

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

TESE

***Beauveria bassiana* no controle biológico de estágios
imatuross de *Stomoxys calcitrans*.**

Ana Paula Rodrigues Moraes Badini

2011



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

Beauveria bassiana no controle biológico de estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*.

ANA PAULA RODRIGUES MORAES BADINI

Sob a Orientação do Professor

Avelino José Bittencourt

Sob a Co-orientação da Professora

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

595.774

B136b

T

Badini, Ana Paula Rodrigues Moraes, 1976-.
Beauveria bassiana no controle biológico
de estágios imaturos de Stomoxys calcitrans
/ Ana Paula Rodrigues Moraes Badini - 2011.
81 f.

Orientador: Avelino José Bittencourt.

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

Bibliografia: p. 66-81.

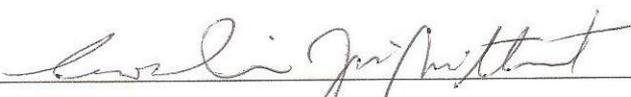
1. Mosca de estábulo - Teses. 2. Mosca
de estábulo - Controle biológico - Teses.
I. Bittencourt, Avelino José, 1961-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

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

ANA PAULA RODRIGUES MORAES BADINI

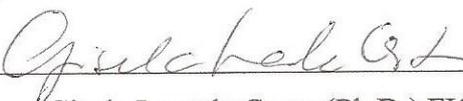
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 02/03/2011.


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


Cristiane Martins Cardoso de Salles (Ph.D.) UFRRJ


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


Gisela Lara da Costa (Ph.D.) FIOCRUZ


Rubens Pinto de Mello (Ph.D.) FIOCRUZ

*“O mundo é fascinante demais para ficarmos
sem perguntas.”*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos mais difíceis e por sempre me dar força para continuar. Aos professores *Avelino José Bittencourt* e *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* pela orientação e amizade oferecida, o que resultou em meu crescimento como profissional. Aos professores, técnicos e funcionários do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelo apoio fornecido para a realização do projeto. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. A professora *Glória Maria Direito* que me recebeu com muita atenção para a realização dos perfis cromatográficos no Laboratório de Micotoxinas da UFRRJ. A professora *Cristiane Martins Cardoso de Salles* por todo apoio e orientação dada para a realização e compreensão dos perfis cromatográficos, protéico e proteolítico. A *Geraldo Baeta* (EMBRAPA – Agrobiologia) pelo apoio técnico para a realização da microscopia eletrônica de varredura e por sua simpatia sempre existente em todos momentos que fui pedir auxílio. A *Ingrid Annes Pereira* e *Miliane Moreira Soares de Souza* pelo auxílio no processo de identificação bacteriana (Laboratório de Bacteriologia Veterinária/UFRRJ). A *Sandy Sampaio Videira* e *Aline Macedo* (EMBRAPA – Agrobiologia) pela atenção e dedicação dada para realização da identificação bacteriana. Aos técnicos *Thaís Siqueira Marques* e *Geneval Luciano Batista* (IOC/FIOCRUZ) pelo apoio na realização da microscopia eletrônica de varredura. Aos técnicos *Vanessa Alvaro Diniz* e *Romulo Custódio dos Santos* e a pesquisadora *Suzana Côrte-Real Faria* pela simpatia, dedicação e extrema atenção dada para a realização e conclusão da MEV. Agradeço também a Dra. Suzana pela oportunidade para a utilização do microscópio eletrônico de varredura (IOC/FIOCRUZ). As minhas queridas amigas *Isabele da Costa Angelo*, *Patrícia Silva Gôlo* e *Mariana Guedes Camargo*, obrigada pelas horas vividas no laboratório e no Biomol. Obrigada por vocês terem ajudado em todos os momentos difíceis sejam nos experimentais ou pessoais. Obrigada por vocês estarem sempre prontas a me ajudar, independente da hora e do dia, meus anjos! A *Huarrison Azevedo dos Santos* pela amizade e apoio. A *Éverton Kort Kamp Fernandes* pela amizade, força e orientações. A *Bruno Gomes de Castro* pelo apoio dado durante todos estes anos. Valeu Wally! Obrigada aos amigos do laboratório pela convivência, *Caio Balduino Coutinho*, *Fillipe Araújo de Sá* e *Wendell Marcelo de Souza Perinotto*. *Didi* e *Huarrison*, o café foi essencial! A *Arisa Mandarino Pereira*, que mesmo distante continuou me apoiando. Muito obrigada por vocês fazerem parte da minha vida. A *Paula Sant'Anna Alves* e *Isabela Helena Leite* pela ajuda na manutenção da colônia em laboratório. A *Jéssica* pelas horas em laboratório na luta com os géis para avaliação enzimática. A *Todos* meus amigos pela amizade, consideração e apoio em todos os sentidos, para a realização do projeto e o conforto dado para que a minha distância da família fosse tolerável. Aos *Colegas* do curso de Pós-graduação pelo companheirismo durante a realização do curso. Ao amigo, colega e esposo *Pablo Vieira Badini* pelo amor, incentivo, apoio incondicional e compreensão por tantos dias ausentes. As minhas irmãs *Fabiana Moraes Soares Faturine* e *Juliana Rodrigues Moraes Ascenciano* obrigada por vocês sempre estarem ao meu lado. Minha fortaleza! Aos meus cunhados *Milton Neves Ascenciano* e *Felipe Soares de Moura Faturini*, sempre dispostos a me ajudar. A minha sobrinha *Manuela Moraes Ascenciano* que soube me esperar, mesmo sendo tão nova. Ao meu pai *Celso Fernando Moraes* pelo apoio e compreensão pelos momentos ausentes. E para minha mãe *Eline Rodrigues Moraes (in memoriam)*, razão da minha jornada em Medicina Veterinária, obrigada por ter me ensinado a nunca desistir e por ter me mostrado o caminho para a aprendizagem. Sem vocês isso tudo seria impossível.

Nestes anos na Rural adquiri muito mais que títulos e conhecimento...

Muito Obrigada!!!

BIOGRAFIA

Ana Paula Rodrigues Moraes Badini, filha de Celso Fernando Moraes e Eline Rodrigues Moraes, nascida em 06 de outubro de 1976, no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

No ano de 1999 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), diplomando-se em 29 de setembro de 2004. Durante a graduação foi estagiária remunerada no Curral de Apreensão (convênio UFRRJ/Polícia Rodoviária Federal) entre os anos de 2000 a 2001. No ano de 2002, foi estagiária na área de Bacteriologia desta Instituição e no Hospital Veterinário de Macaé. Em 2003, foi estagiária no Hospital Veterinário de Macaé, no Centro de Hemodiálise e Diagnóstico - Renal Vet (setor de Radiologia) e no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Instituição. Ainda neste mesmo ano, foi selecionada em primeiro lugar nos dois processos seletivos para monitoria nas disciplinas de Radiologia Médica e na disciplina de Anestesiologia e Técnicas Cirúrgicas II, não assumindo por ser bolsista de Iniciação Científica do CNPq/PIBIC durante os anos de 2001 a 2004, sob orientação do professor Avelino José Bittencourt. E ainda, durante o ano de 2004, foi estagiária na área de Medicina e Cirurgia Veterinária no Instituto de Veterinária desta instituição.

Em 2005 iniciou o Mestrado no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal, do Instituto de Veterinária da UFRRJ, sob orientação do Professor Dr. Avelino José Bittencourt. No ano de 2007, foi aprovada pelo Processo de Seleção para Doutorado do mesmo curso, sob orientação do Professor Dr. Avelino José Bittencourt e Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Durante o período de março de 2005 a fevereiro de 2011 foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Durante todos estes anos participou de Congressos e Simpósios Científicos publicando artigos em periódicos nacionais e internacionais.

RESUMO

BADINI, Ana Paula Rodrigues Moraes. *Beauveria bassiana* no controle biológico de estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*. 2011. 81p. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O desequilíbrio populacional de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) tem ocasionado perdas significativas na produção animal. Atualmente, pesquisas têm sido direcionadas para métodos de controle que preservem o meio ambiente. Com o presente estudo verificou-se o potencial entomopatogênico dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* sobre ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans* onde se utilizou três métodos de exposição fúngica. Larvas de *S. calcitrans* expostas ao isolado CG 138 e do grupo controle foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura para verificar a capacidade do fungo em aderir e se desenvolver sobre a cutícula e aberturas naturais. Macerado e muco de larvas expostas aos três isolados e as do grupo controle foram utilizados para verificar a capacidade de inibição fúngica através do teste de difusão em meio sólido. Através do método de PCR fez-se a identificação de uma bactéria, presente no macerado e muco das larvas e foi avaliada a atividade antifúngica para os três isolados. Ainda foram avaliados os perfis cromatográficos, protéicos e proteolíticos destas amostras em cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese protéica e enzimática, respectivamente. Foi observado que os estágios imaturos de *S. calcitrans* se desenvolveram em condições experimentais, onde foram expostos a diferentes concentrações dos três isolados fúngicos. Os três isolados não reduziram a emergência de moscas provenientes das larvas expostas nos três métodos utilizados. Inibição fúngica foi observada quando o isolado CG 138 foi exposto ao macerado de larvas sensibilizadas ao mesmo. Através da microscopia eletrônica de varredura, foi observado reduzido desenvolvimento do isolado CG 138 sobre a cutícula das larvas. Verificaram-se diferenças entre os perfis cromatográficos, protéicos e proteolíticos de larvas expostas aos isolados fúngicos e as do grupo controle, indicando reação antifúngica. A bactéria identificada como *Stenotrophomonas maltophilia* apresentou atividade antifúngica frente aos três isolados. Os resultados sugerem que os isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 apresentaram efeito saprofítico, pois não afetaram significativamente o desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca dos estábulos, comprometendo desta forma a sua utilização como agente entomopatogênico no controle de *S. calcitrans*.

Palavras chave: *Stomoxys calcitrans*, *Beauveria bassiana*, controle biológico

ABSTRACT

BADINI, Ana Paula Rodrigues Moraes. *Beauveria bassiana* no controle biológico de estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*. 2011. 81p. Thesis (Doctor Science) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Abstract: *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) population imbalance has caused significant economic losses in animal productivity. Currently concern about environmental safety has fostered the research and development for alternative control methods. The present study evaluated the entomopathogenic potential of *Beauveria bassiana* CG 138, CG 228 and ESALQ 986 isolates using three different *in vitro* methods to treat *S. calcitrans* eggs, larvae and pupae. *S. calcitrans* larvae exposed to CG 138 isolate and control group have been examined by scanning electron microscopy to verify the fungus adhesion and development on cuticle and natural openings. The *in vitro* antifungal activity was evaluated by diffusion test on media solidified using the larvae homogenate and surface mucus of control and treated groups. The bacterium present in the larvae homogenate and surface mucus was identified by PCR method. The antifungal activity of this bacterium was evaluated using the three *B. bassiana* isolates. The protein, enzymatic and chromatography profiles of these samples were evaluated by electrophoresis in a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide, zymography and high-performance liquid chromatography respectively. The results observed in the present study showed that the *S. calcitrans* immature stages are able to develop when are exposed to the three fungi isolates under experimental conditions. The three different fungi exposure methods used did not reduce the flies emergence of *S. calcitrans* adults. There was antifungal activity when the CG 138 isolate was exposed to the homogenate of larvae treated with this fungus. A reduced development of CG 138 on larvae cuticle was observed by scanning electron microscopy. There were differences between the chromatographic, protein and enzymatic profiles from control and treated groups, indicating antifungal reaction. The bacterium was identified as *Stenotrophomonas maltophilia* and presented antifungal activity against the three isolates. The results suggested the CG 138, 228, and ESALQ 986 isolates presented saprophytic effect since did not change significantly the development of *S. calcitrans* immature stages, and therefore, are not indicated to be used as stable fly biocontrol agent.

Key words: *Stomoxys calcitrans*, *Beauveria bassiana*, biologic control

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de mortalidade de estágios imaturos de <i>Stomoxys calcitrans</i> imersos em suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 ou ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> pelo primeiro método de exposição.....	29
Tabela 2. Percentual de mortalidade de ovos e larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> imersos e mantidos em placas de Petri acrescidas de suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 ou ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> pelo segundo método de exposição.....	30
Tabela 3. Percentual de emergência de moscas proveniente de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostas às suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 ou ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> pelo primeiro método de exposição fúngica.....	30
Tabela 4. Percentual de emergência de moscas proveniente de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostas às suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 e ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> pelos segundo método de exposição fúngica.....	31
Tabela 5. Percentual de mortalidade de ovos, larvas e pupas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostos aos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> pelo terceiro método de exposição fúngica.....	36
Tabela 6. Germinação dos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> em placas de Petri com ágar batata dextrose e extrato de levedura (1%) com discos de papel filtro impregnados com muco ou macerado de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr do isolado bacteriano.....	24
Quadro 2. Identificação de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> proveniente de muco e macerado de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> através do método PCR.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento fúngico dos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> em placa de Petri onde estágios imaturos de <i>S. calcitrans</i> foram expostos pelo primeiro método de exposição.....	32
Figura 2. Larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> ingerindo conídios de <i>Beauveria bassiana</i> após exposição fúngica.....	32
Figura 3. Crescimento hifal e conidiogênese em placa de Petri onde estágios imaturos de <i>S. calcitrans</i> foram expostos aos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> pelo segundo método de exposição.....	33
Figura 4. Placa de Petri referente ao grupo controle do segundo método de exposição fúngica, onde as larvas foram expostas apenas ao diluente.....	33
Figura 5. Crescimento hifal e conidiogênese dos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de <i>Beauveria bassiana</i> em becker onde estágios imaturos de <i>S. calcitrans</i> foram expostos.....	37
Figura 6. Anverso da placa de Petri onde foi observado halo de inibição do isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> , através da utilização do macerado de larvas previamente sensibilizadas pelo fungo.....	40
Figura 7. Reverso da placa de Petri onde foi observado halo de inibição do isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> , através da utilização do macerado de larvas previamente sensibilizadas pelo fungo.....	40
Figura 8. Anverso da placa de Petri onde não foi observado halo de inibição do isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> , através da utilização do muco de larvas previamente sensibilizadas pelo fungo.....	40
Figura 9. Aspecto macroscópico da colônia bacteriana proveniente das amostras de muco ou macerado de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	42
Figura 10. Semeadura em ágar batata dextrose e extrato de levedura da colônia bacteriana obtida no macerado e muco de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> e que apresentou intensa fermentação do meio, ocasionando produção de gás.....	42
Figura 11. Halo de inibição fúngica resultante do crescimento de colônia bacteriana presente no macerado de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	42
Figura 12. Perfil cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência de macerado de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> do grupo controle (A) e das larvas sensibilizadas com os isolados CG 138 (B), CG 228 (C) ou ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i>	45
Figura 13. Perfil cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência de muco de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> do grupo controle (A) e das larvas sensibilizadas com os isolados CG 138 (B), CG 228 (C) ou ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i>	46

Figura 14. Perfil cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência dos isolados CG 138 (A), CG 228 (B), ESALQ 986 (C) de <i>Beauveria bassiana</i> , Tampão Fosfato de Sódio (D) e Diluente (água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80) (E).....	47
Figura 15. Perfil protéico de macerado de larvas pertencentes ao grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i> e marcador de peso molecular (E) em gel de poliacrilamida (12%).....	50
Figura 16. Perfil protéico do muco de larvas pertencentes ao grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i> e marcador de peso molecular (E) em gel de poliacrilamida (12%).....	51
Figura 17. Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i> em tampão ácido (pH = 4,5).....	53
Figura 18. Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i> em tampão neutro (pH = 6,5).....	53
Figura 19. Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i> em tampão básico (pH = 8,5), onde foi observada maior atividade proteolítica.....	54
Figura 20. Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de <i>Beauveria bassiana</i> em tampão básico forte (pH = 10,0).....	54
Figura 21. Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de <i>Beauveria bassiana</i> e controle (D) em tampão ácido (pH = 4,5).....	55
Figura 22. Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de <i>Beauveria bassiana</i> e controle (D) em tampão neutro (pH = 6,5).....	55
Figura 23. Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de <i>Beauveria bassiana</i> e controle (D) em tampão básico (pH = 8,5), onde se observou maior atividade proteolítica.....	56
Figura 24. Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de <i>Beauveria bassiana</i> e controle (D) em tampão básico forte (pH = 10,0).....	56
Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostas ao isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> 15 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar a formação do tubo germinativo (seta).....	58
Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostas ao isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> 24 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar a formação do tubo germinativo e penetração na cutícula (seta)....	58

Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostas ao isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> 48 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar o desenvolvimento de hifas, penetração na cutícula e presença de bactérias de aspecto bacilar (seta).....	60
Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostas ao isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> 72 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar o desenvolvimento de hifas sobre a cutícula (A) e ação enzimática fúngica na cutícula (B) (seta).....	60
Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> expostas ao isolado CG 138 de <i>Beauveria bassiana</i> 96 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar a formação de apressório (seta).....	62
Figura 30. Larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> pertencentes ao grupo controle sonicadas (A) e não sonicadas (B) apresentando diferente concentração de bactérias de aspecto cocóide....	63
Figura 31. Bactérias de formato bacilar e presença de flagelo (seta) e microfibrilas (seta) na superfície da cutícula de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 <i>Stomoxys calcitrans</i>	02
2.1.1 Biologia.....	02
2.1.2 Manutenção da colônia em laboratório.....	03
2.1.3 Perdas econômicas.....	03
2.1.4 Lesões.....	05
2.1.5 Transmissão de agentes com potencial patogênico.....	05
2.1.6 Controle populacional.....	06
2.2 Fungos Entomopatogênicos.....	06
2.2.1 <i>Beauveria bassiana</i>	07
2.3 Controle de Moscas com Fungos Entomopatogênicos.....	09
2.4 Inibição Microbiana Realizada por Artrópodes.....	12
2.5 Bactérias Relacionadas às Moscas.....	14
2.6 Teste de Difusão em Meio Sólido.....	16
2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE.....	16
2.8 Eletroforese Protéica e Enzimática.....	17
2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Localização Experimental.....	19
3.2 Estabelecimento e Manutenção da Colônia de <i>Stomoxys calcitrans</i>	19
3.3 Manutenção dos Isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	19
3.4 Ensaio Biológicos.....	20
3.4.1 Elaboração das suspensões fúngicas.....	20
3.4.2 Primeiro método de exposição fúngica.....	20
3.4.3 Segundo método de exposição fúngica.....	21
3.4.4 Terceiro método de exposição fúngica.....	21
3.4.5 Viabilidade fúngica.....	21
3.4.6 Análise estatística.....	22
3.5 Análise de Muco e Macerado de Larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	22
3.5.1 Exposição fúngica de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	22
3.5.2 Obtenção de muco de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	22
3.5.3 Obtenção de macerado de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	22
3.5.4 Teste de difusão em meio sólido.....	23
3.5.4.1 Teste de difusão em meio sólido com cloranfenicol.....	23
3.5.4.2 Teste de difusão em meio sólido sem cloranfenicol.....	23
3.5.4.3 Isolamento e identificação bacteriana.....	23
3.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.....	25
3.5.6 Eletroforese.....	25
3.5.6.1 Eletroforese protéica.....	25
3.5.6.2 Avaliação da atividade proteolítica por eletroforese (zimografia).....	26
3.5.6.3 Preservação dos géis.....	26
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura de Larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	26
3.6.1 Exposição fúngica de larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	26
3.6.2 Preparação das larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i> para microscopia eletrônica de varredura.....	27

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 <i>Beauveria bassiana</i>	28
4.2 Ensaio Biológico.....	28
4.2.1 Primeiro e segundo método de exposição fúngica.....	28
4.2.2 Terceiro método de exposição fúngica.....	34
4.3 Viabilidade Fúngica.....	38
4.4 Análise do Muco e Macerado de Larvas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	38
4.4.1 Teste de difusão em meio sólido.....	38
4.4.1.1 Teste de difusão em meio sólido com cloranfenicol.....	39
4.4.1.2 Teste de difusão em meio sólido sem cloranfenicol	41
4.4.1.3 Identificação bacteriana.....	41
4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.....	44
4.4.3 Eletroforese.....	49
4.4.3.1 Eletroforese protéica.....	49
4.4.3.2 Avaliação da atividade proteolítica por eletroforese (zimografia).....	52
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	57
5 CONCLUSÕES	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758) é um díptero hematófago, considerado um dos mais importantes para a pecuária nacional. Grisi et al. (2002) estimaram que o desequilíbrio de sua população tem ocasionado perdas anuais em mais de 100 milhões de dólares/ano no Brasil. Ele é descrito parasitando diferentes espécies, sejam animais de produção, silvestres, de companhia e até o homem (GUIMARÃES, 1983; GUIMARÃES, 1984; MATTOS-JUNIOR, 1986; BITTENCOURT, 1998).

O Manejo Integrado de Pragas associa métodos de controle mecânicos (PAIVA, 1994), biológicos e o uso consciente de inseticidas químicos (MCCOY & TIGANO-MILANI, 1992) que refletirão na qualidade de produtos de origem animal e vegetal (ALVES, 1998; FOIL & HOGSETTE, 1994). Estas medidas devem ocasionar o menor impacto ambiental possível e controlar os insetos em níveis populacionais que não afetem economicamente a produção (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são amplamente utilizados no mundo para o controle de diferentes pragas, e dentre estes, o fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Ascomycota: Hypocreales) tem sido um dos mais estudados (ALVES 1998). Este fungo tem sido descrito, parasitando a mosca dos estábulos em baixa prevalência (SKOVGARD & STEENBERG, 2002).

Estudos têm sido direcionados à avaliação do sistema imune dos insetos, com o intuito de elucidar suas estratégias antimicrobianas (SILVA, 2002). Desta forma, os mecanismos adaptativos desenvolvidos pelos artrópodes devem ser estudados, para esclarecer os motivos da baixa eficiência de um agente entomopatogênico, que pode limitar sua utilização.

O presente estudo avaliou o potencial entomopatogênico dos isolados CG 138 e CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* sobre estágios imaturos de *S. calcitrans* em condições controladas de laboratório e em condições naturais de temperatura e umidade. Verificou a capacidade de inibição fúngica do macerado e muco de larvas expostas ou não aos três isolados, e observou as diferenças existentes no perfil cromatográfico, protéico e proteolítico que indicassem atividade antimicrobiana destas amostras. Também foi realizada microscopia eletrônica de varredura de larvas expostas ao isolado CG 138 em diferentes períodos de tempo e a identificação de um isolado bacteriano que apresentou atividade antifúngica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Stomoxys calcitrans*

2.1.1 Biologia

O ciclo biológico da mosca dos estábulos possui duração de 20 a 30 dias, desenvolvendo-se continuamente nos locais de temperatura e umidade elevadas. O período de incubação dos ovos varia de um a quatro dias. Após eclosão, as larvas se aprofundam na matéria orgânica para evitar seu ressecamento, alimentam-se intensamente e, em seguida, se deslocam para as porções mais secas da matéria para pupar (6 a 26 dias). Após pupação (seis a 20 dias), os adultos emergem rapidamente e em torno de 1 hora estão aptos para voar. As fêmeas iniciam sua postura nove dias após emergência, depositando 23 a 100 ovos (GUIMARÃES, 1984; MATTOS-JUNIOR, 1986; SOULSBY, 1987; MELLO, 1989)

Em condições favoráveis, o pico populacional de *S. calcitrans* pode ser observado entre os meses de outubro a março, que correspondente ao período de verão e outono no hemisfério sul, ou seja, época do ano de elevada temperatura e índice pluviométrico (NEVES & FARIA, 1988; CRUZ-VÁZQUEZ et al., 2000).

De acordo com Foil e Hogsette (1994), a ingestão de sangue de vertebrados está diretamente relacionada à sobrevivência e maturidade reprodutiva desta mosca. Mello e Garcia (1983) verificaram que o sangue de suíno, bovino, ovino e equino apresentaram eficiência decrescente com relação à atividade reprodutiva de fêmeas de *S. calcitrans*, quando avaliada a produção de ovos. A mosca pode ingerir 8,6 mg de sangue em média, o que equivale a três vezes a sua massa corporal (PARR, 1962). Segundo Hafez e Gamal-Eddin (1959), o maior número de picadas está relacionado à elevação da temperatura ambiente, e consequentemente, à velocidade de digestão do sangue.

As moscas atacam os animais preferencialmente antes das dez horas da manhã e ao entardecer, com objetivo de evitar os períodos mais quentes do dia (CARRERA, 1991; HERRERO et al., 1989). Bittencourt e Moya Borja (2000) relataram a preferência da mosca dos estábulos em se alimentar principalmente nas extremidades dos membros torácicos e pélvicos, devido à maior disponibilidade de vasos sanguíneos superficiais que favoreceriam sua alimentação, à ausência ou menor intensidade do tremor cutâneo e à dificuldade em espantar as moscas com a boca e cauda (BITTENCOURT & MOYA BORJA, 2002).

A mosca dos estábulos é facilmente encontrada em volta dos estábulos ou nos locais onde são criados os animais. Após alimentação, ela pode ser observada pousada em local fresco e sombreado (CARRERA, 1991; HERRERO et al., 1989), moirões de cerca, cordoalhas, muros ou paredes (MATTOS-JUNIOR, 1986; CARRERA, 1991).

Como *S. calcitrans* realiza sua postura sobre a matéria orgânica, autores descrevem o desenvolvimento das fases imaturas em fezes de cavalos, bovinos, ovinos e aves, quando misturadas a capim umedecido e fermentado (GUIMARÃES, 1984; MATTOS-JUNIOR, 1986; BRUNO et al., 1993; BITTENCOURT, 1998; COOK et al., 1999). Cook et al. (1999) destacam que dois milhões de moscas dos estábulos em média, emergem por hectare cultivado com hortaliças, quando utilizada a cama de frango como fertilizante. Sutherland (1978a) relata que raramente *S. calcitrans* se desenvolve em fezes puras de aves, tanto que a cama de frango, que é a associação das fezes com matéria orgânica vegetal em decomposição, proporciona um meio ideal para seus estágios imaturos. Outros autores descrevem a alfafa, grãos ou farinhas encontrados abaixo de cochos nos currais, pilhas de grama cortada, fezes de aves ou restilo de usinas de açúcar (GUIMARÃES, 1983), esterco bovino acumulado próximo

aos currais, restos alimentares ao redor dos cochos ou resíduos de cervejaria nas instalações das propriedades rurais (BADINI et al., 2003) como ambiente favorável para procriação e estabelecimento da mosca dos estábulos. Segundo Neves e Faria (1988) as pupas são encontradas principalmente aos cinco centímetros de profundidade, entretanto, quando em profundidades maiores que dez centímetros, há maior dificuldade na emergência.

2.1.2 Manutenção da colônia em laboratório

Com relação à criação de mosca dos estábulos, autores relatam que há maior dificuldade em sua produção em laboratório, quando comparada a mosca doméstica (JONES, 1966; WATSON et al., 1995; MACEDO, 2001; SKOVGARD & STEENBERG, 2002). Jones (1966) destaca que melhores resultados foram obtidos na postura quando se forneceu sangue bovino, equino ou suíno, enquanto que, o sangue de carneiro, cobaia ou de rato prejudicaram a postura. Sutherland (1978b) constatou que moscas alimentadas com sangue de herbívoros produzem mais ovos do que as alimentadas com sangue de carnívoros e onívoros, mas a postura não é realizada quando as moscas são alimentadas com sangue de galinhas.

Com relação ao meio de desenvolvimento dos estágios imaturos de *S. calcitrans*, Macedo (2001) destacou que as larvas se desenvolvem em material orgânico variável, desde que este se apresente úmido, fermentado e friável. Para criação de larvas, Moraes (1990) obteve melhores resultados na criação de moscas dos estábulos quando usou dieta nutritiva composta por cana-de-açúcar, farelo de trigo, farinha de carne, bicarbonato de sódio associado ao vinhoto. Estes componentes são similares a aqueles utilizados na dieta descrita por Christmas (1970) e Macedo (2001), mas ambos não usaram vinhoto na composição da mistura. A diferença entre a dieta descrita por Christmas (1970) e a dieta utilizada por Macedo (2001), foi que este último substituiu farinha de peixe por farinha de carne. Moraes (2007) adaptou a dieta substituindo a farinha de carne pela mesma quantidade de carne moída bovina, por ser um ingrediente mais fácil de ser encontrado. A dieta ainda foi autoclavada e mantida sob refrigeração, pois o estudo necessitava que a mistura apresentasse reduzido crescimento microbiano.

Segundo Moraes (2007), quando são utilizadas gaiolas de material plástico para criação e transporte da mosca dos estábulos, são verificadas vantagens quando comparadas as gaiolas com estrutura de madeira, devido à facilidade de observação, higiene, transferência das moscas e coleta de ovos. Além disso, estas gaiolas mimetizam o ambiente natural onde a mosca vive, pois apresenta locais sombreados para o pouso das moscas após a alimentação.

2.1.3 Perdas econômicas

A picada dolorosa (CARRERA, 1991; MIHOK & CLAUSEN, 1996) e o comportamento alimentar interrompido da mosca dos estábulos geram estresse (MATTOS-JUNIOR, 1986) nos animais (MIHOK & CLAUSEN, 1996; BITTENCOURT, 1998), ocasionando redução na produtividade leiteira (MATTOS-JUNIOR, 1986) e de corte (MATTOS-JUNIOR, 1986; WIEMAN et al., 1992), contribui para a disseminação de diferentes agentes patogênicos (GUIMARÃES, 1983; GUIMARÃES 1984; TARRY & CARROLL, 1988; MATTOS-JUNIOR, 1986) e ocasiona maior susceptibilidade dos animal às doenças. A capacidade de dispersão da mosca dos estábulos está relacionada a elevados prejuízos, pois alcançam até 10 km de distância do local da postura ou até 29,91 (machos) e 29,11 (fêmeas) quilômetros durante um período de 24 horas (BAYLEY et al., 1973).

Bruce e Decker (1958) mencionaram que as perdas na produtividade animal podem alcançar até 20,0%. Em um período de 100 dias, quando comparado o ganho de peso e a

média de infestação da mosca dos estábulos em bovinos, foi verificado que os animais livres das moscas apresentavam ganho/dia de 90g e 200g a mais que os parasitados por 50 e 100 moscas, respectivamente (CAMPBELL et al., 1977). Campbell et al. (1987) mencionam que a presença de 35 moscas parasitando o membro de um bovino são suficientes para ocasionar perdas de 12,0% na conversão alimentar e 20,0% em queda de peso. Dougherty et al. (1993) observaram redução no ganho de peso de bovinos na ordem de 28,6%, devido ao efeito direto das picadas. Wieman et al. (1992) verificaram que os efeitos indiretos ocasionados pela mosca dos estábulos sobre o gado bovino confinado representou redução de 71,5% no ganho de peso dos animais e o efeito direto relacionado à energia gasta para espantar as moscas representou perdas de 28,5% no ganho de peso, pois além do efeito espoliativo da mosca, a tentativa de se proteger das picadas, ocasionou estresse térmico e, conseqüentemente, redução no desempenho dos animais.

Em outro estudo realizado por Campbell et al. (2001), foi observado que as moscas dos estábulos também afetaram bezerros castrados com idade de um ano. Estes animais apresentaram perda de peso de 0,2kg/bezerro em três anos de estudo, tendo uma infestação média de 3,64 moscas/perna dianteira, quando comparada a 0,85 do grupo de bezerros do grupo controle. Verificaram que os animais não apresentaram ganho de peso compensatório após a transferência para confinamento de terminação sem o parasitismo da mosca. Kavaliers et al. (2003) confirmaram o efeito estressor da mosca em ratos, pois verificaram o aumento de corticosterona após exposição às picadas.

Campbell et al. (1987) não observaram prejuízos econômicos em animais parasitados por duas moscas por membro torácico ou por seis em todo o corpo, considerando-se o ganho de peso, conversão alimentar e custos com inseticidas. Bittencourt (1998) observou em seu estudo redução no ganho de peso dos animais, devido ao desgaste de energia e redução do pastejo. Os animais realizavam movimentação cutânea, de cabeça e orelhas em reação às picadas e se aglomeravam no parasitismo intenso. Em inquérito epidemiológico foi constatado que a mosca podia gerar alterações comportamentais nos bovinos, pois 100,0% dos entrevistados relataram que os animais apresentavam-se inquietos, 98,0% citaram que ficavam aglomerados, 80,0% procuravam a água para se proteger, 36,5% responderam que a mosca incomodava e não deixava os animais pastarem e 13,5% reduziam a produção de leite.

As transformações ambientais decorrentes da ação do homem ocasionam a extinção de espécies nativas e podem favorecer a introdução de novas espécies que possuem alta capacidade de adaptação às condições criadas. Segundo Guimarães (1983) o acúmulo de material orgânico decorrente da produção animal favorece o estabelecimento e o desequilíbrio populacional de dípteros como a mosca dos estábulos. Barros et al. (2010) relataram que os surtos populacionais da mosca dos estábulos, ocorridos no estado do Mato Grosso do Sul, estavam relacionados com a expansão das usinas de álcool e açúcar em áreas tradicionalmente direcionadas a bovinocultura de corte. Nestes locais, o acúmulo dos resíduos e subprodutos da indústria sucro-alcooleira contribuíram para o desenvolvimento e desequilíbrio populacional desta mosca, que ocasionaram a aglomeração e perda de peso de bovinos de corte.

O parasitismo da mosca dos estábulos não está limitado aos animais, pois em locais onde há uma população elevada, é possível presenciar a mosca atacando as pessoas que os manejam ou que residem próximos a estes locais (BARROS et al., 2010). Também há relatos da mosca parasitando pessoas em praias da Flórida, em decorrência ao acúmulo e fermentação de diferentes espécies de algas em áreas costeiras, principalmente nos meses de agosto e setembro (KING & LENERT, 1936), e ainda, em parques que apresentam gramíneas cortadas e acumuladas (HANSENS, 1951). Os meses do ano que apresentam elevada temperatura e umidade são considerados como intoleráveis aos animais, devido à elevada infestação da mosca (SOULSBY, 1987; NEVES & FARIA, 1988; CRUZ-VÁZQUEZ et al., 2000).

2.1.4 Lesões

O parasitismo da mosca dos estábulos pode ainda ocasionar lesões de pele, principalmente nos emaciados, devido à menor camada de gordura subcutânea destes bovinos (PHILPOOT & EZEH, 1978). Em inquérito epidemiológico foi constatado que 3,8% dos entrevistados responderam que a mosca causava lesões no pescoço e tórax, 59,6% relataram lesões nos membros torácicos, 17,3% nos membros pélvicos, 1,9% no úbere e mesmo percentual nos tetos de bovinos (BITTENCOURT, 1998). Barros et al. (2010) observaram a formação de lesões podais de bovinos de corte na avaliação de surtos da mosca dos estábulos.

Moorhouse (1972) descreveu que os bovinos apresentam reação de hipersensibilidade quando parasitados por *S. calcitrans*, podendo ser observado a formação de lesões e elevação intra-dérmica no caso de picada individual. Sangramento, edema, exsudação e formação de crostas foram observados quando ocorreu a concentração de picadas. Este mesmo autor relata que a ocorrência de infecções secundárias não deve ser descartada. White e Bourdeau (1995) verificaram que as lesões ocorridas nas bordas, dobradura das orelhas e extremidades do focinho de cães seriam ocasionadas pelas picadas de moscas, como a mosca dos estábulos. Eles acrescentaram que as picadas podem desencadear reação de hipersensibilidade, com o desenvolvimento de dermatites, inclusive ulcerativas e furunculose eosinofílica. Yeruham e Braverman (1995) também descreveram o efeito espoliativo do parasitismo da mosca dos estábulos em diferentes espécies. Foi observada lesão de pele do tipo dermatite necrosante nas pontas das orelhas de cães de várias raças. Bem como foi constatada dermatite exudativa nas patas dos equinos adultos e no dorso de vacas de pelagem branca.

2.1.5 Transmissão de agentes com potencial patogênico

Em estudo realizado por Badini et al. (2004), foi avaliada a capacidade de *S. calcitrans* em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites. A espécie *Staphylococcus aureus aureus* foi identificada em 41,6% das amostras de leite de vacas leiteiras positivas para mastite clínica ou subclínica e em 50,0% das amostras de *S. calcitrans* capturadas. A similaridade entre isolados nas amostras de leite e moscas também ocorreu para *Klebsiella oxytoca*. Em outro estudo, espécies como *Escherichia coli* e *S. aureus* também foram isoladas de amostras de leite de vacas positivas para mastite e de macerado de moscas capturadas em mesma propriedade (MORAES et al., 2004). Ambos os estudos foram realizados em municípios onde as principais atividades produtivas baseiam-se na produção de leite e horticultura, que ocasionam concentração de animais, acúmulo de esterco bovino e utilização de cama de frango para a adubação de hortaliças.

Castro et al. (2008) identificaram diferentes espécies de *Bacillus* sp, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp., *Providencia* sp., *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. de acordo com o segmento do corpo da mosca dos estábulos. Esta também é descrita na literatura como disseminadora da estreptococose cutânea em coelhos. Segundo Richard e Pier (1966), a penetração cutânea pelo aparelho bucal da mosca não foi necessária para a transmissão. Verificaram que *Dermatophilus congolensis* presente em suas patas e nas lesões úmidas dos coelhos, onde as moscas pousavam, contribuíram para a transmissão da doença aos coelhos sadios.

A mosca dos estábulos foi incriminada como transmissora mecânica de *Anaplasma* spp. e *Trypanosoma evansi*, como também transmite o vírus da estomatite vesicular, vírus do herpe bovino e da febre suína africana, diarreia viral bovina (CARN, 1996) e anemia

infecciosa eqüina (FOIL et al., 1983; CARN, 1996). Soulsby (1987) menciona a mosca dos estábulos como hospedeiro intermediário de *Habronema majus* e como responsável pela transmissão mecânica de agentes que desenvolvem infecções septicêmicas. Moscas adultas foram observadas veiculando ovos de *Dermatobia hominis* a campo e em condições laboratoriais (MOYA BORJA, 1982).

2.1.6 Controle populacional

Como a mosca possui picada dolorosa (MIHOK & CLAUSEN, 1996), sua alimentação é realizada em curtos períodos, permanecendo pouco tempo em contato com os animais. Este tipo de comportamento dificulta o controle de adultos, pois o menor tempo de contato com os inseticidas utilizado nos animais pode estar relacionado à maior tolerância da mosca dos estábulos, quando utilizados inseticidas efetivos no controle de outras moscas (GUIMARÃES, 1983).

Guimarães (1985) relatou que a utilização contínua de inseticidas organosintéticos em granjas ocasiona rápido desenvolvimento de moscas resistentes. Segundo o autor, a aplicação maciça de larvicidas resulta na destruição de quase 100,0% dos inimigos naturais no esterco, que deveriam controlar cerca de 95,0% da população de moscas, conseqüentemente, o restabelecimento tardio da população de parasitóides (6 a 12 meses) permitiria o desenvolvimento de várias gerações de moscas.

Por estes motivos, métodos de controle devem ser direcionados principalmente aos locais de desenvolvimento dos estágios imaturos, empregando-se metodologias que diminuam a umidade das camas ou feno associados às fezes, resíduos alimentícios ou vegetais acumulados em estábulos ou pátios. A remoção dos resíduos alimentares úmidos ou procedimentos que acelerem a secagem destes materiais são relatados por Guimarães (1983), pois o acúmulo de restos de culturas e plantas daninhas favorece a fermentação. Foil e Hogsette (1994) destacaram que o manejo adequado do habitat das larvas nas instalações, pode ser considerado um dos pontos mais importantes no controle da mosca dos estábulos.

Paiva (1994) descreve métodos mecânicos eficientes no manejo do esterco para o controle de moscas, como a utilização de canaletas com água suficiente para cobrir o esterco, esterqueiras (revestidas ou bioesterqueiras), lagoas aeróbias ou anaeróbias, tanques de oxidação, câmaras de fermentação, ou lona plástica para cobrir a matéria orgânica. Além disso, a utilização de agentes entomopatogênicos não deve ser descartada no controle da mosca dos estábulos, entretanto, poucos estudos sobre o controle microbiano de *S. calcitrans* são descritos, com a utilização de fungos entomopatogênicos (WATSON et al., 1995; SKOVGARD & STEENBERG, 2002; MORAES et al., 2008).

2.2 Fungos Entomopatogênicos

Diferentes microrganismos têm sido pesquisados com o objetivo de verificar a capacidade entomopatogênica sobre os parasitos de importância econômica que apresentem potencial de resistência aos inseticidas químicos disponíveis no mercado (DAVIDSON & SWEENEY, 1983; CILEK & GREENE, 1994). Os fungos entomopatogênicos são referidos por diferentes autores como os mais eficazes em programas de controle biológico (HALL & PAPIEROX, 1982).

Tratamentos experimentais com diferentes microrganismos têm como objetivo selecionar agentes entomopatogênicos mais adequados para o controle biológico de determinada praga, onde se deve considerar a segurança de utilização, a especificidade, a patogenicidade, a capacidade de produção industrial e a viabilidade após exposição a

condições ambientais (ALVES, 1998). Fernandes (2007) destaca que a maior parte dos estudos, nos quais se avalia o efeito entomopatogênico sobre o hospedeiro-alvo, realiza-se em condições ideais de laboratório, o que poderia superestimar sua ação em condições naturais.

Segundo Alves (1998) a interação fungo-hospedeiro apresenta as fases de adesão, germinação, formação de grampo de penetração, penetração e colonização. A primeira fase é complexa e ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto, com o objetivo de preparar o local de contato para a penetração.

O apressório é formado a partir da dilatação das hifas localizadas na extremidade do tubo germinativo, iniciando a fase de penetração na epicutícula e procutícula do tegumento do inseto, principalmente nas áreas mais finas. Nesta fase, há a influência do processo físico, realizada pela própria pressão da hifa terminal, e o químico, pela produção e ação enzimática de proteases, lípases e quitinases que, agindo de forma conjunta, favorecem a penetração fúngica e o metabolismo do tubo germinativo (ST. LEGER et al., 1991; ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007).

Zimmermann (2007) relata que a germinação e a infecção fúngica estão relacionadas à susceptibilidade, estágio de vida do hospedeiro e a fatores ambientais. Certos lipídeos cuticulares como ácidos graxos de cadeia curta, aldeídos, ésteres, cetonas e alcoóis podem apresentar atividade antimicrobiana. Outras substâncias, como aminoácidos livres ou peptídeos sobre a cutícula, podem ser necessários para o reconhecimento fúngico e início da germinação.

A penetração pelas camadas da cutícula e início da invasão com engrossamento da hifa, ramificação inicial no tegumento e na hemocele, caracteriza a fase de colonização. O encapsulamento das estruturas hifais e o seu crescimento limitado no interior do inseto são métodos adaptativos contra o sistema de defesa do hospedeiro, pois durante este processo os fungos secretam toxinas que podem afetar as células e estimular reações celulares e humorais, como a produção de componentes antifúngicos, produção de inibidores de protease, fenoloxidase, substâncias fúngicas desintoxicantes, determinados hemócitos e melanização (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007).

O período de incubação depende do hospedeiro, temperatura e virulência do isolado fúngico. Assim, com a morte do inseto e em condições favoráveis de umidade, o fungo inicia sua fase saprofítica, fazendo com que suas hifas filamentosas invadam todos os tecidos. O crescimento micelial pode ser observado do interior ao exterior do inseto, através dos espiráculos e cutícula (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007). Além disso, o inseto torna-se rígido, mumificado e com cobertura pulverulenta (SWEETMAN, 1936; ALVES, 1998).

Sweetman (1936) relatou que os primeiros sinais de infecção de fungos entomopatogênicos sobre os insetos aparecem em torno de três a cinco dias após o contato dos esporos à cutícula ou ingestão. Estes sinais podem ser influenciados pela temperatura e pelo número de esporos ao qual o inseto é exposto. Zimmermann (2007) destacou que durante o período de incubação os fungos podem afetar o comportamento dos insetos. Segundo Alves (1998), manchas nas pernas, regiões intersegmentais ou em todo o tegumento podem surgir como sintomas iniciais da doença. A alimentação é interrompida e o inseto se torna enfraquecido, apresenta paralisia, perda da coordenação dos movimentos e desorientação. Distúrbios nervosos também são frequentemente observados nos últimos estágios da doença, como movimentos vagarosos, perda do equilíbrio e reflexos.

2.2.1 *Beauveria bassiana*

Os estudos que utilizam fungos como agentes no controle de diferentes artrópodes têm aumentado no decorrer dos anos em todo o mundo (MCCOY & TIGANO-MILANI, 1992),

sendo *B. bassiana* utilizado há mais de 100 anos (ALVES, 1998). Dos 171 produtos levantados por Faria e Wraight (2007), *B. bassiana* representa 33,9% dos fungos mais utilizados como base de micoinseticidas e micoacaricidas. Este é descrito no controle de pragas que afetam a agricultura (WEI-BING & MING-GUANG, 2004; IBARRA-APARICIO et al., 2005; CHERRY et al., 2005), a pecuária (FERNANDES, 2007; MORAES et al., 2008) e animais de companhia (MELO et al., 2007).

Outros estudos têm sido direcionados ao próprio fungo, como a verificação da prevalência em insetos (PELAGATTI et al., 1993), variabilidade genética e distribuição geográfica (ZIMMERMANN, 2007; FERNANDES et al., 2009), avaliação enzimática (SASSÁ et al., 2008), interação com inseticidas químicos (MCCOY & TIGANO-MILANI, 1992), produção de toxinas (ZIMMERMANN, 2007), ação sobre artrópodes benéficos, animais e humanos (ZIMMERMANN, 2007) e tolerância a condições de estresse e desempenho (FERNANDES, 2007).

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico anamórfico (MEYLING & EILENBERG, 2007) encontrado em amostras de solo e em uma variedade de insetos, principalmente em áreas tropicais e temperadas (ZIMMERMANN, 2007). Segundo Pelagatti et al. (1993) é um dos fungos mais frequentemente associado a insetos.

Macroscopicamente, *B. bassiana* ocasiona a doença “muscardine branca”, pois suas colônias apresentam-se brancas ou levemente amareladas. Suas toxinas apresentam baixo peso molecular e a maioria é considerada inseticida. Dentre elas são descritos peptídeos cíclicos (beauvericina e bassianolida), pigmentos (bassianina e tenelina) e uma macromolécula relacionada ao processo de infecção da hemolinfa denominada melanisina. A proteína hidrofílica similar a quitosanase e a ciclosporina A produzidas pelo fungo também apresentariam potencial tóxico (ZIMMERMANN, 2007).

No processo de infecção, enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula do hospedeiro, como quitinases e β -1,3-glicanases são produzidas por *B. bassiana* e determinam sua virulência e patogenicidade (CAMPOS et al., 2005). Na avaliação da atividade enzimática das quitinases (exoquitinases e endoquitinases) de *B. bassiana*, Sassá et al. (2008) constataram que a predominância de cargas negativas na estrutura molecular das quitinases são decisivas na interação com regiões positivas do substrato quitina coloidal. Segundo os autores, as enzimas apresentariam menor atividade com o aumento do pH. Além disso, a elevada concentração iônica de um meio, potencialmente com maior número de cargas negativas/mol, poderia saturar os sítios de ligação, promovendo desta maneira, a redução da interação enzima-substrato por mecanismo competitivo. St Leger et al. (1996) relataram que durante a fase de penetração inicial, as quitinases são produzidas em baixos níveis pela estrutura de infecção fúngica na superfície da cutícula do inseto, contudo grandes níveis de quitinase são acumulados na zona de degradação proteolítica, indicando que a liberação desta enzima é dependente da acessibilidade ao substrato. Enzimas proteolíticas e toxinas também são produzidas por *Beauveria* spp durante o processo de infecção. Em contrapartida, o hospedeiro desenvolve uma reação celular e humoral de defesa, com a produção de inibidores de proteases fúngicas (ZIMMERMANN, 2007). Campos et al. (2005) observaram a formação de apressório e verificaram a produção de protease similar a subtilisina e quitina durante a penetração na cutícula do carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus*.

Alves (1998) e Kouassi (2001) destacam que o mecanismo de penetração realizado pelo fungo *B. bassiana* contribui para sua utilização como entomopatógeno no controle de artrópodes, pois seu parasitismo pode se iniciar pela ingestão de seus conídios ou pela penetração ativa na cutícula e orifícios do inseto.

Melo et al. (2007) relatam que os conídios de *B. bassiana* apresentavam-se aderidos a superfície da pulga *Ctenocephalides felis felis* após duas horas de exposição fúngica,

principalmente nas membranas intersegmentais do abdome, e após 26 horas, já se observava as ramificações fúngicas e engrossamento hifal sobre a cutícula.

Devi et al. (2005) verificaram que isolados de *B. bassiana* mantidos por 16 horas a 25°C tiveram ótimo crescimento, entretanto, quando expostos pelo mesmo período a temperatura acima de 32°C apresentam redução ou atraso na germinação de alguns isolados. Já Farguez et al. (1997) relataram que este fungo se desenvolve em temperaturas que variam de 8 a 35°C, com limite máximo de 37°C. Zimmermann (2007) observou que conídios de *B. bassiana* iniciam a germinação cerca de 10 horas após o contato e sua conclusão ocorre em torno de 20 horas a 20-25°C. Bittencourt et al. (1999) verificaram a germinação e dilatação do tubo germinativo com a formação do apressório, entretanto, não foi possível sua visualização sobre a cutícula de fêmeas ingurgitadas do carrapato.

2.3 Controle de Moscas com Fungos Entomopatogênicos

Dentre os diversos fungos entomopatogênicos se destaca *B. bassiana*, que é uma espécie descrita como eficiente controlador de *Glossina* spp, quando incorporada ao meio de desenvolvimento dos estágios imaturos (KAAYA & MUNYINYI, 1995). Percentuais de mortalidade acima de 87,0% foram obtidos com larvas de *Fannia canicularis* e *Fannia femoralis* expostas ao fungo *B. bassiana*, entretanto baixos a moderados percentuais de mortalidade foram alcançados quando utilizados diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. Os autores relatam que o aumento da patogenicidade do fungo foi relacionado a três passagens fúngicas sobre hospedeiros susceptíveis e que a reduzida susceptibilidade das larvas ao isolado bacteriano pode estar relacionada ao fator β -exotoxina, que impediria sua ação sobre as larvas (HALL et al., 1972).

Avaliando-se a influência da idade, como fator importante na patogenicidade dos fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre dípteros como *Musca domestica*, *Phormia regina* e *Hylemya antiqua*, Rizzo (1977) constatou que os fungos não apresentaram patogenicidade significativa às moscas adultas, pois a idade dos três dípteros não influenciou no tempo letal destes fungos. Quando analisada a taxa de mortalidade, a espécie *B. bassiana* foi mais efetiva em *M. domestica* e *P. regina*, enquanto que para *H. antiqua* não houve diferença significativa.

A ocorrência natural de *B. bassiana* em *M. domestica* foi verificada por Steinkraus et al. (1990). Concluíram que esta espécie poderia ser utilizada como um dos meios de controle biológico da mosca, devido à alta susceptibilidade dos adultos e a baixa viabilidade pupal das larvas expostas experimentalmente às suspensões conidiais. Pode-se verificar em seu estudo que a alta susceptibilidade dos adultos (93,1%) estava relacionada à ingestão de conídios adicionados a solução de açúcar, pois foram obtidos resultados inferiores quando as moscas foram aspergidas (86,7%). As larvas utilizadas foram susceptíveis as duas doses testadas, apresentando 52,0% de mortalidade na menor dose e 72,7% na maior ($2,08 \times 10^5$ e $8,32 \times 10^5$ conídios, respectivamente). Também foi observado que as larvas deram origem a pupas normais, porém estas não formaram adultos.

A utilização de *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Tolypocladium cylindrosporum* e *Verticillium lecanii* em suspensões aquosas de 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 con.mL⁻¹ em larvas de *M. domestica* foi realizada por Barson et al. (1994). Foi constatado que todas as suspensões de *T. cylindrosporum* evitaram a emergência das pupas. O mesmo ocorreu para *M. anisopliae*, nas suspensões 10^8 e 10^7 con.mL⁻¹, enquanto que nas concentrações de 10^6 e 10^5 con.mL⁻¹ ocorreu emergência de 1,0% e 16,0%, respectivamente. A mortalidade dos adultos foi verificada entre o sexto e nono dia pós-tratamento, onde se concluiu que a espécie *M. anisopliae* foi a mais patogênica, pois 100,0%

das moscas adultas estavam mortas no sexto dia. Entretanto, foi observado apenas 6,0% e 15,0% de emergência de adultos provenientes das larvas expostas as suspensões de diferentes isolados de *V. lecanii* na concentração de 10^8 con.mL⁻¹.

Senna-Nunes (2000) realizou o isolamento e identificação de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. e *Curvularia* sp., provenientes de moscas domésticas capturadas em ambiente natural. Senna-Nunes et al., (2002a) constataram que o percentual de sobrevivência de larvas de *M. domestica* foi de 63,7% e 72,5%, após exposição a dois isolados de *Penicillium corylophilum* na concentração de 10^8 conídios/mL, enquanto que a emergência das moscas provenientes destas larvas foi reduzida para 45,0% em ambos isolados. Em outro estudo realizado pelos mesmos autores, avaliando-se dois isolados de *Aspergillus flavus* e de *P. corylophilum*, foi verificado que os adultos de mosca doméstica foram susceptíveis aos quatro isolados, principalmente nas maiores concentrações fúngicas utilizadas, obtendo-se 100,0% de mortalidade no sétimo dia após exposição. Apenas com um isolado *A. flavus* foi obtido mesmo percentual no terceiro dia pós-tratamento (Senna-Nunes et al., 2002b).

Em estudo realizado por Kaaya (1989), larvas de *Glossina morsitans morsitans* expostas a *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram maiores taxas de mortalidade quando comparados aos fungos *Paecilomyces fumosoroseus* e *P. farinosus*. Com objetivo confirmar a aplicabilidade na utilização de fungos no meio de desenvolvimento dos estágios imaturos de *G. morsitans morsitans*, esporos de *B. bassiana* ($1,4 \times 10^6$ esporos/g) e *M. anisopliae* ($2,3 \times 10^6$ esporos/g) foram misturados a areia estéril (1,0 g/litro) para adição das larvas. As moscas resultantes apresentaram alta mortalidade após dois a dez dias de realizada a emergência, sendo 97,0% ocasionada por *B. bassiana* e 80% por *M. anisopliae*. Menores concentrações de esporos (0,5g/litro de areia) resultaram em menores percentuais de mortalidade, ou seja, 60,0% e 40,0%, respectivamente (KAAYA & MUNYINYI, 1995).

Ángel-Saragún et al. (2005) avaliaram a patogenicidade de isolados fúngicos sobre adultos, pupas e ovos de *Haematobia irritans* em condições laboratoriais. Os adultos foram susceptíveis a 23 isolados na concentração de 10^8 con.mL⁻¹. Alguns isolados de *M. anisopliae* alcançaram 100,0% de mortalidade dos adultos, enquanto que isolados de *B. bassiana* obtiveram até 73,75% e *P. fumosoroseus* 85,0% de mortalidade. Isolados de *M. anisopliae* foram mais patogênicos às pupas do que os isolados das outras duas espécies, alcançando até 71,2% de mortalidade. As suspensões fúngicas foram capazes de reduzir a emergência de moscas provenientes de ovos expostos a concentração de 10^6 con.mL⁻¹. Nesta concentração, isolados de *M. anisopliae* causaram mortalidade máxima de 63,7%, 50,0% e 46,2%, sendo estes maiores dos que os obtidos com *B. bassiana* (11,2% e 43,7%) e *P. fumosoroseus* (20,0% e 27,5%). Neste estudo verificou-se que os diferentes estágios de *H. irritans* foram susceptíveis, contudo o efeito entomopatogênico foi diretamente relacionado ao isolado utilizado.

Em experimento realizado por Lohmeyer e Miller (2006), adultos de *H. irritans* foram expostos a superfícies contendo conídios de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*. Foram obtidos 16,8% à 73,0% de mortalidade entre os dias dois e sete após exposição ao fungo *M. anisopliae*, enquanto que entre o segundo e quarto dia, 9,5% à 98,4%, quando estas foram expostas a *B. bassiana*. Porém, *P. fumosoroseus* manteve a mortalidade similar ao controle, ou seja, de 6,8% a 33,3% entre os dias dois e sete. Segundo os autores os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são patogênicos para adultos das moscas dos chifres e possuem potencial para serem utilizados em seu controle populacional.

Os fungos *B. bassiana* e *Isaria farinosa* não foram patogênicos para larvas de *H. irritans*. A exposição de suas larvas e pupas ao isolado de *M. anisopliae* na concentração de 10^7 con.mL⁻¹ ocasionou 37,7% e 38,3% de mortalidade, entretanto a 10^8 con.mL⁻¹ houve

100,0% de inviabilidade das larvas (MOCHI et al., 2009). Em outro estudo com dois isolados de *M. anisopliae*, Mochi et al. (2010) obtiveram 31,6% e 23,3% de inviabilidade pupal a 10^7 con.mL⁻¹ e 30,0% e 23,3% a 10^8 con.mL⁻¹. Com o fungo *B. bassiana* os dois isolados apresentaram 36,6% e 25,0% de mortalidade na concentração de 10^8 con.mL⁻¹, enquanto que o controle apresentou apenas 10,0%. Verificaram que estes dois fungos não apresentaram efeito sobre os adultos provenientes das pupas tratadas. Em contrapartida, o fungo *I. farinosa* foi o mais efetivo, pois um dos isolados causou 56,6% de mortalidade pupal na concentração de 10^8 con.mL⁻¹. Dentre os isolados testados, Lecuona et al. (2005) verificaram que o isolado Bb72 foi mais virulento para *M. domestica* na concentração de 1×10^8 conídios/mL, (97,0% de mortalidade), onde foi monitorada a emergência de adultos a partir da exposição das larvas. E Bernardi et al. (2006) obtiveram 48,0%, 56,0% e 68,0% de mortalidade, em comparação aos 8,0% de mortalidade, quando larvas de *M. domestica* foram imersas em suspensões fúngicas de *B. bassiana* na concentração de 10^5 a 10^7 con.mL⁻¹.

Poucos estudos sobre a utilização de agentes entomopatogênicos no controle biológico de *S. calcitrans* foram realizados e, segundo Skovgard e Steenberg (2002), pouca informação sobre a ocorrência natural destes fungos na mosca tem sido descrita.

Steinkraus e Kramer (1987) conseguiram transmitir experimentalmente, em baixas proporções, *Entomophthora schizophorae* de moscas domésticas às moscas dos estábulos. Melo et al. (2008) identificaram o fungo *P. corylophilum* como produtor da toxina citrinina em adultos de *S. calcitrans*. Skovgard e Steenberg (2002) verificaram a prevalência de fungos entomopatogênicos em moscas doméstica e em moscas dos estábulos, tendo isolado *Entomophthora muscae* em baixa prevalência (4,0%) em *S. calcitrans*, enquanto que em *M. domestica* alcançou 90,0%. Como estas duas espécies co-habitam o mesmo ambiente, estes autores relatam que esta relação favoreceria a ocorrência de infecção cruzada. Outros fungos foram isolados em baixa prevalência parasitando *S. calcitrans*, como *V. lecani* (0,5%) e *B. bassiana* (0,6%). Os autores conseguiram realizar a transmissão de *E. muscae* proveniente de cadáveres de *S. calcitrans* a *M. domestica*, a qual resultou em 50,0% de mortalidade, mas o inverso não foi alcançado, devido à dificuldade da manutenção da mosca dos estábulos em laboratório (Skovgard & Steenberg, 2002).

Isolados de *B. bassiana* provenientes de mosca doméstica, foram utilizadas por Watson et al. (1995) em larvas e adultos de *M. domestica* e em adultos de *S. calcitrans* em condições laboratoriais. Observaram que larvas de mosca doméstica (segundo instar) expostas a concentração 10^8 con.mL⁻¹, alcançaram a fase adulta com mortalidade mínima (16,0% para o isolado L90 e 20,0% para o P89), entretanto, na concentração de 10^{10} con.mL⁻¹ os isolados foram mais eficazes, com 56,0% e 48,0% de mortalidade, respectivamente. A mosca dos estábulos foi menos susceptível aos isolados P89 e L90, quando comparadas a mosca doméstica, pois somente suspensões com altas doses (10^8 con/cm³) foram capazes de eliminar 70,0% e 84,0% das moscas, enquanto que na mosca doméstica este valor foi superior a 90,0%. Segundo estes autores, a variação da mortalidade entre as duas moscas pode estar relacionada à diferença existente entre a composição da cutícula, que resultaria em diferente susceptibilidade à infecção fúngica.

Moraes et al. (2008) verificaram 100,0% de inviabilidade em dois métodos de exposição de ovos de *S. calcitrans*, utilizando a concentração de 2×10^8 con.mL⁻¹ de *M. anisopliae*. Entretanto, reduzidos percentuais de mortalidade foram observados quando larvas e pupas foram expostas ao mesmo fungo. Os autores sugerem que mecanismos de defesa podem se tornar ativos à medida que os estágios imaturos se desenvolvam, fazendo com que fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* sejam efetivos apenas em estágio inicial de desenvolvimento da mosca dos estábulos, quando utilizada elevada concentração conidial.

2.4 Inibição Microbiana Realizada por Artrópodes

Silva (2002) destaca o aumento de estudos relacionados ao sistema de defesa imunológica dos insetos, onde se permite avaliar suas estratégias antimicrobianas. Dunn (1986) aponta componentes como proteínas, lipídeos, hidrocarbonetos, difenóis, carboidratos, quitina e melanina produzidos com intuito de impedir a infecção microbiana. Os insetos são capazes de produzir proteínas de reconhecimento e inibidores de proteases, que participam das defesas humorais e estes têm sido identificados na hemolinfa dos insetos.

Smith e Grula (1981) averiguaram que fontes de carbono exógeno são necessárias para a germinação dos conídios e de nitrogênio para sustentar o crescimento hifal de *B. bassiana*. Glicose, N-acetilglicosamina, glicosamina, quitina, amido, lanolina, hidrocarbonetos de petróleo bruto e alguns ácidos graxos de cadeia longa são descritos como fontes de carbono para germinação dos conídios. A falta de certos nutrientes pode ser determinante para inibir o desenvolvimento e desempenho de *B. bassiana* sobre a cutícula do hospedeiro, como observado por Hunt et al. (1984) em *Dendroctonus ponderosae*. Os autores destacaram que somente foi observada significativa germinação conidial quando a hemolinfa do besouro ou o meio de cultura fúngica estavam presentes sobre a cutícula antes da exposição fúngica ou quando os besouros passaram previamente pelo processo de sonicação. Em contrapartida, os autores constataram que o extensivo crescimento de hifas errantes sobre a superfície dos besouros, estaria relacionado ao excesso de nutrientes disponibilizados artificialmente sobre a cutícula, e que desta forma, interfeririam nos estímulos desencadeados para a ocorrência da penetração.

Outro aspecto a ser abordado sobre mecanismos de defesa associados à mosca dos estábulos seria a presença de microrganismos produtores de substâncias antibióticas que contribuiriam para a ineficácia de alguns fungos entomopatogênicos (DILLON & DILLON, 2004). Na revisão realizada por Cohen (1987) foi descrito que certos antibióticos são efetivos fungicidas, porém pobres agentes controladores de insetos. Compostos naturais produzidos por actinomicetos são potentes inibidores da polimerização enzimática de quitina de fungos e insetos. Contudo, não é descrito se este efeito é observado na mosca dos estábulos. Polioxinas e nicomicinas são os maiores grupos de inibidores derivados de *Streptomyces* sp. e são utilizados comercialmente para o controle de fitopatógenos fúngicos em arroz, legumes e árvores frutíferas. A efetiva ação destes compostos sobre os fungos, sem que haja um efeito colateral sobre os insetos, está relacionado à natureza polar dos inibidores que restringe drasticamente a penetração através da epicutícula hidrofóbica do inseto. Quando ingeridos, estes componentes são susceptíveis a degradação no interior do canal alimentar do inseto, mas seu peso molecular relativamente alto impede a translocação através das membranas das células do intestino médio do inseto. Segundo o autor, aparentemente, os insetos não dispõem de um sistema de transporte ativo para di e tripeptídeos, como ocorre nas membranas celulares dos fungos.

Valipe et al. (2009) investigaram o mecanismo antimicrobiano do ácido caprílico como opção de tratamento para a dermatofilose. O ácido caprílico se ligaria aos aminoácidos aromáticos das proteínas de superfície, afetando a permeabilidade seletiva da membrana celular dos microrganismos, mas o mecanismo de ação ainda não é claro.

Os ácidos graxos livres: caprílico, valérico e nonanóico foram identificados na superfície das lagartas *Heliothis zea* e *Spodoptera fragiterda* e apresentaram atividade antimicrobiana contra *B. bassiana* (SMITH & GRULA, 1982). Lockey (1985) apontou em sua revisão que *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina* e *Sarcophaga bullata* apresentam ácidos graxos como constituintes da cutícula. Através da utilização de três concentrações decrescentes do ácido caprílico (2,0; 0,2 e 0,02%), Hunt (1986) observou a formação do halo

de inibição de *B. bassiana*. O efeito de ácidos graxos, orgânicos ou fenólicos foi avaliado sobre a germinação de conídios de *Metarhizium flavoviridae* por Barnes e Moore (1997). Foi observado que certos ácidos graxos de cadeia C₁₀ ou menores, incluindo ácido láctico, salicílico, caprílico e cáprico, ocasionaram inibição significativa na germinação conidial, quando utilizados em solução oleosa. Quando incorporados ao ágar, todos os ácidos de dez carbonos e menores apresentaram efeito inibitório, com exceção do ácido sebático e succínico.

James et al. (2003) verificaram que o aumento gradual na concentração de lipídeos cuticulares, obtidos com o extrato da cutícula de ninfas de *Bemisia argentifolii*, reduziu a germinação conidial de *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*. Este perfil também ocorreu quando utilizaram ácidos graxos sintéticos, sendo mais intenso em *B. bassiana*. Nos ensaios de exposição fúngica obtiveram menores percentuais de mortalidade após exposição de ninfas de quarto instar, quando comparadas as de segundo e terceiro instar, indicando que a mosca branca adquire tolerância ao parasitismo fúngico conforme seu desenvolvimento. Pouca germinação fúngica foi observada sobre a superfície dos ovos expostos aos dois fungos, mesmo estes apresentando 97,0% e 99,0% de viabilidade conidial, respectivamente. Os autores sugeriram que os lipídeos cuticulares apresentam efeito tóxico ou inibitório aos fungos estudados, pois quando semeados em meio de cultivo acrescido de lipídeos cuticulares, houve inibição ou redução de crescimento. Em contrapartida, a ausência destes lipídeos permitiu a germinação dos conídios. Foi sugerido que a espessa camada de lipídeos cuticulares produzidas pelas ninfas de *B. argentifolii* comprometeria a germinação dos esporos por toxicidade fungilítica ou fungioestática. Também relataram que esta camada funcionaria como uma barreira que impediria a interação dos fungos à matriz de quitina do exoesqueleto do inseto, evitando efetivamente o contato do conídio com nutrientes ou outros fatores que promoveriam a germinação.

Outras substâncias têm demonstrado potencial antimicrobiano como a quitosana, obtida da cutícula de larvas de *M. domestica*. Jing et al. (2007) observaram que as concentrações mínimas inibitórias das quitosanas variou de acordo com o tipo de bactéria e quitosana utilizada. Além disso, foi constatado que a quitosana causaria vazamento do conteúdo celular e desestabilizaria a parede celular bacteriana.

No estudo realizado por Vilcinskis e Wedde (1997), larvas pré-sensibilizadas com zimozane A ou com células inativadas aumentaram os níveis de inibidores de protease de *B. bassiana* na hemolinfa, porém não apresentaram decréscimo no percentual de mortalidade. O que se verificou foi um maior período de sobrevivência após inoculação com esporos do fungo. Foi observado que frações enriquecidas de larvas sensibilizadas atrasaram o crescimento fúngico em comparação com larvas não tratadas, sugerindo que o atraso na mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *B. bassiana* estaria relacionado aos elevados níveis de inibidores de protease. Os autores também ressaltaram que a forma não virulenta do isolado fúngico apresentou menor capacidade de liberação de proteases (50,0%) e sugeriram que a habilidade do inseto em liberar inibidores de proteases influenciaria diretamente a susceptibilidade aos fungos entomopatogênicos.

Russell e Dunn (1996) relataram a caracterização e purificação de peptídeos frente à infecção fúngica ou bacteriana de *Manduca sexta*. Segundo Hoffmann e Reichhart (1997) genes presentes no tecido gorduroso de insetos são codificados para a produção de peptídeos antimicrobianos como defensinas, cecropinas, drosomicinas, atacinas e dipterocinas. Os peptídeos antimicrobianos são parte das adaptações evolutivas que os insetos possuem para combater os entomopatogênicos (BULET & STÖCKLIN, 2005). Han et al. (1998) verificaram que larvas de *Drosophila* sp. infectadas por fungos entomopatogênicos desenvolvem resposta

imunológica adaptativa com a produção de peptídeos, entretanto, não são capazes de manter esta resposta.

As defensinas são peptídeos encontrados na hemolinfa de artrópodes expostos a infecções microbianas (COCIANCICH et al., 1993; JOHNS et al., 2001). Através da utilização de carrapatos de *Dermacentor variabilis*, previamente sensibilizados com *Borrelia burgdorferi*, Johns et al. (2001) verificaram que os peptídeos purificados da hemolinfa apresentaram 83,0% de similaridade com a defensina de escorpião. Estes peptídeos participaram na reação de defesa antibacteriana e possuem atividade anti-gram-positivos (COCIANCICH et al., 1993). Segundo Cociancich et al. (1993) as defensinas afetam a permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática de *Micrococcus luteus*, resultando na perda de potássio citoplasmático, parcial despolarização do interior da membrana, decréscimo de ATP citoplasmático e inibição da respiração celular. Os autores propunham que as defensinas dos insetos ocasionam alterações na membrana citoplasmática, resultando na formação de canais na membrana citoplasmática que inviabilizam o microrganismo. Candido-Silva et al. (2007) decodificaram o gene BhSGAMP-1 responsável pela produção de um peptídeo produzido apenas nas glândulas salivares do díptera (Sciaridae) *Bradysia hygida* que apresentou capacidade inibitória para *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Candida albicans* e que na superfície larval ocasionaria a inibição de microrganismos.

Hamilton et al. (2002) constataram que as defensinas do intestino de *S. calcitrans* aumentaram 40 vezes após ingestão de sangue e que o mesmo não foi observado quando forneceram solução de açúcar. Este aumento foi relacionado à função protetora das defensinas que previne o ataque bacteriano sobre o sangue estocado. Munks et al. (2001) verificaram que a família de genes de defensinas no intestino de adultos de *S. calcitrans* possui a função de proteger o sangue ingerido pela mosca contra o ataque microbiano, pois são muito estimulados na presença de sangue ingerido e não em solução de açúcar. Boulanger et al. (2002) observaram que peptídeos antimicrobianos, envolvidos em mecanismos imunes epiteliais no intestino de adultos de *S. calcitrans*, podem ser os primeiros determinantes no destino de uma infecção no inseto. O peptídeo identificado como estomoxina é expresso e secretado exclusivamente no intestino anterior de *S. calcitrans* e apresenta um amplo espectro de atividades que afetam o crescimento de microrganismos, como bactérias gram-positivas e negativas, fungos filamentosos e leveduras.

2.5 Bactérias Relacionadas às Moscas

Em um contexto ecológico, os microrganismos devem ser considerados como importantes componentes na biologia do inseto. De acordo com Dillon e Dillon (2004), a microbiota intestinal representa os aspectos da relação de mutualismo obrigatório entre os insetos e as bactérias para a produção de antibióticos contra seus patógenos. Castro et al. (2008) isolaram diferentes enterobactérias em segmentos da mosca dos estábulos que podem estar em condição de mutualismo, mantendo desta forma, uma interação não-patogênica com a mosca, como *Enterobacter amnigenus*, *Serratia odorífera*, *Serratia ficaria*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella hoshinae*, *Cedecea lapagei*, *Hafnia alvei*, *Erwinia quercina*, *Erwinia stewartii*. Dentre os isolados bacterianos, somente *C. lapagei* foi destacada como causadora de doença no carrapato *R. (B.) microplus*. Segundo os autores, a maioria das espécies é considerada ambiental e possivelmente a mosca *S. calcitrans* as adquiriu no meio de desenvolvimento dos estágios imaturos, ou ainda, quando na forma adulta. Destaca ainda, a importância sobre o conhecimento da sua capacidade de transmissão de agentes patogênicos, como o papel de algumas bactérias no desenvolvimento das fases imaturas ou no controle microbiano deste muscídeo.

Estudos mostram que a presença de bactérias ou seus metabólitos são essenciais para o desenvolvimento larval de moscas domésticas. Uma grande variedade de bactérias pode contribuir para o desenvolvimento de um substrato orgânico eficiente, desde que, segundo Schmidtman e Martin (1992), *Bacillus cereus* não esteja presente, pois inibe o desenvolvimento larval de *M. domestica*. Em estudo realizado por Zurek et al. (2000) com larvas de *M. domestica* coletadas em camas de peru e em silagem de milho, foram isoladas 11 e 14 espécies bacterianas do trato intestinal, respectivamente. A maioria dos isolados foi classificada como aeróbios facultativos capazes de realizar fermentação. A importância de bactérias durante o estágio larval foi avaliada em ensaios que utilizaram culturas puras de ambas as amostras. Verificaram que os isolados puros provenientes de larvas coletadas das camas de perus favoreceram muito mais a proliferação de moscas do que aqueles obtidos das larvas coletadas na silagem de milho, obtendo assim, maior número de moscas no meio em que foi semeado *Streptococcus sanguis*. Estes autores destacaram a importância destas bactérias, principalmente quando há a necessidade da produção de moscas domésticas em meio artificial de desenvolvimento.

Quando avaliada a sobrevivência de larvas de *S. calcitrans* em meio acrescido de culturas puras ou mistas de bactérias, Lysyk et al. (1999) verificaram que os meios que possuíam isolados de *Aeromonas* sp. ou *Serratia marcescens* observaram a morte das larvas de primeiro estágio após a deposição dos ovos. Em contrapartida, quando acrescentados os isolados de *Acinetobacter* sp., *Empedobacter breve*, *Flavobacterium odoratum* ou *E. coli*, as larvas completaram seu desenvolvimento. Maior percentual de sobrevivência foi obtido na associação de *Acinetobacter* sp. e *F. odoratum*, quando comparada a *E. coli* e *Escherichia breve*, porém foi, em média, 22,7% menor que a sobrevivência larval em cultura pura. Já a associação de *E. breve* e *F. odoratum* foi, em média, 21,6% mais alta que as culturas puras. Não houve diferença no desenvolvimento larval quando realizadas as associações de *Acinetobacter* sp. com *E. coli* ou *E. breve*, *E. coli* com *E. breve* ou *F. odoratum*. Os autores relatam que o período de desenvolvimento larval foi mais curto nas culturas mistas, quando comparada às culturas puras e que bactérias são necessárias para o desenvolvimento larval da mosca dos estábulos.

Outros resultados são observados quando adultos de *S. calcitrans* são infectados oralmente por *Aeromonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *S. marcescens*. Lysyk et al. (2002) constataram que o isolado selvagem de *Aeromonas* sp. foi mais patogênico aos adultos do que o re-isolado de moscas mortas. *Aeromonas* sp. e *S. marcescens* ocasionaram mortalidade das moscas após alguns dias após ingestão e *P. aeruginosa* somente 3 a 7 dias pós-exposição. Além disso, foi ressaltado que a mortalidade das moscas aumentou conforme o aumento da dose utilizada para todos os isolados bacterianos. Os autores correlacionaram a mortalidade causada por *Aeromonas* sp. a presença de enzimas que provocam α e β hemólise, enquanto que para *S. marcescens* foi associada a α hemólise, elastases e quitinases. Castro (2004) identificou as bactérias *B. thuringiensis* e *S. marcescens*, utilizadas no controle microbiano de artrópodes, em intestino e superfície externa de adultos de *S. calcitrans*.

Romero et al. (2006) obtiveram mais de 95,0% de ovos de *S. calcitrans* sobre substrato com microbiota bacteriana ativa, quando comparada ao esterilizado, sendo o isolado *Citrobacter freundii* responsável pela maior postura. Descrevem esta espécie como favorável ao desenvolvimento larval de *S. calcitrans*, mas em menores proporções, se comparada a *Serratia fanticola*. Relatam ainda que, as larvas não poderiam se desenvolver em substrato estéril natural ou artificial, pois estas são dependentes de uma microbiota natural simbiótica. Como descrito por outros autores (LYSYK et al., 2002), Romero et al. (2006) observaram que *S. marcescens* e *Aeromonas* sp. não contribuíram na postura e no desenvolvimento das larvas.

O crescimento e sobrevivência de estágios imaturos de *H. irritans* também são influenciados por diferentes bactérias. Perotti et al. (2001) verificaram que larvas de moscas dos chifres interromperam seu desenvolvimento quando mantidas em meio estéril de esterco bovino. Entretanto, a sobrevivência média foi de 74,0% em fezes não estéreis e variou de 4,0 para 53,0% em esterco com único isolado bacteriano. A sobrevivência larval foi mais elevada quando as larvas foram criadas em esterco com bactérias da família Pseudomonadaceae, Corynebacteriaceae, Micrococaceae e Bacillaceae e mais baixa quando criadas com Enterobacteriaceae e Microbacteriaceae. As pupas foram mais pesadas quando obtidas de meio acrescido de bactérias da família Flavobacteriaceae, seguido por Pseudomonadaceae e Corynebacteriaceae, pesando $4,9 \pm 0,08$ mg (bactérias gram-negativas) e $3,6 \pm 0,09$ mg (bactérias gram-positivas). Também foi obtido bom índice reprodutivo das moscas provenientes das larvas criadas em esterco não estéril, principalmente com Pseudomonadaceae e Corynebacteriaceae. Segundo os autores, parecem ser os grupos que melhor reúnem as necessidades nutricionais de larvas de *H. irritans* e destacam sua utilização como um complemento nos meios de criação desta mosca.

2.6 Teste de Difusão em Meio Sólido

O teste de difusão em meio de cultivo sólido é um método ágil que avalia o potencial inibitório de uma substância sobre um microrganismo (OLIVEIRA, 2000). Hunt (1986) verificaram a produção de substâncias inibitórias por *D. ponderosae* sobre a germinação de conídios de *B. bassiana*, através de discos de papel filtro estéreis impregnados com os extratos colocados sobre meios de cultura (Ágar de Extrato de Malte) semeados com *B. bassiana* para posterior visualização das zonas de inibição fúngica. A utilização do halo em meio de cultura sólido também foi aplicada para verificar o efeito inibitório de extratos, compostos ou óleos essenciais de diferentes plantas sobre a atividade de fungos de importância médica (MISSAU et al., 2006; MENEZES et al., 2009). Ensaio de zona de inibição realizados por Hamilton et al. (2002) confirmaram a presença de atividade antimicrobiana nos homogenatos de intestino da mosca dos estábulos.

Johns et al. (1998) comprovaram maior atividade antimicrobiana de frações da hemolinfa de carrapatos *D. variabilis* inoculados com a bactéria *Bacillus subtilis*, quando comparada a hemolinfa de carrapatos não sensibilizados. Através da visualização de zonas de inibição em meio de cultura em placa de Petri, os autores observaram halos de maior tamanho dos observados com a primeira hemolinfa e relacionaram esta ação antibacteriana a mecanismos de proteção acelulares, sugerindo que a hemolinfa do carrapato é constitutivamente antimicrobiana.

2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

De maneira geral, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação que permitem visualizar diferenças existentes entre os perfis cromatográficos de substâncias, detectar ou separá-los e caracterizar a composição química de uma diversidade de materiais. Esta técnica apresenta-se como alternativa viável, eficiente e rápida, quando comparada a métodos químicos e microbianos (NETO et al. 2003). Diferentes colunas podem ser acopladas, de acordo com o objetivo da separação. A coluna C18 de fase reversa possui ampla utilização. Ela pode ser empregada para a separação de carotenóides (NUNES & MERCADANTE, 2006), realizar análise dos ácidos biliares (YUN et al., 2003), determinar a atividade antimicrobiana de proteínas solúveis na hemolinfa (JOHNS et al., 1998; JOHNS et

al., 2001) e purificar peptídeos antimicrobianos, como defensinas (JOHNS et al., 2001) ou estomoxinas (BOULANGER et al., 2002).

2.8 Eletroforese Protéica e Enzimática

A eletroforese protéica e enzimática têm sido utilizada para diferentes fins, como na avaliação de enzimas ativas em eventos de defesa contra microrganismos (MOFFATT et al., 1995), na avaliação dos constituintes protéicos e enzimáticos na patogenicidade e infecção fúngica de insetos (ST. LEGER et al., 1996; SCREEN et al., 2001; XIA et al., 2002; NAHAR et al., 2004), evidenciar a existência de proteínas antimicrobianas na hemolinfa de carrapatos (JOHNS et al., 1998; JOHNS et al., 2001), como também comparar isozimas de diferentes populações de insetos, como *S. calcitrans* (JONES et al., 1987).

Johns et al. (1998) verificaram em gel de eletroforese a atividade de determinada fração da hemolinfa de carrapatos *D. variabilis* infectados com diferentes espécies bacterianas. Segundo os autores, as frações analisadas continham atividade antimicrobiana com um componente protéico essencial e uma fração proteica foi similar a uma lisozima de vertebrados.

Moffatt et al. (1995), através de estudos sobre a síntese e secreção de tripsina no intestino de *S. calcitrans*, com o uso de SDS-PAGE e zimograma, verificou a produção de 15 bandas. Foi observado que a tripsina é estocada como uma pró-enzima inativa, mas é secretada em uma forma totalmente ativa. Estudos com inibidores sugerem que o gatilho na síntese de tripsina ocorre imediatamente após a ingestão de sangue pela mosca. Em estudo realizado por Lehane et al. (1998), foi estimado que 24 serino proteases são encontradas no intestino de adultos da mosca dos estábulos e que estariam relacionadas ao ciclo digestivo do inseto. Estes autores verificaram a associação de uma defensina do intestino da mosca com uma nova serino protease. Com a utilização géis de gelatina em SDS-PAGE, Jordão et al. (1996) confirmaram que duas bandas formadas, a partir do material coletado da zona opaca de células intestinais de *S. calcitrans*, apresentaram atividade proteolítica e as descreveram como sendo as duas maiores formas de tripsinas produzidas e secretadas pela mosca.

No estudo da atividade das serino proteases em larvas de primeiro instar de *Oxysarcodexia thornax*, Cuervo et al. (2008) descreveram a expressão de múltiplas proteases ativas. A análise zimográfica do homogenato fresco das larvas revelou um completo perfil proteolítico. Os autores relataram que apesar da atividade ter sido detectada entre a pH 3,5 e 5,5, a maior atividade proteolítica foi observada entre pH 7,5 e 9,5. Além disso, as principais proteases foram classificadas como pertencentes à classe das serino proteases e a inativação de todas as atividades enzimáticas, por um inibidor específico, as classificou como serinoproteases similares a quimiotripsina.

Através da avaliação enzimática do intestino de larvas de *M. domestica*, Lemos e Terra (1991) verificaram que a lisozima produzida no tecido do intestino de larvas alimentadas com esterco é capaz de digerir eficientemente as bactérias presentes e que esta habilidade seria característica de Cyclorrapha. Segundo os autores, a lisozima do intestino possui elevada atividade em pH 3.5 e a das glândulas salivares em pH 6.0. Os autores afirmam que, tanto a lisozima quanto a quitinase estão ativas no intestino das larvas e que estas bactérias fazem parte de sua alimentação.

2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Alguns autores têm utilizado esta ferramenta para verificar mais detalhadamente os processos de adesão e penetração fúngica no hospedeiro (PEKRUL & GRULA, 1979;

BITTENCOURT et al., 1999; MOINO Jr. et al., 2002; CAMPOS et al., 2005; GARCIA et al., 2005; JARROLD et al., 2007; GARCIA et al., 2008), colonização e formação de lesão (GARCIA et al., 2004), avaliação do tempo necessário para ocorrer a adesão fúngica, formação do tubo germinativo, ramificações e engrossamento das hifas sobre o hospedeiro (MELO et al., 2007), comprovar a ineficácia de um fungo em parasitar determinado inseto (HUNT et al., 1984), avaliar o comportamento do hospedeiro na associação de inseticida químico e fungos entomopatogênicos (NEVES & ALVES, 2000) ou para determinar a morfogênese das características externas de larvas de primeiro estágio de *S. calcitrans* (AJIDAGBA et al., 1985).

Grodowitz et al. (1982) e Colwell e Kokko (1985) relataram a dificuldade em preparar larvas de dípteros para microscopia de varredura, pois quando utilizada as técnicas de fixação e desidratação habituais, há um considerável colapso da amostra e as características morfológicas tornam-se distorcidas, devido a reduzida penetração do fixador. Este resultado foi relacionado à estrutura extremamente mole das larvas e a cutícula impermeável à água. Por esta razão, Grodowitz et al. (1982) desenvolveram um método no qual são utilizadas duas soluções que ocasionam rápida penetração dos agentes de fixação em larvas de *S. calcitrans*. Outros métodos foram levantados por estes autores como a perfuração da cutícula, mas esta também ocasiona extravasamento da hemolinfa e colapso. A utilização de 2,2-dimetilpropano acidificado e heptano saturado com gluteraldeído têm demonstrado moderado sucesso, porém estas substâncias podem ser onerosas, difíceis de encontrar e até tóxicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização Experimental

A colônia de *S. calcitrans* foi mantida no Laboratório de Pesquisa de Dípteros Hematófagos na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e os ensaios com os isolados fúngicos e manutenção de suas colônias no Laboratório de Controle Microbiano, EPPWON, DPA, IV, UFRRJ. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada no Laboratório de Micotoxinas, DMIV, IV, UFRRJ, enquanto que as Eletroforeses Protéica e Enzimática foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, DPA, IV, UFRRJ. A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no setor de Microscopia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e na Plataforma Multiusuários de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ). Na EMBRAPA-Agrobiologia realizou-se a identificação bacteriana.

3.2 Estabelecimento e Manutenção da Colônia de *Stomoxys calcitrans*

A captura das moscas adultas de *S. calcitrans* foi realizada no Hospital Veterinário de Grandes Animais, IV, UFRRJ e no Departamento de Reprodução Animal (DRA) do Instituto de Zootecnia (IZ) da UFRRJ com auxílio de rede entomológica (BRITO, 2000). As moscas foram armazenadas em gaiolas plásticas de transporte (15cm X 15cm X 20cm) e identificadas segundo Furman e Cats (1982). Estas foram mantidas em gaiolas plásticas de criação (60 cm x 40 cm x 50 cm), onde se forneceu sangue bovino com citrato de sódio (0,38%) em almofada de gaze (BENIGNO, 1987; WATSON et al., 1995; MORAES, 2007) para fornecer um local adequado para alimentação e postura (BENIGNO, 1987; MELLO, 1989).

Diariamente os ovos foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo papel tipo filtro embebido com água destilada estéril e uma gota de sangue bovino citratado (0,38%). As larvas eclodidas foram mantidas em tubos de ensaio (200 mm X 25 mm de diâmetro) contendo dieta autoclavada composta por cana-de-açúcar (66g), farelo de trigo (25g), carne moída bovina (8g), bicarbonato de sódio (1g) e água destilada (127mL) para obtenção das pupas. Os tubos de ensaio permaneceram fechados com rolha de algodão hidrófobo revestido com tecido fino. As pupas foram transferidas para placas de Petri (9 cm) até a emergência dos adultos. Ovos, larvas e pupas permaneceram em câmara climatizada para BOD a 26°C ± 1 e 70 – 80% de umidade relativa (U.R.) (Moraes, 2007).

3.3 Manutenção dos Isolados de *Beauveria bassiana*

Para manutenção fúngica, os isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* foram semeados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (BDA, 39g/L) e extrato de levedura (EL) - 1%, em cabine biológica classe II (ALVES, 1998). As placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada para B.O.D. durante 15 dias a 25°C e 70-80% U.R., em ausência de luz para propiciar o desenvolvimento fúngico e conidiogênese.

Os isolados CG 138 (Recife – PE) e CG 228 (Brasília, DF) foram isolados previamente de coleópteros da família Curculionidae e Chrysomelidae, respectivamente, enquanto o isolado ESALQ 986 (Piracicaba, SP) foi isolado de carrapato da família Ixodidae e mantidos pelo Laboratório de Controle Microbiano.

3.4 Ensaios Biológicos

Três métodos de exposição fúngica foram utilizados para avaliação da mortalidade dos estágios imaturos e do percentual de emergência de adultos de *S. calcitrans*.

3.4.1 Elaboração das suspensões fúngicas

Para o preparo das suspensões fúngicas, os isolados foram removidos das placas de Petri com auxílio de lâmina de bisturi, suspensos em tubos plásticos tipo Falcon (50 mL) contendo solução estéril de água destilada e Tween 80 (0,01%) e agitados em Vortex por dois minutos. As concentrações de 2×10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios.mL⁻¹ foram obtidas através da contagem em Câmara de Neubauer (MANIANIA, 1994; BARSON et al., 1994; ALVES, 1998; SENNA-NUNES et al., 2002a). A média da contagem por campo (n) foi multiplicada por um fator fixo ($n \times 4 \times 10^6$), o que determinou o número de conídios existentes na suspensão (ALVES, 1998).

3.4.2 Primeiro método de exposição fúngica

Para a realização deste ensaio, os estágios imaturos de *S. calcitrans* foram imersos por dois minutos em placas de Petri contendo suspensões fúngicas nas concentrações 2×10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios.mL⁻¹ dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* (MORAES et al. 2008). Em seguida, as suspensões foram retiradas com auxílio de uma seringa hipodérmica, e os estágios imaturos transferidos para placas de Petri contendo papel para filtro embebido com 3 mL de água destilada estéril (SENNANUNES et al. 2002a) e três gramas da dieta autoclavada composta por cana-de-açúcar (66g), farelo de trigo (25g), carne moída bovina (8g), bicarbonato de sódio (1g) e água destilada (127mL) (adaptado por Moraes 2007). Diferentemente dos ovos e das larvas, as pupas foram imersas nas suspensões supracitadas dos isolados CG 138 e CG 228 em tubos tipo Falcon (50 mL) e mantidas em placas de Petri sem dieta.

Todas as placas de Petri foram fechadas com parafilm e que foi perfurado com agulha hipodérmica. Mesmo procedimento foi realizado para os grupos controle, sendo os estágios imaturos imersos apenas no diluente (água destilada estéril e Tween 80 - 0,01%).

Nos ensaios de exposição fúngica foram utilizados grupos compostos por 80 ovos de *S. calcitrans*, com menos de 24 horas de postura, para cada concentração do isolado de *B. bassiana*, enquanto que, nos ensaios com larvas os grupos possuíam 30 larvas, com 10 dias de desenvolvimento a partir da postura; e nos experimentos com as pupas, foram formados grupos com 32 pupas com 14 dias de desenvolvimento a partir da postura.

A contagem das larvas provenientes dos ovos foi realizada no quinto dia após exposição fúngica. As pupas e as moscas originárias das larvas desafiadas com os isolados fúngicos foram contadas dez e 20 dias após os ensaios de exposição das larvas, respectivamente. A contagem das moscas emergidas nas placas de Petri, onde as pupas expostas foram armazenadas, foi realizada no décimo dia após ensaio fúngico.

O primeiro método de exposição fúngica foi utilizado para que os estágios imaturos permanecessem em contato com os conídios durante o período de imersão, e ainda, permitir que as larvas ingerissem os conídios dos três isolados fúngicos.

3.4.3 Segundo método de exposição fúngica

Grupos formados por 80 ovos, com menos de 24 horas de postura e grupos formados por 30 larvas, com 10 dias de desenvolvimento a partir da postura, foram imersos por dois minutos em 0,5 mL das suspensões dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana*, na concentração de 2×10^8 conídios.mL⁻¹. Em seguida, os grupos de ovos e de larvas foram transferidos com as suspensões fúngicas, para as placas de Petri contendo a dieta estéril (3g) e papel filtro previamente embebido com 2,5 mL da respectiva suspensão. Ovos e larvas dos grupos controle foram imersos em 0,5 mL do diluente e transferidos para placas de Petri, contendo papel filtro embebidas com 2,5 mL do mesmo (água destilada estéril e Tween 80 – 0,01%) e dieta (3g). Todas as placas foram fechadas com parafilm e furadas com agulha hipodérmica.

As larvas provenientes dos ovos expostos foram contadas cinco dias após ensaio, enquanto que, as pupas e as moscas formadas após os ensaios de exposição das larvas foram contadas dez e 20 dias, respectivamente.

Neste método de exposição fúngica, a imersão nas suspensões fúngicas e a adição das suspensões no papel filtro tiveram como objetivo proporcionar um maior período de exposição dos estágios imaturos aos isolados fúngicos até a ocorrência da metamorfose, e ainda, permitir a ingestão dos conídios pelas larvas.

3.4.4 Terceiro método de exposição fúngica

Neste método de exposição fúngica, grupos formados por 80 ovos de *S. calcitrans* foram depositados sobre a dieta (150g em becker de 600 mL) descrita por Christmas (1978) e adaptada por Moraes (2007), juntamente com 10 mL das suspensões dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986, nas concentrações de 2×10^8 , 10^7 e 10^6 conídios.mL⁻¹, que foram aspergidas com auxílio de um borrifador plástico. Grupos formados por 30 larvas e 30 pupas foram expostos apenas aos isolados CG 138, CG 228 nas mesmas concentrações fúngicas. Ovos, larvas e pupas dos grupos controle foram aspergidos apenas com diluente composto por água destilada estéril e espalhante adesivo (Tween 80 – 0,01%). Em seguida, os recipientes foram cobertos com tecido de algodão (CHRISTMAS, 1978) e abrigados em local protegido da irradiação solar direta e da chuva, permitindo a exposição às condições naturais de temperatura e umidade. Para aferição diária da temperatura e umidade ambiental foi utilizado termohigrômetro digital. O Isolado ESALQ 986 foi utilizado para confirmação do efeito observado com os outros dois isolados. A contagem de moscas emergidas foi realizada 30 dias após exposição fúngica dos três estágios imaturos.

Neste método de exposição fúngica, a aspersão das suspensões fúngicas sobre a dieta e estágios imaturos teve como objetivo proporcionar um maior período de exposição dos estágios imaturos aos isolados fúngicos até a emergência dos adultos, e ainda, permitir a ingestão dos conídios pelas larvas.

3.4.5 Viabilidade fúngica

A viabilidade conidial foi realizada através da inoculação de 10 µL das suspensões em placa de Petri (BDA e EL) e após 24 horas foi realizada a contagem dos conídios germinados e não germinados, conforme Alves (1998).

3.4.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados duas vezes e em dias diferentes para maior confiabilidade dos dados. Os percentuais relacionados ao efeito dos isolados fúngicos foram determinados pelo ajuste da mortalidade natural dos controles utilizando a fórmula de Abbott (1925). A mortalidade de ovos, larvas e pupas, bem como o percentual de emergência de adultos foram avaliados pelo Teste de Qui-quadrado (Bioestat 4.0) com 95% de significância (Sampaio, 2002).

3.5 Análise de Muco e Macerado de Larvas de *Stomoxys calcitrans*

Devido aos resultados obtidos nos ensaios de exposição fúngica descritos anteriormente, novas metodologias foram necessárias para indicar ou comprovar a presença de atividade antimicrobiana das larvas de *S. calcitrans*, que afetaram o desempenho entomopatogênico dos isolados utilizados.

3.5.1 Exposição fúngica de larvas de *Stomoxys calcitrans*

Grupos formados por nove larvas de *S. calcitrans* com nove dias de desenvolvimento foram imersos em 0,5 mL da suspensão fúngica na concentração de 2×10^8 con.mL⁻¹ dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* durante dois minutos. Em seguida, larvas e suspensões foram transferidas para placas de Petri contendo dieta (3g) e papel filtro previamente embebido com 2,5 mL da respectiva suspensão. Larvas do grupo controle foram imersas em 0,5 mL do diluente (água destilada estéril e Tween 80 – 0,01%) e transferidas para placas de Petri contendo papel filtro embebido com 2,5 mL do diluente e dieta (3g). Todas as placas foram fechadas com parafilm e furadas com agulha hipodérmica e incubadas a $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, 70-80% UR.

Para confirmação da viabilidade fúngica, 10 µL de cada suspensão fúngica dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* foram inoculados em placas de Petri contendo o meio (BDA + EL), e após 24 horas foi realizada a contagem dos conídios germinados e não germinados, conforme Alves (1998).

3.5.2 Obtenção de muco de larvas de *Stomoxys calcitrans*

Após três dias de incubação, as larvas dos grupos expostos a cada isolado fúngico ou diluente (controle) foram retiradas das placas, lavadas em água destilada estéril e colocadas em tubos de criogênicos graduados estéreis (1,5 mL), onde permaneceram por uma hora para produção de muco. Em seguida, as larvas foram retiradas e adicionou-se 900 µL de tampão fosfato de sódio - PBS (0,1M; NaCl 1,5M; pH 7,4) estéril resfriado. Todo procedimento foi realizado em cabine biológica classe II e as amostras manipuladas em gelo. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para evitar a degradação do material.

3.5.3 Obtenção de macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans*

A exemplo do que foi realizado para obtenção de muco, larvas dos grupos expostos a cada isolado fúngico ou diluente foram retiradas das placas, lavadas em água destilada estéril e depositadas em tubos estéreis de microcentrifugação graduados (1,5 mL). Estas foram maceradas com bastão cônico e homogeneizadas com 900 µL de PBS (0,1M; NaCl 1,5M; pH

7,4) estéril resfriado. O procedimento de manipulação e armazenamento foi o mesmo utilizado no item 3.5.2.

3.5.4 Teste de difusão em meio sólido

3.5.4.1 Teste de difusão em meio sólido com cloranfenicol

Dez microlitros da suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 con.mL⁻¹ dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 foram utilizados para que o intenso crescimento fúngico não sobreponha a formação do halo de inibição fúngica. As suspensões foram adicionadas sobre as placas de Petri contendo meio BDA (39g/L), E.L. (1%) e Cloranfenicol (500mg/L), e em seguida, espalhados homogeneamente com *swab* estéril. Dois discos de papel filtro (6mm de diâmetro) impregnados com cloranfenicol (500mg/L), autoclavados (120°C/ 20min) e secos em forno Pasteur (100°C), foram imersos no muco das larvas previamente expostas e não expostas aos isolados fúngicos e colocados em cada placa semeada. Mesmo procedimento foi realizado para as amostras do macerado. As placas foram incubadas por três dias em câmara climatizada para B.O.D. ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 70 - 80% U. R.) e a zona de inibição fúngica foi verificada no segundo e terceiro dia após realização do experimento (HUNT, 1986; OLIVEIRA, 2000; JOHNS et al., 1998). O teste foi realizado duas vezes em dias diferentes para confiabilidade dos resultados.

3.5.4.2 Teste de difusão em meio sólido sem cloranfenicol

Dez microlitros da suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 con.mL⁻¹ dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 foram adicionados sobre as placas de Petri contendo BDA (39g/L), E.L. (1%), e em seguida, espalhados homogeneamente com *swab* estéril. Dois discos de papel filtro (6mm de diâmetro), autoclavados (120°C/ 20min) e secos em forno Pasteur (100°C) foram imersos no muco das larvas previamente expostas e não expostas aos isolados fúngicos e colocados em cada placa semeada. Mesmo procedimento foi realizado para as amostras de macerado. As placas foram incubadas por três dias em câmara climatizada para BOD ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 70 - 80% U. R.) e a zona de inibição fúngica e crescimento bacteriano foram observados no segundo e terceiro dia após realização do experimento (HUNT, 1986; OLIVEIRA, 2000; JOHNS et al., 1998). O teste foi repetido duas vezes em dias diferentes para confiabilidade dos resultados.

3.5.4.3 Isolamento e identificação bacteriana

O isolado bacteriano proveniente do macerado e muco de larvas de *S. calcitrans* foi semeado em placa de Petri contendo Ágar Infuso de Cérebro e Coração (BHI) e mantido em câmara climatizada para BOD na temperatura de 27°C, 70-80% UR por até 48 horas. Após o crescimento bacteriano, as placas foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

Para identificação bacteriana foram observadas características macroscópicas e microscópicas, como aspecto da colônia, concavidade, coloração, bordos e caracterização celular. Também foi realizada a identificação bacteriana através da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a amplificação do fragmento da região 16S DNAr, foi utilizada a combinação de iniciadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (1538-1519) (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') (WANG et al, 1996). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de

amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 93°C por 45 seg., uma etapa de anelamento 62°C por 45 seg. e uma etapa de extensão a 72°C por 2 min. Depois de 35 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 min. O produto da PCR amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1% submetido a uma voltagem de 100 V por 2 horas. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5 mg.L⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®). O produto da amplificação foi avaliado pela comparação com um marcador molecular de 1 Kb ladder (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA).

Os produtos de amplificação da região 16S DNAr foram purificados com uma reação de 8 µL de NaCl 5M, 40 µL de polietilenglicol 8000 22 % e 32 µL do material amplificado. A mistura foi incubada a 4°C durante a noite, e posteriormente centrifugada a 14000 rpm por 30 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70 %. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 4°C por 15 min, secado ao ar e ressuscitado em 20 µL de água milli-Q esterilizada.

Visando verificar a qualidade de material amplificado e estimar a concentração para posterior reação de sequenciamento, o produto da purificação foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TAE 1 X, submetidos a uma voltagem de 50 V por 4 horas. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5 mg.L⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®). Os produtos da digestão foram avaliados pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA).

Para o sequenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos foram utilizados 300 ng dos produtos de PCR purificados, 5,0 µM dos iniciadores (Quadro 1), TE Dynamics Kit (Amersham Biosciences) e água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen Co.) para um volume final de 20 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). A amplificação constituiu-se de 30 ciclos com uma etapa de desnaturação a 95°C por 20 seg., uma etapa de anelamento 50°C por 15 seg. e uma etapa de extensão a 60°C por 1 min. Posteriormente foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 min. Em seguida, as amostras foram precipitadas adicionando-se 1,0 µL de acetado de amônio 7,5M e 27,5 µL de etanol 70% procedendo-se uma incubação a 4°C durante a noite. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min. a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 150 µL de etanol 70% e centrifugado 14000 rpm por 5 min. a 4°C. As amostras foram secas ao ar, e ressuscitadas em 7,5 µL de tampão de corrida e analisadas em sequenciador automático MEGA BACE 1000 (Amersham Biosystem).

A montagem das seqüências contíguas, foi realizada a partir das seqüências diretas e reversas utilizando-se os programas PHRED/PHRAP ou CAP3/CONSED em ambiente

Quadro 1. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr do isolado bacteriano.

Iniciadores	Seqüência (5'→3')	Referência
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	FURUSHITA et al., 2003
108r	CAGATTCCCACGCGTTACGC	LEYS et al., 2004
Amp2	AAGGAGGTGATCCARCCGCA	WANG et al., 1996
420r	TTACAACCCTAAGGCCTTC	LEYS et al., 2004
16S1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1110r	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	SOARES-RAMOS et al., 2003

Linux, com a criação dos diretórios, execução do script “phredPhrap”, chamada de bases e atribuição de qualidades, montagem das sequências contíguas, edição das montagens.

As sequências contíguas foram obtidas através da montagem das seqüências parciais feitas a partir dos oligonucleotídeos iniciadores para o sequenciamento da fita direta e dos oligonucleotídeos iniciadores para o sequenciamento da fita reversa do DNA.

3.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

As amostras de muco e macerado das larvas de *S. calcitrans* expostas aos isolados fúngicos ou ao diluente, assim como as amostras das suspensões fúngicas dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 foram centrifugadas (centrífuga refrigerada - 10.000 rpm, 10 min., 4°C) para a separação e posterior utilização do sobrenadante. Dez microlitros de cada amostra foram aplicados em uma coluna de fase reversa (Microsorb, 250 x 4,6 mm). Foi utilizado um sistema isocrático (ácido trifluoroacético a 0,1% em água destilada) com fluxo de 0,6 mL/min e a detecção dos picos foi realizada a 220 nm. Para cada amostra foi necessário um período máximo de 30 minutos para a visualização de todos os picos (JOHNS et al., 1998; JOHNS et al., 2001; BOULANGER et al., 2002).

O perfil cromatográfico das suspensões utilizadas nos ensaios de exposição das larvas foi realizado com o intuito de verificar se existiriam picos similares entre os isolados e o macerado ou muco das larvas expostas aos fungos. Os tempos de retenção do diluente e do tampão PBS foram avaliados para não afetar a avaliação dos perfis.

3.5.6 Eletroforese

3.5.6.1 Eletroforese protéica

A espectrofotometria do macerado e muco de larvas expostas aos isolados fúngicos ou diluente, foi realizada através do método de Lory modificado (MARKWELL et al., 1978), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Para a avaliação protéica do macerado das larvas previamente centrifugadas (10.000 rpm/10 min.), se realizou a extração protéica através da precipitação ácida das proteínas. Em tubos estéreis de microcentrifugação foram adicionados 28 µL do macerado das larvas e 5,6 µL do ácido tricloroacético - TCA (100%), mantendo-se a proporção de 100 µL amostra: 20 µL TCA. Estes foram agitados e permaneceram em repouso durante 10 minutos em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm em centrífuga refrigerada (4°C) e o sobrenadante desprezado. Nos precipitados foram acrescentados 30 µL de acetona gelada (-18°C), repetindo-se a agitação, centrifugação e descarte do sobrenadante. Este processo de lavagem em acetona foi realizado duas vezes. No precipitado final foi adicionado 28 µL do tampão de amostra. Realizou-se agitação até que a amostra se tornasse homogênea (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

As amostras de muco das larvas foram previamente centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm em centrífuga refrigerada (4°C) e o sobrenadante desprezado. Em tubos estéreis de microcentrifugação foram adicionados 100 µL da amostra de muco precipitado e 20 µL do tampão de amostra. Estes foram agitados até que a amostra se tornasse homogênea para aplicação de 60 µL/poço.

Realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) em placa fina vertical (kit ensaio BioRad, Protein, BioRad, Richmond, VA), tampão de corrida (pH 8,3), 100 volts para o gel de empacotamento e 220 volts para o gel de corrida, de acordo com Sambrook e Russell (2001) e Johns et al. (2001). Para

comparação das amostras de macerado e de muco, foi utilizado 10µL/poço do marcador de peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards, Brad Range (catálogo 161-0318) da BIO-RAD). Para visualização das bandas proteicas, das amostras de macerado e muco, foi realizada coloração pela prata (SAMBROOK; RUSSEL, 2001)

3.5.6.2 Avaliação da atividade proteolítica por eletroforese (zimografia)

A avaliação do perfil proteolítico do macerado e muco de larvas sensibilizadas aos isolados fúngicos e do grupo controle, foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) e gelatina em placa fina vertical (kit ensaio BioRad, Protein, BioRad, Richmond, VA) e coloração com Comassie Blue (JOHNS et al. 2001; SAMBROOK & RUSSELL, 2001; CUERVO et al., 2008).

No zimograma das amostras de muco, 50 µL das amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, 30 µL do sobrenadante foi descartado, e 20 µL do tampão de amostra sem mercaptoetanol foi adicionado e homogeneizado. Foram utilizados 100 V para o gel de empacotamento e 220 V para o gel de corrida a 12% de gelatina. Após corrida, onde foram aguardados 20 minutos após a saída do corante do gel, os géis foram lavados duas vezes por 30 minutos em solução de Triton X-100 (2,5%) e mantidos por 16 horas em solução tampão de acetato de sódio (0,1M – pH 4.5), fosfato de sódio (0,1M – pH 6.5), Tris/HCl (0,1M – pH 8.5) ou Tris/HCl (0,1M – pH 10.0), corados por duas horas com Comassie Blue e lavados em solução de água e etanol (descoloração lenta) até a visualização das bandas digeridas.

Na avaliação das amostras de macerado, foram retirados 5 µL de cada amostras e adicionou-se 5 µL do tampão fosfato de sódio e 10 µL do tampão de amostra sem mercaptoetanol, que foram homogeneizados. Como as amostras foram diluídas, não houve necessidade de centrifugação, pois a este procedimento fazia com que o material do fundo dos tubos de centrifugação permanecessem insolúveis quando adicionada a solução tampão. Foram utilizados 100 V para o gel de empacotamento e 200 V para o gel de corrida a 8% de gelatina. Após corrida, onde foram aguardados 20 minutos após a saída do corante do gel, estes foram lavados duas vezes e por 30 minutos em solução de Triton X-100 (2,5%) e mantidos por 16 horas em solução tampão de acetato de sódio (0,1M – pH 4.5), fosfato de sódio (0,1M – pH 6.5), Tris/HCl (0,1M – pH 8.5) ou Tris/HCl (0,1M – pH 10.0), corados por duas horas com Comassie Blue e lavados em solução de água e etanol (descoloração lenta) até a visualização das bandas digeridas.

3.5.6.3 Preservação dos géis

Para preservação dos géis de eletroforese estes foram imersos em solução secante na proporção de 40 mL de metanol, 3 mL de glicerol e 57 mL de água destilada. Os géis foram mantidos entre duas folhas de celofane, previamente lavadas com a solução secante, e depositados sobre placas de vidro para que todas as bolhas de ar pudessem ser retiradas. Após secagem, os géis com celofane foram armazenados em envelopes de papel.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura de Larvas de *Stomoxys calcitrans*

3.6.1 Exposição fúngica de larvas de *Stomoxys calcitrans*

Larvas de *S. calcitrans*, com nove dias de desenvolvimento, foram imersas por dois minutos em 0,5 mL das suspensões na concentração de 2×10^8 conídio.mL⁻¹ do isolado CG

138 de *B. bassiana*. Em seguida, todo conteúdo foi transferido para placa de Petri contendo dieta (3 g) e papel filtro previamente embebido com 2,5 mL da respectiva suspensão. As placas foram fechadas com parafilm e furadas com agulha hipodérmica.

Para confirmação da viabilidade fúngica, 10 µL da suspensão fúngica do isolado CG 138 de *B. bassiana* foi inoculada em placa de Petri (BDA e EL) e após 24 horas foi realizada a contagem dos conídios germinados e não germinados, de acordo com Alves (1998).

3.6.2 Preparação das larvas de *Stomoxys calcitrans* para microscopia eletrônica de varredura

Grupos formados por seis larvas foram retirados da placa de Petri nos tempos 0, 2, 15, 24, 48, 72 e 96 horas e fixadas por 30 segundos em solução “super skipper”, lavadas por imersão e mantidas por 24 horas em “solução de Carl’s”, conforme Grodowitz et al. (1982). Duas larvas também foram retiradas em cada tempo para visualização dos conídios sobre a superfície larval antes e após o processo de fixação, através da utilização de lâmina e lamínula, azul de algodão e microscópio óptico de luz no aumento de quatro, 10 40 e 100 vezes (Alves, 1998).

As larvas foram desidratadas em série etanólica, onde permaneceram por 15 minutos em solução resfriada de 30, 50, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 100 e 100%. Em seguida, foi realizado o processo de secagem em ponto crítico - CO₂ e metalização (10 miliamperes/90 segundos). Em microscópio eletrônico de varredura convencional Joel-JSM-JEM 1011, as seis larvas de cada grupo foram observadas e fotografadas com objetivo de confirmar se os conídios do isolado CG 138 de *B. bassiana* encontram-se sobre a superfície das larvas e verificar o desenvolvimento das estruturas de fixação e penetração fúngica (GRODOWITZ et al., 1982).

Similar ao utilizado por Dedavid et al. (2007), larvas sem tratamento e larvas sonicadas foram utilizadas para comparação com as larvas expostas ao isolado fúngico nos tempos descritos acima. No processo de sonicação, as larvas foram lavadas em água destilada estéril. Em seguida, permaneceram por três períodos de 30 segundos a 20 KHz (Disruptor de Célula Ultra-Sônico – Unique R2D091109) em 10 mL de solução PBS (0,1M; NaCl 1,5M; pH 7,4) estéril resfriado. As larvas não expostas ao fungo, também passaram pelos processos de fixação, desidratação, ponto crítico – CO₂ e metalização, que foram realizados nas larvas dos grupos expostos ao isolado CG 138.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Beauveria bassiana*

Os isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* foram selecionados para os ensaios fúngicos, a partir dos estudos realizados por Fernandes (2007) e Fernandes et al. (2009), onde foi avaliada a viabilidade conidial após exposição a diferentes temperaturas (5°C e 45°C) e à radiação UV-B, pois os fatores ambientais são limitantes na utilização destes agentes no controle biológico de artrópodes (SMITS et al., 2003). Os autores verificaram que os três isolados apresentaram elevada tolerância à radiação UV-B e as temperaturas de 45°C (uma e duas horas) e 5°C (15 dias), com exceção do isolado ESALQ 986 que foi menos tolerante a temperatura mais elevada.

4.2 Ensaios Biológicos

4.2.1 Primeiro e segundo método de exposição fúngica

No primeiro método de exposição fúngica (Figura 1), foram obtidos 27,5% e 37,5% de inviabilidade de ovos expostos ao isolado CG 138 e 36,2% e 32,5% dos expostos ao isolado CG 228, na concentração 2×10^8 con.mL⁻¹ (30,0 e 32,5% controle). Menores percentuais de mortalidade foram alcançados quando os ovos foram imersos nas suspensões do isolado ESALQ 986 (17,5% e 28,7%), entretanto, não diferiram dos 16,2% e 15,0% de mortalidade dos grupos controle (Tabela 1). Estes resultados diferiram dos descritos por Moraes et al. (2008), que obtiveram 100,0% de inviabilidade dos ovos de *S. calcitrans* expostos ao fungo *M. anisopliae* pelo método de imersão com mesma concentração fúngica e 96,2% na concentração 2×10^7 con.mL⁻¹. Não foi obtida diferença significativa entre os grupos expostos ao fungo *B. bassiana* em todas as concentrações fúngicas utilizadas e os do grupo controle.

Senna-Nunes et al. (2002a) realizaram metodologia similar da utilizada no primeiro método de exposição das larvas de *S. calcitrans*. Os autores verificaram que as larvas de *M. domestica* não foram afetadas por *A. flavus* quando comparadas aos grupos controle, porém, diferença significativa foi obtida quando utilizado dois isolados de *P. corylophilum* nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 con.mL⁻¹. De acordo com Mochi et al. (2009), os fungos *B. bassiana* e *I. farinosa* não foram patogênicos para larvas de *H. irritans*. A exposição de suas larvas e pupas ao isolado de *M. anisopliae* na concentração de 10^7 con.mL⁻¹ ocasionou 37,7% e 38,3% de mortalidade, entretanto a 10^8 con.mL⁻¹ houve 100,0% de inviabilidade das larvas.

Mesmo no segundo método de exposição, onde ovos e larvas permaneceram em contato com os isolados fúngicos (2×10^8 con.mL⁻¹) até o momento da leitura, e ainda que tenha sido observada a ingestão dos conídios (Figura 2), não se verificaram alterações comportamentais, mumificação proliferação fúngica sobre os estágios imaturos ou aumento significativo dos percentuais de mortalidade. Foi observado nos dois métodos de exposição que os isolados fúngicos utilizados no estudo não tiveram efeito deletério sobre os estágios imaturos, pois se verificou menores percentuais de mortalidade dos grupos tratados, quando comparados ao controle (Tabela 1 e 2).

Os resultados obtidos no presente estudo com o segundo método de exposição de ovos diferiram dos alcançados por Moraes et al. (2008) que utilizaram *M. anisopliae* com metodologia similar de exposição. Estes autores verificaram 100,0% de inviabilidade dos ovos expostos às concentrações 2×10^8 e 10^7 conídios.mL⁻¹. O fato de *M. anisopliae* ocasio-

Tabela 1 - Percentual de mortalidade de estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans* imersos em suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 ou ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* pelo primeiro método de exposição.

	Primeiro Ensaio						Segundo Ensaio					
	Ovo*		Larva*		Pupa*		Ovo*		Larva*		Pupa*	
	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)
Controle	30,0	0	26,6	0	15,6	0	32,5	0	16,6	0	21,8	0
	<u>CG 138</u>						<u>CG 138</u>					
2 x 10 ⁵ con.mL ⁻¹	10,0	-28,2	26,6	0	25,0	11,1	20,0	-18,5	26,6	12,0	25,0	4,0
2 x 10 ⁶ con.mL ⁻¹	26,2	-5,3	30,0	4,5	37,5	25,9	32,5	0	43,3	32,0	18,7	-3,9
2 x 10 ⁷ con.mL ⁻¹	20,0	-14,2	40,0	18,1	9,37	-7,4	35,0	3,7	43,3	32,0	21,8	0
2 x 10 ⁸ con.mL ⁻¹	27,5	-3,57	30,0	4,5	25,0	11,1	37,5	7,4	40,0	28,0	25,0	4,0
	<u>CG 228</u>						<u>CG 228</u>					
2 x 10 ⁵ con.mL ⁻¹	37,5	10,7	23,3	-4,5	18,7	3,7	37,5	7,4	16,6	0	37,5	20,0
2 x 10 ⁶ con.mL ⁻¹	36,2	-8,9	6,6	-27,2	15,6	0	38,7	9,2	6,6	-12,0	31,2	12,0
2 x 10 ⁷ con.mL ⁻¹	35,0	7,1	16,6	-13,6	18,7	3,7	10,0	-33,3	23,3	8,0	15,6	-8,0
2 x 10 ⁸ con.mL ⁻¹	36,2	8,9	30,0	4,5	25,0	11,1	32,5	0	33,3	20,0	12,5	-11,9
	<u>ESALQ 986</u>						<u>ESALQ 986</u>					
Controle	16,2	0	6,6	0	-	-	15,0	0	0	0	-	-
2 x 10 ⁵ con.mL ⁻¹	15,0	-14,9	3,3	-3,6	-	-	30,0	17,6	6,6	6,7	-	-
2 x 10 ⁶ con.mL ⁻¹	23,7	8,9	3,3	-3,6	-	-	21,2	7,3	3,3	3,3	-	-
2 x 10 ⁷ con.mL ⁻¹	21,2	6,0	13,3	7,1	-	-	11,2	-4,4	13,3	13,3	-	-
2 x 10 ⁸ con.mL ⁻¹	17,5	1,5	13,3	7,1	-	-	28,7	16,2	13,3	13,3	-	-

M = percentual de mortalidade; MC = Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott. - = Não avaliado. * Não houve diferença estatística entre os percentuais de mortalidade dos grupos tratados e controle em cada estágio imaturo de *Stomoxys calcitrans* avaliado.

nar mortalidade satisfatória de ovos pode estar relacionado à ativação de determinadas enzimas ou peptídeos do próprio fungo (GABRIEL, 1968; ALVES, 1998). Segundo Watson et al. (1995) a mosca dos estábulos pode ter desenvolvido algum método adaptativo para tolerar a presença e o parasitismo de certos microrganismos e que isto estaria relacionado ao ambiente extremamente contaminado onde seus estágios imaturos se desenvolvem.

O segundo método de exposição foi adotado para proporcionar um ambiente com elevado nível de infestação fúngica até as placas de Petri serem avaliadas, e mesmo assim, não foi observado um aumento no percentual de mortalidade que resultasse em diferença estatisticamente significativa com os grupos controle, como visto na Tabela 2 (Figura 3 e 4). Ao invés disso, foi observada redução dos percentuais de mortalidade com todos os isolados, tanto em ovos como em larvas. Deve-se destacar que estas condições não seriam encontradas em ambiente natural e nem em casos de aplicação fúngica sobre os locais onde os estágios imaturos de *S. calcitrans* se desenvolvem, o que deveria se esperar elevada mortalidade.

Esta metodologia ainda foi utilizada com objetivo de verificar se o primeiro método de exposição fúngica estaria influenciando negativamente os resultados, principalmente quando se realizou a exposição das larvas, pois a intensa movimentação larval e produção de muco poderiam facilitar a retirada dos conídios de sua superfície. A imersão também foi utilizada para propiciar o contato com toda a superfície de ovos, larvas e pupas, e ainda, favorecer a ingestão dos conídios pelas larvas. Ovos e larvas foram utilizados no segundo método por serem considerados mais susceptíveis a condições ambientais, parasitárias e predatórias, quando comparadas às pupas (NEVES & FARIA, 1988).

Pode-se observar na tabela 3 e 4, que os percentuais de emergência de moscas provenientes de larvas de *S. calcitrans* nos dois métodos de exposição, não foram afetados, mesmo com o isolado ESALQ 986, onde foram observados percentuais de emergência iguais,

Tabela 2 - Percentual de mortalidade de ovos e larvas de *Stomoxys calcitrans* imersos e mantidos em placas de Petri acrescidas de suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 ou ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* pelo segundo método de exposição.

	Primeiro Ensaio				Segundo Ensaio			
	Ovo*		Larva*		Ovo*		Larva*	
	M	MC	M	MC	M	MC	M	MC
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Controle	31,2	0	13,3	0	31,2	0	20,0	0
	$2 \times 10^8 \text{ con.mL}^{-1}$				$2 \times 10^8 \text{ con.mL}^{-1}$			
CG138	20,0	-16,3	13,3	0	16,2	-21,8	10,0	-12,5
CG228	27,5	-5,4	3,3	-11,5	27,5	-5,4	6,6	-16,7
ESALQ986	27,5	-5,4	6,6	-7,7	31,2	0	6,6	-16,7

M = percentual de mortalidade; MC = Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott. *Não houve diferença estatística entre os percentuais de mortalidade dos grupos tratados e controle em cada estágio imaturo de *Stomoxys calcitrans*.

Tabela 3 - Percentual de emergência de moscas proveniente de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas às suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 ou ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* pelo primeiro método de exposição fúngica.

	Emergência (%)	
	Primeiro Ensaio*	Segundo Ensaio*
Controle	63,3	60,0
	CG138	
$2 \times 10^5 \text{ con.mL}^{-1}$	46,6	53,3
$2 \times 10^6 \text{ con.mL}^{-1}$	56,6	36,6
$2 \times 10^7 \text{ con.mL}^{-1}$	46,6	43,3
$2 \times 10^8 \text{ con.mL}^{-1}$	63,3	43,3
	CG228	
$2 \times 10^5 \text{ con.mL}^{-1}$	66,6	66,6
$2 \times 10^6 \text{ con.mL}^{-1}$	63,3	73,3
$2 \times 10^7 \text{ con.mL}^{-1}$	63,3	60,0
$2 \times 10^8 \text{ con.mL}^{-1}$	60,0	53,3
	ESALQ986	
Controle	80,0	90,0
$2 \times 10^5 \text{ con.mL}^{-1}$	90,0	86,6
$2 \times 10^6 \text{ con.mL}^{-1}$	90,0	73,3
$2 \times 10^7 \text{ con.mL}^{-1}$	83,3	73,3
$2 \times 10^8 \text{ con.mL}^{-1}$	86,6	86,6

* Não houve diferença estatística entre os percentuais de emergência dos grupos tratados e controle.

maiores ou sem diferença significativa com o grupo controle. Foi constatado que os três isolados fúngicos não agiram de forma tardia sobre as larvas, pois não afetaram significativamente a emergência das moscas, seja pelo primeiro ou segundo método de exposição fúngica nas placas de Petri, sugerindo que os isolados de *B. bassiana* podem não apresentar os fatores necessários para debelar mecanismos antimicrobianos provavelmente presentes nos estágios imaturos da mosca dos estábulos. A ineficácia do fungo *B. bassiana*

como entomopatígeno de larvas de *M. domestica* foi constatada por Bernardi et al. (2006). De acordo com os autores, o isolado CG 34 de *M. anisopliae* afeta o desenvolvimento pupal de *M. domestica* a partir da imersão de suas larvas em concentrações crescentes da suspensão fúngica (10^5 a 10^7 con.mL⁻¹) e o mesmo não foi observado com o isolado CG 240 de *B. bassiana*, que não afetou significativamente a emergência das moscas. O ritmo de emergência de *M. domestica* não foi afetado pelos isolados de *P. corylophilum* e *A. flavus* isolados previamente de adultos de moscas doméstica coletados no ambiente, não havendo diferença significativa entre os tratamentos e grupos controle (SENNA-NUNES et al.,(2002b).

Contudo, quando avaliada a patogenicidade deste fungo sobre os adultos de *S. calcitrans*, Watson et al. (1995) verificaram que estes foram susceptíveis ao parasitismo fúngico, pois foram obtidos 70,0% e 84,0% de mortalidade com os isolados P89 e L90. Os autores ressaltaram que mesmo que tenha sido alcançado resultado satisfatório no controle de *S. calcitrans*, foram obtidos mais de 90,0% de mortalidade de adultos de *M. domestica*. Lohmeyer e Miller (2006) também constataram que esta espécie fúngica é efetiva no controle de adultos de *H. irritans*, pois em seu estudo, obtiveram 98,4% de mortalidade após quatro dias de realizada exposição a *B. bassiana*, contra 43,5% de mortalidade ocasionada por *M. anisopliae* e 13,0% com *P. fumosoroseus*. No sétimo dia após o ensaio fúngico, foram obtidos 100,0%, 73,0% e 33,0 % de mortalidade dos adultos expostos, respectivamente.

Carlberg (1986) relatou que as moscas *S. calcitrans* e *F. caniculares* apresentaram menor susceptibilidade ao *B. thuringiensis* quando comparadas a *M. domestica* na tentativa de controle populacional de moscas que se desenvolvem em esterco de aves. Pode-se verificar que a tolerância da mosca dos estábulos a diferentes microrganismos, como destacado por Watson et al. (1995), sugere que novos agentes controladores e seus mecanismos evolutivos devem ser investigados para que métodos biológicos sejam efetivos em seu controle.

Tabela 4 - Percentual de emergência de moscas provenientes de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas às suspensões aquosas dos isolados CG 138, CG 288 e ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* pelo segundo método de exposição fúngica.

	Emergência (%)	
	Primeiro Ensaio*	Segundo Ensaio*
Controle	76,6	80,0
	CG 138	
2×10^8 con.mL ⁻¹	83,3	76,6
	CG 228	
2×10^8 con.mL ⁻¹	86,6	86,6
	ESALQ 986	
2×10^8 con.mL ⁻¹	86,6	86,6

* Não houve diferença estatística entre os percentuais de emergência dos grupos tratados e controle.

Vale ressaltar que mesmo que um fungo entomopatogênico apresente resultados aceitáveis no controle de adultos de *S. calcitrans* em condições laboratoriais, a aplicação prática sobre os animais campo é questionável. Como ela é uma mosca picadora e hematófaga, seria improvável a ingestão dos conídios, devido ao formato de seu aparelho bucal, como ocorre com a mosca doméstica. Steinkraus et al. (1990) obtiveram mortalidade



Figura 1 – Desenvolvimento fúngico dos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* em placa de Petri onde estágios imaturos de *S. calcitrans* foram expostos pelo primeiro método de exposição.



Figura 2 – Larvas de *Stomoxys calcitrans* ingerindo conídios de *Beauveria bassiana* após exposição fúngica.



Figura 3 – Crescimento hifal e conidiogênese em placa de Petri onde estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans* foram expostos aos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* pelo segundo método de exposição.



Figura 4 - Placa de Petri referente ao grupo controle do segundo método de exposição fúngica, onde as larvas de *Stomoxys calcitrans* foram expostas apenas ao diluente.

significativa de adultos de mosca doméstica, pois seu aparelho bucal lambedor permitiu a ingestão dos conídios de *B. bassiana* e consequente infecção.

Além disso, a mosca dos estábulos apresenta um comportamento muito reativo e permanece por curtos períodos nos animais para se alimentar. Este é um fator que dificulta a utilização de métodos como a aspersão, banho ou loções nos animais, com objetivo de proporcionar contato suficiente da mosca com os conídios e favorecer a infecção fúngica. Logo, para que o fungo apresente potencial para o controle de adultos da mosca dos estábulos, este também deve ocasionar um efeito patogênico tardio. Desta forma, a população adulta poderia ser controlada a partir da exposição de seus estágios imaturos, como verificado por Alves (2010), que em seu estudo, verificou que o fungo *Lecanicillium lecanii* não ocasionou mortalidade significativa das larvas de *S. calcitrans*. Entretanto, quando utilizada a concentração 2×10^8 con.mL⁻¹ em larvas, ocorreu redução significativa na emergência dos adultos.

Os resultados verificados por Moraes et al. (2008) corroboram com o encontrado no presente estudo, pois não houve diferença estatística significativa com os percentuais de mortalidade verificados nos grupos controle, quando pupas de *S. calcitrans* foram tratadas com suspensões conidiais de *M. anisopliae*. Alves (2010) também observou baixa mortalidade pupal de *S. calcitrans* após exposição ao fungo *L. lecanii*. O autor justificou os resultados obtidos à capacidade protetora do pupário. Thomas e Rudolf (2010) sugerem que há evidências de que o sistema de defesa dos insetos pode se condicionar contra um patógeno e atenuar futuras infecções, mesmo ocorrendo a metamorfose, entretanto, o mecanismo ainda não está claro.

A permanência das larvas abaixo da dieta colonizada pelos isolados fúngicos, além do bom aspecto morfológico e comportamental e a intensa ingestão dos conídios, com observação do conteúdo fúngico no intestino das larvas utilizadas no presente estudo, não ocasionaram alterações motoras, comportamentais ou má-formação pupal, como destacado por Moraes (2007) que descreveu larvas pré-emergidas liquefeitas, paralisia larval, mumificação e má-formação pupal, quando ovos e larvas de *S. calcitrans* foram expostos a elevadas concentrações fúngicas de suspensões aquosas de *M. anisopliae*. Também não foram observadas alterações comportamentais nas moscas emergidas, como descrito por Alves (1998), quando insetos infectados apresentam incoordenação, paralisia ou desenvolvimento fúngico em orifícios ou locais mais frágeis da cutícula. Na avaliação do efeito entomopatogênico de *L. lecanii* sobre os estágios imaturos de *S. calcitrans*, Alves (2010) também observou a permanência das larvas abaixo da dieta colonizada sem que houvesse um efeito patogênico direto.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os estágios imaturos de *S. calcitrans* foram tolerantes a CG 138 e CG 228 de *B. bassiana*. Além disso, a baixa mortalidade verificada com o isolado ESALQ 986 comprovou os resultados obtidos com os dois isolados, pois era de se esperar mortalidade significativa dos estágios imaturos, visto que este é considerado um fungo de elevada patogenicidade para outros artrópodes (Fernandes, 2007).

4.2.2 Terceiro método de exposição fúngica

No presente estudo, foi verificado baixo percentual de mortalidade dos ovos expostos a concentração 2×10^8 con.mL⁻¹ nas duas repetições realizadas (Tabela 5). Com o isolado CG 138 de *B. bassiana* foram obtidos apenas 20,0% e 22,5% de mortalidade e com isolado CG 228, 22,5% e 21,2%. Baixos percentuais também foram verificados com isolado ESALQ 986, mesmo sendo considerado um fungo de elevada patogenicidade (FERNANDES, 2007). Estes

resultados diferiram dos descritos por Moraes et al. (2008), que obtiveram 100,0% de inviabilidade dos ovos de *S. calcitrans* expostos ao fungo *M. anisopliae* pelo método de gotejamento sobre a dieta e ovos, com mesma concentração fúngica. Não foi obtida diferença significativa entre os grupos expostos ao fungo *B. bassiana* e o grupo controle.

Apesar do bom desenvolvimento fúngico nos beckeres (Figura 5), os isolados CG 138 e CG 228 de *B. bassiana* não foram capazes de afetar significativamente os percentuais de mortalidade nos experimentos com larvas de *S. calcitrans* em todas as concentrações fúngicas utilizadas, pois os grupos tratados não diferiram dos 36,7% e 33,3% de mortalidade de larvas dos grupos controle, sendo observados mesmos percentuais quando as larvas foram expostas a concentração 2×10^8 con.mL⁻¹ do isolado CG 138 e percentuais similares com o isolado CG 288. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, a exemplo da baixa efetividade do fungo *M. anisopliae* em impedir o desenvolvimento de larvas e pupas de *S. calcitrans* (MORAES et al., 2008), no qual os estágios imaturos foram imersos em concentrações fúngicas similares a utilizadas no presente estudo.

Entretanto, Kaaya e Munyinyi (1995) obtiveram bons resultados, com 97,0% e 80,0% de mortalidade quando larvas de *G. morsitans morsitans* (mosca Tsetsé) foram adicionadas em areia acrescida de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* na proporção estimada de 1.4×10^6 esporos/g e $2,3 \times 10^6$ esporos/g da mistura, respectivamente, ou seja, 1g de esporos/litro de areia. Quando utilizado 0,5g esporos/areia, houve redução nos percentuais de mortalidade para 60,0% e 40,0%, mas estes percentuais ainda diferiram do grupo controle. O período para obtenção dos percentuais de mortalidade alcançados por Kaaya e Munyinyi (1995) foi menor do que o utilizado no presente estudo. Talvez a mosca *S. calcitrans* apresente algum mecanismo de defesa que não permita que seja afetada tardiamente pelos isolados utilizados, e por esta razão, as duas espécies fúngicas podem ser empregadas no controle biológico da mosca Tsetsé. Kaaya e Munyinyi (1995) ainda sugerem que estes fungos possam ser utilizados como controladores microbianos nos sítios de larviposição.

Ángel-Saragun et al. (2005) verificaram susceptibilidade variável de ovos e pupas de *H. irritans*, quando expostos a diferentes isolados fúngicos, dentre eles *B. bassiana*. Os ovos foram depositados sobre fezes bovinas frescas misturadas a farinha de peixe (10:1), onde foram aspergidas suspensões de *B. bassiana* (10^6 con.mL⁻¹), enquanto que as pupas, depositadas em placas de Petri, receberam aspersão na concentração de 10^8 con.mL⁻¹. Verificou-se que dos dois isolados de *B. bassiana* utilizados, o isolado B17 reduziu o percentual de emergência de adultos de *H. irritans* quando utilizado nos ovos (11,3% de emergência) e o isolado B21 foi efetivo apenas com as pupas, visto que foi obtido 44,0% de mortalidade. Os autores destacaram que o efeito patogênico dos fungos estaria diretamente relacionado ao isolado empregado.

Lecuona et al. (2005) constataram que dos 19 isolados e espécies fúngicas utilizadas para o controle de larvas, pupas e adultos de *M. domestica*, cinco isolados de *B. bassiana* foram relativamente mais virulentos. Após avaliação da mortalidade das moscas expostas aos isolados, os autores concluíram que o isolado Bb72 foi mais virulento (97,0% de mortalidade) e efetivo produtor de conídios, indicando que este é o mais promissor no desenvolvimento de micoinseticidas para *M. domestica*.

Percentuais de mortalidade pupal próximos aos verificados nos grupos controle também foram observados no estudo (Tabela 5), demonstrando a ineficácia destes isolados fúngicos em controlar a emergência de *S. calcitrans*. Os resultados obtidos nas duas repetições do presente estudo demonstraram que os isolados CG 138 e CG 228 de *B. bassiana* não apresentaram o potencial entomopatogênico esperado (Tabela 5), visto que a mortalidade dos grupos tratados foi menor ou igual a mortalidade obtida nos grupos controle,

independente do estágio imaturo avaliado. Em poucas situações foram observados percentuais de mortalidade maiores que aqueles dos grupos controle, porém a diferença não foi significativa.

Tabela 5 – Percentual de mortalidade de ovos, larvas e pupas de *Stomoxys calcitrans* expostos aos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* pelo terceiro método de exposição fúngica.

Tratamento (con.mL ⁻¹)	Primeiro Ensaio						Segundo Ensaio					
	Ovo*		Larva*		Pupa*		Ovo*		Larva*		Pupa*	
	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)	M (%)	MC (%)
Controle	37,5	0	36,66	0	20,0	0	23,7	0	33,3	0	13,3	0
	<u>CG 138</u>						<u>CG 138</u>					
2 x 10 ⁶	47,5	16,0	16,7	-31,6	16,7	-4,2	37,5	18,0	36,7	5,0	23,3	11,5
2 x 10 ⁷	47,5	16,0	33,3	-5,2	16,7	-4,2	36,2	16,4	36,7	5,0	20,0	7,7
2 x 10 ⁸	20,0	-28,0	36,7	0	16,7	-4,2	22,5	-1,6	33,3	0	20,0	7,7
	<u>CG 228</u>						<u>CG 228</u>					
2 x 10 ⁶	25,0	-20,0	46,7	15,8	20,0	0	20,0	-4,9	26,7	-10,0	23,3	11,5
2 x 10 ⁷	25,0	-20,0	46,7	15,8	20,0	0	22,5	-1,6	26,7	-10,0	26,7	15,4
2 x 10 ⁸	22,5	-24,0	33,3	-5,2	23,3	4,2	21,2	-3,3	23,3	-15,1	16,7	3,8
	<u>ESALQ 986</u>						<u>ESALQ 986</u>					
Controle	25,0	0	-	-	-	-	28,7	0	-	-	-	-
2 x 10 ⁶	21,2	-5,0	-	-	-	-	28,7	0	-	-	-	-
2 x 10 ⁷	20,0	-6,7	-	-	-	-	38,7	13,9	-	-	-	-
2 x 10 ⁸	13,7	-15,0	-	-	-	-	28,7	0	-	-	-	-

M=mortalidade; MC= Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott; - = Não avaliado. * = Não houve diferença estatística entre os percentuais de mortalidade dos grupos tratados e controle em cada estágio imaturo de *Stomoxys calcitrans* avaliado.

tiva. A utilização do isolado ESALQ 986 teve por finalidade confirmar se a reduzida mortalidade observada em ovos seria reproduzida, o que foi confirmado pelos resultados obtidos nos dois ensaios realizados com este isolado (Tabela 1).

Em estudo de controle biológico de moscas, Watson et al. (1995) destacaram a tolerância de *S. calcitrans* ao fungo *B. bassiana*, pois foram obtidos menores percentuais de mortalidade quando comparado à mosca doméstica. Estes mesmos autores relatam que o ambiente extremamente contaminado, onde os estágios imaturos de *S. calcitrans* se desenvolvem, estimularia seus mecanismos de defesa, e ainda, que a composição de sua cutícula resultaria em distinta susceptibilidade à infecção fúngica. Outros autores destacaram que a fermentação da matéria orgânica, realizada por diferentes microrganismos, disponibilizaria nutrientes para a alimentação das larvas (SCHMIDTMANN & MARTIN, 1992; PEROTTI et al., 2001; ROMERO et al., 2006), contribuindo desta forma, para o desenvolvimento dos estágios imaturos de *S. calcitrans*. Alguns pesquisadores têm observado a resistência de alguns dípteros a uma infecção com bactérias patogênicas, quando estas foram previamente sensibilizadas com bactérias não patogênicas (SILVA, 2002). Castro (2004) isolou e identificou as bactérias *B. thuringiensis* e *S. marcescens*, utilizadas no controle microbiano de artrópodes, em intestino e superfície externa de adultos de *S. calcitrans*.

Logo, para que um fungo possa atuar sobre os estágios imaturos de moscas, este deve possuir mecanismos que promovam elevada patogenicidade ou que anulem os fatores antimicrobianos do inseto. Pode-se verificar no presente estudo, que os isolados selecionados



Figura 5 – Crescimento hifal e conidiogênese dos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* em becker onde estágios imaturos de *S. calcitrans* foram expostos.

capazes de tolerar as adversidades ambientais e com bom crescimento (Figura 5) não foram eficientes para inviabilizar o desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca dos estábulos, mesmo quando utilizado um isolado com elevada patogenicidade para artrópodes, como o ESALQ 986 (FERNANDES, 2007).

4.3 Viabilidade Fúngica

Na avaliação da capacidade de germinação, verificou-se 100,0% de viabilidade conidial no re-isolamento das suspensões fúngicas empregadas. Também foi observado bom desenvolvimento hifal e conidiogênese nas placas de Petri (Figura 1 e 3) em que os estágios imaturos foram imersos nas suspensões, como também nas placas onde foram aplicadas as suspensões fúngicas (Figura 3), quando comparados aos grupos controle (Figura 4).

Um fator que poderia influenciar a capacidade entomopatogênica dos isolados seria o potencial de germinação dos conídios após o preparo das suspensões e a permanência destes no ambiente, como realizado no terceiro método de exposição fúngica, visto que neste experimento os estágios imaturos e as suspensões fúngicas ficaram sujeitos às variações ambientais (Figura 5). Segundo Devi et al. (2005), isolados de *B. bassiana* mantidos por 16 horas a 25°C apresentaram ótimo crescimento, entretanto, quando expostos pelo mesmo período a temperatura superior a 32°C, constataram redução ou atraso na germinação de alguns isolados. Já Farguez et al. (1997) mencionaram que esta espécie fúngica desenvolve-se em temperaturas que variam de 8 a 35°C, com limite máximo de 37°C.

Na avaliação da viabilidade dos isolados utilizados no terceiro método de exposição fúngica, durante todo período de estudo, os valores médios de temperatura e umidade (máxima e mínima) foram mensurados diariamente. Foram obtidos respectivamente 29,53 °C com 89,73% U.R. e 19,66 °C com 52,33% U.R., sendo observado intenso desenvolvimento dos isolados fúngicos nos recipientes contendo a dieta de criação. Segundo Fernandes (2007) estes valores não são considerados como capazes de inviabilizar a ação de *B. bassiana*.

Outro fator relacionado à ineficácia dos isolados de *B. bassiana* para o controle dos estágios imaturos de *S. calcitrans* seria a ausência de nutrientes necessários para a germinação dos conídios sobre a cutícula. Hunt et al. (1984) mencionaram que os nutrientes disponibilizados nos meios de cultura para o desenvolvimento conidial, nem sempre são encontrados na cutícula dos hospedeiros e que poucos estudos sobre sua composição são relatados. Segundo St. Leger et al. (1998), o pH do meio seria um dos principais fatores que influenciariam a produção das diferentes enzimas fúngicas que podem atuar no processo de degradação da cutícula do hospedeiro, sendo necessários mais estudos que relacionem a variação de pH do meio onde são encontrados os estágios imaturos de *S. calcitrans* e a ativação das enzimas fúngicas responsáveis pelo processo de penetração da cutícula.

Diferentes estudos vêm sendo desenvolvidos para verificar os fatores que determinam a ineficácia entomopatogênica de certos fungos, como a inibição de proteases e quitinases (VILCINSKAS & WEDDE, 1997) e a presença de determinados ácidos graxos (SMITH & GRULA, 1982; HUNT, 1986; BARNES & MOOE, 1997; JAMES et al., 2003), mas a relação destes fatores com a mosca *S. calcitrans* ainda não são descritos. Os resultados observados indicam que a ineficácia dos fungos utilizados no presente estudo não estaria relacionada com a incapacidade de germinação de seus conídios ou aos fatores estressores de temperatura e umidade ambientais.

4.4 Análise do Muco e Macerado de Larvas de *Stomoxys calcitrans*

4.4.1 Teste de difusão em meio sólido

4.4.1.1 Teste de difusão em meio sólido com cloranfenicol

Com relação à capacidade de inibição dos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* através do teste de difusão em meio sólido, foi constatado que o macerado e muco de larvas não expostas aos isolados não ocasionaram a formação de zona de inibição fúngica. Entretanto, no grupo do macerado de larvas previamente sensibilizadas com o isolado CG 138 de *B. bassiana*, verificou-se redução no desenvolvimento fúngico, ocasionando a formação de uma zona de inibição, como pode ser observado nas figuras 6 e 7. O mesmo não foi observado com os outros dois isolados fúngicos, onde se verificou bom desenvolvimento fúngico ao redor dos discos embebidos com o muco ou macerado das larvas sensibilizadas (Figura 8). Também não se observou halo de inibição fúngica quando o isolado CG138 foi exposto ao muco das larvas desafiadas (Tabela 6). Provavelmente, os fatores inibitórios devem necessitar de prévio estímulo para causar a inibição fúngica, e conseqüentemente, formar o halo de inibição do isolados CG 138 no meio de cultura.

O teste de inibição fúngica em meio sólido contribuiu para verificar a capacidade de larvas de *S. calcitrans* em debelar o parasitismo fúngico dos isolados de *B. bassiana*. (Tabela 4). O resultado negativo obtido com os dois outros isolados e com o muco das larvas sensibilizadas pode estar relacionado ao método utilizado, pois são oferecidas condições ideais para germinação fúngica, que podem sobrepor os fatores de inibição das larvas aos isolados CG 228 e ESALQ 986, ou ainda, a concentração mínima do macerado ou muco, necessária para reduzir ou inibir o desenvolvimento destes isolados não foi alcançada. Segundo Hunt (1986), a reduzida concentração de ácido caprílico encontrada em *D. ponderosae* não é suficiente para formar halo de inibição fúngica, enquanto que em *Hyphantria cunea* verificou-se moderada inibição. O autor destaca que os reduzidos níveis de ácido caprílico não foram ideais para produzir inibição fúngica em condições experimentais.

Tabela 6 - Germinação dos isolados CG 138, CG 228 ou ESALQ 986 de *Beauveria bassiana* em placas de Petri com ágar batata dextrose e extrato de levedura (1%) com discos de papel filtro impregnados com muco ou macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans*.

Cultivo fúngico (placa de Petri)	Amostra	Pré-exposição - isolado fúngico	Repetição	
			1	2
CG 138	Muco	Positiva - CG 138	-	-
		Negativa - CG 138	-	-
	Macerado	Positiva - CG 138	+	+
		Negativa - CG 138	-	-
CG 228	Muco	Positiva - CG 228	-	-
		Negativa - CG 228	-	-
	Macerado	Positiva - CG 228	-	-
		Negativa - CG 228	-	-
ESALQ 986	Muco	Positiva - ESALQ 986	-	-
		Negativa - ESALQ 986	-	-
	Macerado	Positiva - ESALQ 986	-	-
		Negativa - ESALQ 986	-	-

+ = Formação de halo de inibição; - = Ausência de halo de inibição.

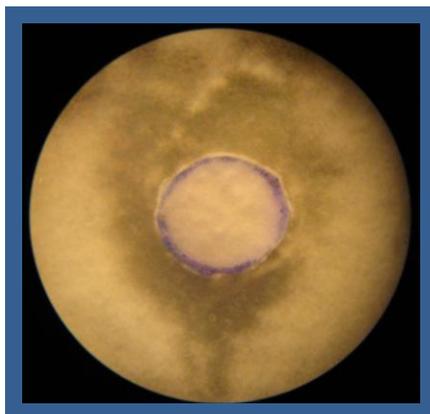


Figura 6 – Anverso da placa de Petri onde foi observado halo de inibição do isolado CG 138 de *Beauveria bassiana*, através da utilização do macerado de larvas previamente sensibilizadas pelo fungo.

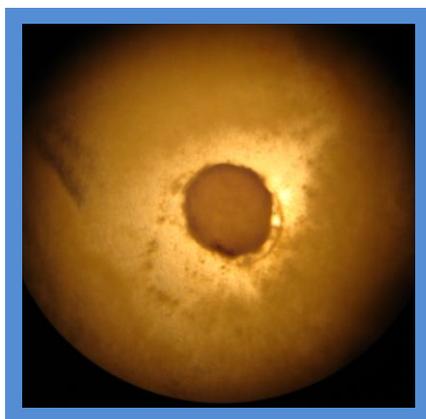


Figura 7 - Reverso da placa de Petri onde foi observado halo de inibição do isolado CG 138 de *Beauveria bassiana*, através da utilização do macerado de larvas previamente sensibilizadas pelo fungo.

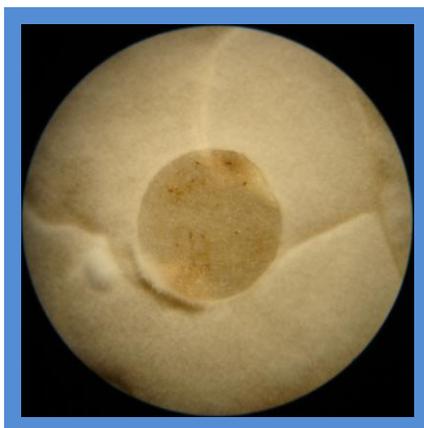


Figura 8 – Anverso da placa de Petri onde não foi observado halo de inibição do isolado CG 138 de *Beauveria bassiana*, através da utilização do muco de larvas previamente sensibilizadas pelo fungo.

Alves (2010) não verificou a formação de halo de inibição fúngica quando o fungo *L. lecanii* foi desafiado com muco e macerado de larvas expostas ao fungo e as do grupo controle, através do teste de difusão em meio sólido. Segundo o autor, o teste pode não ter apresentado as condições mínimas para a formação do halo, como levantado por Hunt (1986).

Poucos estudos são direcionados às propriedades do muco produzido por larvas. Segundo Neto (2006), acreditava-se que o muco secretado por moluscos seria eficaz no tratamento de verrugas e manchas de pele, assim como para dores de cabeça e acidez gástrica. Os autores destacaram que a detecção de novos compostos bioativos possui grande importância clínico-farmacológica, pois é uma forma de empregar um valor medicinal à diversidade biológica. A formação do halo de inibição fúngica verificada no estudo pode estar relacionado, entre outros fatores, a produção de determinados peptídeos com propriedades antimicrobianas, como relatado por Candido-Silva et al. (2007) que identificaram um gene relacionado com a produção do peptídeo nas glândulas salivares do díptera (Sciaridae) *B. hygida*, responsável pela inibição de microrganismos na superfície larval do díptera, entretanto para larvas de *S. calcitrans* ainda não é relatado.

4.4.1.2 Teste de difusão em meio sólido sem cloranfenicol

O teste de inibição fúngica sem a utilização de cloranfenicol, realizado com as amostras de muco e macerado de larvas de *S. calcitrans*, incluindo as do grupo controle, permitiu o crescimento de uma colônia de coloração pardácea, brilhosa, borda regular, lisa, convexa e mucóide (Figura 9), capaz de fermentar o meio de cultura sólido composto de batata, dextrose e extrato de levedura (Figura 10). A colônia apresentou atividade antifúngica, com a formação de halo de inibição em todas as placas de Petri utilizadas (Figura 11), demonstrando que a ineficácia dos isolados fúngicos de *B. bassiana* também pode estar relacionada à presença de microrganismos bacterianos produtores de substâncias que inibem ou dificultam o parasitismo sobre as larvas de *S. calcitrans*.

4.4.1.3 Identificação bacteriana

Foi verificada a presença de uma bactéria que apresentou coloração gram-negativa e aspecto bacilar reto ou levemente curvo. Quando as larvas foram submetidas à MEV, também foi visualizado flagelo polar e microfibras relacionadas à aderência bacteriana sobre a cutícula das larvas.

De acordo com Videira et al. (2004) as técnicas de biologia molecular promovem a identificação rápida, simples e precisa de bactérias e podem auxiliar na identificação bacteriana, quando as técnicas tradicionais baseadas nas características morfológicas e fisiológicas não são conclusivas. Por esta razão, foi utilizada a técnica de PCR para identificação do isolado bacteriano proveniente do macerado e muco das larvas de *S. calcitrans*, sendo a mesma caracterizada como *Stenotrophomonas maltophilia*, (Quadro 2).

Segundo Konemman et al. (2001) esta espécie está incluída no novo gênero *Stenotrophomonas* e apresenta ampla distribuição, podendo ser isolada de quase todos sítios anatômicos humanos. Esta espécie é descrita em uma variedade de ambientes e regiões geográficas, podendo ter diferentes fontes (rios, poços, lagos de reservatórios, solo, leite cru, peixe congelado, ovos, carcaças de animais, ambiente e equipamentos hospitalares, sêmem e embriões bovinos congelados) (ALMEIDA et al., 2005). Konemman et al. (2001), Ben-Gigirey et al. (2002) e Almeida et al. (2005) destacam a importância desta espécie bacteriana nas infecções oportunistas e que está emergindo como um importante patógeno adquirido em

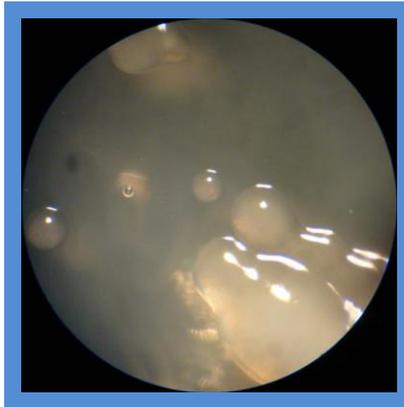


Figura 9 – Aspecto macroscópico da colônia bacteriana proveniente das amostras de muco ou macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans*.

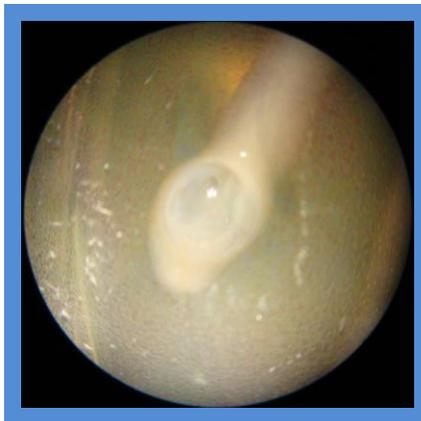


Figura 10 – Semeadura em Ágar Batata Dextrose e Extrato de Levedura da colônia bacteriana obtida no macerado e muco de larvas de *Stomoxys calcitrans* e que apresentou intensa fermentação do meio, ocasionando produção de gás.

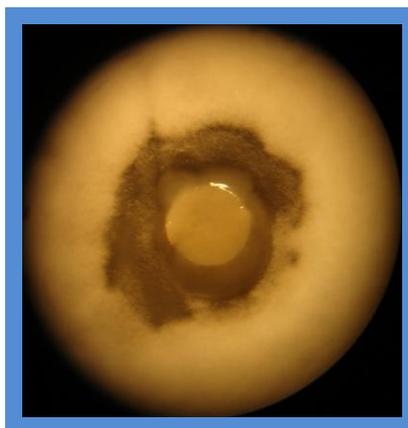


Figura 11 – Halo de inibição fúngica resultante do crescimento de colônia bacteriana presente no macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans*.

Quadro 2 – Identificação de *Stenotrophomonas maltophilia* proveniente do muco e macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans* através do método PCR*.

```
GAACTACGAGTTTGATCCTGGCCTTCAGAGTGAACGCTGCCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCAACGGCA
GCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTTCGT
GGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACC
TTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAA
AGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGTTATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCC
GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
GTGCGTAGGTGGTTCGTTTAAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGC
GACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATC
CATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAAGTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCT
AACCGGTTAAGTTCGCCGCCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAAGT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAAGTCT
AAGGAGACCGCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGG
CTACACACGTAATAAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCCAGAAACCCTA
TCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTG
CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGCA
GGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACCAGGTGGC
CCGTTCTCGGGGGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTG
```

*Similaridade 98% com 16S ribossomal RNA gene da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* K279a complete genome, strain K279a (number GenBank AM743169.1)

ambiente hospitalar, como já foi detectada no peixe de valor comercial *Thunnus alalunga* (BEN-GIGIREY et al., 2002).

O crescimento de colônias de características mucóides também foi observado na dieta de criação autoclavada, onde foram adicionados os estágios imaturos. Na literatura, já é descrita a capacidade de determinados microrganismos em produzir substâncias que inibem o desenvolvimento de outros agentes competidores (DILLON & DILLON, 2004). Castro et al. (2008) realizaram o isolamento e identificação de outras bactérias em diferentes partes do corpo de adultos de *S. calcitrans*, porém a produção de substâncias inibidoras não foi avaliada. Outros autores (SCHMIDTMANN & MARTIN, 1992) já observaram que a presença de determinados microrganismos podem inibir ou contribuir para o desenvolvimento de estágios imaturos de diferentes moscas, seja pela ingestão da própria bactéria ou pela fermentação do meio.

Lemos e Terra (1991) relataram que a lisozima presente no intestino de algumas larvas de moscas é capaz de digerir bactérias com eficiência e que isto seria característico de *Cyclorhapha*. A capacidade de síntese de metabólitos por *S. maltophilia*, como a pirrolnitrila e a maltofilina, permitem a sobrevivência em nichos polimicrobianos e são utilizadas contra fungos patogênicos, como *Candida* spp. e *Aspergillus fumigatus* (KERR Jr, 1996; ALMEIDA et al., 2005). Kerr Jr (1996) verificou que as dez cepas utilizadas em seu estudo apresentaram significativa inibição fúngica.

A constatação da presença de microrganismos que possuem atividade antimicrobiana frente aos diferentes isolados de *B. bassiana*, bem como ter o conhecimento sobre a microbiota presente nos estágios imaturos da mosca dos estábulos é de grande importância para o controle microbiano desta mosca, pois as substâncias produzidas podem inibir ou inviabilizá-los, e consequentemente limitar o uso de determinados agentes.

4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

O perfil cromatográfico demonstrou resultados relevantes com relação à exposição das larvas aos três isolados fúngicos. Comparando-se o perfil cromatográfico do macerado das larvas não tratadas com o perfil das tratadas com os fungos, foi observado o desaparecimento de determinados picos cromatográficos, quando as larvas foram sensibilizadas pelos fungos. Picos com tempos de retenção (RT) de 4,284 min e 5,785 min produzidos pelo grupo controle (Figura 12A) não foram observados quando as larvas foram expostas aos três isolados. Pico com RT similar a 6,957 min não foi detectado no perfil cromatográfico das larvas expostas aos isolados CG 138 (Figura 12B) ou ESALQ 986 (Figura 12D), enquanto que os picos com RT de 2,069 min e 8,582 min não foram observados no macerado das larvas expostas aos isolados CG 228 (Figura 12C) ou ESALQ 986 (Figura 12D). As substâncias detectadas no perfil cromatográfico do macerado e muco das larvas dos grupos controle e não detectadas nos perfis das larvas expostas aos isolados fúngicos, podem estar relacionados à quebra de peptídeos das larvas por ação de determinadas enzimas fúngicas (Machado et al. 2004) durante o processo parasitário fúngico.

Em contrapartida, verificou-se a formação de cinco novos picos no perfil cromatográfico do macerado das larvas previamente expostas ao isolado CG 138 (Figura 12B). Estes picos não foram similares aos picos cromatográficos observados no perfil cromatográfico do fungo CG 138 (Figura 14A). Apenas um novo pico (RT=4,695 min) foi observado no perfil cromatográfico do macerado das larvas expostas ao isolado CG 228 (Figura 12C) e não foi observada similaridade com os picos obtidos com o isolado CG 228. (Figura 14B). Picos com tempos de retenção 2,755 min, 4,097 min, 6,200 min, 8,322 min e 10,432 min foram detectados no perfil cromatográfico do macerado das larvas expostas ao isolado ESALQ 986 (Figura 12D), diferentemente do grupo controle, sendo que, apenas o primeiro RT foi associado ao isolado fúngico (Figura 14C).

Avaliando-se os perfis cromatográficos, três picos observados no grupo controle (Figura 13A) não foram verificados na amostra de muco, quando as larvas foram expostas ao isolado CG 138 (RT= 2,140 min, 6,630 min e 7,239 min). Entretanto, não houve a formação de novos picos (Figura 13B) e nenhum dos picos foram equivalentes aos picos observados no perfil cromatográfico da amostra fúngica, como observado na Figura 14A. Resultados similares foram observados com o isolado CG 228 (Fig. 13C), sendo apenas verificados os picos com RT de 4,230 min e 6,630 min. Com relação à mobilização de moléculas, a exposição das larvas ao isolado ESALQ 986 (Fig. 13D) não permitiu a observação de picos com RT de 2,140 min e 12,427 min. Entretanto, dos quatro outros picos formados (RT= 8,784 min, 9,932 min, 10,967 min e 12,270 min), os três últimos foram relacionados aos picos obtidos no perfil cromatográfico do próprio fungo (Figura 14C). Os perfis cromatográficos do tampão fosfato de sódio e diluente foram avaliados para que os picos formados não afetassem a análise (Figura 14D e 14E). As moléculas detectadas podem estar sendo utilizadas para uma ativação enzimática de defesa ou outro mecanismo antimicrobiano. Como os insetos não desenvolvem memória imunológica frente a uma infecção, seja por bactérias, fungos ou protozoários (Silva, 2002) os picos observados no grupo controle e não verificados nas larvas expostas aos fungos, sugerem que estas moléculas são fatores intrínsecos inespecíficos presentes nas larvas, que podem ser mobilizados frente a uma infecção, fatores estes que podem ter sido adquiridos no decorrer de sua evolução como sugerido por Watson et al. (1995).

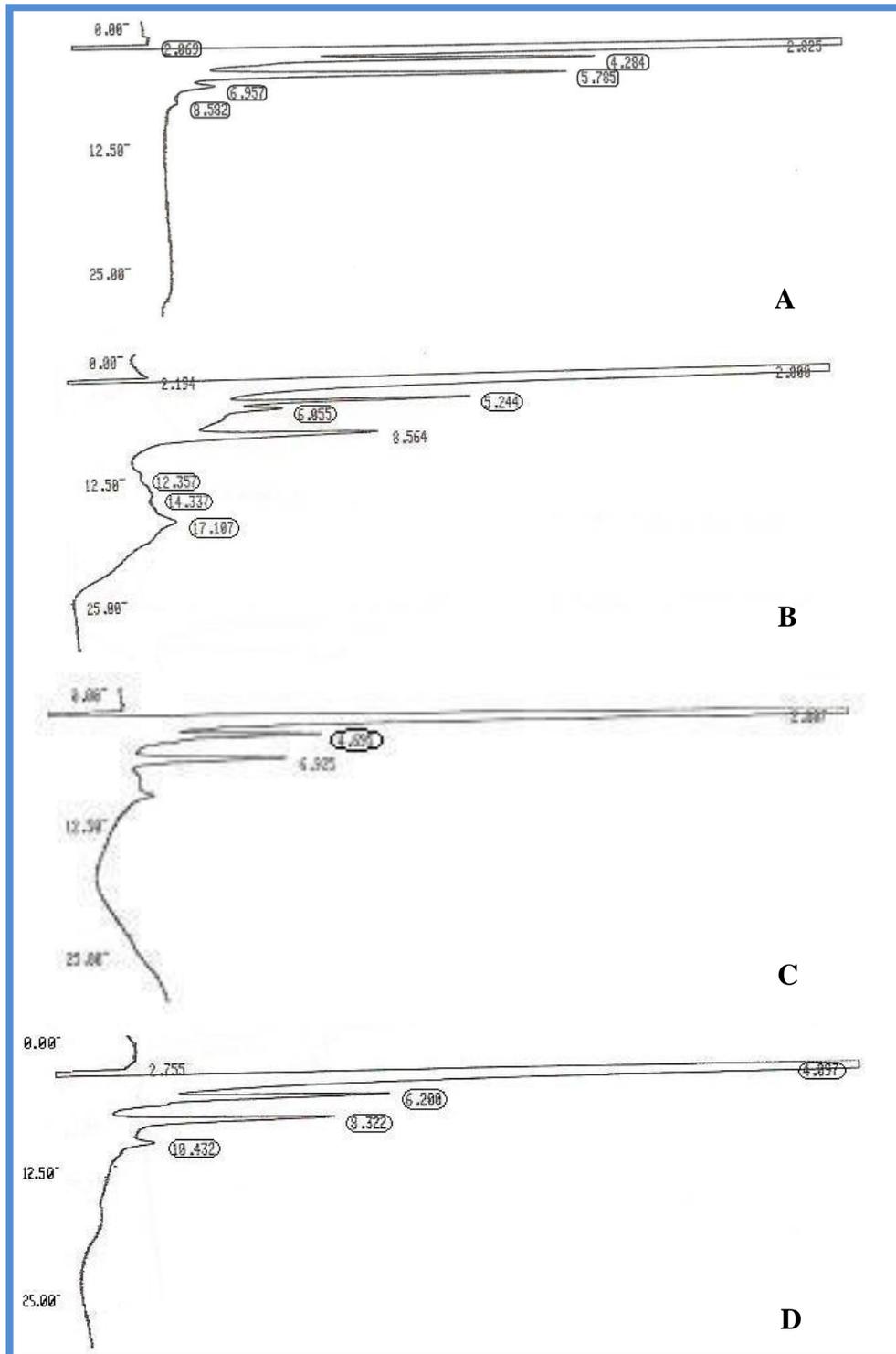


Figura 12 – Perfil cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de macerado de larvas de *Stomoxys calcitrans* do grupo controle (A) e das larvas sensibilizadas com os isolados CG 138 (B), CG 228 (C) ou ESALQ 986(D) de *Beauveria bassiana*.

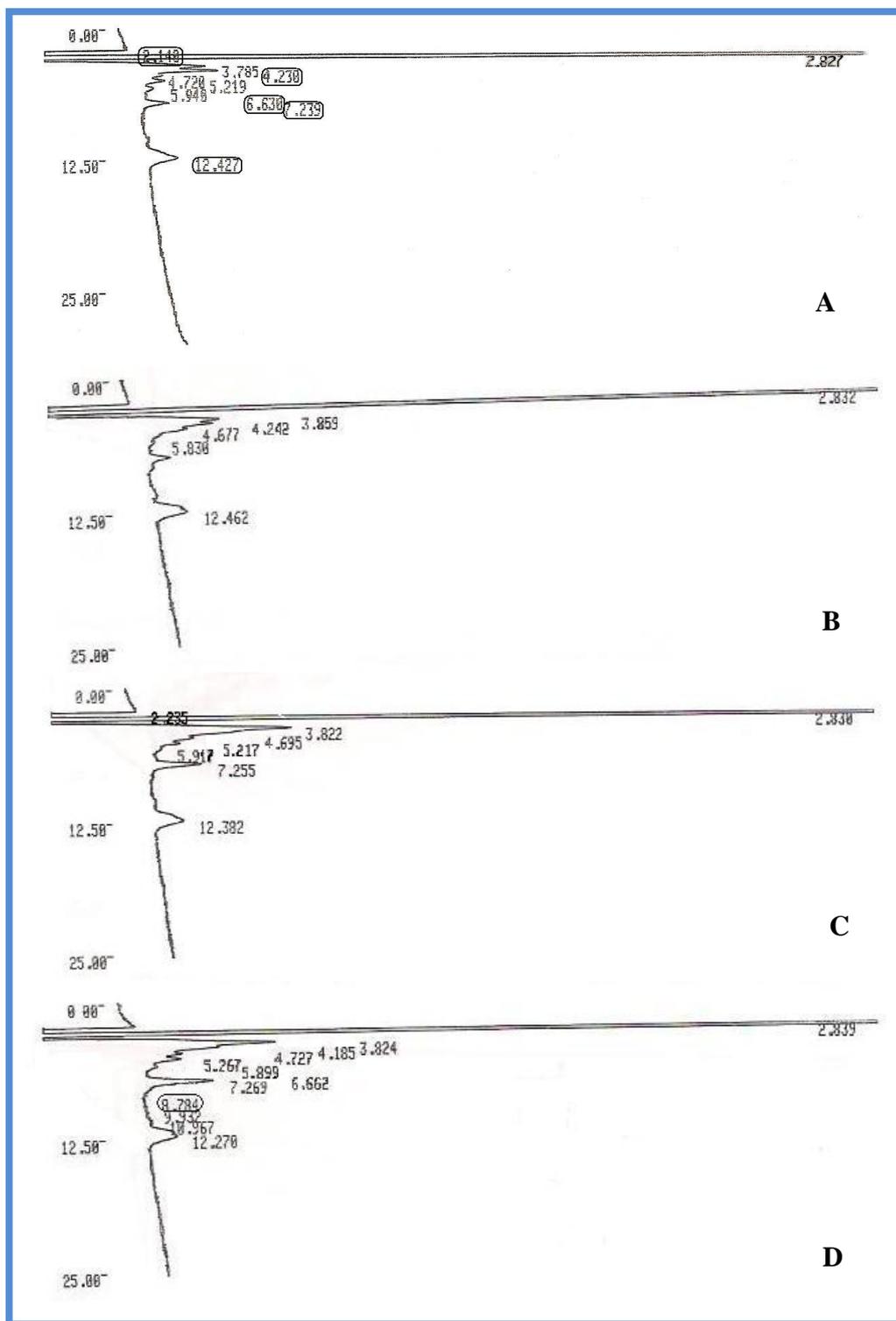


Figura 13 – Perfil cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de muco de larvas de *Stomoxys calcitrans* do grupo controle (A) e das larvas sensibilizadas com os isolados CG 138 (B), CG 228 (C) ou ESALQ 986 (D) de *Beauveria bassiana*.

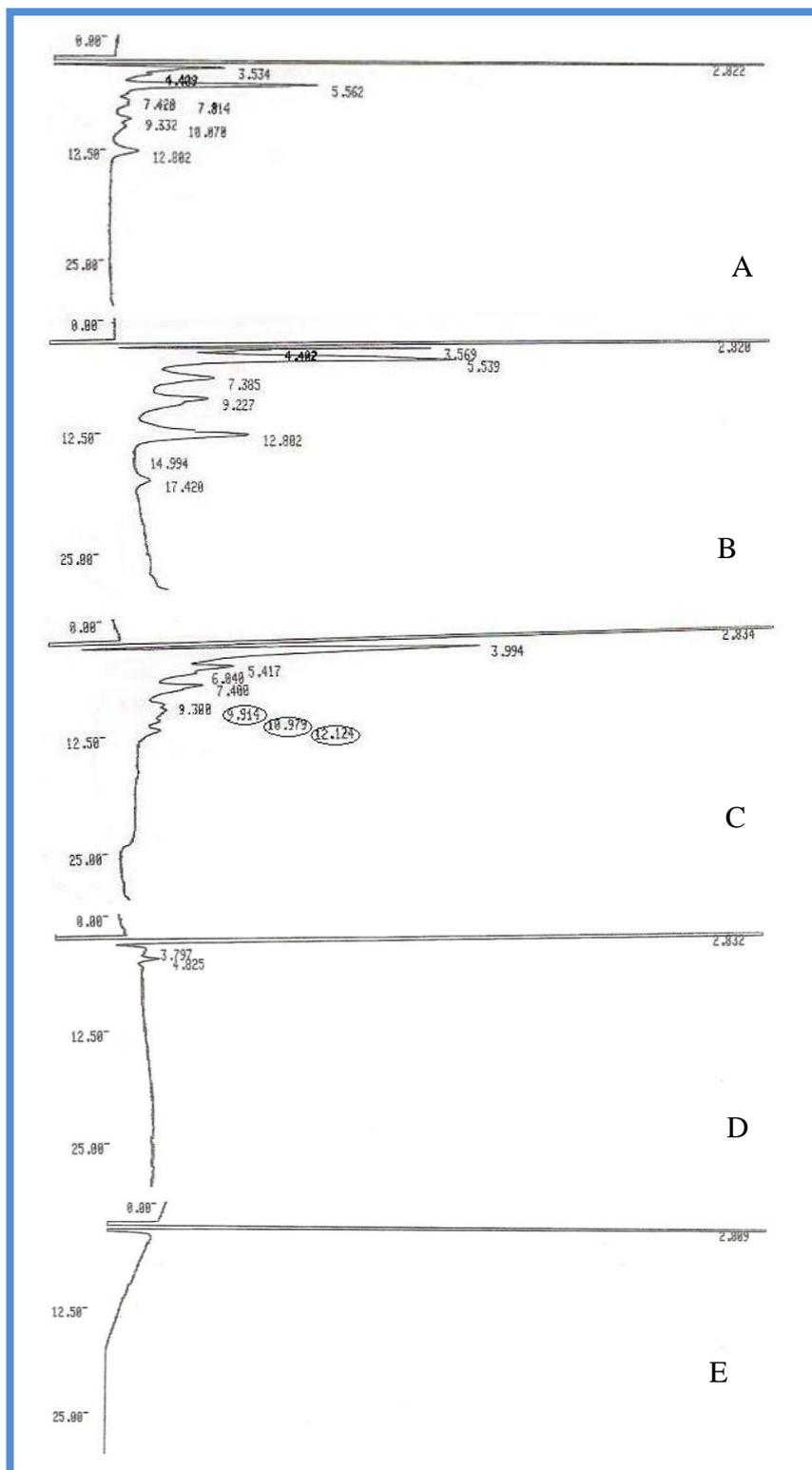


Figura 14 – Perfil cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos isolados CG 138 (A), CG 228 (B), ESALQ 986 (C) de *Beauveria bassiana*, Tampão Fosfato de Sódio (D) e Diluente (água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80) (E).

As substâncias detectadas no perfil cromatográfico do macerado e muco das larvas do grupo controle e não observadas nas das larvas expostas aos três isolados fúngicos, podem estar relacionadas com peptídeos presentes em mecanismos básicos de defesa de *S. calcitrans*, como a estomoxina presente no intestino de adultos (BOULANGER et al. 2002) ou o peptídeo antimicrobiano MDpep9 purificado de larvas de *M. domestica* (Ya-Li et al., 2009) visto que o método utilizado neste trabalho detecta principalmente peptídeos. De maneira geral, a observação de novos picos cromatográficos no macerado e muco, não associados aos isolados fúngicos, sugerem que estes picos podem conter moléculas que devem estar sendo mobilizadas ou modificadas pelas larvas para que apresentem atividade antifúngica, para assim debelar a infecção quando esta ocorrer.

Segundo Dangl e Jones (2001), os peptídeos são considerados elementos primitivos da resposta imune dos seres vivos, onde as vias de indução são relativamente conservadas em insetos. Vale ressaltar, que este é um estudo preliminar que avalia a existência de fatores relacionados à atividade antimicrobiana observada nos ensaios de exposição fúngica com estágios imaturos de *S. calcitrans* e na formação de halo de inibição. A dificuldade em relacionar as substâncias envolvidas nesta resposta está no fato de que não são encontrados estudos relacionados à produção, composição e à atividade protetora do muco de suas larvas e os poucos estudos existentes são direcionados as formas adultas da mosca (BOULANGER et al. 2002).

Não há descrição sobre os mecanismos antimicrobianos existentes em larvas de *S. calcitrans*, apenas são encontrados na literatura genes ou peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana no intestino anterior de moscas adultas, após ingestão de sangue. De acordo com Tsuji et al. (1998) a expressão de genes Smd1 e Smd2, aumentam após ingestão de sangue e decrescem após 24h. Os autores destacam que estes não são as únicas defensinas produzidas para proteger o sangue ingerido contra ataque bacteriano e que ainda não são relatadas as propriedades das moléculas descritas acima ou de outras que possuam propriedades antifúngicas no intestino de adultos de *S. calcitrans* e dos estágios imaturos. A associação de peptídeos antibacterianos e defensina similar a serino ainda não está muito clara, e pode ser que os peptídeos precisem de uma ativação proteolítica. Ciencialová et al. (2008) relataram a presença de um di-peptídeo, duas variantes de peptídeo e uma proteína com propriedades antibacterianas em hemolinfa de larvas de terceiro estágio da mosca *S. bullata*.

De acordo com Munks et al. (2001), o papel mais provável para a família de genes Smd de defensinas é evitar o acúmulo de microrganismos na porção do intestino que funciona como reservatório do sangue ingerido e podem ser encontrados em diferentes tecidos da mosca *S. calcitrans*. A estimulação destes genes estaria relacionada à ingestão de sangue e resultaria em baixo nível de infecções no intestino da mosca. Hamilton et al. (2002) destacaram que os peptídeos antibacterianos e proteases estão localizados nos tecidos dos insetos. Segundo estes autores, a associação de peptídeos às proteases pode representar atividade antibacteriana, porém, estudos mais aprofundados sobre a interação das moléculas imunes e proteases em insetos são necessários, pois contribuiriam para o estudo da manipulação genética no controle de vetores. Tzou et al. (2000) relataram que os insetos podem apresentar respostas imunes epiteliais. Os resultados obtidos em seu estudo sugerem que um subconjunto de genes produzidos por *D. melanogaster* expressam pelo menos dois peptídeos com propriedades antimicrobianas. Estes autores verificaram que os sete peptídeos antimicrobianos secretados no intestino desta mosca estão na gordura corporal sistêmica e participam da resposta imune.

Extrapolando o descrito por Boulanger et al. (2002) e Hamilton et al. (2002), os resultados do presente estudo sugerem que peptídeos antimicrobianos também podem ser

produzidos pelos estágios imaturos de *S. calcitrans*, já que foram obtidos picos cromatográficos que indicam uma reação das larvas frente ao parasitismo. De acordo com Han et al. (1998) peptídeos antimicrobianos foram identificados após exposição de larvas de *Drosophila* sp. aos fungos entomopatogênicos e Candido-Silva et al. (2007) identificaram o gene responsável pela produção de peptídeo antimicrobiano em glândula salivar de larvas do díptera *B. hygida*. Junto a isto, a observação das larvas ingerindo conídios sem que afetassem seu desenvolvimento ou ocasionasse percentuais de mortalidade satisfatórios, ou ainda, verificar que a dieta de criação com proliferação fúngica ou bacteriana não impede a emergência dos adultos, reforçam a idéia de que os estágios imaturos da mosca dos estábulos podem estar bem adaptados a determinados microrganismos e que mecanismos antimicrobianos são produzidos.

Daffre et al. (2001) relatam que estudos destinados a busca de substâncias naturais ou sintéticas com atividade antimicrobiana e os mecanismos alternativos não utilizados pelos antibióticos convencionais devem ser investigados. Também tem sido levantada a importância da pesquisa, purificação, caracterização química, biológica e estrutural de novas substâncias antimicrobianas, como peptídeos provenientes da fauna e da flora, pois a própria evolução selecionou um grande espectro de substâncias eficientes que podem ser utilizadas contra infecções (DAFFRE et al. 2001; MACHADO et al. 2004), doenças parasitárias, regeneração de tecidos e na redução de tumores (MACHADO et al. 2004). Por esta razão, é necessário que estudos mais detalhados sobre os mecanismos de defesa desenvolvidos pelos estágios imaturos de *S. calcitrans* sejam investigados, para que o melhor entendimento sobre sua evolução possa ser utilizado no estudo de controle microbiano e no desenvolvimento de compostos sintéticos.

4.4.3 Eletroforese

4.4.3.1 Eletroforese protéica

Após avaliação do perfil protéico do macerado e muco das larvas de *S. calcitrans* expostas aos isolados fúngicos e as do grupo controle, constatou-se que a exposição das larvas aos diferentes isolados fúngicos não alterou a formação das bandas, indicando que as proteínas das larvas não são afetadas pela ação fúngica ou que proteínas não estão sendo destinadas à atividade antimicrobiana (Figura 15 e 16). Diferentes resultados foram obtidos por Johns et al. (2001) com a hemolinfa de *D. variabilis* inoculados com *B. burgdorferi*. Estes autores observaram que a hemolinfa ocasionou forte efeito inibitório sobre esta bactéria e foi verificada em SDS-PAGE, a presença de duas novas bandas protéicas no plasma da hemolinfa de carrapatos infectados com *B. burgdorferi*. Ciencialová et al. (2008) relataram o isolamento e identificação de uma proteína de massa molecular relativamente baixa que apresentou atividade antimicrobiana na hemolinfa de larvas de terceiro estágio de *S. bullata*, diferindo do observado no presente estudo.

A eletroforese protéica realizada no presente estudo, proporcionou uma avaliação preliminar do perfil protéico e teve como objetivo apenas verificar a formação de bandas diferenciadas entre as amostras de larvas expostas e não expostas. Seria necessário um estudo mais aprofundado sobre a caracterização destas proteínas, com a finalidade de descartar qualquer possível presença de proteínas nas larvas, que possa contribuir para sua defesa imunológica, pois em outros estudos (Johns et al., 1998) proteínas antimicrobianas foram detectadas em *D. variabilis* e apresentaram atividade contra diferentes isolados bacterianos. De acordo com Johns et al. (1998) é necessário mais estudos relacionados ao isolamento, pu-

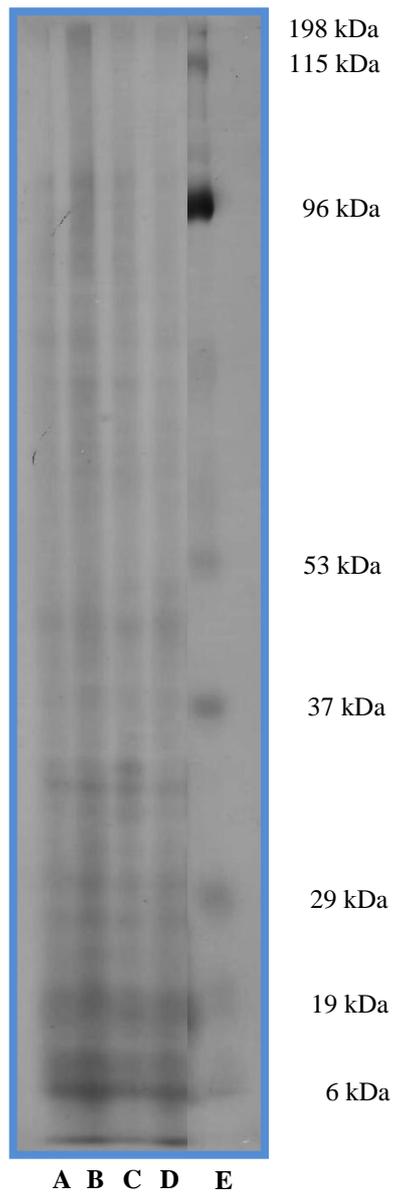


Figura 15 - Perfil protéico de macerado de larvas pertencentes ao grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de *Beauveria bassiana* e marcador de peso molecular (E) em gel de poliacrilamina 12%.

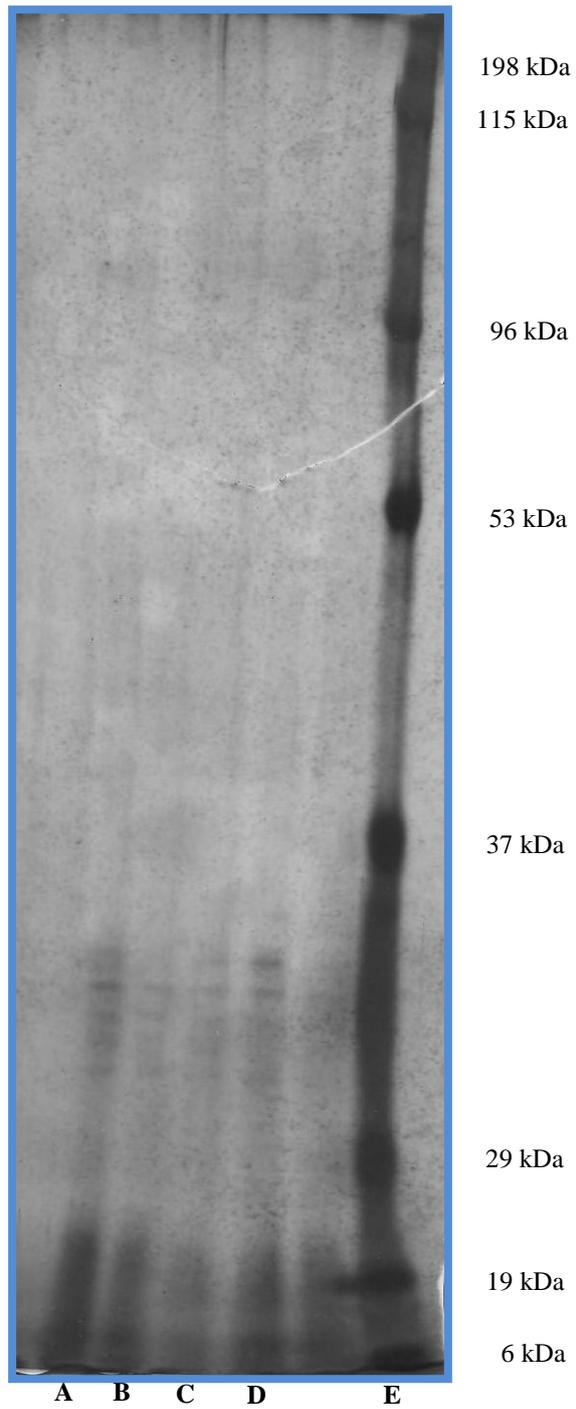


Figura 16 - Perfil protéico do muco de larvas pertencentes ao grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de *Beauveria bassiana* e marcador de peso molecular (E) em gel de poliacrilamina 12%.

rificação e identificação das frações protéicas que apresentaram ação bactericida ou bacteriostática.

4.4.3.2 Avaliação da atividade proteolítica por eletroforese (zimografia)

A avaliação preliminar do perfil proteolítico das larvas expostas aos isolados de *B. bassiana* em diferentes condições de pH, revelou que as proteases produzidas pelas larvas de *S. calcitrans*, tanto no macerado (Figuras 17, 18, 19 e 20) como no muco (Figura 21, 22, 23 e 24), apresentaram maior atividade em pH 8,5 (Tris/HCl) (Figura 19 e Figura 23). Enzimas evidenciadas no zimograma com atividade nesta variação de pH (Figura 19 e 23) são sugestivas de proteases pertencentes ao grupo das serino proteases (CUERVO et al., 2008) e algumas são descritas na literatura, apresentando propriedades antimicrobianas. Cuervo et al. (2008) verificaram proteases com atividade ótima entre pH 7,5 e 9,5 em larvas de primeiro instar de *O. thornax* (Diptera: Sarcophagidae) através da análise zimográfica, e destas, sete foram classificadas como pertencentes ao grupo das serino proteases.

Outro fator que pode ser abordado, é que o odor amoniacal decorrente da degradação da dieta de criação, onde as larvas de *S. calcitrans* estão presentes, pode tornar as proteases das larvas mais ativas e não há descrição na literatura se estas enzimas estariam envolvidas no seu mecanismo de defesa. Além da maior atividade proteolítica observada em pH 8,5, verificou-se que os perfis proteolíticos do macerado das larvas expostas aos isolados CG 228 e ESALQ 986, diferiram acentuadamente dos perfis verificados no macerado das larvas do grupo controle, enquanto que, no macerado das larvas expostas ao isolado CG 138, verificou-se perfil proteolítico próximo ao verificado no grupo controle (Figura 19).

Na avaliação do perfil proteolítico do muco das larvas, verificou-se que uma banda proveniente das larvas expostas ao isolado CG 138 e duas das larvas expostas ao isolado ESALQ 986 diferiram do controle. Além disso, uma quarta banda, proveniente das larvas expostas ao isolado ESALQ 986, apresentou posição similar ao controle, porém foi mais larga e ativa (Figura 23).

Os resultados obtidos no zimograma demonstraram que as larvas respondem à infecção fúngica de maneira diferenciada, variando de acordo com o isolado utilizado. Um estudo mais detalhado deve ser realizado para verificar a real contribuição das enzimas produzidas pelas larvas frente ao desafio fúngico, pois como o perfil do macerado das larvas expostas ao isolado CG 138 foi similar a do grupo controle, talvez as enzimas detectadas não contribuam diretamente para a formação do halo de inibição fúngica (Figura 6 e 7) e outros fatores de defesa estejam atuando para debelar o parasitismo fúngico, como a produção de algum peptídeo antimicrobiano (Figura 12 e 13).

Como se trata de uma avaliação inicial da atividade proteolítica, ainda são necessários estudos que verifiquem se em ambiente com elevado odor amoniacal ou de elevado pH, verificado na dieta onde estão as larvas de *S. calcitrans*, inviabilizaria ou reduziria a ação das enzimas fúngicas destinadas à infecção e colonização. E ainda, são necessárias a separação e identificação das enzimas produzidas pelas larvas para que haja uma melhor compreensão sobre a ineficácia dos isolados de *B. bassiana* utilizados no controle dos estágios imaturos da mosca dos estábulos, assim como a localização dos sítios de produção e ativação destas enzimas, pois dos poucos estudos encontrados, a maioria é destinada à identificação de enzimas presentes no intestino de *S. calcitrans* que não são destinadas a atividade antimicrobiana (BLAKEMORE et al. 1995; MOFFATT et al., 1995; JORDÃO et al. 1996).

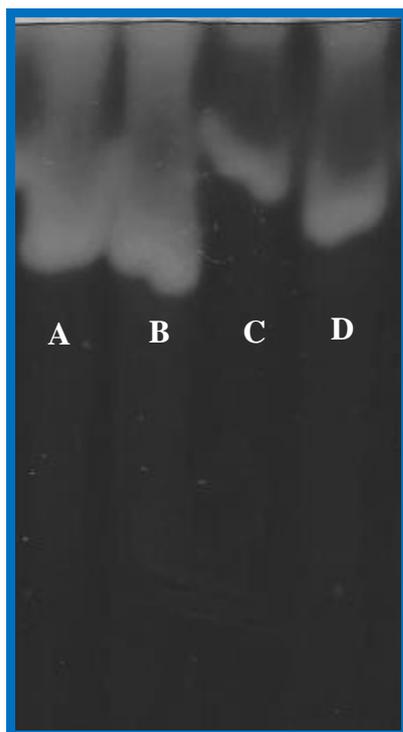


Figura 17 - Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de *Beauveria bassiana* em tampão ácido (pH = 4,5).



Figura 18 - Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de *Beauveria bassiana* em tampão neutro (pH = 6,5).

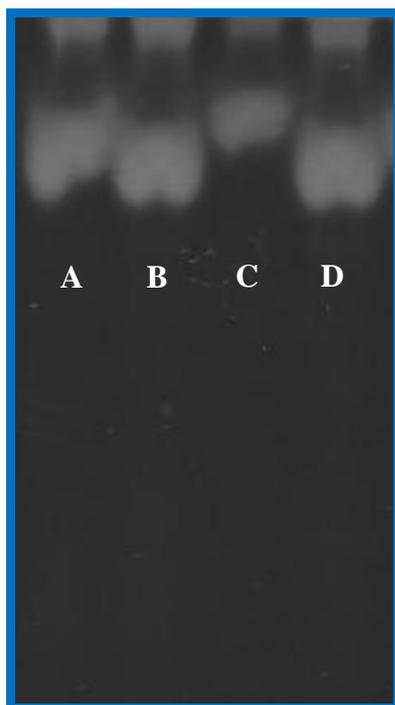


Figura 19 - Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de *Beauveria bassiana* em tampão básico (pH = 8,5), onde foi observada maior atividade proteolítica.



Figura 20 - Perfil proteolítico de macerado de larvas do grupo controle (A) e previamente expostas aos isolados CG 138 (B), CG 228 (C) e ESALQ 986 (D) de *Beauveria bassiana* em tampão básico forte (pH = 10,0).

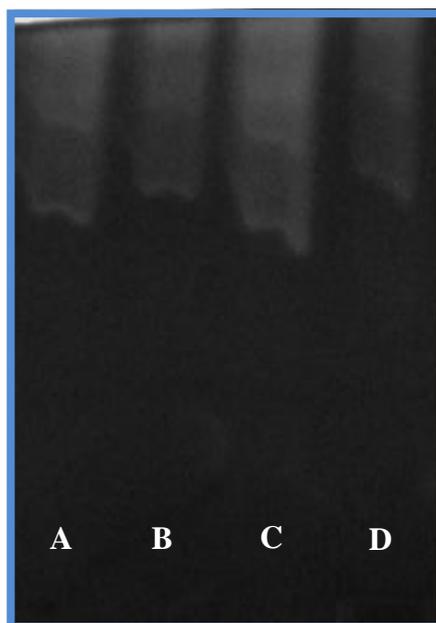


Figura 21 - Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de *Beauveria bassiana* e controle (D) em tampão ácido (pH = 4,5).



Figura 22 - Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de *Beauveria bassiana* e controle (D) em tampão neutro (pH = 6,5).

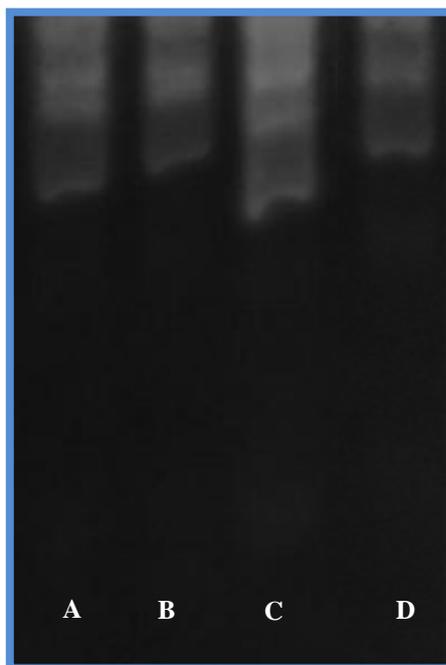


Figura 23 - Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de *Beauveria bassiana* e controle (D) em tampão básico (pH = 8,5), onde se observou maior atividade proteolítica.

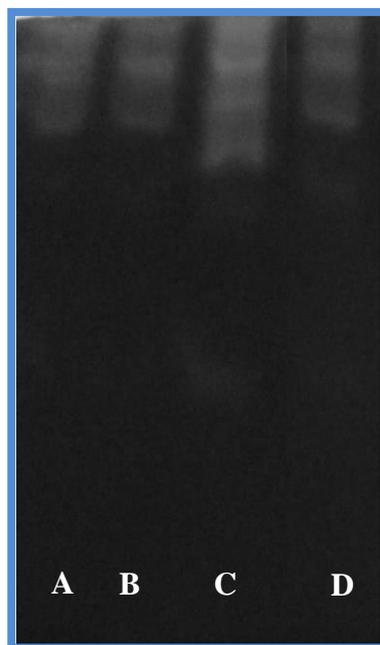


Figura 24 - Perfil proteolítico de muco de larvas previamente expostas aos isolados CG 138 (A), CG 228 (B) e ESALQ 986 (C) de *Beauveria bassiana* e controle (D) em tampão básico forte (pH = 10,0).

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Na microscopia eletrônica de varredura foi revelado que é necessário um período de 15 horas após a exposição fúngica para a observação de conídios do isolado CG 138 de *B. bassiana* germinados sobre a superfície das larvas de *S. calcitrans* (Figura 25). Este resultado diferiu de Garcia et al. (2004), onde estes autores relataram que uma hora após a infecção, as eletromicrografias revelaram grande quantidade de conídios de *M. anisopliae* aderidos de forma difusa no tegumento das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus*. Isso pode estar relacionado ao modo com que os carrapatos são mantidos após a exposição fúngica, isto é, fixados com fita adesiva em placa de Petri (ANGELO et al., 2010) ou em tubos transparentes (GARCIA et al., 2004), pois as larvas de *S. calcitrans* precisam ficar livres nas placas de Petri para sobreviver. Além disso, as larvas produzem muco, que pode contribuir para uma não aderência dos conídios em sua superfície, diferindo dos carrapatos que não produzem secreções sobre a cutícula que possam contribuir para a retirada dos conídios.

Garcia et al. (2004) observaram que a maior parte dos conídios germinaram 18 horas após exposição fúngica do carrapato *R. sanguineus* e que passados 48 horas do experimento, se observou a penetração no tegumento, delimitando o intervalo entre 48 e 72 horas para a colonização difusa do corpo do carrapato. A presença de conídios de *B. bassiana* sobre a superfície larval de *S. calcitrans* também foi confirmada nos tempos 24 (Figura 26) 48 (Figura 27) 72 (Figura 28) e 96 (Figura 29) horas após ensaio fúngico, mas sem proliferação difusa fúngica como verificado por Garcia et al. (2004). Apesar de ter sido observado desenvolvimento fúngico e formação de estruturas similares ao tubo germinativo, dilatação das hifas e apressório, estas estruturas parecem estar mais alongadas do que as observadas em outros estudos de microscopia de varredura com *B. bassiana* (MOINO Jr et al., 2002; CAMPOS et al. 2005). Talvez este comportamento fúngico possa estar relacionado a algum mecanismo de defesa da larva, ou com o microambiente resultante da associação de sua cutícula com o muco que pode dificultar a penetração do fungo na cutícula.

Foram observados que certos conídios apresentaram mais de uma estrutura similar a tubo germinativo, como pode ser observado na figura 27. Segundo Hunt et al., (1984), o excesso de nutrientes presentes na dieta de criação, necessário para manter a viabilidade das larvas no experimento, podem contribuir para o desenvolvimento errante das hifas, dificultando ou retardando o parasitismo do isolado CG 138 de *B. bassiana*.

Bittencourt et al. (1999) relataram pela primeira vez a presença de conídios de *M. anisopliae* germinados sobre a cutícula de *R. (B.) microplus* três dias após a realização da exposição fúngica e que a principal via de penetração foi pela cutícula, como verificado no presente estudo, pois não se observou conídios germinados nos orifícios das larvas de *S. calcitrans*. Este resultado diferiu do descrito por Pekrul e Grula (1979) que mostraram que os conídios de *B. bassiana* podem germinar dentro de aberturas dos espiráculos de larvas da espiga de milho *H. zea*. A maior eficiência na penetração da cutícula relatada por outros autores, quando comparada ao presente estudo, também pode estar relacionada ao fato de que as fases de penetração, colonização e conidiogênese de *M. anisopliae* ocorrem mais rápido que *B. bassiana* (MOINO Jr. et al., 2002), e por esta razão, resultados mais satisfatórios são descritos com o primeiro fungo em ensaios de controle microbiano de estágios imaturos de *S. calcitrans*, como os relatados por Moraes et al. (2008).

Garcia et al. (2004) relataram ainda que no quarto e quinto dias pós-exposição as fêmeas infectadas estavam mortas e sem realização da postura. Em outro estudo realizado por Garcia et al. (2005) é relatada a penetração e formação de lesão em ovos de *R. sanguineus* infectados por *M. anisopliae*. No estudo realizado em 2008 por Garcia e colaboradores, com larvas e ninfas da mesma espécie de carrapato, também se visualizou a penetração fúngica a-

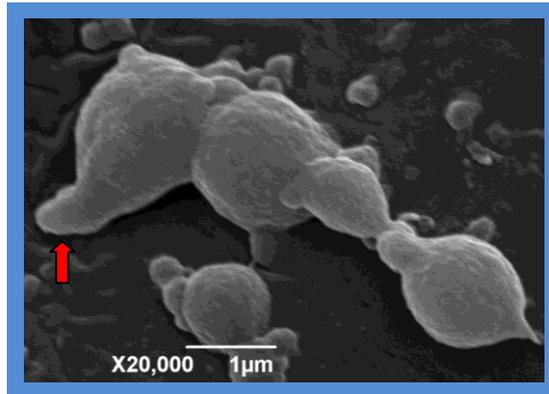


Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas ao isolado CG 138 de *Beauveria bassiana* 15 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar a formação do tubo germinativo (seta).

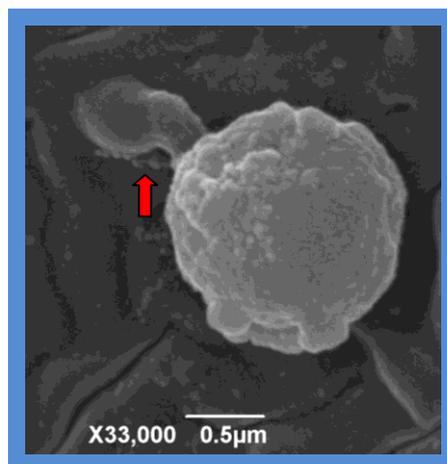


Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas ao isolado CG 138 de *Beauveria bassiana* 24 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar a formação do tubo germinativo e penetração na cutícula (seta).

pós 18 horas de realizado o experimento, porém não foram observadas lesões significativas.

No presente estudo, foi detectada uma alteração similar ao que ocorre quando há ação enzimática sobre a cutícula do inseto (Figura 28 B) e também se observou a formação de hifas e penetração fúngica, entretanto, isso não ocorreu de forma predominante. Verificou-se que as larvas encontravam-se viáveis e com bom aspecto, ou seja, apresentavam-se ativas, com coloração normal, brilhosas, viscosas e com conteúdo intestinal (conídios e dieta de criação) no momento em que foram fixadas nas soluções Super Skipper e Carl's (GRODOWITZ et al., 1982). Logo, apesar de ter sido observado desenvolvimento hifal e algumas alterações sugestivas de penetração fúngica, estes não foram significativos para que o isolado fúngico fosse capaz de inviabilizar as larvas, pois reduzido número de conídios foram observados sobre sua cutícula, independente do período de exposição.

Também não foi detectado intenso crescimento fúngico 96 horas após exposição fúngica, mesmo sendo verificada viabilidade conidial próxima aos 100,0% da suspensão fúngica utilizada, indicando que possa existir algum fator que iniba ou retarde o desenvolvimento fúngico nas larvas, como inibidores presentes no muco (CANDIDO-SILVA et al., 2007) ou no intestino (BOULANGER et al., 2002).

Campos et al. (2005) também observaram a formação de apressório e verificaram a produção de protease similar a subtilisina e quitinases durante a penetração na cutícula do carrapato *R. (B.) microplus* e sugerem que a aderência do conídio na cutícula do carrapato é mediada por interações hidrofóbicas e a produção de um muco adesivo. Talvez o muco produzido pelas larvas de *S. calcitrans* possua a capacidade de quebrar estas interações não permitindo uma aderência eficaz dos conídios, mas é um fator que ainda necessita ser estudado.

Por outro lado, o ambiente amoniacal encontrado na dieta de criação contendo os estágios imaturos, ou seja, de elevado pH, pode ainda diminuir a atividade das enzimas produzidas pelos fungos no processo de infecção e colonização fúngica, ocasionando percentuais de mortalidade e de emergência insatisfatórios, como abordado por Sassá et al.

(2008), que verificaram que há redução da atividade enzimática das quitinases fúngicas conforme ocorre a elevação do pH. A elevada concentração iônica dos tampões, potencialmente com maior número de cargas negativas/mol, pode saturar os sítios de ligação, promovendo desta forma, a redução na interação enzima-substrato através de mecanismos competitivos. A predominância de cargas negativas na estrutura molecular das quitinases são decisivas na interação com regiões positivas presentes no substrato quitina coloidal.

A ação mecânica de cupins *Cornitermes cumulans* através do comportamento de limpeza nas primeiras horas após exposição aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi avaliada por Neves e Alves (2000). Com a utilização de sub-doses de um inseticida, os autores inibiram este mecanismo mecânico de limpeza, permitindo que os conídios germinassem e penetrassem na cutícula do inseto, provocando a infecção. Mantendo-se as devidas proporções, a ação mecânica realizada pela movimentação das larvas na placa de Petri contendo dieta de criação, associada à intensa ingestão dos conídios e produção de muco (Figura 2), devam ser considerados como contribuintes na retirada dos conídios da superfície das larvas, pois estes eventos podem reduzir o número de conídios sobre a cutícula.

O método de sonicação não foi utilizado nas larvas expostas aos fungos para que não houvesse o risco de se retirar os conídios ou hifas da cutícula das larvas, como realizado por Bittencourt et al. (1999) com fêmeas de carrapatos. A observação de larvas em microscópio óptico com azul de algodão antes e após fixação confirmou que as soluções também não foram capazes de retirar os conídios. Apesar das larvas terem sido imersas na suspensão

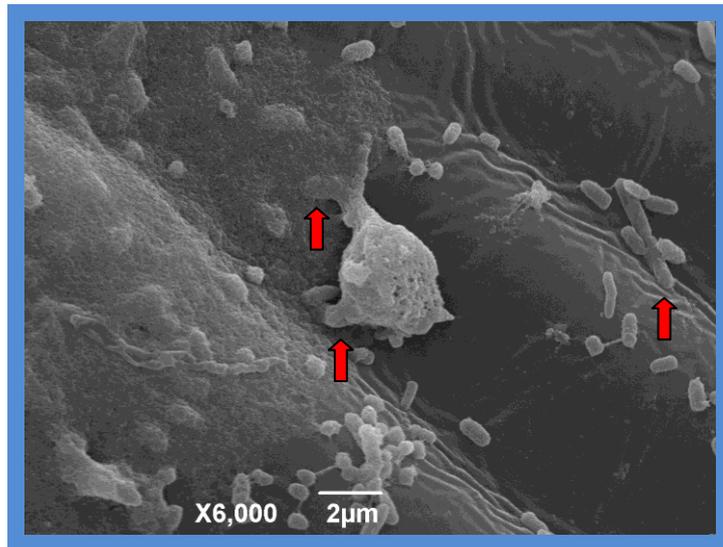


Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas ao isolado CG 138 de *Beauveria bassiana* 48 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar o desenvolvimento de hifas, penetração na cutícula e presença de bactérias de aspecto bacilar (seta).

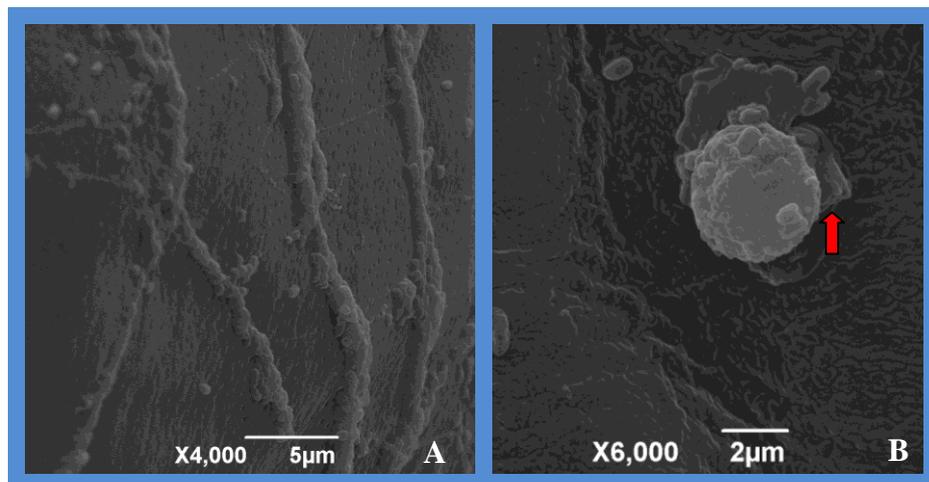


Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas ao isolado CG 138 de *Beauveria bassiana* 72 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar o desenvolvimento de hifas sobre a cutícula (A) e ação enzimática fúngica na cutícula (B) (seta).

fúngica na concentração de 2×10^8 com. mL⁻¹ e serem mantidas nas placas de Petri, até o momento da fixação, foram observados poucos conídios sobre a superfície e reduzido desenvolvimento de suas hifas. Era de se esperar a presença de muitos conídios sobre a superfície larval, pois a suspensão fúngica também foi adicionada nas placas de Petri.

Nenhuma alteração que sugerisse crescimento fúngico no interior das larvas foi observada, mesmo tendo sido verificado a intensa ingestão dos conídios pelas larvas após exposição fúngica (Figura 2), o que poderia estar relacionado aos poucos conídios verificados sobre a superfície das larvas.

Bactérias foram observadas nas larvas expostas aos fungos (Figura 27) como nas pertencentes aos grupos controle (Figura 30A e B), entretanto em menor quantidade quando utilizada a sonicação (Figura 30A). A observação de toda a superfície das larvas revelou intenso crescimento bacteriano, principalmente nas reentrâncias da cutícula e sobre os conídios e hifas (Figura 31). Nas primeiras horas após exposição fúngica verificou-se o predomínio de bactérias com aspecto cocóide (Figura 30), enquanto que após 48 horas de realizado o ensaio fúngico, se observou o predomínio de bactérias com formato bacilar (Figura 31). Esta parte do estudo pode evidenciar que as bactérias sobre a superfície das larvas devem ser consideradas como um fator que dificulta o parasitismo dos isolados de *B. bassiana*, pois o teste de difusão em meio sólido sem cloranfenicol demonstrou que a bactéria de aspecto bacilar apresentou propriedades antifúngicas e um estudo mais detalhado sobre esta interação deve ser realizado.

De acordo com os resultados obtidos no estudo, onde foram verificados percentuais de mortalidade e emergência insatisfatórios, associados ao perfil cromatográfico e proteolítico e, principalmente, a constatação que o macerado de larvas previamente sensibilizadas ao fungo foi capaz de formar uma zona de inibição fúngica, pode-se sugerir que as larvas da mosca dos estábulos apresentam fatores antimicrobianos já questionados por Watson et al. (1995) e que precisam ser investigados mais profundamente.

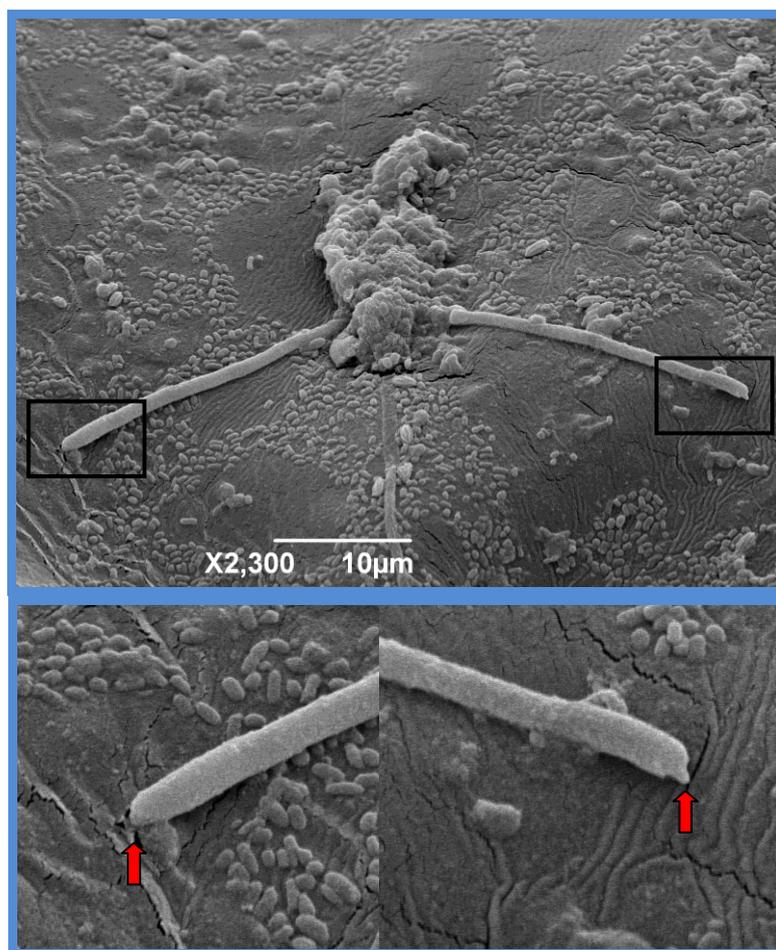


Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Stomoxys calcitrans* expostas ao isolado CG 138 de *Beauveria bassiana* 96 horas após exposição fúngica, onde se pode visualizar a formação de apressório (seta).

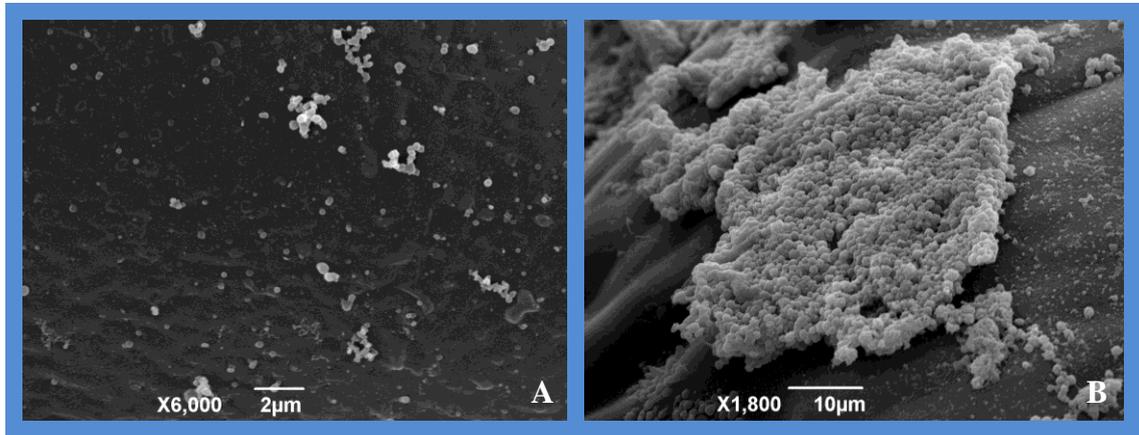


Figura 30 - Larvas de *Stomoxys calcitrans* pertencentes ao grupo controle sonicadas (A) e não sonicadas (B), apresentando diferente concentração de bactérias de aspecto cocóide.

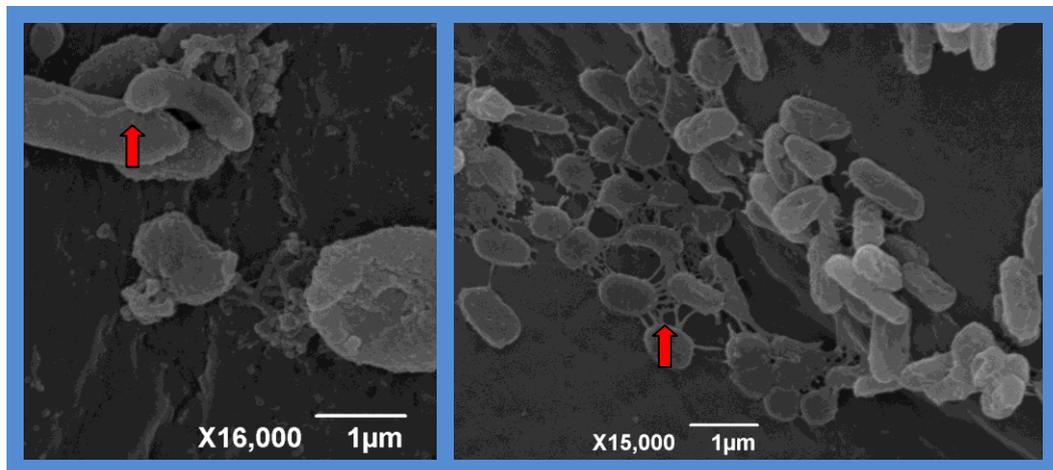


Figura 31 – Bactérias de formato bacilar e presença de flagelo (seta) e microfibrilas (seta) na superfície da cutícula de larvas de *Stomoxys calcitrans*.

5 CONCLUSÕES

Os isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* são capazes de se desenvolver no meio onde os estágios imaturos de *S. calcitrans* se desenvolvem, mas não foram eficazes como controladores microbianos nas concentrações conidiais utilizadas;

A maior exposição dos estágios imaturos de *S. calcitrans* aos isolados fúngicos pelo segundo método, onde foram imersos nas suspensões fúngicas e permaneceram em contato com os conídios até a leitura das placas, não influenciou os percentuais de mortalidade e emergência;

A permanência dos estágios imaturos em contato com os isolados de *B. bassiana* até a emergência dos adultos, pelo terceiro método de exposição fúngica, onde as suspensões fúngicas foram aspergidas sobre a dieta de criação, não contribuiu para o aumento da mortalidade;

O macerado de larvas de *S. calcitrans* previamente sensibilizadas ao isolado CG 138 de *B. bassiana* apresentou atividade antimicrobiana, pois inibiu o desenvolvimento deste isolado, através do teste de difusão em meio sólido com antibiótico;

O teste de difusão em meio sólido sem antibiótico permitiu o crescimento de uma bactéria que apresentou atividade antimicrobiana e com potencial simbiótico identificada como *Stenotrophomonas maltophilia*;

O perfil cromatográfico (CLAE) do macerado e muco das larvas de *S. calcitrans* expostas aos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* apresentou resultados sugestivos de atividade antimicrobiana;

O zimograma do macerado e muco das larvas de *S. calcitrans* expostas aos isolados CG 138, CG 228 e ESALQ 986 de *B. bassiana* apresentou resultados sugestivos atividade antimicrobiana;

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o isolado CG 138 de *B. bassiana* apresentou crescimento lento e presença de poucos conídios, indicando atividade antimicrobiana, que afeta o processo de fixação e desenvolvimento fúngico sobre a cutícula das larvas de *S. calcitrans*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos até o momento com os testes de inibição fúngica, CLAE, eletroforese protéica, proteolítica e MEV ainda não são conclusivos para afirmar quais os fatores estão envolvidos na resposta imune de larvas de *S. calcitrans* contra os isolados de *B. bassiana* testados. Eles foram empregados para demonstrar a presença de atividade antimicrobiana e que os resultados insatisfatórios de mortalidade e emergência, obtidos nos diferentes ensaios de exposição fúngica, estão relacionados à capacidade dos estágios imaturos da mosca dos estábulos em debelar uma infecção fúngica por *B. bassiana*.

Há a necessidade de se testar quais microrganismos podem ser efetivos no controle biológico de *S. calcitrans*, visto que existem fatores relacionados ao fungo e a seus estágios imaturos que contribuem para a tolerância aos diferentes isolados de *B. bassiana*, assim como novos estudos devem ser desenvolvidos para constatar quais fatores e substâncias relacionadas à resposta imune das larvas, contribuem para que os estágios imaturos de *S. calcitrans* possam se desenvolver em ambientes com grande diversidade microbiana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v. 18, p. 265-267, 1925.
- AJIDAGBA, P. A.; BAY, D. E.; PITTS, C. W. morphogenesis of the external features of the first-stage larva of the Stable Fly (Diptera: Muscidae). *Journal of the Kansas Entomology Society*, v. 58, n. 4, p. 569-577, 1985.
- ALMEIDA, T. G.; BERTELLI, E. C. P.; ROSSIT, A. R. B.; BERTOLLO, E. M. G.; MARTINEZ, M. B. Infecções hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspectos clínico-epidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana. *Arquivo Ciência e Saúde*, v. 12, n. 3, p. 141-145, 2005.
- ALVES, P. S. Avaliação experimental de *Lecanicillium lecanii* no controle biológico de *Stomoxys calcitrans*. 2010. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- ALVES, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2^a ed., São Paulo: FEALQ, 1998, 1163 p.
- ÁNGEL-SARAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MONILA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPES-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S. R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 50, 2005.
- ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIENSE, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; MORAES, A. P. R.; TERRA, A. L. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 317-322, 2010.
- BADINI, P. B.; MORAES, A. P. R.; SILVA, R. T.; BITTENCOURT, A. J. Parasitismo por *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) associado a diferentes regiões do corpo e pelagem de vacas leiteiras do município de Resende – RJ. In: XIII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2003. Seropédica. Anais... Seropédica: Editora da Universidade Rural, 2003. v. 13, n. 1, p. 335-338.
- BADINI, P. V.; MORAES, A. P. R. CASTRO, B. G.; ALMEIDA, C. R. R.; SOUZA, M. M. S.; BITTENCOURT, A. J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites no município de Rio Claro – RJ. In: XIV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2004. Seropédica. Anais... Seropédica: Editora da Universidade Rural, 2004. v.14, n. 1, p. 443-448.
- BARNES, S. E.; MOORE, D. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviridae*. *Mycology Research*, v. 101, n. 6, p. 662-666, 1997.

BARROS, A. T. M.; KOLLER, W. W.; CATTO, J. B.; SOARES, C. O. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato do Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 11, 945-952, 2010.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the House Fly (*Musca domestica*, L.), a pest of intensive animal units. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, p. 107-134, 1994.

BAYLEY, D. L.; WHITEFIELD, T. L.; SMITTLE, B. J. Flight and dispersal of the stable fly. *Journal of Economic Entomology*, v. 66, n. 2, p. 410-411, 1973.

BEM-GIGIREY, B.; VIEITES, J. M.; KIM, S. H.; NA, H. VILLA, T. G.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Specific detection of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by reverse dot-blot hybridization. *Food Control*, v. 13, p. 293-299, 2002.

BENIGNO, R. N. M. Classificação etária, fisiológica e comportamento alimentar de acordo com o sexo e desenvolvimento ovariano em *Stomoxys calcitrans* (L.) (DIPTERA-MUSCIDAE). 1987. 96p. Tese (Mestrado em Ciências em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1987.

BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; NASCIMENTO, J. S.; RIBEIRO, P. B.; SILVA, C. I. Efeito de fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em laboratório. *Arquivo do Instituto Biológico*, v. 73, n. 1, p. 127-129, 2006.

BITTENCOURT, A. J. Aspectos clínico-epidemiológicos de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em bovinos e eqüinos em Espírito Santo do Pinhal - SP. 1998. 120f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

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

BITTENCOURT, A. J.; MOYA BORJA, G. E. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Muscidae): preferência por locais do corpo de bovinos para alimentação. *Revista Brasileira de Zoociências*, v.4, n. 1, p. 75-83, 2002.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*, v. 29, n. 2, p. 351-354, 1999.

BLAKEMORE, D.; WILLIAMS, S.; LEHANE, M. J. Protein stimulation of trypsin secretion the opaque zone midgut cells of *Stomoxys calcitrans*. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 110B, n. 2, p. 301-307, 1995.

BOULANGER, N.; MUNKS, R. J. L.; HAMILTON, J. V.; VOVELLE, F.; BRUN, R.; LEHANE, M. J.; BULET, P. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the

blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 51, p. 49921-49926, 2002.

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

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

BRUNO, T. V.; GUIMARÃES, J. H.; SANTOS, A. M.; TUCCI, E. C. Moscas sinantrópicas (Diptera) e seus predadores que se criam em esterco de aves poedeiras confinadas, no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 37, n. 3, p. 577-590, 1993.

BULET, P; STÖCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*, v. 12, p. 3-11, 2005.

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

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

CAMPBELL, J. B.; SKODA, S. R.; BERKEBILE, D. R.; BOXLER, D. J.; THOMAS, G. D.; ADAMS, D. C.; DAVIS, R. Effects of Stable Flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. *Veterinary Entomology*, v. 94, n. 3, p. 780-783, 2001.

CAMPOS, R. A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J. T.; SILVA, M. V.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.; SCHRANK, A. VAINSTEIN, M. H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*, v. 50, p. 257-261, 2005.

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

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

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

CASTRO, B. G. Avaliação da microbiota bacteriana de segmentos da mosca *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) em propriedades rurais de municípios da

microrregião do Vale do Paraíba Fluminense. 2004. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

CASTRO, B. G.; SOUZA, M. M.; BITTENCOURT, A. J. Microbiota bacteriana em segmentos de mosca do estábulo *Stomoxys calcitrans* no Brasil: primeiro relato de espécies. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 3, p. 1029-1031, 2008.

CHERRY, A. J.; ABALO, P.; HELL, K. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Collosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in store cowpea. *Journal of Stored Products Research*, v. 41, p. 295-309, 2005.

CHRISTMAS, P. E. Laboratory rearing of the biting fly *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), p. 446-49, 1970. Disponível em: http://www.ento.org.nz/nzentomologist/free_issues/volume%204-4-45-49.pdf. Acesso em: 13 mar. 2005.

CIENCIALOVÁ, A.; NEUBAUEROVÁ, T.; SANDA, M.; SINDELKA, R.; CVACKA, J.; VOBURKA, Z.; BUDESÍNSKÝ, M.; KASICKA, V.; SÁZELOVÁ, P.; SOLINOVÁ, V.; MACKOVÁ, M.; KOUTEK, B.; JIRÁCEK, J. Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. *Journal of Peptide Science*, v. 14, p. 670-682, 2008.

CILEK, J. E.; GREENE, G. L. Stable fly (Diptera: Muscidae) Insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. *Journal of Economic Entomology*, v. 87, n. 2, p. 275-279, 1994.

COCIANCICH, S.; GHAZI, A.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A.; LETELLIER, L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 26, p. 19239-19245, 1993.

COHEN, E. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Annual Reviews Entomology*, v. 32, p. 71-93, 1987.

COLWELL, D. D.; KOKKO, E. G. Preparation of diptera larvae for scanning electron microscopy using a freeze-substitution technique. *Canadian Journal Zoology*, v. 64, p. 797-799, 1985.

COOK, D. F.; DADOUR, I. R.; KEALS, N. J. Stable fly, house fly (Diptera: Muscidae), and other nuisance fly development in poultry litter associated with horticultural crop production, *Journal of Economic Entomology*, v. 92, n. 6, p. 1352-1357, 1999.

CRUZ-VÁZQUEZ, C.; RANGEL, S. M.; MENDOZA, I. V.; PARRA, M. R.; MARTÍNEZ, M. T. Q.; VÁRQUEZ, Z. G. Variación anual de la infestación por *Stomoxys calcitrans* (L.) (DIPTERA:MUSCIDA) em tres establo lecheros de Aguascalientes México. *Técnica Pecuária em México*, v. 38, n. 002, p. 135-142, 2000.

CUERVO, P.; MESQUITA-RODRIGUES, C.; LEVY, C. M. A.; BRITTO, C.; PIRES, F. A.; GREDILHA, R.; ALVES, C. R.; JESUS, J. B. Serine protease activities in *Oxysarcodexia thornax* (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p. 504-506, 2008.

DAFFRE, S.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M. T. M.; BULET, P.; SILVA JR., P. I.; MACHADO, A.; FOGAÇA, A. C.; LORENZINI, D. M.; PEREIRA, L. S.; FÁZIO, M. A.; ESTEVES, E.; BURGIERMAN, M. R. Peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 23, p. 48-55, 2001.

DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, v. 411, p. 826-833, 2001.

DAVIDSON, E. W.; SWEENEY, A. W. Microbial control of vectors: A decade of progress. *Journal of Medical Entomology*, v.20, n.3, p.235-247, 1983.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia Eletrônica de Varredura. Aplicações e preparações de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007, 60p.

DEVI, K. U.; SRIDEVI, V.; MOHAN, C. M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on *in vitro* germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 88, p. 181-189, 2005.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insect: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews Entomology*, v. 49, p. 71-92, 2004.

DOUGHERTY, C. T.; KNAPP, F. W.; BURRUS, P. B.; WILLIS, D. C.; BURG, J. G.; CORNELIUS, P. L.; BRADLEY, N. W. Stable flies (*S. calcitrans* L.) and the behavior of grazing beef cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 35, n. 3, p. 215 - 233, 1993.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, v. 31, p. 321-339, 1986.

FARGUEZ, J.; GOETTEL, M. S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, v. 89, p. 383-392, 1997.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and micoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classificacion of formulacion types. *Biological Control*, v. 43, p. 237-256, 2007.

FERNANDES, E. K. K. F. Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus*. 2007. 130f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

FERNANDES, E. K. K.; MORAES, A. M. L.; PACHECO, R. S.; RANGEL, D. E. N.; MILLER, M. P.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Genetic diversity among

Brasilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparison with non-Brasilian isolates and other *Beauveria* species. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, p. 760-774, 2009.

FOIL, L. D.; HOGSETTE, J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et Technique*, v. 13, n. 4, p. 1125 – 1158, 1994.

FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. V.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Crysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, n. 1, p. 155 - 156, 1983.

FURMAN, D.P.; CATTS, E.P. *Manual of Medical entomology*. 4a ed, Cambridge: University Press, 1982, 207p.

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TORII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 9, p. 5336-5342, 2003.

GABRIEL, B. P. Enzymatic Activities of some Entomophthorous Fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.II, p. 70-81, 1968.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Ciência Rural*, v. 34, n. 5, p. 1513-1518, 2004.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; PRETTE, N. Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 4, p. 855-863, 2008.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABO, M. J.; PRETTE, N.; BECHARA, G. H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 368-372, 2005.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GRODOWITZ, M. J.; KRCHMA, J.; BROCE, A. B. A method for preparing soft bodied larval diptera for scanning electron microscopy. *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 55, n. 4, p. 751-753, 1982.

GUIMARÃES, J. H. Moscas – Biologia, ecologia e controle. *Agroquímica Ciba-Geigy*, n. 21, p. 20-26, 1983.

GUIMARÃES, J. H. Mosca dos estábulos - Uma importante praga do gado. *Agroquímica Ciba - Geigy*, n. 23, p. 10 - 14, 1984.

GUIMARÃES, J. H. Mosca sinantrópicas – Perspectivas de manejo integrado em aviários no estado de São Paulo. *Agroquímica Ciba - Geigy*, n. 28, p. 10 - 15, 1985.

HAFEZ-M; GAMAL-EDDIN, F.M. On the feeding habits of *Stomoxys calcitrans* (L.) and sites Rond., with special reference to their biting cycle in nature. *Bulletin of the Entomological Society Egypt*, v. 4, p. 241-301, 1959.

HALL, I. M.; DULMAGE, H. T.; ARAKAWA, K. Y. Laboratory tests with entomogenous bacteria and the fungus *Beauveria bassiana* against the little house fly species *Fannia canicularis* and *F. femoralis*. *Environmental Entomology*, v. 1, n. 1, 105-107, 1972

HALL, R.A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultura and medical importance. *Parasitology*, v. 84, p. 205-240, 1982.

HAMILTON, J. V.; MUNKS, R. J. L.; LEHANE, S. M.; LEHANE, M. J. Association of midgut defensin with a novel serineprotease in the blood-sucking fly *Stomoxys calcitrans*, *Insect Molecular Biology*, v. 11, n. 3, p. 197–205, 2002.

HAN, Z. S.; ENSLEN, H.; HU, XD; MENG, XJ.; WU, IH; BARRETT, T.; DAVIS, R. J.; IP, YT. A conserved p38 mitogenactivated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, v. 18, n. 6, p. 3527-3539, 1998.

HANSENS, E. J. The stable fly and its infests on seashore recreational areas in New Jersey. *Journal of Economic Entomology*, v. 44, n. 4, p. 482-487, 1951.

HERRERO, M. V.; MONTES, L.; SANABRIA, C.; SÁNCHEZ, A.; HERNÁNDEZ, R. Estudio inicial sobre la mosca de los establos *Stomoxys calcitrans* (Díptera: Muscidae), em la region del pacífico sur de Costa Rica. *Ciências Veterinárias*, v.XI, n. 2 e 3, p. 11-14, 1989.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. *Drosophila* immunity. *Trends in Cell Biology*, v. 7, n. 8, p. 308-316, 1997.

HUNT, D, W. A. Absence of fatty acid germination inhibitors for conidia of *Beauveria bassiana* on the integument of the Bark Beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *The Canadian Entomologist*, v. 118, n. 8, p. 837-838, 1986.

HUNT, D. W. A.; BORDEN, J. H.; RAHE, J. E. Nutrient-mediated germination of *Beauveria bassiana* conidia on the intertegument of the Bark Beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 44, p. 304-314, 1984.

IBARRA-APARICIO, G.; MOYA-RAYGOZA, G.; BERLANGA-PADILLA, A. Efectos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chigarrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (DeLong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomologica Mexicana*, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2005.

JAMES, R. R.; BUCKNER, J. S.; FREEMAN, T. P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 84, p. 67-74, 2003.

- JARROLD, S. L.; MOORE, D.; POTTER, U.; CHARNLEY, K. the contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research*, v. III, p. 240-249, 2007.
- JING, Y. J.; HAO, Y. J.; QU, H.; SHAN, Y.; LI, D. S.; DU, R. Q. Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. *Acta Biologica Hungarica*, v. 58, n. 1, p. 75-86, 2007.
- JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYLES, W. L. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): Evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *Journal Medical Entomology*, v. 35, n. 4, p. 458-464, 1998.
- JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYLES, W. L. Identification of defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, 857-865, 2001.
- JONES, C. M. Stable Flies. In: SMITH, C. N. *Insect Colonization and Mass Production*. New York: Academic Press, 1966, p. 145 - 152.
- JONES, C. J.; PATTERSON, R. S.; MILNE, D. E. Eletrophoretic comparisons of isozymes from selected population of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal Medical Entomology*, v. 24, n. 1, p. 54-60, 1987.
- JORDÃO, B. P.; LEHANE, M. J.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the Stablefly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26, n. 5, p. 445-453, 1996.
- KAAYA, G. P. *Glossina morsitans morsitans*: Mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. *Acta Tropica*, v. 46, p. 107-114, 1989.
- KAAYA, G. P.; MUNYINNYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse Flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 66, p. 237-241, 1995.
- KAVALIERS, M.; COLWELL, D. D.; CHOLERIS, E. Learning to fear and cope with a natural stressor: individually and socially acquired corticosterone and avoidance responses to biting flies. *Hormones and Behavior*, v. 43, p. 99-107, 2003.
- KERR, Jr. Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 45, p. 380-382, 1996.
- KING, W. V.; LENERT, L. G. Outbreaks of *Stomoxys calcitrans* L. ("dog flies") along Florida's northwest coast. *Florida Entomologist*, v. XIX, n. 3, p. 33 - 39, 1936.
- KONEMMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINNG, W. C. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. Editora Médica e Científica Ltda: Rio de Janeiro, 2001, 1.465p.

KOUASSI, M. Les possibilités de la lutte microbiologique, emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo-Les revue en sciences de l'environnement sur le WEB*, v. 2, n. 2, 2001.

LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TAROCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 3, p. 332-336, 2005.

LEHANE, S. M.; ASSINDER, S. J.; LEHANE, M. J. Cloning, sequencind and tissue-specificity of two putative digestive serine proteases from *Stomoxys calcitrans*. *European Journal of Biochemistry*, v. 254, p. 290-296, 1998.

LEMOS, F. J. A.; TERRA, W. R. Digestion of bactéria and the role of midgut lysozime in some insect larvae. *Comparative Biochemistry Physiogy.*, v. 100B, n. 2, p. 265-268, 1991.

LEYS, N. M. J.; RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M.; SPRINGAEL, D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, 1944-1955, 2004.

LOCKEY, K. H. Insect cuticular lipidás. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 81B, n.2, 263-273, 1985.

LOHMEYER, K. H.; MILLER, J. A. Pathogenicity of three formulations of enthomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Biological and Microbial Control*, v. 99, n. 6, p. 1943-1947, 2006.

LYSYK, T. J. ; KALISCHUK-TYMENSEN, L.; SELINGER, L. B.; LANCASTER, R. C.; WEVER, L.; CHENG, K. L. Rearing stable fly larvae (Diptera: Muscidae) on an egg yolk medium. *Journal Medical*, v. 36, n. 3, p. 382-388, 1999.

LYSYK, T. J. ; KALISCHUK-TYMENSEN, L.; SELINGER, L. B. Comparison of selected growth media for culturing *Serratia marcescens*, *Aeromonas* sp., and *Pseudomonas aeruginosa* as pathogens of adult *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 39, n. 1, p. 89-98, 2002.

MACEDO, D. M. Desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Díptera: Muscidae) e *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) criadas em fezes de bovinos tratados com diferentes avermectinas. 2001. 97f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Química Nova*, v. 27, n. 5, 781-789, 2004.

MANIANIA, N. K. A laboratory technique for infecting adult tsetse with a fungal pathogen. *Insect Science and its Application*, v. 15, n. 4/5, p. 421-426, 1994.

MARKWELL M. A. K.; HAAS, S. M.; BIEBER, L. L.; TOLBERT, N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, v. 87, p. 206-210, 1978.

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

MCCOY, C. W.; TIGANO-MILANI, M. S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 27, p. 87 – 93, 1992.

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

MELLO R. P.; GARCIA, M. L. Effects of different blood diets on the reproductive activity of female *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Arquivo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 6, n. 1, p. 75-80, 1983.

MELO, D. R.; CRUZ, G. B.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 3, p. 166-170, 2007.

MELO, R. F. R.; HARDUIM, R. C.; CASTRO, B. G.; BITTENCOURT, A. J. Avaliação toxigênica de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium corylophilum* (Eurotiales Ascomycota) isoladas de *Stomoxys calcitrans*. *Revista de Ciências da Vida*, v. 28, p. 43-45, 2008. Supl.

MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre a cepa de *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the temperature agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, v. 43, 145-155, 2007.

MIHOK, S.; CLAUSEN, P. H. Feeding habits of *Stomoxys* spp. stable flies in a Kenyan forest. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 10, p. 392-394, 1996.

MISSAU, F. C.; GILIOLI, A.; JOHANN, S.; 2 (PG), RESENDE, M. A; PIZZOLATTI, M. G. Atividade antifúngica dos extratos e compostos isolados de *Polygala paniculata*. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química em Águas de Lindóia, São Paulo, 2006.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, A. C. R. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 1, p. 62-66, 2009.

- MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, A. C. R.; YOSHIDA, L. Entomopathogenic fungal activity against pupae and adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology*, v. 168, n. 1-2, p. 105-110, 2010.
- MOINO Jr., A. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; NEVES, P. M. O.J.; PEREIRA, R. M.; VIEIRA, S. A. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola*, v. 59, n. 2, p. 267-273, 2002.
- MOFFATT, M. R.; BLAKEMORE, D.; LEHANE, M. J. Studies on the synthesis and secretion of trypsin in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 110B, n. 2, p. 291-300, 1995.
- MOORHOUSE, D. E. Cutaneous lesions on cattle caused by Stable Fly. *Australian Veterinary Journal*, v. 48, p. 643-644, 1972.
- MORAES, A.P.R. *Stomoxys calcitrans*: estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos. 2007, 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- MORAES, A. P. R.; ANGELO, I. C. A.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; BITTENCOURT, A. J. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to Eggs and Immature Stages of *Stomoxys calcitrans*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of New York Academy Sciences*, v. 1149, p. 384-387, 2008.
- MORAES, A. P. R.; BADINI, P. V.; SOUZA, M. M. S.; BITTENCOURT, A. J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 13, n. 4, p. 143-149, 2004.
- MORAES, J. L. C. Toxicidade comparativa de alguns inseticidas organofosforados e piretróides sobre larvas e adultos de *Stomoxys calcitrans* Linnaeus, 1758. 1990. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1990.
- MOYA-BORJA, G. E. O berne: biologia, comportamento e controle. *Agroquímica Ciba Geygi*, v. 17, p. 19-26, 1982.
- MUNKS, R. J. L.; HAMILTON, J. V.; LEHANE, S. M.; LEHANE, M. J. Regulation of midgut production in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Insect Molecular Biology*, v. 10, n. 6, 561-571, 2001.
- NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 85, p. 80-88, 2004.
- NETO, E. M. C. Os moluscos na zooterapia: medicina tradicional e importância clínico-farmacológica. *Revista Biotemas*, v. 19, n. 3, p. 71-78, 2006.

NETO, F. R. A.; SILVA, D.; NUNES, S. *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

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

NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Grooming capacity in *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) inoculated with entomopathogenic fungi and treated with imidacloprid. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 29, n. 3, p. 537-545, 2000.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Vantagens e desvantagens das colunas C18 e C30 para a separação de carotenóides por CLEA. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 4, p. 539-543, 2006.

OLIVEIRA, S. J. Guia bacteriológico prático: Microbiologia Veterinária. Canoas: Ed. ULBRA, 2000, 240p.

PAIVA, D. P. Controle integrado de moscas em criação de suínos. *Suinocultura Dinâmica*, ano. II, n. 12, 1-5, 1994.

PARR, H. C. M. Studies on *Stomoxys calcitrans* (L.) in Uganda, East Africa. II. Notes on life – history and behaviour. *Bulletin De La Societe Entomologique D'Egite*, v. 53, n. 2, p. 437 – 443, 1962.

PEKRUL, S.; GRULA, E. A. mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 34, n. 3, 238-247, 1979.

PELAGATTI, O.; FRATE, G.; PICCO, A.; CARETTA, G. Fungi associated with insects found in various Italian environments: further observations. *Redia*, v. LXXVI, n. 1, 169-178, 1993.

PEROTTI, M. A.; LYSYK, L. D.; KALISCHUK-TYMENSEN, L. D.; YANKE, L. J.; SELINGER, L. B. Growth and survival of immature *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) is influenced by bacteria isolated from cattle manure and conspecific larvae. *Journal of Medical Entomology*, v. 38, n. 2, p. 180-187, 2001.

PHILPOOT, M.; EZEH, A. O. The experimental transmission by *Musca* and *Stomoxys* species of *D. congolensis* infection between cattle. *British Veterinary Journal*, v. 134, n. 6, p. 515 – 520, 1978.

RICHARD, J. L.; PIER, A. C. Transmission of *Dermatophilus congolensis* by *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica*. *American Journal Veterinary Research*, v. 27, n. 117, p. 419-421, 1966.

RIZZO, D. C. Age of three dipteran hosts as a factor governing the pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.30, p.127-130, 1977.

ROMERO, A.; BROCE, A.; ZUREK, L. Role of bacteria in the oviposition behaviour and larval development of Stable Flies. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 20, p. 115-121, 2006.

RUSSELL, V.; DUNN, P.E. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Journal of Insect Physiology*, v.42, 65–71, p. 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. A8.1 – A8.55, 2001.

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

SASSÁ, D. C.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D. T.; NEVES, P. M. O. J.; WU, J. I.; SUGAHARA, V. H.; KAMOGAWA, E. Avaliação de parâmetros cinéticos de quitinases produzidas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 4, p. 807-814, 2008.

SCHMIDTMANN, E. T.; MARTIN, P. A. W. Relationship between selected bacteria and the growth of immature house flies, *Musca domestica*, in an axenic test system. *Journal of Medical Entomology*, v. 29, n. 2, p. 232-235, 1992.

SCREEN, S. E.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *Anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 78, p. 260-266, 2001.

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

SENNA-NUNES, M.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E.; SOUZA, E. J. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophyllum* em larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitologia Latinoamericana*, v. 57, p. 134-140, 2002a.

SENNA-NUNES, M.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E.; SOUZA, E. J. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophyllum* em ADULTOS de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitologia Latinoamericana*, v. 57, p. 9-14, 2002b.

SILVA, C. C. A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 24, 68-72, 2002.

SKOVGARD, H.; STEENBERG, T. Activity of pupal parasitoids of the stable fly *Stomoxys calcitrans* and prevalence of entomopathogenic fungi in the stable fly and house fly *Musca domestica* in Denmark. *BioControl*, v. 47, N. 1, p. 45 – 60, 2002.

SMITH, R. J.; GRULA, E. A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 37, n. 3, 222-230, 1981.

SMITH, J.; GRULA, E.A. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.39, n.1, p.15-22, 1982.

SMITS, N.; BRIERE, J. F.; FARGUES, J. Comparison of non-linear temperature-dependent development rate models applied to *in vitro* growth of entomopathogenic fungi. *Mycological Research*, v. 107, p. 1476-1484, 2003.

SOARES-RAMOS, J. R. L.; RAMOS, H. J. O.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 4, p. 537-543, 2003.

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

ST. LEGER, R.J. et al. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied Environmental Microbiology*, v.64, n.2, p.709-713, 1998.

ST. LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Prepenetration events during infection of cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 58, p. 168 – 179, 1991.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (Manduca sexta) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 907-912, 1996.

STEINKRAUS, D. C.; GEDEN, C. J.; RUTZ, D. A.; KRAMER, J. P. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales - Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, v.27, n. 3, p.309-312, 1990.

STEINKRAUS, D.C.; KRAMER, J. P. Susceptibility of sixteen species of Diptera to the fungal pathogen *Entomophthora muscae* (Zygomycetes: Entomophthoraceae). *Mycopathologia*. v. 100, n. 55 – 63, 1987.

SUTHERLAND, B. The suitability of various types of dung and vegetable matter as larval breeding media for *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.45, p. 241-243, 1978a.

- SUTHERLAND, B. Nutritional values of different blood diets expressed as reproductive potentials in adult *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 45, n. 3, p. 209-212, 1978b.
- SWEETMAN, H.L. *The Biological Control of Insects*. Ithaca, New York: Comstock Publishing Company, Inc., 1936, 461 p.
- TARRY, D. W.; CARROLL, P. J. Summer mastitis: transmission by blood feeding flies. *The Veterinary Record*, v. 10, p. 304, 1988.
- THOMAS, A. M.; RUDOLF, V. W. Challenges of metamorphosis in invertebrate hosts: maintaining parasite resistance across life-history stages. *Ecological Entomology*, v.35, n. 2, p. 200-205, 2010.
- TSUJI, Y.; NAKAJIMA, Y.; HOMMA, K.; NATORI, S. Antibacterial activity of a novel 26-kDa serine protease in the yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) pupae. *FEBS Lett* **425**: 131–133; 1998.
- TZOU, P.; OHRESSER, S.; FERRANDON, D.; CAPOVILLA, M.; REICHHART, J.M.; LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J.A.; IMLER, J.L. Tissuespecific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*, v. 13, p. 737-748, 2000.
- VALIPE, S.; CHOI, G.; MORTON, M.; NADEAU, J. Investigation of the antimicrobial mechanism of caprylic acid on *Dermatophilus congolensis*. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 29, n. 5, p. 404-405, 2009.
- VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Identificação e avaliação da diversidade de novos isolados de bactérias diazotróficas em plantas de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 24, n.2, p. 35-40, 2004.
- VILCINSKAS, A.; WEDDE, M. Inhibition of *Beauveria bassiana* proteases and fungal development by inducible protease inhibitors in the haemolymph of *Galleria mellonella*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 7, n. 4, p. 591-602, 1997.
- XIA, Y.; CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. Trealose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 80, p. 139-147, 2002.
- WANG, R.F; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 1242-1247, 1996.
- WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae), *Biological Control*. v. 5 p. 405-411, 1995.

WEI-BING, S; MING-GUANG, F. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biological Control*, v. 30, 165-173, 2004.

WHITE, S. D.; BOURDEAU, P. Hypersensibilités aux piqûres de diptères chez les carnivores. *Le point vétérinaire*, v. 27, n. 169, p. 203-206, 1995.

WIEMAN, G. A.; CAMPBELL, J. B.; DESHAZER, J. A.; BERRY, I. L. Effects of Stable Flies (Diptera: Muscidae) and Heat stress on weight gain and feed efficiency of feeder cattle. *Veterinary Entomology*, v. 85, n. 5, p. 1835-1841, 1992.

YA-LI, T.; YONG-HUI, S.; WEI, Z.; GANG, H.; GUO-WEI, L. Discovery of a novel antimicrobial peptide using membrane binding-based approach. *Food Control*, v. 20, p. 149-156, 2009.

YERUHAM I.; BRAVERMAN, Y. Skin lesions in dogs, horses and calves caused by the Stable Flies *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, v. 48, n. 4, p. 347-349, 1995.

YUN, S. S.; SCOTT, A. P.; BAYER, J. M.; SEELYE, J. G.; CLOSE, D. A.; LI, W. HPLC and ELISA analyses of larval bile acids from Pacific and western brook lampreys. *Steroids*, v. 68, p. 515-523, 2003.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 17, n. 5/6, p. 553-596, 2007.

ZUREK, L.; SCHAL, C.; WATSON, D. W. Diversity and contribution of the intestinal bacterial community to the development of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. *Journal of Medical Entomology*, v. 37, n. 6, p. 924-928, 2000.