação semelhante foi observada em todos os tratamentos que receberam fungo em sua composição, a partir de 60 horas da infecção com o isolado Bb 986. Esses dados confirmam, as afirmações de vários autores sobre o efeito nocivo do fungo *B. bassiana* sobre as diferentes espécies de insetos. Segundo Alves (1998), a penetração tegumentar do fungo *B. bassiana*, ocorre devido a uma ação mecânica e química (enzimática), que leva aproximadamente 12 horas e decorridas 72 h da inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado.

O tempo para colonização pode variar de 72 a 120 horas, dependendo do inseto, patógeno e das condições ambientais. O mesmo autor cita que a morte do inseto pode ocorrer depois de dois a oito dias da inoculação, devido a produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento vegetativo e outros danos físicos, em decorrência do crescimento do micélio e do início da esporulação do fungo. No presente trabalho observou-se que a morte do inseto ocorre antes de dois dias após a inoculação, talvez esse fato tenha ocorrido pela diferente espécie em avaliação ou da cepa fúngica utilizada.

4.1.6. Bioensaios com adultos de *Ctenocephalides felis felis* e o fungo *Metarhizium anisopliae*.

Na tabela 5, observou-se que os grupos tratados com o isolado Ma E9, nas concentrações 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹, apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) 24 horas após o tratamento quando comparadas com os outros grupos. Com 60 horas após o tratamento, verificou-se que todos os grupos tratados com as suspensões fúngicas já apresentavam diferenças significativas, ao serem comparadas aos grupos controles.

Com 120 horas após a infecção, pôde-se observar que todos os espécimes infectados com as diferentes suspensões conidiais haviam morrido.

Notou-se para o isolado Ma 959, já na primeira observação, com 12 horas da infecção fúngica, que a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, apresentou diferenças significativas e com 36h após o tratamento, as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹, já apresentavam diferenças significativas, quando comparadas aos controles. A partir de 72 horas da infecção fúngica, todos os grupos tratados com o entomopatógeno apresentaram diferenças significativas e as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹ apresentavam 100% de mortalidade.

Diversos autores já avaliaram o fungo *M. anisopliae* e seus isolados sobre diferentes espécies de insetos e artrópodes de importância médica veterinária e constataram o seu potencial patogênico sobre os diversos ínstares. Segundo Albuquerque et al. (2005), o uso de fungos entomopatogênicos no controle de insetos tem sido objeto de pesquisas importantes com a finalidade de melhor preservar o meio ambiente.

Observou-se que para os dois isolados de *M. anisopliae* testados, o maior percentual de mortalidade foi registrado quando se utilizou a concentração fúngica mais elevada. Os resultados obtidos demonstraram que esse fungo apresenta potencial patogênico para ser empregado em programas de controle integrado sobre *C. felis felis*.

Tabela 5. Percentual de adultos de *Ctenocephalides felis felis* mortos em diferentes horários após tratamento com diferentes concentrações dos isolados Ma E9 e Ma 959 do fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma), mantidos sob temperatura de 25 ± 1 °C = 75% UR.

Trat. Horas	Ma E9						Ma 959					
	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	C	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
12	2 ^a	22 ^a	22 ^a	22 ^a	22 ^a	24 ^a	0 ^a	6 ^{ab}	12 ^{ab}	12 ^{ab}	8 ^{ab}	34 ^b
24	4 ^a	30 ^a	36 ^a	24 ^a	46 ^b	46 ^b	4 ^a	6 ^a	16 ^a	22 ^a	24 ^a	64 ^b
36	8 ^a	36 ^a	50 ^a	64 ^b	92 ^b	96 ^b	20 ^a	10 ^a	26 ^{ab}	66 ^{bc}	72 ^{bc}	80 ^c
48	14 ^a	38 ^a	74 ^b	88 ^b	98 ^b	100 ^b	30 ^a	26 ^a	54 ^a	94 ^{ab}	100 ^b	100 ^b
60	16 ^a	42 ^a	84 ^b	94 ^b	98 ^b	100 ^b	32 ^a	26 ^a	80 ^{ab}	100 ^b	100 ^b	100 ^b
72	26 ^a	46 ^a	92 ^b	96 ^b	100 ^b	100 ^b	40 ^a	26 ^a	94 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
84	38 ^a	50 ^a	96 ^b	98 ^b	100 ^b	100 ^b	48 ^a	28 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
96	54 ^a	62 ^a	98 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	54 ^a	28 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
108	58 ^a	78 ^a	98 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	56 ^a	30 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b
120	68 ^a	90 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	58 ^a	36 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b

Médias seguidas de mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Dunn's.

4.1.7. Avaliação do Tempo Médio de Mortalidade observado para adultos tratados com *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

O tempo médio de mortalidade tem por objetivo identificar o tempo necessário que uma determinada dose necessita para matar certo número de insetos. Assim, o organismo que está sendo testado é o inseto, o estímulo é a dose do patógeno e os resultados são as respostas quantitativas binárias, representadas pelo tempo em que ocorre a morte dos indivíduos tratados. O conhecimento do tempo de letalidade é muito importante, pois conduz a conclusões a respeito da potência dos patógenos, da sensibilidade dos insetos a doenças e até mesmo sobre previsões de controle de pragas através de inseticidas microbianos. A estimativa do tempo médio de mortalidade associada a outras informações como, por exemplo, à produção massal e produção de propágulos sobre o hospedeiro, deve ser também considerada na seleção de um isolado (HADDAD, 1998).

Observa-se na tabela 6, que o tempo médio de mortalidade para matar 200 pulgas, com as diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae*, isolado Ma E9, apresentou para as concentrações 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹ um tempo médio de

mortalidade de 39,6h e 38,4h, respectivamente. Ao analisar-se os grupos controles, verificou-se que somente após 134,4h (cinco dias) houve a mortalidade de todos os espécimes. Já para o isolado Ma 959 o tempo médio de mortalidade foi de 36h (1,6 dias) após a infecção.

Tabela 6. Tempo médio letal, em horas e em dias, observado em adultos de *Ctenocephalides felis felis*, tratados com os isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

	Controle	Água + Tween	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Ma E9	176,4h (7,35 dias)	134,4h. (5,6 dias)	69,6h . (2,9 dias)	58,8h. (2,45 dias)	39,6h. (1,65 dias)	38,4h . (1,6 dias)
Ma 959	160,8h. (6,7 dias)	184,8h (7,7 dias)	68,4h (2,85 dias)	46,8h (1,95 dias)	42,0h. (1,75 dias)	36,0h . (1,5 dias)
Bb 747	176,4h (7,35 dias)	134,4h. (5,6 dias)	114h. (4,75 dias)	82,8h (3,45 dias)	64,8h. (2,7 dias)	46,8h. (1,95 dias)
Bb 986	160,8h. (6,7 dias)	184,8h. (7,7 dias)	45,6h. (1,9 dias)	36,0h . (1,5 dias)	31,2h. (1,3 dias)	32,4h. (1,35 dias)

Para o fungo *B. bassiana*, destacou-se o isolado Bb 986 na concentração 10⁸ conídios.mL⁻¹ 32,4 h após a infecção fúngica. O isolado 747 apresentou os maiores tempos médios de mortalidade para todas as concentrações avaliadas, quando comparado a outro isolado de *B. bassiana* e aos dois isolados de *M. anisopliae*.

Quando se comparou-se o tempo médio de mortalidade dos diferentes tratamentos que receberam fungo em sua composição, entre as duas espécies fúngicas testadas, percebeu-se que o isolado 959 de *M. anisopliae* e o isolado 986 de *B. bassiana* causaram um efeito deletério sobre os adultos da pulga em menor tempo, podendo associar a diferença entre os tempos de letalidade à virulência do isolado fúngico.

4.1.8. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas nos bioensaios com adultos de *Ctenocephalides felis felis* tratados com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Na análise de próbites realizada com os dados referentes ao percentual de mortalidade de adultos de *C. felis felis*, o grupo controle negativo foi o selecionado para efetuar o cálculo das concentrações letais (CL 50 e 90). Verificou-se na tabela 7, que os valores obtidos com a utilização do isolado Bb 986, apresentou, CL 50 e CL 90, mais baixas que todos os isolados testados, apresentando os valores de 7,39 x 10⁴ e 4,58 x 10⁶ conídios.mL⁻¹, respectivamente.

Ao verificar-se os valores obtidos com a utilização do fungo *M. anisopliae*, para promover a mortalidade dos adultos de *C. felis felis* encontrou-se a menor concentração de 1,94 x 10⁶ conídios.mL⁻¹ para o isolado Ma E9. Esse isolado, também apresentou a menor concentração necessária para inibir a eclosão das larvas oriundas de ovos tratados de *C. felis felis*, demonstrando a ação eficaz desse isolado sobre adultos e larvas.

Tabela 7. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), em adultos de *Ctenocephalides felis felis*, tratados com os isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb) e avaliados 36 horas após o tratamento.

ISOLADOS	MORTALIDADE DE ADULTOS	
	CL50 ¹	CL90 ¹
Ma E9	1,94 x 10 ⁰	1,72 x 10 ⁸
Ma 959	2,87 x 10 ¹	4,19 x 10 ⁹
Bb 747	2,94 x 10 ⁸	4,04 x 10 ¹⁰
Bb 986	7,39 x 10 ⁴	4,58 x 10 ⁰

¹ Concentrações em conídios.mL⁻¹

4.2. Microscopia de Varredura em adultos de *Ctenocephalides felis felis*

Ao se estudar as eletromicrografias observou-se que com 2 horas após a infecção fúngica, os conídios estavam aderidos por toda a cutícula (Figura 1-A e B). Para avaliar o mecanismo de infecção da mesma espécie fúngica utilizada no presente trabalho, Garcia et al. (2004) infectaram fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. sanguineus* com o isolado Ma E9 e constataram, através da microscopia eletrônica de varredura, a aderência de grande quantidade de conídios sobre a cutícula dos carrapatos uma hora após a infecção. Esse processo de adesão depende das enzimas esterases e proteases, que ocorrem na superfície dos conídios não germinados que alteram a superfície do tegumento do inseto, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo, (WANG; St. LEGER, 2005).

Observou-se que com 15 horas após a infecção, para ambos os fungos utilizados nesse experimento, que houve a formação de tubos de germinação e de hifas sobre a cutícula da pulga, demonstrados na Figura 1 (C e D). Wraight et al. (1990) ao estudarem o processo de germinação de *Erynia radicans* sobre ninfas de *Empoasca fabae* observaram que o percentual de germinação não diferiu entre as regiões da cabeça, do tórax e do abdome, mas a porcentagem de conídios que deram origem a penetração era de 5% depois de 10-12 h e 20% depois de 48 h. Segundo St. Leger (1991), na presença de nutrientes e níveis ideais de umidade, o fungo *M. anisopliae* forma tubos germinativos na superfície cuticular do hospedeiro, formando um apressório e logo após forma um grampo de penetração onde enzimaticamente penetra na epicutícula, estabelecendo uma relação nutricional com o hospedeiro. Também Bittencourt et al. (1999), através da microscopia eletrônica de varredura, demonstraram que a espécie fúngica *M. anisopliae*, isolado Ma 959, foi capaz de aderir, germinar e formar o apressório sobre a cutícula do carrapato *B. microplus*. No presente trabalho, não foi possível a observação do apressório e do grampo de penetração, no entanto, o fato do fungo desenvolver-se até a formação de colônia, sugere que todas as etapas tenham sido realizadas pelo fungo.

O engrossamento e as ramificações das hifas de ambos os fungos foram analisadas 24 horas após a infecção. Foi observado um maior número de hifas nas membranas intersegmentais do abdome da pulga, sugerindo que essa região seria o local de predileção para a penetração do fungo, como ilustrada na Figura 1 (E e F). Alguns autores citam que as membranas intersegmentais do abdome são mais comumente acometidas pelos fungos, porém espiráculos respiratórios, aparelho bucal, ânus e tarsos, também são locais de penetração fúngica (WRAIGHT et al.,1990, St. LEGER, 1991, ALVES, 1998).

De forma geral, cada grupo de patógeno possui um mecanismo específico para penetração. Tanto bactérias como os vírus, que predominam as inoculações via oral, têm

como barreira o micro-habitat intestinal, representado por reações enzimáticas e pH que se constituem em fator supressivo desse patógeno, (ALVES e LECUONA, 1998). Ainda, segundo afirmação de Alves (1998), a penetração normal dos fungos é via tegumento através de atividade enzimática ou pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório. Na penetração o patógeno necessita ultrapassar a barreira físico-química do tegumento, que varia de inseto para inseto e até dentro da mesma espécie.

Após 96 horas da infecção fúngica, observou-se na Figura 1 (G e H), o crescimento micelial, com a formação de colônia e a conidiogênese do fungo sobre a cutícula de *C. felis felis*. O desenvolvimento dos isolados fúngicos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* demonstram o potencial patogênico desses isolados para promoverem o controle deste inseto, em ensaios *in vitro*.

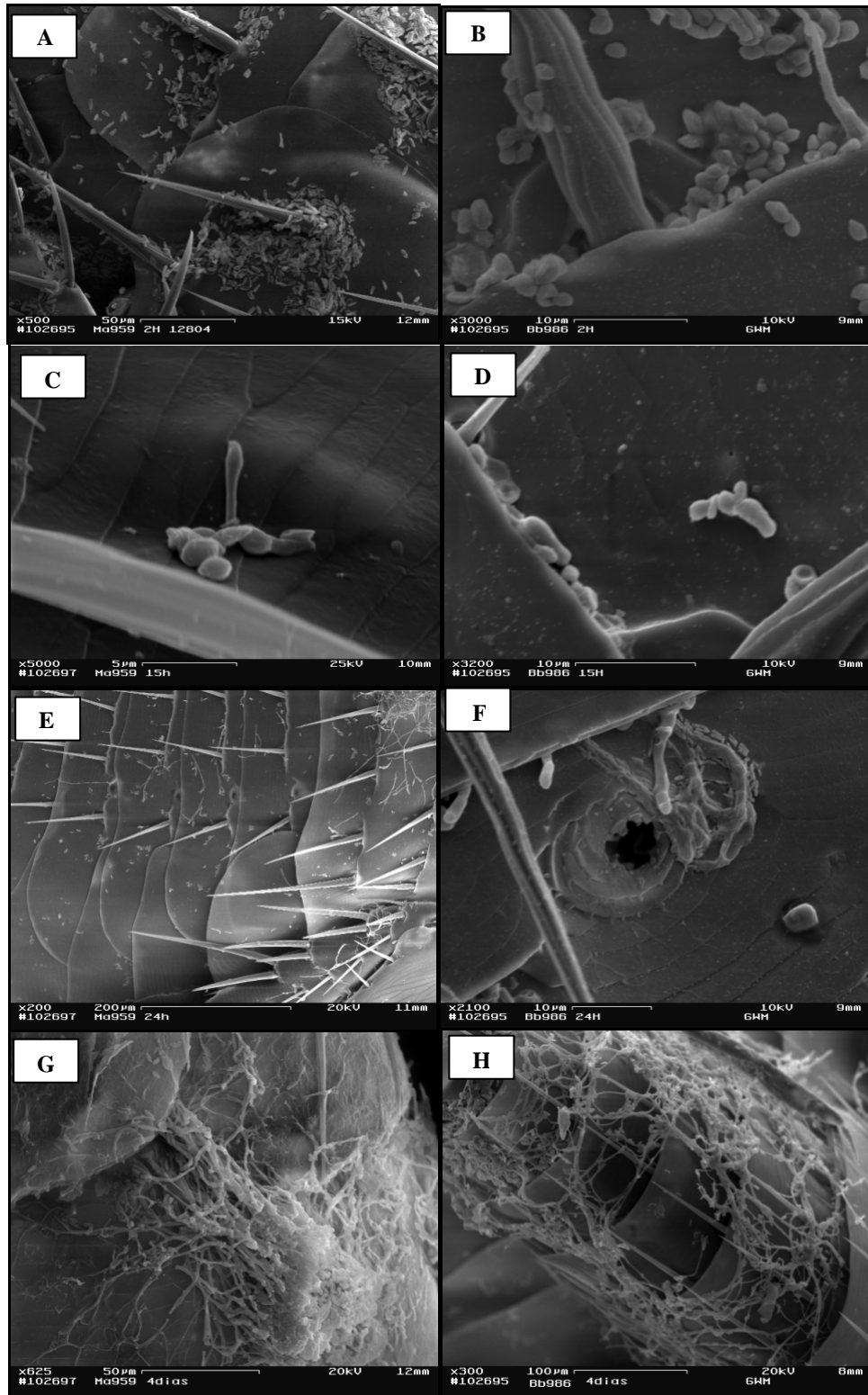


Figura 5. Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, demonstrando o desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* Ma 959 (A, C, E e G) e do fungo *Beauveria bassiana* Bb 986 (B, D, F e H) sobre a cutícula da pulga *Ctenocephalides felis felis*. (A e B) duas horas após infecção fúngica, demonstrando a adesão dos conídios à cutícula; (C e D) germinação dos conídios, 15h após a infecção; (E e F) Crescimento e ramificação das hifas, após 24h do tratamento; (G e H) crescimento micelial, com a formação de colônia e conidiogênese.

4.3. Considerações Gerais

Neste experimento foi verificado que a pulga do gato é suscetível tanto ao *M. anisopliae* como a *B. bassiana*, porém pesquisas visando à seleção de isolados mais virulentos devem ser desenvolvidas e a sua forma de utilização, já que esse é o primeiro trabalho que foi realizado utilizando fungos entomopatogênicos visando o controle de *C. felis felis*.

A patogenicidade verificada neste experimento dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre as fases de ovos e adultos de *C. felis felis* e também a evidência de diferentes fases do desenvolvimento do fungo sobre a cutícula da pulga, possibilitam afirmar que a ação dos fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico contra a pulga do gato é de grande potencial para sua utilização como um método alternativo de controle. Levando-se em consideração que a metodologia utilizada neste experimento foi adaptada de bioensaios utilizando fungos entomopatogênicos em carrapatos, novas metodologias para avaliar a patogenicidade destes agentes sobre pulgas e também o desenvolvimento de novas tecnologias para a aplicação de produtos biológicos, ainda devem ser estudados com o intuito de contribuir no controle desse inseto e diminuir o risco de transmissão de doenças a seus hospedeiros. Portanto recomenda-se o prosseguimento dos estudos para o desenvolvimento de novos métodos para a sua utilização no controle integrado desse parasito.

5. CONCLUSÕES

- Os isolados Bb986 e Bb747 de *B. bassiana*, Ma959 e MaE9 de *M. anisopliae* são patogênicos para *C. felis felis*, inibindo a eclosão das larvas e causando morte aos adultos.
- O isolado Bb747 do fungo *B. bassiana* apresentou a menor concentração de conídios.mL⁻¹ capaz de inibir 90% de eclosão das larvas.
- O isolado Bb986 do fungo *B. bassiana* apresentou a menor concentração de conídios.mL⁻¹ capaz de causar 90% de mortalidade dos adultos.
- O isolado 959 de *M. anisopliae* e o isolado 986 de *B. bassiana* demonstraram ter um maior efeito deletério sobre os adultos, pois o tempo médio de mortalidade verificado para eles foi menor que para os demais.
- Após observação das micrografias, verificou-se que os isolados testados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* completam seu ciclo sobre a cutícula da pulga *C. felis felis*.
- Os conídios de ambos os fungos estudados estavam aderidos à cutícula 2 horas após a infecção, apresentaram germinação 15 horas após infecção e 96 horas após infecção, verificou-se a conidiogênese dos fungos sobre a cutícula de *C. felis felis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A.C., PEREIRA, K.C.A., CUNHA, F. M. *et al.* Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* on *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology**, July/Aug. 2005, v.34, n.4, p.585-591. ISSN 1519-566X.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, S. B.; LEUCONA Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. *In*: ALVES, S.B. (Coord.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 5, p. 765-777.

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano. *In*: ALVES, S.B. (Coord.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 23, p. 765-777.

ARAÚJO, F. R., et al. Severe cat flea infestation of dairy calves in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 83-86, 1998.

AZAD, A. F.; BERD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, 1998.

BEARD, C. B.; BUTLER, J. F.; HALL, D. W. Prevalence and biology of endosymbionts of fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from dogs and cats in Alachua County, Florida. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 6, p. 1050-1061, 1990.

BENINTENDE, G. B.; SAUKA, D. H.; COZZI, J. G. Formulacion sólida de *Bacillus thuringiensis* de alta eficacia. Palestra e Mesa Redonda. Recife/Pe. *In* **9º. Simpósio de Controle Biológico**. Anais...p. 46, 2005.

BERGH, K.; BEVANGER, L.; HANSSSEN, I. E.; LOSETH, K. Low prevalence of *Bartonella henselae* infections in Norwegian domestic and feral cats. **APMIS**, v. 110, p. 309-314, 2002.

BITTENCOURT, V. R. E. P., MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida. v. 16, p. 39-45, 1994.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus*, em condições experimentais. **Revista Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 351-354, 1999.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A. F. & VIEGAS. Isolamento e produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, a

partir de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida**, 17: 55-60. 1995 b

BITTENCOUT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. de. Dinâmica da infecção do carrapato *Boophilus microplus* pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Revista Universidade Rural, Série. Ciência da Vida**. v. 17, p. 83-88, 1995a.

BOSSARD, R. L.; HINKLE, N. C.; RUST, M. K. Review of insecticide resistance in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 415-422, 1998.

BRYON, D.W. **Aspects of the biology, behavior, and control of immature stages of the cat flea *Ctenocephalides felis felis* (Bouché) in the domiciliary environment**. 1987. 135f. Ph.D. Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, In DRYDEN, M. W.; RUST, M. K. The cat flea: biology, ecology and control. **Veterinary Parasitology**. v. 52, p. 1-19, 1994.

BURG, I. C.; MAYER, P. H. **Alternativas Ecológicas para Prevenção e Controle de Pragas e Doenças**. 7. ed. Francisco Beltrão: Grafit, p. 153, 1999.

CARLOTTI, D. N.; JACOBS, D. E. Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, v. 11, p. 83, 2000.

CERQUEIRA, E. J. L.; LINARDI, P. M.; Infecção Natural de *Polygenis Tripus* (Jordan, 1933)(Siphonaptera, Rhopalopsyllidae) Pelo *Rhyzoglyphus Echinopus* (Fumouze ; Robin, 1868)(Acarina, Sarcoptiformes). **Natura UFBA**, v. 76, n. 2, p. 153-157, 1976.

CERQUEIRA, E. J. L.; SILVA, E. M.; MONTE-ALEGRE, A. F.; SHERLOCK, I. A. Considerações sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa *Cercocyon thous* (Canidae) da área endêmica de leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Comunicação, v. 33, n. 1, p. 91-93, 2000.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science Technology**, v. 10, p. 357-384, 2000.

CHOMEL, B. B.; et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by cat flea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 1952-1956, 1986.

DRYDEN, M. W.; BROCE, A. B. Development of trap for collecting newly emerged *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera:Pulicidae) in homes. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 5, p. 901-906, 1993.

DRYDEN, M. W.; PAYNE, P. A.; SMITH, V. Evaluation of the CatanDog's® tag to prevent flea infestations, inhibit flea reproduction or repel existing flea infestations on cats. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 303-308, 2000.

DRYDEN, M. W.; PEREZ, H. R.; ULITCHNY, D. M. Efficacy of imidacloprid against *Ctenocephalides felis* in dogs and cats under field conditions. In **Proceedings of the Bayer International Flea Control Symposium 1**. Birmingham. p. 5-10. 1997.

DRYDEN, M. W.; RUST, M. K. The cat flea: biology, ecology and control. **Veterinary Parasitology**, v. 52, p. 1-19, 1994.

DRYDEN, M.W. Management of flea infestations. In **Proceedings of Congress of The World Veterinary Association**, 25. Yokohama. p. 308-313, 1995.

DURDEN L. A. et al. Fleas parasitizing domestic dogs in Georgia, USA: Species composition and seasonal abundance **Veterinary Parasitology**. Março. p.1-6, 2005. www.elsevier.com/locate/vetpar www.sciencedirect.com

ECKSTEINR. A.; HART, B. L. Grooming and control of fleas in cats. **Applied Animal Behavior Science**, v. 68, n. 2, p. 141-150, 2000.

EL-GAZAR, L. M.; KOEHLER, P. G.; PATTERSON, R. S.; MILLO, J. Insect growth regulators' mode of action on the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 625-628, 1998.

FOIL, L., et al. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) faces. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 625-628, 1998.

FOX, I. ; GARCIA-MOLL, I. Ants attacking fleas in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1067-1066, 1961.

FOX, I.; BAYONA, I. G. *Alphitobius laevigatus*, a predator on flea larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 61, n. 3, p. 877, 1968.

FREIMOSER, F. M.; G. HU; R. J. St. LEGER. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticle or nutrient deprivation *in vitro*. **Microbiology**, v.151, p. 361-371, 2005.

GALVÃO, M. A. M., et al. Clinical and laboratorial evidence of Rickettsia felis infections in Latina América. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 238-240, 2004.

GARCIA, M. V. et al. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**. v. 34, n. 5, p. 1513-1518. 2004.

GORTEL, K. Advances in topical and systemic therapy for flea control in dogs. **Canine Pract**, v. 22, n. 2-3, p. 16-21. 1993.

HADDAD, M. L. Utilização do Polo-PC para a análise de Probit. In: ALVES, S.B. (Coord.) **Controle Microbiano de Insetos**, 2. ed. Piracicaba: FEALQ, cap. 34, p. 999-1012. 1998.

HINKLE, N. C.; KOEHLER, P. G. E.; PATTERSON, R. S. Host grooming efficiency for regulation of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) populations. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 3, p. 266-269, 1998.

HINKLE, N. C.; RUST, M. K.; REIERSON, D. A. Biorational approaches to flea (Siphonaptera:Pulicidae) suppression: Present and future. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 14, n. 3, p. 309-321, 1997.

- HOGSETT, J. A. Management of ectoparasites with biological control. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 147-151, 1999.
- HSU, M. H.; HSU, Y. C.; WU, W. J. Consumption of flea faeces and eggs by larvae of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.16, p.445-447, 2002.
- JOSEPH, S. A. Studies on the bionomics of the *Ctenocephalides felis orientis* (Jordan) 1925. **Cheiron**, v. 10, p. 275-280, 1981.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 15-20, 1996.
- KERN, W. H.; RICHMAN, D. L.; KOEHLER, P. G.; BRENNER, R. J. Outdoor survival and development of immature cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in Florida. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 207-211. 1999.
- KOZLOV, M. P.; CHUMAKOVA, I. V.; BELOKOPYTOVA, A. M. Effect of nematoda *Aphanitylenchus* sp. on the reproductive capacity of fleas *Ceratophyllus consimilis*. **Parazitologia**. v. 19, n. 5, p. 407-409, 1985.
- LEITE, L. G.; et al. Produção in vitro de nematóides entomopatogênicos: Pesquisa e desenvolvimento. Recife/Pe. In Palestra. **9º. Simpósio de Controle Biológico**. Anais...p.57, 2005.
- LIMA, A. C. Suctoria. In **Insetos do Brasil**. Escola Nacional de Agronomia. Série Didática v. 4, n. 6, p. 17-71, 1943.
- LINARDI, P. M.; DE MARIA, M. E.; BOTELHO, J. R. Effects of larval nutrition on the postembryonic development of the *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 497-7. 1997.
- LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Siphonapteros do Brasil**. São Paulo, Museu de Zoologia, USP/FAPESP. 2000, 291p.
- LINARDI, P. M.; NAGEM, R. L. Observações sobre o ciclo evolutivo de *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae) e sua sobrevivência fora do hospedeiro. **Boletim do Museu de História Natural**, UFMG – Zoologia, v. 13, p. 1-21, 1972.
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. Simple method of fitting dose effect curve. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**,v. 95:p. 99-113, 1949.
- MACIEJEWSKA, J.; CHAMBERLAIN, W. F.; TEMEYER, K. B. Toxic and morphological effects of *Bacillus thuringiensis* preparations on larval stages on the oriental rat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 81, n. 16, p. 1656-1661, 1988.

MELO, D. R. **Ação *in vitro* de dois isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (MaE9 e Ma319) sobre a fase não parasitária do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 71p. 2002.

MEOLA, R. W.; DEAN, S. R.; BRASKARAN, G. Effects of juvenile hormone on eggs and adults of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 85-92, 2001.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Ed.: Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, v. 3, 2000, p. 163-200.

MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E. ; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 461-466, 1998.

OSBRINK, W. L. A.; RUST, M. K.; REIERSON, D. A. Distribution and control of cat flea in homes in Southern California (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 1, p. 135-140, 1986.

PEREIRA, M. C.; SANTOS, P. A. *Ctenocephalides felis felis* : biologia, ecologia e controle integrado. **Clínica Veterinária**, v. 16, p. 34-38 1998.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan, 11 ed. Rio de Janeiro. 1988. p. 691-706.

ROBERTS, D.W.; HUMBER, R.A. Entomogenous fungi. In: Cole, G.T., Kendrick, B. (Eds.) **Biology of conidial fungi**. Academic Press, New York, v. 2., p. 201-236, 1981.

REIS, R. C. S., MELO, D. R., SOUZA, E. J. et al. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.544-547, 2001.

SANTOS, H. D. **Período de desenvolvimento dos estágios imaturos de *Ctenocephalis felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera:Pulicidae) mantidos em condições controladas e no ambiente**. 2000. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ.

SHIPSTONE, M.A.; KENNETH, V. M. The use of insect development inhibitors as an oral medication for the control of the fleas *Ctenocephalides felis*. and *Ctenocephalides canis* in the dog and cat. **Veterinary Dermatology**, v. 6, p. 131-137, 1995.

SILVERMAM, J.; APPEL, A. G. The pupal cocoon of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Bouché) (Siphonaptera:Pulicidae) a barrier to ant predation. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 86, p. 660-663, 1984.

SILVERMAM, J.; PLATZER, E. G.; RUST, M. K. Infection of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Bouché) by *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. **Journal of Nematology**, v. 14, n. 3, p. 394-397, 1982.

- SILVERMAM, J.; RUST, M. K.; REIERSON, D. Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera:Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 18, n. 1, p. 78-83, 1981.
- SLOWIK, T. J.; LANE, R. S.; DAVIS, R. M. Field trial of systemically delivered arthropod development-inhibitor (Fluazuron) used to control woodrat fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae) and ticks (Acari:Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 75-84, 2001.
- SOUZA, E.J., REIS, R.C.S., BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação do efeito *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre ovos e larvas de *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.8, p.127-132, 1999.
- St LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Penetration Events during Infection of Host Cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168-170, 1991.
- St. LEGER R. J.; JUDD O. N.; STEVEN E. S The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity **Microbiology**, v. 145, p. 2691-2699, 1999.
- St. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 253, p. 221-232, 1987.
- STANNECK, D.; LARSEN, K. S.; MENCKE, N. An evaluation of the effects of pyriproxyfen on eggs and adults of the cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae), **Irish Veterinary Journal**, v. 55, n. 8, p. 383-387, 2002.
- STENDEL, W. The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. **Journal South Africa Vet. Assoc.**, 51: 147-152. 1980.
- THIEMANN, T.; FIELDEN L. J.; KELRICK, M. I. Water uptake in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Pulicidae: Siphonaptera). **Journal of Insect Physiology**. v. 49, n. 12, p. 1085-1092, 2003.
- TORRADO, J. M. G & GUTHIERREZ, R. O. Metodo para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata. Evolucion de sensibilidad. **Rev Inst. Agr. Patol.** 135-158. 1969.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Ed. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v. 1, p. 201-230, 1998.
- VOBIS, M.; HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. The feline Leukemia Virus (FeLV) and the cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Parasitology Research**, v. 90, p. 132-134, 2003.
- WANG, C; St. LEGER, R. J. Developmental and Transcriptional Responses to Host and Nonhost Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 5, p. 937-947, 2005.

WRAIGHT, S. P. et al. Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 56, p. 157-174. 1990.

YERUHAM, I.; ROSEN, S.; BRAVERMAN Y. *Ctenocephalides felis felis* flea infestation in horses. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 341-343, 1996.

ZENTKO, D. C.; E RICHMAN, D. L. **Cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché)**. EENY-011, serie: Entomology and Nematology Department, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL 32611. Original publication date July 1997. Reviewed May 2003. Visit the EDIS Web Site at <http://edis.ifas.ufl.edu>.