

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da mortalidade de larvas de
Ctenocephalides felis felis por nematoides
entomopatogênicos *Heterorhabditis spp.***

ANA CAROLINE FERREIRA DE SOUZA

2020



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

**Avaliação da mortalidade de larvas de
Ctenocephalides felis felis por nematoides
entomopatogênicos *Heterorhabditis spp.***

ANA CAROLINE FERREIRA DE SOUZA

Sob a Orientação da Professora
Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli

e Coorientação da Professora
Thaís Ribeiro Correia Azevedo

Dissertação submetida como
requisito parcial para a obtenção do
grau de **Mestre** em Ciências no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

S719a Souza, Ana Caroline Ferreira de, 1982-
Avaliação da mortalidade de larvas de
Ctenocephalides felis felis por nematoides
entomopatogênicos Heterorhabditis spp. / Ana
Caroline Ferreira de Souza. - Botucatu, 2020.
52 f.: il.

Orientadora: Melissa Carvalho Machado do Couto
Chambarelli.
Coorientadora: Thais Ribeiro Correia.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias, 2020.

1. Ctenocephalides felis felis. 2. Nematoides
entomopatogênicos. 3. Controle biológico de pulgas. I.
Chambarelli, Melissa Carvalho Machado do Couto, 1979
, orient. II. Correia, Thais Ribeiro , 1978-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Titulo.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO
DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 3835/2020 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.066979/2020-63

Seropédica-RJ, 10 de
dezembro de 2020.

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

ANA CAROLINE FERREIRA DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/03/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 10/12/2020 21:45)

VELINO JOSE BITTENCOURT

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)

Matrícula: 2181861

(Assinado digitalmente em 11/12/2020 11:58)

MELISSA CARVALHO MACHADO DO COUTO
CHAMBARELLI

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: 2221840

(Assinado digitalmente em 15/12/2020 13:48)

CLAUDIA DE MELO DOLINSKI

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 901.597.997-91

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3835, ano: 2020, tipo: ATA, data de emissão: 10/12/2020 e o código de verificação: 2cf4ebec8a

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

(Fernando Sabino)

**Dedico este trabalho primeiramente à Deus, aos meus
queridos pais, aos meus irmãos e sobrinha, aos meus
amigos e a todos os animais de estimação que já
passaram pela minha vida e me ajudaram a não
desistir nos momentos mais difíceis.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força e coragem durante essa longa caminhada.

A minha mãe Benedita Ferreira de Souza e ao meu pai Carlos Marcílio Fontes Balestrero que não mediram esforços para que eu chegassem até esta etapa da minha vida, pelo amor, carinho, paciência e seus ensinamentos e que me moldaram na pessoa que sou.

A Ana Rosa Rossetto por todo apoio e incentivo durante a minha vida e principalmente nessa jornada acadêmica, nunca deixando que eu desistisse desse sonho.

Aos meus gatos, Gelatina, Canjica e “Minhojo”, que estão comigo desde o início dessa caminhada, sem eles essa etapa jamais teria sido concluída.

Ao meu namorado Renato Gonçalves Rangel, companheiro durante esses últimos anos pelo carinho, incentivo e por ter acreditado em mim, mesmo nos momentos mais difíceis e aos meus sogros Marta Lúcia Gonçalves da Silva e Ediomar Rangel Lobo “Seu Bedeu” pelo apoio recebido nesses anos.

Aos meus amigos Danielle Pereira da Silva, Daniel Santos Rabelo, Juliana Letícia Rossetto Marques, companheiros de trabalho e irmãos na amizade, que fizeram parte na minha formação e que vão continuar presentes em minha vida, por tudo que nós vivemos nesses últimos anos.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli, por ter confiado e acreditado em mim nessa jornada que é o Mestrado, por toda sua atenção, orientação, dedicação e esforço para que eu criasse confiança e segurança na realização desta etapa.

A minha co-orientadora Prof. Dra. Thaís Ribeiro Correia Azevedo, por todos os ensinamentos e puxões de orelhas, bem merecidos.

Ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes, pelo meu desenvolvimento como profissional, e aos queridos amigos da família LCM e do Laboratório de Dípteros Hematófagos Américo Monteiro, Grazielle Calixto, Manuella Dantas, Janisse Gomes, Bárbara Procópio e Priscila Uliano pelos trabalhos em equipe e ajuda nos experimentos

A Prof.^a Dra Claudia de Melo Dolinski por ter cedido os nematoides para desenvolvimento da nossa colônia e por toda ajuda que foi fundamental para esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof.^a Dr. Avelino José Bittencourt e Prof.^a Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pelos ensinamentos, pela ajuda na realização dos experimentos e por ter cedido o espaço para que pudéssemos realizar os ensaios biológicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa e financiamento do projeto.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, auxiliaram para o desenvolvimento desse trabalho.

BIOGRAFIA

Ana Caroline Ferreira de Souza, filha de Benedita Ferreira de Souza e Carlos Marcílio Fontes Balestrero, nasceu no dia 19 de dezembro de 1982, no município de Botucatu, São Paulo.

Iniciou o ensino fundamental na Escola Estadual Angelino de Oliveira no ano de 1990, tendo concluído o mesmo na Escola Estadual Dom Lúcio Antunes de Souza em 1997, iniciando o ensino médio nessa mesma escola, vindo a concluir o Centro Educacional de Educação Tecnológica ETE “Dr. Domingos Minicucci Filho” em dezembro de 2000.

Em fevereiro de 2002 ingressou no curso de Ciências Biológicas nas Faculdades Integradas Regionais de Avaré tendo sua conclusão em dezembro de 2005. Trabalhou como professora de Educação Básica I no estado de São Paulo entre 2007 e 2011.

Em agosto de 2011 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Nessa Instituição atuou como monitora das disciplinas de Bioquímica 1 e 2 entre os anos de 2012 e 2013 e Farmacologia 1 entre 2014 e 2016. Também foi estagiária do projeto de mapeamento do capital humano, projeto castração e SOS animal durante a graduação.

Em julho de 2017 terminou a graduação em Medicina Veterinária e em dezembro de 2017 foi aprovada na seleção de Mestrado em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob orientação da Dra. Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli. Durante este período publicou cinco resumos e um resumo expandido em eventos científicos.

RESUMO

DE SOUZA, Ana Caroline Ferreira. **Avaliação da mortalidade de larvas de *Ctenocephalides felis felis* por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis spp.*** 2020. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Nos últimos anos, os estudos sobre a utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs) aumentou, tornando-se uma alternativa no controle de artrópodes de importância Médico Veterinária, pois apresenta diversas vantagens em relação ao seu uso, podendo ser utilizados isoladamente ou em conjunto com diversos produtos químicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a mortalidade de larvas de sete dias de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) por nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). O estudo foi dividido em duas etapas onde, a primeira delas teve como objetivo avaliar a mortalidade de larvas *C. felis felis* por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88), verificando a quantidade de líquido necessária (400, 600 e 1000 µL) para que os NEPs pudessem se movimentar e infectar as larvas de pulgas em três concentrações (120, 160 e 200 NEPs/larva de pulga). A segunda etapa teve como objetivo avaliar a mortalidade das larvas de *C. felis felis* por *Heterorhabditis indica* (LPP30) em três concentrações (120, 160 e 200 NEPs/larva de pulga) utilizando 600 µL de solução. Os ensaios biológicos foram divididos em dois grupos experimentais, um contendo dieta específica para larvas de pulga e outro sem dieta. A análise de mortalidade foi corrigida através da fórmula de ABBOTT e os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste F ou teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Na primeira etapa do estudo utilizando *H. bacteriophora* (HP88) observa-se que o uso de 400 µL promoveu uma menor mortalidade das larvas de pulga quando comparado ao uso de 600 µL, sendo a média de mortalidade de 51,3 % e 69,7 % respectivamente, sugerindo que a quantidade mais adequada de líquido para infecção com NEPs e larvas de *C. felis* foi de 600 µL. Quando avaliados os índices de mortalidade em 600 µL os percentuais de mortalidade encontrados para as três concentrações de NEPs foram 100%; 83,3% e 83,3% respectivamente, na presença de dieta e 92,6%; 86,6% e 85,7% respectivamente, na ausência de dieta, não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais com dieta e sem dieta e entre as concentrações de NEPs utilizadas. No ensaio biológico que avaliou o volume de 1000µL a mortalidade foi de 100%, inclusive nos grupos controles, sugerindo que o volume de solução utilizada não é adequado para infecção. Na segunda etapa do estudo utilizando NEPs da espécie *Heterorhabditis indica* (LPP30) os percentuais de mortalidade encontrados foram 85,2%; 75% e 80% respectivamente, para as três concentrações utilizadas na presença de dieta e 81,4%; 74,0% e 93,33% respectivamente, na ausência de dieta, não sendo observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos e entre as concentrações avaliadas. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que as larvas de *C. felis felis* são suscetíveis a infecção *in vitro* por *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30) nas três concentrações de NEPs utilizadas, independente da presença ou não de dieta específica para pulgas, podendo os NEPs ser uma ferramenta promissora no controle biológico desses insetos.

Palavras-chave: *Ctenocephalides felis felis*, nematoides entomopatogênicos, controle biológico.

ABSTRACT

DE SOUZA, Ana Caroline Ferreira. **Mortality evaluation of *Ctenocephalides felis felis* larvae by entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp.** 2020. 53p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

In recent years, studies on the use of entomopathogenic nematodes (NEPs) have increased, becoming an alternative in the control of arthropods of Veterinary Medical importance, since presents several advantages in relation to its use, being able to be used alone or in conjunction with several chemicals. The present study aimed to evaluate *in vitro* the mortality of seven-day *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) larvae by entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). The study was divided into two stages, where the first of them aimed to evaluate the mortality of larvae *C. felis felis* by entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88), checking the amount of liquid required (400, 600 and 1000 μ L) so that the NEPs could move around and infect flea larvae in three concentrations (120, 160 and 200 NEPs / flea larva). The second stage aimed to evaluate the mortality of the *C. felis felis* larvae by *Heterorhabditis indica* (LPP30) in three concentrations (120, 160 and 200 NEPs / flea larva) using 600 μ L of solution. The biological tests were divided into two experimental groups, one containing a specific diet for flea larvae and the other without a diet. The mortality analysis was corrected using the ABBOTT formula and the parametric data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by the F test or the Tukey test ($p \leq 0.05$). In the first stage of the study using *H. bacteriophora* (HP88), it is observed that the use of 400 μ L promoted a lower mortality of flea larvae when compared to the use of 600 μ L, with a mortality rate of 51,3% and 69,7% respectively, suggesting that the most adequate amount of liquid for infection with NEPs and *C. felis* larvae was 600 μ L. When the mortality rates at 600 μ L were evaluated, the mortality percentages found for the three concentrations of NEPs were 100%, 83,3% and 83,3% respectively, in the presence of diet and 92.6%; 86.6% and 85.7% respectively, in the absence of a diet, not significant differences ($p \leq 0.05$) were observed between the experimental groups with diet and without diet and between the concentrations of NEPs used. In the biological assay that evaluated the volume of 1000 μ L, mortality was 100%, including in the control groups, suggesting that the volume of solution used is not suitable for infection. In the second stage of the study using NEPs of the species *Heterorhabditis indica* (LPP30) the mortality percentages found were 85.2%; 75% and 80% respectively, for the three concentrations used in the presence of diet and 81.4%; 74.0% and 93.33% respectively, in the absence of diet, with no significant difference ($p \leq 0.05$) between treatments and between the concentrations evaluated. The results obtained in the present study suggest that *C. felis felis* larvae are susceptible to infection *in vitro* by *H. bacteriophora* (HP88) and *H. indica* (LPP30) in the three concentrations of NEPs used, regardless of the presence or not of a specific flea diet, and NEPs can be a promising tool in the biological control of these insects.

Keywords: *Ctenocephalides felis felis*, entomopathogenic nematodes, biological control

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo da análise de variância referente aos valores de mortalidade (%) de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em função da concentração de nematoides <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88), quantidade de líquido e presença de dieta específica para pulgas.....	22
Tabela 2: Valores médios da mortalidade de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em função da concentração de nematoides <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88).....	22
Tabela 3: Valores médios da mortalidade de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em função da quantidade de líquido e presença de dieta específica para larvas de pulga por nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88).....	23
Tabela 4: Valores médios da mortalidade de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em função da concentração de nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) associado a presença e ausência de dieta em 600 µL.....	23
Tabela 5: Resumo da análise de variância referente aos valores de mortalidade (%) de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em função da concentração de nematoides <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30), com e sem dieta específica para pulgas.....	25
Tabela 6: Valores médios da mortalidade de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em função da concentração de nematoides <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30) e uso de dieta específica para pulgas.....	25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A. Armadilha de White contendo nematoides entomopatogênicos produzidos em *Galleria mellonella*; B. Imagem aproximada evidenciando alguns adultos (setas) de nematoides entomopatogênicos com presença de juvenis infectantes. (Fonte: Arquivo pessoal)..... 15
- Figura 2:** Alíquota de 10 µL contendo juvenis infectantes observados em microscópia óptica de campo claro (10x) para quantificação (Fonte: Arquivo pessoal)..... 15
- Figura 3:** A. Larvas de *Ctenocephalides felis felis* em placa com dieta; B. Larvas de *Ctenocephalides felis felis* em placa sem dieta; C. Placa sem dieta mostrando uma larva de pulga e juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88). (Fonte: Arquivo pessoal)..... 16
- Figura 4:** Esquema do delineamento experimental utilizado no estudo. Cada círculo corresponde a uma placa de petri e o número 10 equivale ao número de larvas de pulga *Ctenocephalides felis felis* por placa. 17
- Figura 5:** **A.** Alteração da coloração das larvas de *Ctenocephalides felis felis* após infecção por nematoides entomopatogênicos (seta pontilhada; larva viva, seta cheia, larva morta); **B.** Larva de *Ctenocephalides felis felis* com coloração amarelada; **C.** Adultos de nematoides entomopatogênicos saindo da larva de pulga *Ctenocephalides felis felis* durante dissecção. (Fonte: Arquivo pessoal)..... 19
- Figura 6:** **A.** Alteração da coloração das larvas de *Ctenocephalides felis felis* após infecção por nematoides entomopatogênicos; **B.** Adultos de nematoides no interior da larva de pulga *Ctenocephalides felis felis*. (Fonte: Arquivo pessoal)..... 21
- Figura 7:** **A.** Alteração da coloração das larvas de *Ctenocephalides felis felis* após infecção por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (LPP30) (seta pontilhada, larva viva; seta cheia, larva morta); **B.** Adultos de nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (LPP30) ao lado da larva de pulga *Ctenocephalides felis felis* após dissecção. (Fonte: Arquivo pessoal)..... 24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Grupos experimentais (com dieta e sem dieta) e tratamentos (diferentes concentrações de nematoídes entomopatogênicos) utilizados na infecção de larvas de pulgas *Ctenocephalides felis felis* por juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88).

.....17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 <i>Ctenocephalides felis felis</i>	2
2.2 Ciclo Biológico.....	2
2.3 Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	3
2.4 Sifonápteros e a Resistência a Inseticidas.....	4
2.5 Controle Biológico	5
2.6 Agentes de Controle Biológico.....	5
2.7 Micro-Organismos Utilizados no Controle Biológico.....	6
2.7.1 Protozoários	6
2.7.2 Vírus	6
2.7.3 Bactérias	6
2.7.4 Fungos	7
2.7.5 Nematoides	7
2.8 Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)	8
2.8.1 Biologia	8
2.8.2 Família Sterneinematidae	9
2.8.3 Família Heterorhabditidae	10
2.9 Fatores que Interferem na Atividade dos Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) e sua Produção	11
2.10 Controle Biológico Utilizando Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)	12
2.11 Métodos Alternativos Para o Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local e Período de Realização dos Experimentos	14
3.2 Obtenção das Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	14
3.3 Obtenção dos Nematoides	14
3.4 Preparação das Suspensões com Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)	14
3.5 Delineamento experimental	16
3.6 Mortalidade das Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	18
3.7 Análise Estatística.....	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Ensaios Biológicos Utilizando Juvenis Infectantes de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	

(HP88)	19
4.1.1 Ensaio biológico I - Avaliação da infecção de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) utilizando 400 µL de solução	19
4.1.2 Ensaio biológico II - Avaliação da infecção de larvas <i>Ctenocephalides felis felis</i> por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) utilizando 1000 µL de solução	20
4.1.3 Ensaio biológico III - Avaliação da infecção de larvas <i>Ctenocephalides felis felis</i> por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) em 600 µL de solução	20
4.2 Influência da Quantidade de Líquido (QL), Concentração de Nematoides Entomopatogênicos (CNEPs) <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) e Presença de Dieta (PD) na Infecção de Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	21
4.3. Ensaio Biológico IV - Avaliação da Infecção de Larvas de Pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> por Nematoides Entomopatogênicos <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30).....	23
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÕES.....	29
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade cães e gatos passaram a fazer parte cada vez mais do dia-a-dia dos seres humanos, sendo muitas vezes tratados como membros da família. Esses animais podem acabar sendo infestados por ectoparasitas e, devido a essa proximidade entre humanos e animais se faz necessária a criação de estratégias de controle eficientes para esses parasitos.

As pulgas são insetos hematófagos pertencentes à ordem Siphonaptera, onde são conhecidas atualmente mais de 3000 espécies. Dentre as espécies e subespécies descritas, as mais encontradas em cães e gatos estão *Ctenocephalides felis felis*, também conhecida como pulga do gato e *Ctenocephalides canis*, pulga do cão, sendo a primeira mais prevalente nestes hospedeiros e com ampla distribuição geográfica.

Ctenocephalides felis felis (Siphonaptera: Pulicidae) tem grande importância em Medicina Veterinária e Saúde Pública, pois provoca irritação e prurido intenso nos animais acometidos, sendo uma das principais responsáveis pela dermatite alérgica, além de ser o hospedeiro intermediário de patógenos com potencial zoonótico como cestóides, riquétisias, bartonelas, dentre outras.

É muito comum ocorrer infestações por estes insetos no ambiente doméstico e sua eliminação é trabalhosa, acarretando algumas vezes um grande gasto financeiro.

As formas de prevenção e tratamento mais utilizadas se baseiam no controle mecânico, através da retirada manual e higienização tanto do animal como do ambiente, e no uso de produtos químicos como os carbamatos, piretróides, organofosforados, fenilpirazoles, nitroguanidinas, neonicotinóides e lactonas macrocíclicas. Na atualidade, os métodos de controle químico mais utilizados incluem o emprego de reguladores de crescimento de insetos (RCIs), que atuam interferindo no desenvolvimento e crescimento das pulgas.

Pesquisas demonstraram que o uso indiscriminado desses produtos químicos acaba por criar resistência nesses insetos, como vem ocorrendo em vários locais do mundo, tornando cada vez mais difícil o seu controle. Além disso, essas substâncias podem acabar se dispersando, promovendo a contaminação do ambiente e intoxicação de outras espécies, inclusive em humanos. Nesse contexto, estudos buscam desenvolver métodos de controle alternativos, que possam ser utilizados isoladamente ou em conjunto aos produtos químicos já existentes.

A utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs) tem se mostrado uma boa alternativa dentro do controle biológico, com resultados satisfatórios no controle de diversos insetos pragas na agricultura. Nas últimas décadas pesquisas vem sendo conduzidas envolvendo o uso de NEPs no controle de artrópodes de importância Veterinária, como carapatos e moscas. Os nematoides mais estudados e utilizados no controle biológico pertencem aos gêneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). Esses nematoides possuem em seu interior bactérias simbiontes capazes de matar rapidamente os insetos por septicemia.

Em relação as pulgas, estudos sobre a utilização de nematoides entomopatogênicos no seu controle são escassos, havendo pesquisas que relatam a infecção em *C. felis felis* por nematoides das espécies *Steinernema carpocapsae* (syn. *Neoplectana carpocapsae*) e *Steinernema abbasi*.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivos avaliar a suscetibilidade e mortalidade *in vitro* de larvas de sete dias de *C. felis felis* por nematoides entomopatogênicos das espécies *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabditis indica* (LPP30).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Ctenocephalides felis felis*

As pulgas são insetos ectoparasitas, pequenos, medindo aproximadamente 2,0 a 3,0 mm de comprimento, de coloração acastanhada, ápteros, com corpo achatado lateralmente pertencentes à ordem Sifonaptera. Possuem o corpo revestido por cerdas voltadas para trás e, algumas espécies também apresentam cerdas mais grossas destinadas a fixação e locomoção (ctenídeos), possuem 3 pares de patas, sendo as posteriores maiores e adaptadas ao salto, forma com a qual chegam ao hospedeiro (LINARDI, 2011; LINARDI, 2017).

Esses ectoparasitos possuem grande importância em Medicina Veterinária e Saúde Pública, devido a perdas econômicas causadas e a transmissão de vários patógenos a humanos e animais (DRYDEN; RUST, 1994; LINARDI; GUIMARÃES, 2000; RUST, 2017).

Dentre as principais espécies de importância Médico Veterinária que infestam cães e gatos estão *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex simulans* e *Echidnophaga gallinacea* (DRYDEN, 1988).

A pulga da subespécie *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835), também conhecida como pulga do gato, é uma das maiores causadoras de incômodo e irritação tanto em humanos quanto em animais. Responsável pela produção de dermatite alérgica a pulga, uma doença autoimune ocasionada por um estado de hipersensibilidade muito comum em cães, também são vetores de vários patógenos como a riquétsia causadora de tifo, filarídeos e cestóides (HALLIWELL, 1979), além de outros agentes patogênicos como bactérias, protozoários e helmintos (LINARDI; GUIMARÃES, 2000). Em grandes infestações, por serem ectoparasitas hematófagos podem causar muitas vezes anemia ferropriva, principalmente em animais jovens (HARVEY et al., 1982).

Infestações por pulgas em animais de estimação e no ambiente doméstico tem sido cada vez mais frequente e seu controle é caro e demorado (DRYDEN; RUST, 1994; BLAGBURN; DRYDEN, 2009). Alguns autores relatam que *C. felis felis* tem apresentado resistência a inseticidas comuns (LINARDI; SANTOS, 2012), corroborando ao que já foi mencionado há alguns anos pela Organização Mundial da Saúde (1992) que ressalta a resistência do parasito a diferentes classes de inseticidas.

2.2 Ciclo Biológico

No que se refere ao ciclo biológico de pulgas da família Pulicidae, tanto machos quanto fêmeas são hematófagos e somente os adultos são parasitas (LINARDI; NAGEM, 1972; URQUHART et al., 1998) As pulgas realizam metamorfose completa e seu ciclo biológico é constituído de quatro estágios: ovo, larva (L_1 , L_2 e L_3), pupa e adultos. O tempo para seu desenvolvimento completo é de aproximadamente 30 dias, (LINARDI; NAGEM, 1972) podendo se estender até 174 dias (SILVERMAN; RUST, 1985), dependendo das condições ambientais de umidade, temperatura e alimento disponível para as larvas (LINARDI; NAGEM, 1972; SILVERMAN; RUST, 1985), com fêmeas emergindo antes dos machos em algumas espécies (LINARDI; NAGEM, 1972).

Os ovos de *C. felis*, são branco-perolados, ovais, com extremidades arredondadas e aproximadamente 0,5 mm de comprimento e a eclosão ocorre dentro de um a seis dias. Os ovos são depositados entre os pelos dos hospedeiros e devido a sua superfície lisa e seca caem facilmente do animal no ambiente, acumulando-se principalmente onde os animais dormem ou frequentam (RUST, 1992; DRYDEN; RUST, 1994).

Após a eclosão tem início a fase larval, que não é parasitária. As larvas se alimentam de matéria em decomposição presente no meio ambiente e sangue misturados à fezes de pulgas adultas, além de dejetos do hospedeiro, possui vida livre e em caso de escassez de alimento

pode ocorrer atos de canibalismo entre elas. As larvas geralmente vivem em ambientes protegidos, com altas temperaturas e umidade (DRYDEN; RUST, 1994). As larvas de pulga são extremamente sensíveis a radiação solar, excesso de umidade, dessecção e temperaturas superiores a 35°C, possuem geotaxia positiva e fototaxia negativa (SILVERMAN; RUST, 1981).

Ao final de seu desenvolvimento, as larvas de terceiro estádio param de se alimentar e esvaziam o trato digestivo, passando a produzir um fio tênue e viscoso para a formação do casulo pupal, é a etapa conhecida como pré-pupa, e uma vez completada passará ao estádio de pupa (SILVERMAN; RUST, 1985; DRYDEN; RUST, 1994).

O período pré-pupal é curto, e a larva já madura se transforma em pupa. Esse casulo pupal possui um aspecto viscoso com a finalidade de atrair sujidades que se aderem a ele a fim de protegê-lo, as larvas permanecem nesses pupários até o desenvolvimento completo em adultas. As pupas podem ser encontradas em diversos ambientes como solo, vegetação, tapetes, sob móveis e nos locais onde os animais dormem (SILVERMAN; RUST, 1985; DRYDEN; RUST, 1994).

Após a formação completa da pupa, a larva permanece dentro do casulo por período variável (diminuindo o seu metabolismo respiratório), se não houver nenhum estímulo para a emergência do adulto, podendo a pupa sobreviver por longos períodos no ambiente. Alguns autores relatam que pode ocorrer ainda a formação de um segundo casulo caso a larva sofra algum tipo de interferência após a conclusão do primeiro casulo, ou mesmo se desenvolver em uma pupa nua (SILVERMAN; RUST, 1985; DRYDEN; RUST, 1994).

De acordo com Silverman e Rust (1985), a pressão mecânica e o aumento da temperatura estimulam a emergência dos adultos de pulga dos casulos, podendo esta variar de 13 a 174 dias dependendo desses fatores. No entanto, em condições normais, a completa formação de *C. felis felis* e sua emergência ocorrerá dentro de três a cinco semanas.

As pulgas adultas apresentam fototropismo positivo e geotropismo negativo importantes para a busca do hospedeiro. Após emergirem elas são atraídas para o hospedeiro por estímulos como vibrações, correntes de ar, níveis de CO₂, odores, dentre outros, dando início ao repasto sanguíneo. Aproximadamente 24 a 48 horas após o repasto sanguíneo pode ocorrer o início da ovoposição (DRYDEN; RUST 1994).

Uma fêmea de pulga pode copular com vários machos (DRYDEN; RUST 1994). Mesmo que o adulto não consiga um hospedeiro logo em seguida à saída do pupário, este consegue sobreviver vários dias antes de realizar o primeiro repasto sanguíneo (DRYDEN, 1988). Após o início da ovoposição sobrevivem apenas de 24 a 48 horas fora do hospedeiro (DRYDEN, 1989).

2.3 Controle de *Ctenocephalides felis felis*

Infestações por ectoparasitas, especialmente pulgas e carapatos, são comuns e sua eliminação é trabalhosa, podendo levar muito tempo e gasto financeiro (BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

A maior parte das pulgas (95%) estão presentes no ambiente, sendo apenas 5% delas encontradas no hospedeiro (LINARDI; GUIMARAES, 2000). Dessa forma, para haver um controle efetivo do parasita é necessário realizar uma combinação de estratégias, como a utilização de produtos químicos e manejo ambiental, tratando todos os animais contactantes (DRYDEN, 1989; DRYDEN; RUST, 1994; BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

Na literatura, são mencionadas diversas formas para o controle desses insetos. Dentre eles podem ser utilizados o controle mecânico e o controle químico, sendo o segundo mais utilizado, tendo como foco a interferência no ciclo biológico do parasita (RUST, 2005).

O controle mecânico consiste na catação ou aspiração extensiva, nas quais as pulgas

adultas são capturadas, podendo ser associado ao tratamento ambiental com produtos químicos (DRYDEN, 1989; BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

No controle químico utilizado para pulgas em animais de companhia, diferentes grupos de substâncias podem ser utilizadas, dentre as quais se destacam os organofosforados, os carbamatos, as formamidinas, os piretróides, os fenilpirazoles e as lactonas macrocíclicas (RUST, 2005; SCOTT et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2016). Porém, nos últimos anos, compostos químicos que agem como reguladores de crescimento de insetos e substâncias adulticidas com prolongado efeito residual passaram a ser mais utilizadas (BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

O grupo dos organofosforados e carbamatos atuam sobre os genes que determinam a atividade enzimática das acetilcolinesterases sobre o Sistema Nervoso Central de artrópodes, onde o primeiro grupo inibe de forma irreversível a ação dessa enzima, e o segundo age competindo com a acetilcolina pelos sítios de ligação da acetilcolinesterase, ambos promovem paralisia e morte do artrópode (MASON et al., 1984).

Na classe das formamidinas, a substância mais conhecida é o amitraz. Seu mecanismo de ação ocorre através da interação da molécula com os receptores (β ,4-dihidroxifenetilamina) e α 2-adrenorreceptores no sistema nervoso central de artrópodes promovendo uma hiperexcitação neuronal e morte do inseto (JONSSON; HOPE, 2007).

Os piretróides atuam no sistema nervoso central onde se ligam de forma seletiva aos canais de sódio, impedindo seu fechamento e inibindo a desativação e estabilização desses canais, promovendo assim excitação das membranas celulares ocasionando rápida paralisia e morte dos artrópodes (TAYLOR, 2001).

Os fenilpirazoles são moléculas que atuam como antagonistas do receptor GABA bloqueando os íons de cloreto controlados por esse receptor, inibindo assim a atividade neuronal nos insetos, ao atuar sobre esse sistema ocorre morte do artrópode por hiperexcitação do sistema nervoso central (NARAHASHI et al., 2007).

No grupo das lactonas macrocíclicas encontramos as avermectinas e as milbemicinas, que possuem mecanismo de ação muito parecidos. Seus efeitos ocorrem principalmente sobre o ácido γ -aminobutírico e aumento da permeabilidade dos canais de cloro-glutamato, provocando ataxia e morte do inseto (CLARK et al., 1995). Fazem parte desse grupo a ivermectina, a doramectina, a abamectina, a eprinomectina e a selamectina. Dentre as mencionadas, a ivermectina apresenta baixos níveis de eficácia no controle de pulgas (SANTORA et al., 2002).

Já na classe dos reguladores de crescimento (IGRs), são conhecidas duas categorias de inseticidas: os análogos do hormônio juvenil, que atuam impedindo a muda e a metamorfose dos insetos, e os inibidores da síntese de quitina, que atuam bloqueando a enzima quitina sintetase e impedindo assim a deposição de quitina (COHEN, 1987).

Na classe dos inibidores de quitina podemos encontrar o lufenuron, o triflumuron, o diflubenzuron, o fluazuron e a ciromasina (GRAF, 1993) e dentro da categoria de análogos de hormônios juvenis podemos encontrar o piriproxifem, o metopreno, fenoxicarbe, dentre outros (SENG; 2006).

No geral, para que ocorra um controle eficiente da pulga é preciso o desenvolvimento de estratégias eficazes que geralmente envolvem a associação do tratamento dos animais e do ambiente em que se encontram, onde são utilizadas essas substâncias adulticidas e/ou substâncias reguladoras de crescimento que impedem o desenvolvimento larval e da pulga adulta (DRYDEN; RUST, 1994).

2.4 Sifonápteros e a Resistência a Inseticidas

Da mesma forma como acontece com diversos ectoparasitos, a literatura relata o desenvolvimento de resistência nas pulgas causado pelo uso incorreto dos compostos químicos,

havendo assim uma necessidade de buscar novas estratégias de controle desses insetos (RUST, 2005).

A resistência de ectoparasitas de importância Veterinária, como *C. felis felis*, tem gerado grande preocupação devido a estudos que apontam um aumento da resistência desses insetos aos piretróides (RUST, 2017).

Em 1952, no sudeste dos Estados Unidos, foi relatada a resistência da espécie *C. felis* ao composto dicloro-dietil-tricloroetano (DDT) em pó, e logo após, foi mencionada a resistência a outros compostos químicos como clordane, dieldrin e hexaclorociclohexano, além do isômero gama do lindane (BOSSARD et al., 1998).

Em Porto Rico, Fox et al., (1968) descreveu existência de adultos e larvas de *C. felis* possivelmente resistentes ao DDT, dieldrina e malation.

Ainda no que se refere ao estudo da resistência a compostos químicos, EI-Gazzar et al. (1986) relatou a presença de uma colônia de pulgas originárias da Flórida resistentes ao malation e a vários outros inseticidas quando comparados com uma colônia originária da Califórnia.

Testes realizados por Schwinghammer et al. (1985) demonstraram cepas resistentes aos organosfosforados em Kentucky.

A maioria dos relatos da perda de efetividade de alguns compostos químicos ocorre em consequência ao uso incorreto desses produtos, o que leva a uma necessidade de conscientizar os tutores de cães e gatos sobre o uso correto desses produtos (RUST, 2017).

2.5 Controle Biológico

O controle biológico é um fenômeno que ocorre de forma natural no meio ambiente, onde há uma regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais, mantendo um equilíbrio entre os seres. Esses inimigos naturais são bem diversificados, podendo ser vírus, bactérias, fungos, nematoídes, protozoários, insetos, dentre outros (PARRA et al., 2002).

O uso de agentes naturais contra pragas foi citado pela primeira vez em 1200 A.C. na China, onde eram utilizados bambus como pontes para que formigas do gênero *Crematogaster* combatesssem o ataque de lagartas em plantas cítricas. Esse tipo de controle se expandiu durante o século XIX e início do século XX, mas com o desenvolvimento dos produtos químicos acabou sendo deixado de lado (BARBOSA, 2004).

Diversos compostos químicos são usados na agricultura para controle de pragas, mas devido a seus efeitos nocivos ao meio ambiente e aos seres vivos, além da grande quantidade de espécimes resistentes a essas substâncias há uma busca por produtos naturais menos agressivos, fazendo com que o controle biológico seja uma alternativa para redução do uso desses produtos químicos no controle de pragas (GRIGOLETTI-JR, et. al, 2000).

2.6 Agentes de Controle Biológico

Há diversos organismos que atuam no controle biológico na natureza, como exemplo podemos destacar parasitoides, predadores e patógenos, nos quais os dois primeiros são considerados entomófagos, organismos que se alimentam de insetos, e o último é considerado entomopatogênico, micro-organismos causadores de doenças em insetos, como os vírus, fungos, bactérias e nematoídes (SILVA, 2000; AGUIAR-MENEZES, 2003; COSTA et al., 2006)

Parasitoides são em geral do tamanho do hospedeiro, sendo insetos que na forma imatura parasitam um indivíduo passando seu ciclo de vida todo no interior deste, causam a morte do hospedeiro e as formas adultas possuem vida livre. Estão em sua maior parte na ordem Hymenoptera, e poucos na ordem Diptera e parasitam insetos em todas as fases, ovos, larvas, pupas e adultos. Já os predadores são organismos de vida livre durante todo o seu ciclo de vida

geralmente são maiores que os indivíduos predados e precisam de um grande número de presas para completar seu ciclo de vida, podem predar tanto no estágio de larva como adulto (PARRA et al., 2002).

Na agricultura são utilizados três tipos de controle biológico: o clássico, o aumentativo e o conservativo. O controle biológico clássico consiste em introduzir um inimigo natural exótico nos agrossistemas afetados por alguma praga a fim de que esse inimigo se estabeleça de forma definitiva. O controle biológico aumentativo é aquele em que os inimigos naturais utilizados se encontram presentes no próprio agrossistema local onde estão sendo usados, mas que não estão em quantidades suficientes para controlar a população de inseto praga, esse tipo de controle pode ser inoculativo, onde pequenos números de exemplares são soltos no local; ou inundativo, no qual grandes números de exemplares são soltos (JUNIOR, 2011), sendo estes cultivados em laboratórios e introduzidos gradativamente nos ecossistemas. Na atualidade já estão disponíveis para esse tipo de controle mais de 125 espécies com aplicação indicada em campo aberto ou que estejam sob ataque de poucas pragas (VAN LENTEREN, 2000). Além destes, há ainda o controle biológico conservativo, onde o meio ambiente é manipulado a fim de favorecer a multiplicação da população de inimigos naturais (JUNIOR, 2011).

De qualquer forma, a utilização do controle biológico deve ser avaliada quanto ao risco em relação a sua introdução, tais avaliações estão descritas no Protocolo de Avaliação de Risco de Introdução de Agentes de Controle Biológico estabelecido pela EMBRAPA (SA, 1995).

2.7 Micro-Organismos Utilizados no Controle Biológico

O termo entomopatogênico é amplamente utilizado em biologia para designar a capacidade de alguns micro-organismos de matar ou causar patogenias em insetos. Dentre estes micro-organismos considerados entomopatogênicos podemos encontrar protozoários, vírus, bactérias, fungos e nematoídes (ALMENARA et al, 2012).

2.7.1 Protozoários

São micro-organismos unicelulares heterotróficos, com organelas cujas funções se assemelham aos animais superiores (SILVA, 2000). Algumas espécies possuem potencial entomopatogênico, podendo causar infecção em insetos, mas poucos possuem alta virulência ou em alguns casos seus hospedeiros conseguem combatê-los rapidamente. A infecção é causada de forma crônica, produzindo debilidade geral e matam seus hospedeiros lentamente. Por este motivo, poucos espécimes são usados no controle biológico (GARCÍA et al., 2008).

2.7.2 Vírus

Os vírus são considerados os menores e mais simples micro-organismos existentes. Não possuem organelas necessárias a produção de energia e síntese proteica, necessitando de uma célula hospedeira para se multiplicar, sendo considerados parasitas celulares obrigatórios (FLORES, 2007).

Diversas famílias de vírus podem causar doenças em insetos, estes penetram no hospedeiro através de alimentos contaminados, chegando assim ao intestino. Ao ser digerido, o alimento libera as partículas virais que iniciarão a infecção através das células epiteliais intestinais, estes se disseminarão pelo resto do corpo do hospedeiro provocando liquefação das vísceras do inseto (SILVA, 2000).

2.7.3 Bactérias

As bactérias são micro-organismos unicelulares, procariontes, microscópicos. Na sua maioria são heterotróficos e algumas podem se movimentar através de flagelos (SILVA, 2000). São micro-organismos obrigatórios ou facultativos, podendo ser esporulante (forma de resistência no ambiente) ou não esporulante, geralmente na forma de bastonetes. As espécies

entomopatogênicas penetram no inseto pela via oral, onde promovem posterior infecção e liberação de enzimas e toxinas (JUNIOR, 2011).

Os sintomas de infecção incluem perda de apetite, regurgitação, lentidão, diarreia, tegumento fosco e sem brilho. As larvas ficam flácidas, sem movimentos e a morte ocorre entre 18 e 72 horas devido a septicemia (JUNIOR, 2011). Infecções através dos ovos, tegumento e traquéia podem ocorrer, porém, são menos comuns (SILVA, 2000).

Atualmente são os micro-organismos unicelulares mais utilizados no controle biológico de insetos (JUNIOR, 2011) e os principais grupos são: *Bacillus thuringiensis* (diversas variedades), como var. *kurstaki*, que ataca lagartas (Lepidoptera), var. *israelensis*, infectando larvas de Diptera (pernilongos e borrachudos) e var. *tenebrionis*, infectando Coleoptera; *Bacillus sphaericus*, também em larvas de Diptera, além de *Bacillus larvae* e *B. alvei*, que causam doenças em abelhas; Pode-se citar também *Serratia marcescens* e *S. entomophila*, que causam septicemias em diversos insetos, pertencentes ao grupo das bactérias não-esporulantes (BUENO et al., 2011).

Ainda encontramos algumas bactérias que podem estar associadas a outros indivíduos, como as dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* que vivem em simbiose com nematoides entomopatogênicos e são liberadas dentro do corpo do inseto hospedeiro apenas após a penetração da forma infectante do helminto (ALMENARA, 2012).

2.7.4 Fungos

Os fungos são micro-organismos unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (maioria dos fungos), possuindo tamanho variável. Os organismos pluricelulares são constituídos por diversas estruturas chamadas micélio, o qual é composto por hifas. Essas hifas podem ter um ou mais núcleos (ALVES, 1998). Os fungos que infectam insetos são chamados de entomopatogênicos, e os primeiros testes de susceptibilidade de insetos a esses micro-organismos foram realizados no final do século XIX pelo Russo Metschnikoff, no qual avaliou o uso potencial do *Metarhizium anisopliae* no controle de uma espécie de besouro. Mas a utilização desses micro-organismos como agentes de controle biológico só veio a se consolidar um século depois (FARIA, 2001).

Os fungos entomopatogênicos possuem amplo espectro de ação e podem colonizar diversas espécies de ácaros e insetos em todos os estádios de desenvolvimento. Penetram nos hospedeiros através da cutícula ou pele e uma vez dentro deles se multiplicam, ocasionando problemas na alimentação do artrópode e causando uma morte rápida, promovendo destruição dos tecidos e liberação de toxinas. Após a multiplicação, emergem produzindo esporos que serão espalhados pelo meio ambiente (ALVES et al., 2008).

Os principais fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico são: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi* (ALVES et al., 2008).

2.7.5 Nematoides

Os nematoides fazem parte de um grupo numeroso e diversificado, com corpo alongado e cilíndrico, com espécies de nematoides parasitas capazes de provocar doenças em artrópodes, são os chamados nematoides entomopatogênicos (NEPs) (ALMENARA et al., 2012).

Os nematoides entomopatogênicos pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), nas quais estão inseridas as famílias Steinernematidae (CHITWOOD; CHITWOOD, 1937) e Heterorhabditidae (Poinar, 1976), sendo que a primeira família possui dois gêneros: *Steinernema* e *Neosteinernema* e a segunda possui apenas o gênero *Heterorhabditis* (DOWDS; PETERS, 2002).

Dentro da família Steinernematidae podemos encontrar 151 espécies descritas no gênero *Steinernema* (Travassos, 1927) e apenas uma espécie no gênero *Neosteinernema* (NGUYEN;

SMART, 1996), já dentro da família Heterorhabditidae foram descritas 71 espécies no gênero *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Ao longo dos anos, as pesquisas referentes ao uso de controle biológico de artrópodes terrestres vêm se concentrando nos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (FERRAZ et al., 2008), devido a sua capacidade de infectar e matar os insetos rapidamente, em um período de 24 a 48 horas (DOWDS; PETERS, 2002).

Diversas características favorecem o uso de nematoides como ferramenta do controle biológico de pragas, dentre elas podemos destacar sua boa capacidade de locomoção no solo em busca de hospedeiros, sua ampla gama de hospedeiros suscetíveis, possibilidade de multiplicação, fácil armazenamento em laboratório, resistência a inseticidas, adaptabilidade a novos ambientes, sinergismo com outras formas de controle biológico e não causam danos as plantas ou vertebrados, além da alta especificidade pelo hospedeiro (DOLINSKI; MOINO, 2006). Outros fatores importantes que favorecem a sua utilização são o fácil cultivo *in vitro*, o baixo custo, o grande período de duração e a fácil aplicação em campo e uma (ALMENARA et al., 2012).

Os nematoides entomopatogênicos possuem grande potencial para serem utilizados dentro do controle biológico de insetos pragas, principalmente no controle daquelas que possuem pelo menos um estádio de desenvolvimento no solo, garantindo assim que os juvenis infectantes (JIs) tenham chance de penetrar no hospedeiro (DOLINSKI; MOINO, 2006).

Em relação aos vertebrados (peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos) a literatura relata que somente algumas espécies de sapos e rãs sofreram infecção por juvenis infectantes dos gêneros *Steinernerma* e *Heterorhabditis*, provocando morte apenas dos girinos jovens de rãs e sapos (GAUGLER; KAYA, 1990). Estudos envolvendo aranhas descreve que estes artrópodes podem ser infectados tanto por indivíduos da família Steinernematidae quanto da Heterorhabditidae (POINAR; THOMAS, 1985)

O impacto da utilização desses nematoides no controle biológico deve ser avaliado de forma a determinar o que eles causariam a outros invertebrados e vertebrados que não sejam considerados insetos pragas (ALMENARA, 2012).

2.8 Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)

2.8.1 Biologia

Duas famílias de nematoides são consideradas importantes no controle biológico, sendo

elas Steinernematidae e Heterorhabditidae (NGUYEN; HUNT, 2007). Dentro delas encontramos os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* que são considerados cosmopolitas, podendo ser encontrados em solos de diversos locais no mundo (LAWRENCE et al., 2006).

Os nematoides atuam como veículo para bactérias simbiontes e após a penetração dos NEPs no corpo dos insetos as bactérias são liberadas e estas provocam rápida septicemia ocasionando a morte do hospedeiro (GREWAL et al., 2001, HAZIR et al., 2003). Além da produção de toxinas, essas bactérias também produzem substâncias que inibem o desenvolvimento de outros micro-organismos (FERRAZ, 1998). No decorrer do ciclo biológico podem ser observadas três fases de desenvolvimento desses nematoides, sendo elas: ovo, juvenil (J_1 , J_2 , J_3 e J_4) e adultos (fêmeas, machos e em determinados casos hermafroditas) (DOLINSKI et al., 2005; DOLINSKI; MOINO-JR, 2006).

Os nematoides podem se relacionar com seus hospedeiros de três formas, sendo elas a forese (ou forésia), o parasitismo facultativo e o parasitismo obrigatório (KAYA; STOCK, 1997). Dentre elas, apenas o parasitismo é capaz de trazer algum dano ao hospedeiro. Alguns desses danos podem ser severos, ocasionando alterações comportamentais, morfológicas e fisiológicas, como por exemplo a dificuldade no voo, problemas na reprodução, longevidade, desenvolvimento e até a morte do hospedeiro (FERRAZ, 1998).

Em relação ao comportamento na busca pelo hospedeiro, os nematoides entomopatogênicos podem ser divididos em três categorias: *Cruiser*, onde o nematode busca seu hospedeiro se movimentando pelo solo, localizando-o através da concentração de CO_2 , como exemplo temos as espécies *Heterorhabditis bacteriophora* e *Steinernema glaseri* (DOLINSKI; MOINO-JR, 2006); *Ambusher*, no qual realizam o movimento de nictação, onde estes ficam com o corpo suspenso, apoiando-se apenas na cauda, e quando o hospedeiro se aproxima ele salta em sua direção, como exemplo de espécies que fazem esse movimento temos o *Steinernema carpocapsae* e *Steinernema scapterisci* (FERRAZ, 1998; DOLINSKI; MOINO-JR, 2006); Há ainda espécies que apresentam os dois comportamentos, agindo hora como *cruiser* e hora como *ambusher* como é o caso de *Steinernema feltiae* (DOLINSKI; MOINO-JR, 2006).

Até a década de 80, não havia garantia sobre as descrições de novas espécies, mas com a utilização de técnicas moleculares na década de 90, as identificações se tornaram mais confiáveis e novas espécies de nematoides entomopatogênicos foram descritas (LABAUDE; GRIFFIN, 2018).

2.8.2 Família Steinernematidae

Pertencem a essa família os gêneros *Steinernema* e *Neosteinernema*, sendo o primeiro mais utilizado no controle biológico. A fase juvenil desses nematoides passa por quatro estádios (J_1 , J_2 , J_3 e J_4), no qual o juvenil infectante (JIs) corresponde ao estádio J_3 (DOLINSKI; MOINO-JR, 2006).

Os juvenis infectantes do gênero *Steinernema* são atraídos ao inseto hospedeiro pelos níveis de CO_2 , produtos de excreção, temperatura e substâncias liberadas por plantas parasitadas pelos insetos (DOLINSKI; MOINO-JR, 2006).

Seu ciclo se inicia com a penetração dos JIs no inseto hospedeiro. Após penetrarem no inseto, os juvenis chegam à hemolinfa onde liberam as bactérias do gênero *Xenorhabdus* que se multiplicam causando septicemia e morte do inseto em curto espaço de tempo (24 a 48 horas) (FORST; CLARKE, 2002; DOLINSKI; MOINO-JR, 2006). Após a morte os insetos entram em decomposição, onde as bactérias liberadas pelos JIs convertem a biomassa do inseto cadáver em substrato que serve de alimento para o desenvolvimento dos nematoides (FORST; CLARKE, 2002; GOODRICH-BLAIR; CLARKE, 2007).

Após iniciarem o processo de alimentação, os nematoides continuam o seu

desenvolvimento passando de J₃ a J₄. Os nematoides de estádio J₄ darão origem aos nematoides adultos de primeira geração que são anfimíticos, machos e fêmeas (FORST; CLARKE, 2002). Havendo a presença de machos e fêmeas no inseto ocorrerá a cópula, consequentemente a formação de ovos fertilizados e a postura destes pelas fêmeas. Porém, alguns desses ovos podem ficar retidos no abdômen da fêmea onde posteriormente ocorrerá a eclosão de juvenis de estádio J₁, que rompem a parede do corpo da mãe. Esses juvenis após liberados irão se alimentar do inseto e alguns desses J₁ sofrerão muda para o estádio J₂ e J₃, onde se tornarão juvenis infectantes (J₃) retendo a cutícula do estádio anterior e deixando o inseto cadáver, outros sofrerão muda até o estádio J₄, se tornando adultos de segunda geração, menores do que os adultos de primeira geração (ADAMS; NGUYEN, 2002; ALMENARA et al., 2012).

Dentro do inseto hospedeiro, pode ocorrer de duas a três gerações de nematoides, e quando a reserva de alimento se esgota, os juvenis do estádio J₂ se desenvolvem em juvenis infectantes (J₃), saindo do corpo do inseto onde no ambiente iniciam a procura por um novo hospedeiro (GREWAL et al., 2001; DOLINSKI; MOINO-JR, 2006). A reinfecção dos juvenis do gênero *Steinernema* pelas bactérias ocorrerá durante o processo de formação dos JIs, que ao se alimentarem do restante do inseto ingerem algumas colônias de bactérias, estas se multiplicam no interior do J₃ após o seu completo desenvolvimento e são armazenadas dentro de uma vesícula especializada (GOODRICH-BLAIR; CLARKE, 2007).

Já o gênero *Neoesternenema* possui o ciclo de vida semelhante a *Sterneinema* spp., exceto pelo fato deste possuir apenas uma geração de nematoides (ADAMS; NGUYEN, 2002; DOLINSKI, 2006a). As fêmeas saem para o meio ambiente e os ovos eclodem em seu interior, os juvenis sofrem mudas até chegarem ao estádio de JIs e estes emergem do cadáver da mãe (FERRAZ, 1998; ADAMS; NGUYEN, 2002). Apesar de ser estudada, a bactéria endossimbionte de *Neosternernema* ainda continua descaracterizada (ADAMS; NGUYEN, 2002).

2.8.3 Família Heterorhabditidae

A família Heterorhabditidae contém um único gênero, *Heterorhabditis* (POINAR; THOMAS, 1985). Morfológicamente, a principal diferença entre os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* é que no primeiro os juvenis infectantes possuem a presença de um dente cárneo, com o qual conseguem perfurar regiões mais flexíveis da cutícula do inseto, sendo este ausente no segundo. (FORST; CLARKE, 2002).

O ciclo de vida dos nematoides desse gênero é semelhante aos do gênero de *Steinernema*, exceto pelo fato de que os nematoides adultos de primeira geração são fêmeas hermafroditas. No ciclo biológico de *Heterorhabditis* há predominância da chamada endoquia matricida (ou endotoquia matricida), onde os ovos eclodem no interior do corpo da mãe e os juvenis (J₁) rompem a parede para serem liberados, levando a morte da fêmea ou da fêmea hermafrodita. A partir da segunda geração já podemos observar o surgimento de machos e fêmeas, ocorrendo agora a reprodução por fertilização cruzada (ALMENARA et al., 2012).

Os juvenis infectantes que emergem do inseto cadáver possuem em seu interior um inóculo da bactéria simbionte na porção anterior do seu intestino, que são regurgitadas na hemolinfa do novo inseto hospedeiro após a infecção (DOLINSKI, 2006a).

Durante a formação da primeira geração de nematoides dentro do hospedeiro, a endoquia matricida tem um papel importante na transmissão da bactéria simbionte para os juvenis. Onde as bactérias atravessam as células intestinais da hermafrodita e se tornam disponíveis para os juvenis recém-eclodidos (CICHE et al., 2008 apud ALMENARA et al., 2012). Já a partir da segunda geração, a proliferação exclusiva de *Photorhabdus* spp. é controlada pela secreção de toxinas e metabólitos secundários (ALMENARA et al., 2012).

Alguns fatores podem influenciar na duração do ciclo biológico do nematoide no hospedeiro, dentre eles podemos destacar a espécie do inseto infectado, o tamanho do JI, a

temperatura ambiente e a quantidade de JIs que penetram no hospedeiro (DOLINSKI; MOINO-JR, 2006).

Os adultos, sejam eles hermafroditas ou machos e fêmeas, são encontrados apenas no interior de cadáveres de insetos infectados. As chamadas fêmeas hermafroditas são produzidas apenas na primeira geração, da segunda geração em diante podemos encontrar indivíduos anfimíticos (ALMENARA, 2012).

Nos indivíduos adultos não há presença de estilete e a extremidade anterior pode ser truncada ou levemente arredondada. Estes possuem seis lábios distintos, podendo algumas vezes serem parcialmente fundidos na base, cada um apresentando uma papila. Nos lábios laterais são encontrados anfídios com abertura circular. A porção anterior do esôfago envolve a base da cavidade bucal, o procorpo é cilíndrico, largo e estreitando-se próximo ao istmo, o bulbo basal é bem distinto, expandido e com aparelho valvar reduzido. O anel nervoso na fêmea localiza-se próximo ao istmo e no macho no bulbo basal (FERRAZ, 1998).

As fêmeas hermafroditas possuem a vulva em formato de fenda localizada medialmente, sendo circundada por anéis elípticos. As hermafroditas possuem ovotestis anfidélficas e reflexas, são ovíparas, porém com o passar do tempo se tornam ovovivíparas. Cauda terminando em formato pontiagudo, apresentando um engrossamento na região anal e pode-se observar a presença de glândulas retais. As fêmeas anfimíticas são semelhantes as hermafroditas, tendo um sistema reprodutor anfidelfo. Estas são menores do que as fêmeas hermafroditas, além disso, a vulva não é funcional para postura de ovos, porém é para a cópula (NGUYEN; SMART, 1996; FERRAZ, 1998).

Os machos possuem um testículo reflexo, dois espículos pareados, de cabeça curta e levemente recurvados ventralmente. Gubernáculo e bolsa copuladora presentes, o primeiro tem tamanho aproximadamente igual a metade do tamanho do espículo. A bolsa copuladora é do tipo pelodera, podendo algumas vezes ser fracamente leptodera, apresentando nove pares de papilas genitais (NGUYEN; SMART, 1996; FERRAZ, 1998).

Os juvenis infectantes ou de terceito estádio possuem bainha, que na região anterior lembra um mosaico e possuem cristas longitudinais. Os JIs são mais esguios e possuem boca e ânus fechados. Na região anterior possuem um dente dorsal proeminente. O poro excretor se abre posteriormente ao anel nervoso e a cauda tem formato pontiagudo (NGUYEN; SMART, 1996; FERRAZ, 1998).

2.9 Fatores que Interferem na Atividade dos Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) e sua Produção

Os nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* possuem ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em diferentes ambientes e solos, além de serem adaptados a diferentes hospedeiros (DOLINSKI; MOINO-JR, 2006).

Por viverem naturalmente nos solos podem sofrer influência desses habitats, afetando tanto sua sobrevivência como a infectividade, dentre as características ambientais podemos destacar a porosidade/tipo do solo, a umidade relativa, a concentração de oxigênio, a temperatura, o pH e a radiação ultravioleta (SHAPIRO-ILAN et al., 2006). As condições ótimas para a sobrevivência dos nematoides varia de acordo com a espécie, onde os fatores acima citados podem afetar diretamente o grau de virulência e a capacidade de localizar o hospedeiro alvo (SHAPIRO- ILAN et al., 2006; ALMENARA et al., 2012).

Os NEPs são resistentes e capazes de sobreviver em condições ambientais adversas quando dentro dos cadáveres dos hospedeiros. Quando em vida livre no solo, os juvenis infectantes (JIs) são mais vulneráveis às mudanças que podem ocorrer no meio ambiente (GAUGLER; BROWN, 1997).

Como os nematoides necessitam de água para se movimentar, baixos níveis de umidade interferem diretamente na sua mobilidade fazendo com que os JIs fiquem inativos. No entanto,

elevados níveis de umidade também podem ocasionar além da restrição da movimentação dos NEPs uma perda de oxigenação do solo impactando na sua sobrevivência (SHAPIRO-ILAN et al., 2006; ROHDE et al., 2010).

A temperatura do solo pode influenciar diretamente na atividade dos NEPs, já que cada espécie de nematoide tem uma temperatura considerada ideal para infecção e reprodução. Além disso, a literatura relata ainda que solos com diferentes texturas também são capazes de interferir na mobilidade dos NEPs. Onde solos mais porosos podem favorecer sua movimentação (SHAPIRO-ILAN et al., 2006)).

Um outro fator ambiental, que pode ser limitante para sobrevivência dos nematoídeos é a radiação ultravioleta. Esta pode provocar a morte dos JIs, sendo recomendado a aplicação de NEPs no solo em horários com menor incidência de radiação solar (SHAPIRO-ILAN et al., 2006).

O comportamento adotado pelo hospedeiro no ambiente também pode influenciar no sucesso de infecção pelos nematoídeos. Dessa forma ao escolhermos a espécie de NEP mais adequada para infectar um inseto alvo devemos levar em consideração algumas características biológicas como tipo de locomoção, geotropismo e fototropismo (SHAPIRO et al., 2006).

Espécies de NEPs que apresentam locomoção do tipo *cruiser* podem ser mais eficientes para o controle de insetos que se locomovem mais lentamente abaixo da superfície do solo, enquanto que espécies de nematoídeos que apresentam locomoção do tipo *ambusher* podem ser mais indicadas para infecção de insetos mais ativos na superfície do solo (SHAPIRO et al., 2006).

Os nematoídeos entomopatogênicos podem ser produzidos em pequena, média e larga escala, para serem usados no controle integrado de pragas, sendo utilizadas a produção *in vivo* e *in vitro* de acordo com a finalidade (DOLINSKI, 2006b).

2.10 Controle Biológico Utilizando Nematoídeos Entomopatogênicos (NEPs)

A utilização em potencial dos NEPs no controle biológico vem abrangendo diferentes ordens de insetos que causam prejuízos em diversos tipos de cultivos agrícolas.

Dentre os estudos realizados podemos citar alguns como o controle de ninfas de cigarrinha da cana (*Mahanarva fimbriolata*) (LEITE et al., 2005), da cochonilha da raiz do cafeeiro (*Dysmicoccus texensis*) (ALVES et al., 2009), da mosca-do-Mediterrâneo (*Ceratitis capitata*) e do gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*) (SILVA et al., 2010), do bicho da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*) (GIOMETTI et al., 2011), dentre outros. O uso dos NEPs em estudos envolvendo cultivos agrícolas vem apresentando resultados promissores, nos quais diferentes espécies de nematoídeos vêm sendo testados para o controle de pragas que acometem diferentes culturas (GUO et al., 2013; SUNANDA et al., 2014; ANTWI; REDDY, 2016). Além disso, pesquisas vêm sendo conduzidas onde se avalia a associação dos NEPs com outras formas de controle de pragas, sejam elas produtos químicos ou outros entomopatogênicos, e ainda diferentes formas de aplicação dos nematoídeos (NEGRISOLI JR et al., 2008; SUNANDA et al., 2014; ANTWI; REDDY, 2016). Pesquisas como estas são de grande importância para avaliar a compatibilidade de diferentes produtos com os nematoídeos, já que alguns compostos podem interferir na capacidade reprodutiva e infectante dos NEPs diminuindo assim a eficiência do controle da praga alvo (MONTEIRO, 2014).

Atualmente os NEPs vêm sendo avaliados como uma nova maneira de controlar artrópodes de importância médica veterinária que são vetores de patógenos. Dentre estes podemos destacar estudos realizados com carrapatos (MONTEIRO et al., 2010; 2012; 2014; 2020), mosquitos (CARDOSO et al., 2015) e moscas (MONTEIRO SOBRINHO et al., 2016; ARCHANA et al., 2017; LEAL et al., 2017; ARRIAGA; CORTEZ-MADRIGAL, 2018). Embora os estudos relacionados a utilização de NEPs como controle biológico de vetores tenha avançado nos últimos anos, pesquisas envolvendo a infecção de pulgas ainda são escassas.

2.11 Métodos Alternativos Para o Controle de *Ctenocephalides felis felis*

Apesar de ter aumentado o interesse pelo desenvolvimento/aperfeiçoamento de métodos mais ecológicos para o controle de pragas e vetores, no que se refere ao controle de pulgas ainda existe muito a ser feito.

Atualmente, a maior parte das pesquisas realizadas para o controle de sifonápteros testa diferentes formulações e compostos químicos, avaliando geralmente diferentes associações, a eficiência na mortalidade do inseto, a segurança para o animal e a persistência do composto no hospedeiro evitando a reinfestação (MAGALHÃES et al., 2016; BORGES et al., 2018; WU et al., 2017; MACHADO et al., 2019).

A partir da conscientização das pessoas no que se refere a questões ambientais formas de controle alternativas para ectoparasitos passaram a ser desenvolvidas. Um desses métodos de controle descrito na literatura foi o uso de dispositivos ultrassônicos, estes não agem diretamente sobre o inseto, mas sim sobre o hospedeiro (cães e gatos) alterando seu comportamento (DRYDEN; RUST, 1994).

Recentemente, dentro do contexto de controle alternativo de ectoparasitos, foram realizados estudos de substâncias naturais para o desenvolvimento de compostos químicos que podem ser utilizados no controle de pulgas. Um destes estudos foi realizado por Batista et al., 2016 e teve como objetivo determinar a composição química de óleos essenciais e extrato da planta *Schinus molle* (vulgarmente conhecida como aroeira-salsa) e sua atividade *in vitro* em ovos e adultos de *Ctenocephalides felis felis*.

No que se refere ao controle biológico, um estudo realizado com fungos entomopatogênicos das espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* obteve resultados satisfatórios, onde o primeiro inibiu com sucesso a eclosão ovos e o segundo foi capaz de causar mortalidade em pulgas adultas, porém, apesar de demonstrar patogenicidade para este inseto não foram desenvolvidas estratégias de controle com eles (DE MELO et al., 2008; RUST, 2017).

Poucos são os estudos relacionados a utilização de nematoides entomopatogênicos no controle de *Ctenocephalides felis felis*. Em 1982, Silverman et al. avaliou a susceptibilidade de larvas de *C. felis* por nematoides entomopatogênicos da espécie *Steinernema carpocapsae* (Syn. *Neoplectana carpocapsae*). Mais recentemente, Chen et al., (2007) comparou a infectividade de duas espécies de nematoides entomopatogênicos, *Steinernema abbasi* e *S. carpocapsae*, em larvas de pulga *C. felis* obtendo resultados satisfatórios.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Período de Realização dos Experimentos

O presente estudo encontra-se cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de cadastro AD3CB93. Este foi realizado no período de março de 2018 a dezembro de 2019 nas instalações do Anexo 1 do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil.

3.2 Obtenção das Larvas de *Ctenocephalides felis felis*

Para a realização do estudo, foram utilizadas larvas de pulgas *Ctenocephalides felis felis* com sete dias de idade, oriundas do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) no Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil. A colônia de *Ctenocephalides felis felis* mantida no LQEPV possui certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - IV/UFRRJ tendo como número de protocolo 4313110419.

3.3 Obtenção dos Nematoides

Os nematoides utilizados foram gentilmente cedidos pela Dra. Cláudia de Melo Dolisnki, do Laboratório de Nematologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

As espécies de nematoides utilizadas no estudo *Heterorhabditis bacteriophora* -HP88 e *Heterorhabditis indica*-LPP30 (Rhabditia: Heterorhabditidae) foram trazidas para o Anexo 1 do LCM/EPPWON/UFRRJ onde foi estabelecida a colônia. Estes são produzidos *in vivo* em larvas de sétimo instar de insetos das espécies *Galleria mellonella* (Lepidoptera; Pyralidae) segundo a metodologia descrita por Lindegren et al. (1993) e Kaya e Stock (1997). A coleta dos juvenis infectantes (JIs) de NEPs é realizada utilizando armadilha de White (WHITE, 1927), em seguida estes são armazenados em garrafas de cultivo celular de 40 ml contendo água destilada autoclavada e mantidos em câmara climatizada a temperatura de 16±1°C, 70-80UR.

3.4 Preparação das Suspensões com Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)

Cada ensaio biológico foi iniciado pela infecção de *Galleria mellonella* obtidas da colônia mantida no Anexo 1 do LCM/EPPWON/UFRRJ. Após infectadas pelos nematoides as larvas de *G. mellonella* foram incubadas em câmara climatizada a uma temperatura de 25±1°C, 70-80UR, por sete dias. Posterior a esse período as larvas foram colocadas em armadilha de White (WHITE, 1927), e os JIs recém produzidos foram coletados durante cinco dias (Figura 1). A suspensão aquosa contendo os NEPs de cada espécie utilizada no estudo foi armazenada em garrafas de cultivo celular de 40 mL, em câmara climatizada a 16±1°C, 70-80UR. Ao final do quinto dia de coleta, os NEPs obtidos foram quantificados para serem utilizados na infecção de larvas de sete dias de *C. felis felis*.

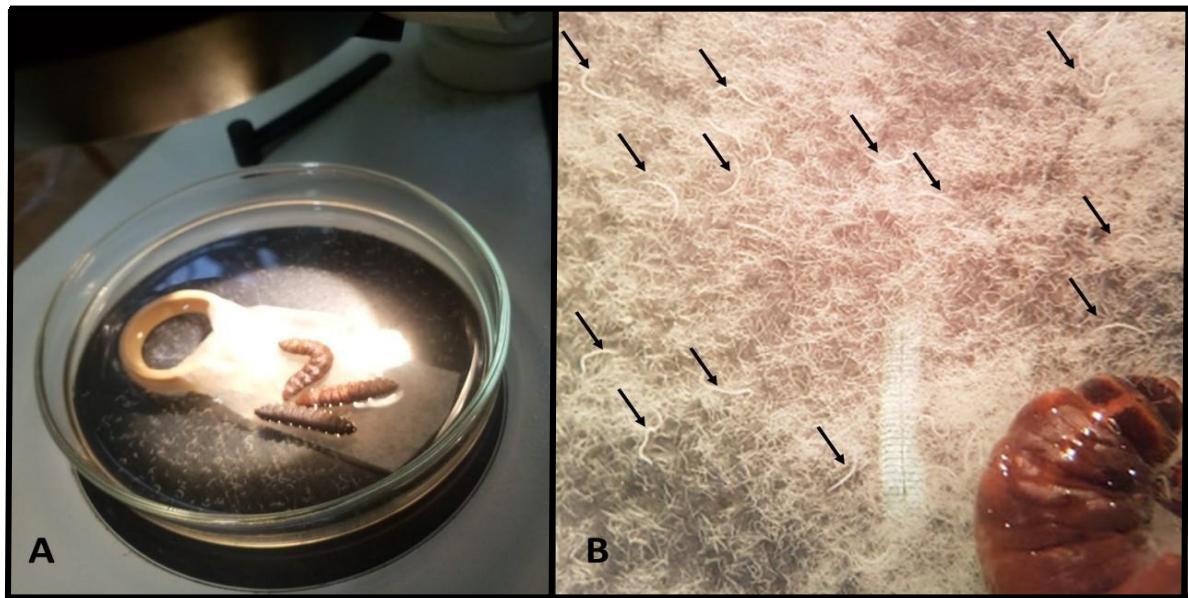


Figura 1 **A.** Armadilha de White contendo nematoídeos entomopatogênicos produzidos em *Galleria mellonella*; **B.** Imagem aproximada evidenciando alguns adultos (setas) de nematoídeos entomopatogênicos com presença de juvenis infectantes. (Fonte: Arquivo pessoal).

A quantificação dos nematoídeos foi realizada através da leitura de 12 alíquotas de 10 μL contendo os JIs em microscópio óptico de campo claro (objetiva 10X). As alíquotas foram distribuídas em uma lâmina de vidro, sem lamínula, com o auxílio de um pipetador automático (Figura 2). Após a leitura de cada alíquota descartou-se o maior e o menor número de juvenis infectantes observado e foi feita uma média com os valores restantes para a obtenção da concentração dos nematoídeos dentro de cada frasco (TAYLOR et al., 1998). As suspensões obtidas foram ajustadas em três concentrações de NEPs para a utilização nos ensaios biológicos, sendo elas 120, 160 e 200 JIs/larva de pulga.

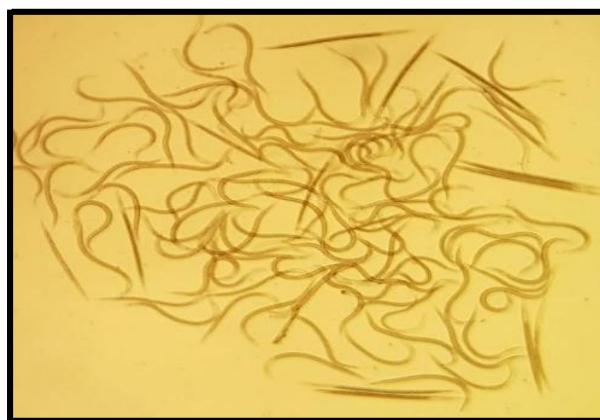


Figura 2 Alíquota de 10 μL contendo juvenis infectantes observados em microscópia óptica de campo claro (10x) para quantificação (Fonte: Arquivo pessoal).

3.5 Delineamento experimental

Na realização de cada ensaio biológico foram utilizadas 240 larvas de pulgas *C. felis felis* com sete dias de idade, alimentadas e com tamanho semelhante entre elas.

As larvas de pulga foram divididas em dois grupos experimentais (com e sem dieta) (figura 3), cada um contendo três tratamentos distintos e um controle.

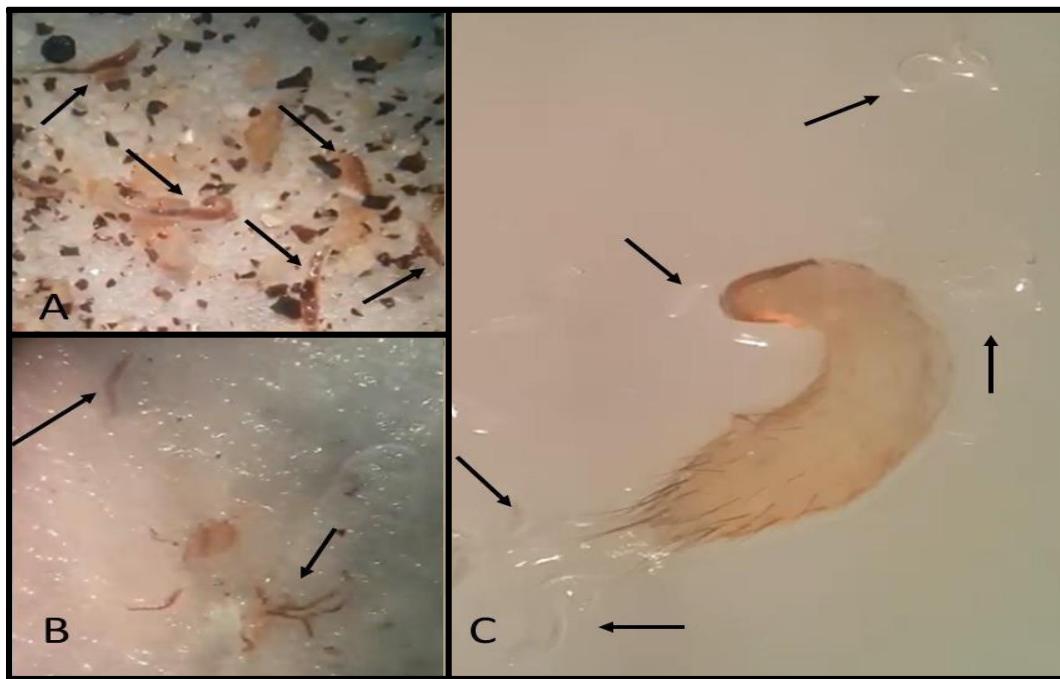


Figura 3 **A.** Larvas de *Ctenocephalides felis felis* em placa com dieta; **B.** Larvas de *Ctenocephalides felis felis* em placa sem dieta; **C.** Placa sem dieta mostrando uma larva de pulga e juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88). (Fonte: Arquivo pessoal).

Nos ensaios biológicos I, II e III cada grupo experimental (com e sem dieta) foi formado por três tratamentos distintos, onde a variável foi a quantidade de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) utilizada (A: 120; B:160 e C:200 JIs/larva de pulga) e o volume de água destilada aplicado juntamente com os juvenis infectantes (400, 600 e 1000 μ L). Cada tratamento possuía três repetições, onde cada repetição era formada por uma placa de Petri (de 6cm de diâmetro) contendo papel filtro previamente esterilizado e 10 larvas de sete dias de pulga *C. felis felis*. Além disso, cada grupo experimental possuía um tratamento controle, com três repetições, onde foi utilizado apenas água destilada (Figura 4).

Já no ensaio biológico IV, foi avaliado a infecção de larvas de pulgas por nematoides entomopatogênicos da espécie *Heterorhabditis indica* (LPP30) nas mesmas concentrações acima (A: 120; B:160 e C:200 JIs/larva de pulga) apenas no volume de 600 μ L de solução.

	COM DIETA	SEM DIETA
Controle	10 10 10	10 10 10
A 120 JIs/larva	10 10 10	10 10 10
B 160 JIs/larva	10 10 10	10 10 10
C 200 JIs/larva	10 10 10	10 10 10

Figura 4 Esquema do delineamento experimental utilizado no estudo. Cada círculo corresponde a uma placa de petri e o número 10 equivale ao número de larvas de pulga *Ctenocephalides felis felis* por placa.

Todos os ensaios biológicos (I, II e III e IV) seguiram o delineamento experimental descrito no quadro 1.

Quadro 1 Grupos experimentais (com dieta e sem dieta) e tratamentos (diferentes concentrações de nematoídes entomopatogênicos) utilizados na infecção de larvas de pulgas *Ctenocephalides felis felis* por juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88).

VARIÁVEIS		GRUPOS EXPERIMENTAIS	
TRATAMENTO		Grupo Sem Dieta	Grupo Com Dieta
Controle		Somente água destilada	Somente água destilada
A	120 JIs/larva		120 JIs/larva
B	160 JIs/larva		160 JIs/larva
C	200 JIs/larva		200 JIs/larva

Após a infecção todas as placas foram mantidas em câmara climatizada a uma temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$, 70-80UR. Estas foram observadas diariamente por um período de 48 horas para avaliar a mortalidade das larvas de sete dias de *C. felis felis*.

Decorridos 24 horas uma larva de cada placa foi dissecada para observar se estas haviam sido infectadas pelos juvenis infectantes (JIs). O mesmo procedimento foi realizado com 48 horas.

Posteriormente a morte das larvas de pulgas foram feitas armadilhas de White (WHITE,1927) na tentativa de recuperar JIs. Os juvenis infectantes recuperados foram agrupados por tratamento e utilizados para infectar *Galleria mellonella* para avaliar se a infecção por estes era viável.

3.6 Mortalidade das Larvas de Ctenocephalides felis felis

A mortalidade das larvas de *C. felis felis* foi avaliada através da observação de características como: movimentação das larvas, mudança de coloração e presença de nematoides no interior das larvas de pulgas.

A comprovação da infecção das larvas de pulgas pelos NEPs foi realizada através da dissecação da mesma e observação através da lupa de adultos de *Heterorhabditis* spp. no seu interior.

A larva de pulga usada para dissecação foi contabilizada como morta antes de sua retirada.

3.7 Análise Estatística

A estatística utilizada para avaliar os ensaios biológicos foi realizada através do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Onde os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) ou pelo teste F com 1% de significância ($p \leq 0,01$). A porcentagem de mortalidade das larvas de *C. felis felis* foi estimada com relação entre o número de larvas mortas e o número de larvas total utilizadas (vivas e mortas) de cada grupo e concentração. Os valores da mortalidade foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbott (1925), descrita a seguir:

$$Mc(\%) = \frac{\%Mo - \%Mt}{100 - \%Mt} \times 100$$

Onde:

Mc = Mortalidade corrigida;

Mo = Mortalidade observada;

Mt = Mortalidade na testemunha.

Todos os fatores (quantidade de solução utilizada, presença de dieta, concentração de NEPs) foram avaliados isoladamente assim como a interação entre eles.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios Biológicos Utilizando Juvenis Infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88)

4.1.1 Ensaio biológico I - Avaliação da infecção de larvas de *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) utilizando 400 µL de solução

O primeiro parâmetro avaliado para determinar a mortalidade das larvas de *Ctenocephalides felis felis* foi a motilidade das larvas. As larvas de pulga são bastante ágeis e quando infectadas estas se mostram imóveis.

Com 24 horas, a motilidade das larvas em ambos os grupos experimentais ainda era grande, sendo observado poucas larvas imóveis distribuídas entre os tratamentos. No grupo experimental com dieta foi observado um maior número de larvas de pulga sem motilidade nas primeiras 24 horas. Após 48 horas, menos de 50% das larvas de pulga distribuídas entre os tratamentos nos dois grupos experimentais ainda apresentavam motilidade, sendo estas mais observadas no grupo com dieta. Nos tratamentos controle, apenas uma placa do grupo experimental sem dieta apresentou duas larvas imóveis.

A segunda característica avaliada foi a coloração das larvas. Estas após infectadas por nematoides entomopatogênicos passam de uma coloração esbranquiçada para uma coloração amarelada ou acastanhada, tal característica foi observada em todas as placas, em ambos os grupos experimentais (Figura 5A).

Nas primeiras 24 horas depois da infecção por juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88), foi possível dissecar uma larva de pulga das placas em que foram observadas larvas imóveis e com alteração na coloração. No grupo sem dieta foi possível observar a presença dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) no interior das larvas de pulga em uma placa do tratamento A (120 JIs/larva). Já no grupo experimental com dieta os NEPs foram observados no interior das larvas de *C. felis felis* em duas placas do tratamento A (120 JIs/larva) e duas placas do tratamento B (160 JIs/larva). Com 48 horas, no grupo sem dieta foi possível observar NEPs adultos dentro de larvas de pulgas em todas as placas dos tratamentos A, B e C (120, 160 e 200 JIs/larva) (Figura 5B e 5C). O mesmo foi observado no grupo com dieta.

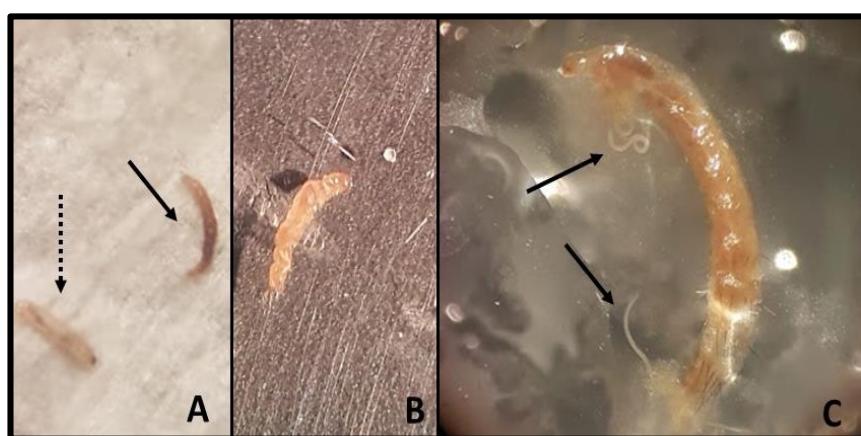


Figura 5 A. Alteração da coloração das larvas de *Ctenocephalides felis felis* após infecção por nematoides entomopatogênicos (seta pontilhada; larva viva, seta cheia, larva morta); **B.** Larva de *Ctenocephalides felis felis* com coloração amarelada; **C.** Adultos de nematoides entomopatogênicos saindo da larva de pulga *Ctenocephalides felis felis* durante dissecção. (Fonte: Arquivo pessoal).

Neste ensaio biológico foi possível observar ainda a presença de larvas de pulga

completamente dessecadas onde não era possível mais ver nematoides entomopatogênicos e nenhum conteúdo no seu interior. Apenas a cutícula das larvas de *C. felis felis* foi observada aderida ao papel filtro demonstrando que toda a hemolinfa havia sido digerida pelos nematoides. .

Foi possível realizar uma recuperação muito pequena de JIs apenas em uma placa do tratamento B, do grupo experimental com dieta. Como a quantidade de JIs obtida foi mínima, a infecção de *Galleria mellonella* utilizando estes NEPs não foi bem sucedida.

4.1.2 Ensaio biológico II - Avaliação da infecção de larvas *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) utilizando 1000 µL de solução

A primeira avaliação da mortalidade das larvas de *C. felis felis* foi realizada 24 horas após a infecção. Neste ensaio biológico foi possível observar 100% de mortalidade das larvas, em todos os grupos e tratamentos, já nesta primeira avaliação. As larvas de *C. felis felis* avaliadas não sofreram alteração da coloração indicando que não houve penetração e infecção promovida pelos nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbiontes. Os controles também apresentaram este mesmo percentual de mortalidade e as mesmas características de cor, sugerindo que a causa da mortalidade das larvas não foi pelos nematoides.

Como houve a mortalidade de todas as larvas durante as primeiras 24 horas, incluindo os controles, não foi realizada a avaliação com 48 horas assim como a dissecação das larvas de pulga.

4.1.3 Ensaio biológico III - Avaliação da infecção de larvas *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) em 600 µL de solução

Quanto a motilidade das larvas de *C. felis felis*, decorridos as primeiras 24 horas, pode-se observar que o percentual de larvas imóveis variou entre 40 e 80% nos tratamentos do grupo experimental sem dieta e 40 e 50% nos tratamentos do grupo experimental com dieta. Após 48 horas poucas larvas permaneceram com movimentação dentro de todas as placas. O oposto pode ser observado nos tratamentos controle dentro dos dois grupos experimentais, a grande maioria das larvas continuaram movimentando-se com agilidade nas placas.

No que se refere à coloração das larvas, foi possível notar que poucas mantiveram-se com a coloração esbranquiçada. Nos dois grupos experimentais, em todos os tratamentos utilizados (exceto os controles) foi observada uma coloração amarelada ou acastanhada (Figura 6A).

Nas primeiras 24 horas após a infecção por juvenis infectantes de *H. bacteriophora* (HP88), uma larva de pulga de cada placa foi dissecada e foi observado que a infecção foi bem sucedida dentro dos dois grupos experimentais, em todos os tratamentos (exceto nos controles). Em alguns casos, pode-se observar a presença de NEPs adultos no interior das larvas de *C. felis felis* quando esta apresentava-se translúcida (Figura 6B). As larvas de pulga restantes foram usadas na confecção da armadilha de White.



Figura 6 A. Alteração da coloração das larvas de *Ctenocephalides felis felis* após infecção por nematoides entomopatogênicos; B. Adultos de nematoides no interior da larva de pulga *Ctenocephalides felis felis*. (Fonte: Arquivo pessoal).

Neste ensaio biológico foi possível observar a emergência de juvenis infectantes de em todas as placas (exceto controle), em ambos os grupos experimentais. A quantidade de JIs observados por placa foi variável, apresentando placas com menos de 10 JIs e placas com até 30 JIs. Neste ensaio biológico a infecção de *G. mellonella* foi bem sucedida nos tratamentos A, B e C dos dois grupos experimentais. Os juvenis começaram a emergir das larvas de *G. mellonella* 12 dias após a infecção por *H. bacteriophora* (HP88). Não foram observadas larvas de *C. felis felis* dessecadas neste ensaio biológico.

4.2 Influência da Quantidade de Líquido (QL), Concentração de Nematoides Entomopatogênicos (CNEPs) *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e Presença de Dieta (PD) na Infecção de Larvas de *Ctenocephalides felis felis*

Nos resultados obtidos através da análise de variância (Tabela 1) foram identificados efeitos significativos na concentração de nematoides (CNEPs) e na quantidade de líquido utilizado. Não houve diferença de mortalidade quanto ao uso de dieta (PD) para manutenção das larvas ($p>0,05$). Não houve diferenças estatísticas significantes entre as interações duplas, concentração de nematoides e quantidade de líquido (CNEPs x QL), concentração de nematoides e presença de dieta (CNEPs x PD) e quantidade de líquido e presença de dieta (QL x PD) . A interação tripla, concentração de nematoides, quantidade de líquido e presença de dieta (CNEPsxQLxPD) quando avaliada não apresentou significância estatística, indicando que esses três fatores não atuam conjuntamente sobre a mortalidade de larvas de *C. felis felis*.

Tabela 1 Resumo da análise de variância referente aos valores de mortalidade (%) de larvas de *Ctenocephalides felis felis* em função da concentração de nematoides *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88), quantidade de líquido e presença de dieta específica para pulgas.

FV	GL	Quadrados Médios
Concentrações de nematoides (CNEPs)	3	15391,4**
Quantidade de líquido (QL)	1	4094,1**
Presença de dieta (PD)	1	316,7 ^{ns}
CNEPs x QL	3	218,1 ^{ns}
CNEPs x PD	3	63,9 ^{ns}
QL x PD	1	650,0 ^{ns}
CNEPs x QL x PD	3	76,2 ^{ns}
Erro	32	-
CV (%)	21,8	-

ns, ** - não significativo e significativo a 1% pelo teste F ($p \leq 0,01$). FV – fontes de variação. GL – graus de liberdade. CV – coeficiente de variação.

Ao analisar os fatores isoladamente (Tabela 2) e comparar todas as concentrações de NEPs, podemos observar que todas apresentaram aumento significativo na mortalidade das larvas de pulga em relação ao controle, não apresentando diferenças estatísticas entre as concentrações de nematoides utilizadas.

Tabela 2 Valores médios da mortalidade de larvas de *Ctenocephalides felis felis* em função da concentração de nematoides *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88).

Mortalidade (%) de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>				
Concentração de nematoides				
0 NEPs. μ L ⁻¹	120 NEPs. μ L ⁻¹	160 NEPs. μ L ⁻¹	200 NEPs. μ L ⁻¹	
7,5 B	84,8 A	79,2 A	70,5 A	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quando analisados separadamente, a comparação da quantidade de líquido utilizados nos ensaios biológicos, observa-se que o uso de 400 μ L promoveu uma menor mortalidade das larvas de pulga quando comparado ao uso de 600 μ L, sendo a mortalidade de 51,3 % e 69,7 % respectivamente, já a análise do fator presença de dieta quando avaliado isoladamente não promoveu influência na mortalidade das larvas, não apresentando diferenças significativas entre si (Tabela 3).

Tabela 3 Valores médios da mortalidade de larvas de *Ctenocephalides felis felis* em função da quantidade de líquido e presença de dieta específica para larvas de pulga por nematoíde entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88).

Mortalidade (%) de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>			
Quantidade de líquido		Dieta	
400 µL	600 µL	Com	Sem
51,3 B	69,7 A	57,9 A	63,1 A

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ao analisar isoladamente a mortalidade das larvas de *C. felis* em 600 µL em relação as concentrações de NEPs, observa-se que a presença de JIs de *H. bacteriophora* (HP88), independentemente da quantidade, aumentou consideravelmente a mortalidade das larvas de *C. felis felis*. Também, observa-se que as quantidades testadas, embora eficientes quando comparadas ao tratamento controle (0 neps.600 μL^{-1}), não apresentaram diferenças estatísticas entre si, o mesmo ocorre ao comparar a presença ou ausência de dieta (Tabela 4).

Tabela 4 Valores médios da mortalidade de larvas de *Ctenocephalides felis felis* em função da concentração de nematoíde entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) associado a presença e ausência de dieta em 600 µL.

Mortalidade (%) de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em 600 µL				
Tratamentos	0 neps.	1200 neps.	1600 neps.	2000 neps.
Com dieta	16,6 Bb	100,0 Aa	83,3 Aa	83,3 Aa
Sem dieta	6,6 Bb	92,6 Aa	90,0 Aa	85,2 Aa
Média	11,6 Bb	96,3 Aa	86,6 Aa	85,7 Aa

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas linhas (comparação entre CL) e minúsculas nas colunas (comparação entre dieta), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Não foi necessário analisar as outras interações (NEPsxQL, NEPsxPD e NEPsxQLxPD), pois essas não apresentaram efeito significativo na ANOVA.

4.3. Ensaio Biológico IV - Avaliação da Infecção de Larvas de Pulgas *Ctenocephalides felis felis* por Nematoíde Entomopatogênico *Heterorhabditis indica* (LPP30)

A motilidade das larvas foi avaliada 24 horas após a infecção. Nesta avaliação foi possível observar que o grupo experimental sem dieta não apresentava larvas imóveis no tratamento A. Porém, nos tratamentos B e C foi possível observar a presença de larvas de *C. felis felis* sem movimentação, onde o percentual variou entre 10 e 16,7%. Já no grupo experimental com dieta, foi possível observar larvas de pulga imóveis em todos os tratamentos (A, B e C), sendo o percentual máximo de 23,33%. Nos controles esse percentual foi baixo em ambos os grupos experimentais, sendo este 3,33% para o grupo sem dieta e 6,67% para o grupo com dieta. Com 48 horas as placas foram avaliadas novamente e o número de larvas sem movimentação aumentou em todos os tratamentos. Onde seis foi o menor número de larvas imóveis por placa observado em todos os tratamentos nos dois grupos experimentais, com exceção dos controles. Nos controles o número de larvas que apresentavam motilidade foi grande, o maior percentual de larvas imóveis foi visto no grupo experimental com dieta (10%).

Quanto a coloração das larvas, foi possível notar que as que se encontravam imóveis geralmente apresentavam uma coloração amarelada ou acastanhada, em todos os tratamentos

(exceto controle) nos dois grupos experimentais.

Após as primeiras 24 horas depois da infecção por juvenis infectantes (JIs) de *H. indica* (LPP30), uma larva com alteração na coloração foi dissecada. A infecção foi comprovada em todas as larvas de pulgas dissecadas nessas primeiras 24 horas. Com 48 horas, o mesmo procedimento foi realizado, em todas foi possível comprovar a infecção das larvas de *C. felis felis* por *H. indica* (LPP30) (Figura 7).

Neste ensaio biológico não foram observadas larvas de *C. felis felis* dessecadas.



Figura 7 A. Alteração da coloração das larvas de *Ctenocephalides felis felis* após infecção por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (LPP30) (seta pontilhada, larva viva; seta cheia, larva morta); **B.** Adultos de nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (LPP30) ao lado da larva de pulga *Ctenocephalides felis felis* após dissecção. (Fonte: Arquivo pessoal).

Neste ensaio biológico foi possível observar a emergência de JIs de *H. indica* (LPP30) em todas as placas, em ambos os grupos experimentais. A quantidade de JIs observado por placa foi variável, onde pode-se observar placas com menos de 10 JIs e placas com até 20 JIs. Neste ensaio biológico a infecção de *G. mellonella* foi bem sucedida nos tratamentos A, B e C dos dois grupos experimentais. Os juvenis começaram a emergir das larvas de *G. mellonella* 14 dias após a infecção por *H. indica* (LPP30).

Os dados relativos à mortalidade das larvas de *C. felis felis* por *H. indica* (LPP30) foram analisados através de métodos estatísticos paramétricos (análise de variância – ANOVA e teste de Tukey).

Com os dados obtidos através da ANOVA foi possível observar que a concentração de nematoides utilizada na infecção influenciou significativamente na mortalidade das larvas de pulga. A presença ou ausência de dieta não influenciou estatisticamente na mortalidade das larvas. A interação entre as concentrações de NEPs e a presença ou ausência de dieta também foi avaliada. Estatisticamente tal interação também não apresentou influência na mortalidade de larvas de *C. felis felis* observada (Tabela 5).

Tabela 5 Resumo da análise de variância referente aos valores de mortalidade (%) de larvas de *Ctenocephalides felis felis* em função da concentração de nematoides *Heterorhabditis indica* (LPP30), com e sem dieta específica para pulgas.

FV	GL	Quadrados Médios
Concentrações de nematoides (NEPs)	3	8186,97**
Presença de Dieta (PD)	1	10,56 ^{ns}
Interação NEPs x PD	3	98,43 ^{ns}
Erro	16	178,51
CV (%)	21,14	-

ns, ** - Não significativo e significativo a 1% pelo teste F ($p \leq 0,01$). FV – Fontes de variação; GL -Graus de liberdade; CV – Coeficiente de variação.

Estes resultados permitem inferir que a presença ou ausência de dieta não aumentou ou reduziu a mortalidade de larvas de *C. felis felis*, independentemente da concentração de NEPs utilizada (Tabela 6).

Quando se compara as concentrações de NEPs, observa-se que a presença de JIs de *H. indica* (LPP30), independentemente da quantidade, aumentou consideravelmente a mortalidade das larvas de *C. felis felis*. Também, observa-se que as quantidades testadas, embora eficientes quando comparadas ao tratamento controle (0 neps.600 μL^{-1}), não apresentaram diferenças estatísticas entre si (Tabela 6).

Tabela 6 Valores médios da mortalidade de larvas de *Ctenocephalides felis felis* em função da concentração de nematoides *Heterorhabditis indica* (LPP30) e uso de dieta específica para pulgas.

Mortalidade (%) de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em 600 μL				
Tratamentos	0 neps.	1200 neps.	1600 neps.	2000 neps.
Com dieta	10,0 Bb	85,2 Aa	75,0 Aa	80,00 Aa
Sem dieta	6,7 Bb	81,4 Aa	74,0 Aa	93,33 Aa
Média	8,3 Bb	83,3 Aa	74,5 Aa	86,7 Aa

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas (com e sem dieta) e maiúsculas na linha inferior (concentrações de nematoides), não diferem entre pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) possuem grande potencial para utilização no controle biológico de pragas, principalmente as que posuem alguma fase evolutiva no solo, (GREWAL et al., 2001), como ocorre com as larvas *Ctenocephalides felis felis* que vivem no solo, geralmente em ambientes protegidos, com altas temperaturas e umidade (DRYDEN; RUST, 1994). Esses nematoides possuem diversas vantagens devido a ampla gama de hospedeiros que podem infectar, sendo altamente específicos, além da fácil produção e armazenamento (GREWAL et al., 2001; DOLINSKI; MOINO-JR, 2006).

Apesar de serem citados, estudos com indivíduos da ordem Sifonáptera são escassos (PONAIR JR.; GREWAL, 2012). Rust, 2017 relata que mesmo com os avanços nas pesquisas com pulgas, o controle biológico desses insetos carece de mais estudos

Devido a essa escassez de estudos e técnicas para infecção em sifonápteros, foi preciso inicialmente analisar diferentes metodologias de infecção utilizando os NEPs em outras espécies de artrópodes, e avaliando juntamente com as características individuais de *Ctenocephalides felis felis* para estabelecer a melhor maneira de infectar larvas de sete dias de pulga. A metodologia de infecção de larvas de pulga foi baseada no trabalho de Arriaga e Cortez- Madrigal (2018) utilizando adultos e larvas de mosca.

Assim como Arriaga e Cortez- Madrigal (2018), a infecção do inseto hospedeiro foi possível, eles também observaram diferença entre as espécies avaliada, sendo *H. indica* a que causou maior mortalidade em moscas adultas, porém, não encontraram diferença significativa entre as concentrações de NEPs utilizadas dentro de cada espécie. No presente estudo também não foi possível observar diferença significativa entre a quantidade de NEPs utilizadas na infecção de larvas de pulga por *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30), com base nisso, sugere-se a utilização da menor concentração (120 JIs/larva de pulga) pois é tão eficiente quanto a maior concentração testada no estudo (200 JIs/larva de pulga), sendo a primeira mais fácil de ser obtida.

Com relação aos estudos envolvendo pulgas, em 1982, Silverman et al. avaliou a patogenicidade de *Sterneinema carpocapsae* (syn *Neoplectana carpocapsae*) em fases imaturas de *C. felis felis*, verificando que o nematoide era patogênico para esse inseto, chegando a obter uma mortalidade de até 90%. Em 2007, Chen et al., estudou a infectividade de dois nematoides entomopatogênicos, *Steinernema abbasi* e *S. carpocapsae*, em larvas de pulgas de *C. felis felis* e verificou que ambas as espécies podem infectar e matar larvas de 3º estádio, com mortalidade chegando a 76,7%.

No presente estudo, duas espécies de NEPs, *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabditis indica* (LPP30) também foram avaliadas quanto ao potencial de infectividade em larvas de pulgas. Onde o percentual de mortalidade observado para larvas de sete dias de *C. felis felis* foi superior ao descrito por Chen et al., (2007) em ambas as espécies estudadas nas três concentrações de NEPs e em ambos os grupos experimentais.

Em relação ao estudo descrito por Silverman et al. (1982), o percentual de infecção por *H. bacteriophora* (HP88) foi superior ao descrito, sendo observado superioridade também na infecção por *H. indica* (LPP30) em um tratamento. Este percentual superior de infecção no presente estudo pode ter sido favorecido pela escolha de NEPs do gênero *Heterorhabditis* para utilização. Pois uma das vantagens dos NEPs utilizados no presente estudo é devido a sua morfologia, já que as larvas de pulgas possuem tamanho menor do que a maioria dos insetos utilizados para produção de nematoides, e os NEPs das espécies estudadas são menores e possuem pequenos apêndices na região cefálica que permitem a penetração pela cutícula do inseto (FORST; CLARKE, 2002). Este fato também já foi sugerido anteriormente por Arriaga e Cortez- Madrigal (2018) que estudaram a susceptibilidade da infecção em larvas e adultos

de *Musca domestica* por nematoides entomopatogênicos *Steinernema* sp., *Heterorhabditis* sp. e *H. indica* nativos do México. Os autores observaram que NEPs do gênero *Heterorhabditis* são mais bem sucedidos na infecção de *M. domestica* principalmente devido as suas características morfológicas. Pois a presença de espiráculos reduzidos e um aparelho bucal lambedor em larvas e adultos da mosca dificultam a penetração por algumas espécies de nematoides entomopatogênicos. Destacam ainda que *H. indica* foi a espécie com maior percentual de infecção, sendo provavelmente favorecido pelo seu tamanho reduzido.

Já em relação a presença ou não de substrato ou dieta específica, Arriaga e Cortez-Madrigal (2018) relatam que a utilização de substrato contendo um elevado percentual de matéria orgânica propicia o desenvolvimento de micro-organismos que podem reduzir a disponibilidade de oxigênio, interferindo diretamente na sobrevivência dos NEPs. Tal fato também foi observado por Archana e colaboradores (2017) em um trabalho desenvolvido com *M. domestica*, que observou maior mortalidade das larvas de mosca pelos nematoides em placas que não utilizavam dieta como substrato. No presente estudo, quando avaliado a presença de dieta nos grupos experimentais no ensaio biológico realizado com *H. bacteriophora* (HP88) e *H. Indica* (LPP30) em 600 μ L de solução não foi observada diferença significativa entre os grupos, sugerindo que a presença de dieta não influencia na infecção pelos NEPs.

Esses resultados obtidos no presente estudo corroboram com os valores obtidos por Monteiro Sobrinho et al., (2016), também utilizando *H. bacteriophora* (HP88) em larvas de moscas *Stomoxys calcitrans* em placa de petri contendo papel filtro com substrato rico em matéria orgânica obtidos da indústria da cana- de-áçúcar (torta de filtro) onde a presença do substrato não interferiu na mortalidade das larvas da mosca pelos nematoides.

No que se refere ao comportamento dos sifonáptos, as larvas de *C. felis felis* podem realizar atos de canibalismo caso não encontrem alimento (DRYDEN; RUST, 1994). Tal fato foi observado no tratamento controle do grupo experimental sem dieta do estudo que avaliou a espécie *H. bacteriophora* (HP88) utilizando um volume de 400 μ L de solução, onde foi possível notar a presença de uma larva despedaçada em duas placas do tratamento, o que pode ter ocorrido devido a pouca umidade dessas placas, que é necessária para que os nematoides consigam se movimentar e penetrar nas larvas de pulga. Este comportamento não foi observado nos grupos experimentais que utilizaram 600 μ L, o que pode ter sido influenciado devido a capacidade dos nematoides entomopatogênicos de infectar e matar os insetos rapidamente, em um período de 24 a 48 horas (DOWDS; PETERS, 2002).

Os três primeiros ensaios biológicos com *H. bacteriophora* (HP88) foram testadas a quantidade de líquido a ser utilizadas nas placas, a concentração de nematoides e presença e ausência de dieta. Quando avaliados estes fatores isoladamente apenas a quantidade de líquido utilizado nas placas interferiu significativamente na mortalidade das larvas de pulgas. Sabe-se que para a sobrevivência e locomoção dos NEPs é necessário umidade, pois estes podem sofrer dessecção além de terem sua locomoção prejudicada (SHAPIRO-ILAN et al., 2006; ROHDE et al., 2010). No ensaio biológico I foram utilizados 400 μ L de líquido, a infecção foi possível porém a média de mortalidade foi significativamente menor do que a observada no ensaio biológico III, que utilizou 600 μ L. Neste primeiro ensaio biológico o papel filtro perdeu umidade nas primeiras 24h, o que possivelmente dificultou a locomoção e a penetração dos NEPs nas larvas de pulga. Tal fato não foi observado no ensaio biológico III, onde a umidade se manteve pelas 48h de observação, propiciando um maior tempo de contato dos NEPs com o hospedeiro inseto.

A umidade é importante tanto para os NEPs quanto para as larvas de *C. felis felis*, pois estas necessitam de umidade para sobreviver, porém, uma umidade excessiva pode causar mortalidade das larvas de pulga (DRYDEN; RUST, 1994; SILVA et al., 2008). No ensaio biológico II foram utilizados 1000 μ L de líquido nas placas, o que ocasionou a mortalidade

de 100% das larvas incluindo os controles, confirmando o que já foi descrito na literatura por Dryden e Rust, 1994 e por Silva et al., 2008.

Na literatura há poucos registros do percentual de umidade relativa ideal para a infecção de pulgas por nematoides entomopatogênicos, no entanto, um estudo conduzido por Silverman et al. (1982), relata que ao aumentar a umidade de 7% para 22% houve uma melhora nas taxas de mortalidade das larvas de pulga. Fato semelhante foi descrito por Chen et al., (2007), onde a umidade relativa do ambiente também influenciou no percentual de mortalidade das larvas de *C. felis felis*, sendo este menor quando a umidade relativa era inferior a 20%. O mesmo ocorreu ao comparar os ensaios biológicos I e III, onde a mortalidade das larvas de pulgas foi maior quando a quantidade de líquido das placas aumentou de 400 μL para 600 μL .

A recuperação de juvenis infectantes a partir da infecção de larvas de pulga foi possível tanto para *H. bacteriophora* (HP88), sendo melhor o ensaio biológico III utilizando 600 μL , quanto para *H. indica* (LPP30), sendo possível utilizar estes JIs na infecção de *G. mellonella*. Em relação a virulência das espécies utilizadas ambas foram capazes de infectar *G. mellonella*, sendo a produção de JIs mais intensa pela espécie *H. bacteriophora* (HP88) do que por *H. indica* (LPP30).

As informações obtidas no presente estudo são de grande importância para o desenvolvimento futuro de um possível controle integrado para *C. felis felis*. No entanto, mais estudos a respeito do potencial de infecção e virulência destes, e de outros, NEPs em de larvas de pulgas devem ser realizados.

6 CONCLUSÕES

- *Heterorhabdits bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabdits indica* (LPP30) são capazes de infectar e matar larvas de sete dias de *Ctenocephalides felis felis* nas condições estudadas; completando seu ciclo biológico, produzindo juvenis infectantes e adultos;
- O volume de líquido mais adequado para a infecção de larvas de sete dias de *Ctenocephalides felis felis* foi de 600 μ L, onde os nematoides de *Heterorhabdits bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabdits indica* (LPP30) puderam sobreviver e se movimentar normalmente, tendo assim mais condições de encontrar as larvas e de infectar com eficiência o hospedeiro inseto;
- A menor concentração de juvenis utilizada pode ser a mais adequada em futuros ensaios biológicos com larvas de sete dias de *Ctenocephalides felis felis*, pois é eficiente e mais fácil de conseguir a quantidade;
- Os juvenis infectantes de *Heterorhabdits bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabdits indica* (LPP30) obtidos a partir de larvas de sete dias de *Ctenocephalides felis felis* conseguem infectar *Galleria mellonella*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base neste estudo foi possível comprovar a infecção de larvas de sete dias de *Ctenocephalides felis felis* por duas espécies de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabditis indica* (LPP30). Os resultados obtidos no presente trabalho favorecerão a realização de estudos posteriores, gerando mais conhecimento sobre o assunto e possibilitando futuramente o desenvolvimento de estratégias de controle integrado para esse sifonáptero.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. **Taxonomy and Systematics**, In: GAUGLER, R. (ed.) **Entomopathogenic Nematology**. CABI, New York. Press, p. 1-33, 2002.
- AGUIAR MENEZES, E. L. Controle biológico de pragas: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas. **Embrapa Agrobiologia-Dокументos (INFOTECA- E)**, 2003.
- ALMENARA, D. P.; ROSSI, C.; NEVES, C. M. R.; WINTER, C. E. **Nematoides entomopatogênicos**, In: SILVA NETO, M.A.C. da; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. (Ed.). **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCT-EM, p. 1-40, 2012.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos**, In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Escola Superior Agricultura Luiz de Queiroz, p. 289-381, 1998.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M.A. **Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina**, In: (Ed). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, p.69-110, 2008.
- ALVES, V. S.; MOINO-JUNIOR, A.; SANTA-CECILIA, L. V.; ROHDE, C.; DA SILVA, M. A. T. Testes em condições para o controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera, Pseudococcidae) em cafeiro com nematóides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida, Heterorhabditidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 139-143, 2009.
- ANTWI, F. B.; REDDY, G. V. P. Efficacy of entomopathogenic nematodes and sprayable polymer gel against crucifer flea beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on canola. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 4, p. 1706-1712, 2016.
- ARCHANA, M.; D'SOUZA, P. E.; PATIL, J. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on developmental stages of house fly, *Musca domestica*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 3, p. 782-794, 2017.
- ARRIAGA, A. A. M.; CORTEZ-MADRIGAL, H. Susceptibility of *Musca domestica* larvae and adults to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) native to Mexico. **Journal of Vector Ecology**, v. 43, n. 2, p. 312-320, 2018.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas o homem e o meio ambiente**. Viçosa, MG: Editora UFV. p. 215, 2004.
- BATISTA, L. C.; CID, Y. P.; DE ALMEIDA, A. P.; PRUDÊNCIO, E. R.; RIGER, C. J.; DE SOUZA, M. A.; CHAVES, D. S. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 627-638, 2016.
- MÉNIER, K.; BEAUCOURNU, J. Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles; Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 5, p. 883-890, 1998.
- BLAGBURN B. L.; DRYDEN M. W. Biology, treatment and control of flea and tick infestations. **The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practices**, v. 39, n. 6, p. 1173-1200, 2009.
- BORGES, D. A.; MORAES, P. A.; CARDOSO, J. D.; OLIVEIRA, P. C.; YASUI, A. M.; FERNANDES, I. M. P.; LAMBERT, M. M.; CORREIA, T. R.; SCOTT, F. B. Efficacy of a dinotefuran, pyriproxyfen and permethrin combination product against *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae) on artificially infested rabbits. **Veterinary**

Parasitology, v. 259, p. 74-79, 2018.

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

BUENO, V. H. P.; JUNIOR, J.; JUNIOR, A. M.; SILVEIRA, L. D. **Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável**. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, 2011.

CARDOSO, D. D. O.; GOMES, V. M.; DOLINSKI C.; SOUZA. R. M. Potential of entomopathogenic nematodes as biocontrol agents of immature stages of *Aedes aegypti*. **Nematoda**, v. 74, n. 8, p. 2275-2287, 2015.

CHEN, L. C.; CHEN. Comparison of infectivity of two entomopathogenic nematodes, *Steinerinema abbasi* and *S. carpocapsae*, against immature stage of *Ctenocephalides felis felis* (Bouche) (Siphonaptera: Pulicidae), 2007.

CLARK, J.M.; SCOTT, J.G.; CAMPOS, F.; BLOOMQUIST, J.R. Resistance to avermectinsextent, mechanisms, and management implications. **Annual Review Entomology**, v. 40, p. 1-30, 1995

COHEN E. Chitin Bioquemistry: synthesis and inhibiton. **Annual Review Entomology**, v. 32, p. 71-93, 1987.

COSTA, V. A.; BERTI FILHO, E.; SATO, M. E. **Parasitóides e predadores no controle de pragas**, p. 25-34. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds.). **Controle Biológico na Prática**. ESALQ/USP, Piracicaba: CP, v. 2, p. 287, 2006.

DE MELO, D., FERNANDES, É. K., DACOSTA, G., SCOTT, F.; BITTENCOURT, V. E . Virulence of *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 388, 2008.

DOLINSKI, C. **Tecnologia de produção e formulação de nematoides entomopatogênicos**. p. 261-289. In: VENZON, M.; DE PAULA JR. T. J.; PALLINI, A. **Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, 1. Ed. Vicos: EPAMIG, p. 377, 2006b.

DOLINSKI, C. **Uso de nematoides entomopatogênicos para o controle de pragas**. p. 261-289. In: VENZON, M.; DE PAULA JR. T.J.; PALLINI, A. **Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, 1. Ed. Vicos: EPAMIG, p. 377, 2006a.

DOLINSKI, C.; A. MOINO JR. Utilização de nematoides entomopatogênicos nativos ou exóticos: O Perigo das Introduções. **Nematologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 139-149, 2006.

DOWDS, B. C.; PETERS, A. **Virulence mechanisms**. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 79-98, 2002.

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

DRYDEN, M. W. Host association, on-host longevity and egg production of *Ctenocephalides felis felis*. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 117-122, 1989.

DRYDEN, M. W. **Evaluation of certain parameters in the bionomics of Ctenocephalides felis felis (Bouché 1835)**. Tese (mestrado). Purdue University, W. Lafayette, IN, p. 115, 1988.

EL-GAZZAR, L. M.; MILIO, J.; KOEHLER, P. G.; PATTERSON, R. S. Insecticide resistance in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, p. 132-134, 1986.

- FARIA, M.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001.
- FERRAZ, L. C. C. B.; LEITE, L. G.; LOPES, R. B.; MOINO JR, A.; DOLINSKI, C. **Utilização de nematoides para o controle de pragas agrícolas e urbanas.** In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina.** Piracicaba: FEALQ, p. 171-202, 2008.
- FERRAZ, L. C. C. B. **Nematóides entomopatogênicos.** In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, p. 541-570, 1998.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.
- FLORES, E. F. **Virologia veterinária.** Santa Maria: Ed. UFMS, p.435-462, 2007.
- FORST, S.; CLARKE, D. J. Nematode-bacterium symbiosis. In: GAUGLER, R. (Ed.) **Entomopathogenic Nematology.** CABI, Wallingford, UK, p. 57-77, 2002.
- FOX, I.; RIVERA, G. A.; BAYONA, I. G. Toxicity of six insecticides to the cat flea. **Journal of Economic Entomology**, v. 61, n. 1, p. 869-870, 1968.
- GARCIA, J. J.; MICIELLI, M. V.; MARTI, G. A.; PELIZZA, S. A. **Uso de protozoários entomopatogênicos em programas de controle biológico nos países latino-americanos.** In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios.** São Paulo: Editora FAELQ, p. 203-214, 2008.
- GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic nematodes in biological control.** Boca Raton: CRC Press, 1990. 365 p.
- GAUGLER, R.; BROWN, I. M. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, v. 43, n. 5, p. 363-375, 1997.
- GIOMETTI, F. H. C.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; SCHMIT, F. S.; BATISTA FILHO, A.; DELL'ACQUA, R. Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 81-86, 2011.
- GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 260-268, 2007.
- GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitol Today**, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.
- GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B DE; AGUILERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; DOS SANTOS, Á. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30, n. 1/2, 2000.
- GUO, W.; YAN, X.; ZHAO, G.; HAN, R. Efficacy of entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in peanut fields. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n.3, p. 1112-7, 2013
- HALLIWELL, R. E. W. Flea bite dermatitis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, v. 1, p. 367-372, 1979.
- HARVEY, J. W.; FRENCH, T. W.; MEYER, D. J. Chronic iron deficiency anemia in dogs.

Journal-American Animal Hospital Association (USA), 1982.

HAZIR, S.; H. K. KAYA; P, STOCK; N. KESKIN. Entomopatogenic nematodes (Steiner nematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, v.27, p.181-202, 2003.

JONSSON, N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 193-198, 2007.

JUNIOR, E. M. **Controle Biológico de Insetos e Pragas.** In: **I Seminário Mosaico Ambiental: Olhares Sobre o Ambiente.** Anais [...] Campos dos Goytacazes, 2011.

KAYA H. K.; P. STOCK. **Techniques in insect nematology.** In: Lacey LA (ed). **Manual of techniques in insect pathology.** Academic, San Diego, CA, p. 281-324, 1997.

LABAUDE S; GRIFFIN C. T. Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. **Insects**, v. 9, n. 2, p. 72, 2018.

LAWRENCE, J. L.; HOY, C. W.; GREWAL, P. S. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. **Biological Control**, v. 37, n. 3, p. 247-255, 2006.

LEAL, L. C. D. S. R.; MONTEIRO, C. M. D. O.; MENDONÇA, A. É. D.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; BITTENCOURT, A. J. Potential of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* for the control of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 4, p. 451-456, 2017.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 785- 790, 2005.

LINARDI, P. M. Checklist of Siphonaptera (Insecta) from Mato Grosso State, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 107, 2017.

LINARDI, P. M. Checklist de Siphonaptera (Insecta) do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1a, p. 1-11, 2011.

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. C. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 345-354, 2012.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil.** São Paulo: Museu de Zoologia USP/FAPESP, p. 291, 2000.

LINARDI, P. M.; NAGEM, R. L. **Observações sobre o ciclo evolutivo de *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera, Pulicidae) e sua sobrevida fora do hospedeiro.** Bol. Museu de Historia Natural. UFMG Zool, v. 13, p. 1-22, 1972.

LINDEGREN, J.E.; VALERO, K.A.; MACKEY, B.E. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. **Journal of Nematology**, v. 5, p. 93- 197, 1993.

MACHADO, M. A.; CAMPOS, D. R.; LOPES, N. L.; BASTOS, I. P. B.; ALVES, M. S. R.; CORREIA, T. R.; SCOTT, F. B.; FERNANDES, J. I. Efficacy of afoxolaner in flea control in experimentally infested cats. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 760-763, 2019.

MAGALHÃES, V. S; CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MEDEIROS, D. M. V.; BATISTA, L. C.

S. O.; CORREIA, T. R.; ALBERTD, A. L. M; SCOTT, F. B. Evaluation of pharmacokinetics and efficacy of ivermectin following oral administration in dogs against experimental infection of *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 288, p. 167-171, 2016.

MASON, J.; MURPHY, M.; RICHDALE, N.; SMITH, M. Effects of oral exposure to trichloroethylene on female reproductive function. **Toxicology**, v. 32, p. 229-242, 1984.

SOBRINHO, A. D. C. M.; MENDES, C. D. O. F.; LEAL, L. C. D. S. R.; BITTENCOURT, A. J. Virulência de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 (Rhabditida: Heterorhabditidae) sobre larvas de *Stomoxyx calcitrans* (Diptera: Muscidae) em dieta de torta de filtro. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. Supl. 3, p. 9-13, 2016.

MONTEIRO, C. O.; COELHO, L.; DE PAULA, L. G. F.; FERNANDES, É. K. K.; DOLINSKI, C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DE AZEVEDO PRATA, M. C. Efficacy of entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulation against engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in semi-field conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, p. 101313, 2020.

MONTEIRO, C. O.; DA SILVA MATOS, R.; ARAÚJO, L. X., CAMPOS, R.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DOLINSKI, C.; DE AZEVEDO PRATA, M. C. Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 3-4, p. 310- 317, 2014.

MONTEIRO, C. M.; PRATA, M. C., FAZA, A.; BATISTA, E. S.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP88 for biological control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): the effect of different exposure times of engorged females to the nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 364-367, 2012.

MONTEIRO, C. O.; FURLONG, J.; DE AZEVEDO PRATA, M. C.; SOARES, A. E.; DE PAULA BATISTA, E. S.; DOLINSKI, C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 355-358, 2010.

NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; NAGATA, K.; YEH, J.Z. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Human and Experimental Toxicology**, v. 26, p. 361– 366, 2007.

NEGRISOLI JR, A. S.; BARBOSA, C. R.; MOINO JR, A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 111-116, 2008.

NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. Entomopathogenic nematodes; Systematics, Phylogeny and bacterial symbionts. **Nematology Monographs and Perspectives**, v. 5, 816p., 2007.

NGUYEN, K. B.; SMART, G. C. Identification of entomopathogenic nematodes in the steinernematidae and heterorhabditidae (nemata: rhabditida). **Journal of Nematology**, v. 28, n. 3, p. 286-300, 1996.

PARRA, J. R. P. et al. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 125-142, 2002. PARRA, J. R. P., Botelho, P. S. M., Corrêa-Ferreira, B. S., & Bento, J. M. S. (2002). Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. *Controle biológico no Brasil: parasitóides e*

predadores. São Paulo: Manole, 125-142.

POINAR JR, G. O.; GREWAL, P.S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 153-161, 2012.

POINAR, G. O. **Biology and taxonomy of Steinernematidae**. In: GAUGLER, R. R; KAYA, H. K (Eds) **Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press, Boca Raton, p. 23-58, 1990.

POINAR JR, G. O.; THOMAS, G. M. Laboratory infection of spiders and harvestmen (Arachnida: Araneae and Opiliones) with *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* nematodes (Rhabditoidea). **Journal of Arachnology**, p. 297-302, 1985.

ROHDE, C.; MOINO JR, A.; SILVA, M. A. T.; CARVALHO, F. D.; FERREIRA, C. S. Influence of Soil Temperature and Moisture on the Infectivity of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against Larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 608-611, 2010.

RUST, M. K. The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: a review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017.

RUST, M. K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 232-236, 2005

RUST, M. K. Influence of photoperiod on egg production of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) infesting cats. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 2, p. 242-245, 1992.

SA, L. A. N. de. **Protocolo de avaliação de risco de introdução de agentes de controle biológico: apresentação geral do protocolo**. In: DE NARDO; E.A.B.; CAPALBO, D.M.F.; OLIVEIRA, M.C.B.; MORAES, G.J. de., eds. **Analise de risco e avaliacao do impacto ambiental decorrente do uso de agentes de controle biológico**: memoria do workshop. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, p.79-80, 1995.

SANTORA, K. A. et al. Development of a mouse model to determine the systemic activity of potential flea-control compounds. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 3, p. 257-264, 2002.

SCHWINGHAMMER, K. A.; BALLARD, E. M.; KNAPP, F. W. Comparative toxicity of ten insecticides against the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 22, n. 5, p. 512-514, 1985.

SCOTT, F. B.; MARTINS, V.F.; SOUZA, C.P.; CORREIA, T. R. Aspectos gerais do controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 13-18, 2002.

SENG, C. M; SETHA, T.; CHANTA, N.; SOCHEAT, D.; GUILLET, P.; NATHAN, M. B. Inhibition of adult emergence of *Aedes aegypti* in simulated domestic water-storage containers by using a controlled-release formulation of pyriproxyfen. **Journal of the America the Mosquito Control Association**, v. 22, n. 1, p. 152- 154, 2006

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; PIGGOTT, S. J.; FIFE, J. P. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**, v. 38, p. 124-133, 2006.

SILVA, A. D.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M., RAGA, A.; SCHMIDT, F. S., Efeito de Nematoides Entomopatogênicos na Mortalidade da Mosca-do Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* e do Gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii*. **Nematologia Brasileira**, v. 34, n. 1, p.31-40, 2010.

SILVA, H. C. D.; VERONEZ, V. A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PRETTE, N., BORGES, F. D.

A.; MIYASAKA, D. D. S.; COSTA, A. J. D. Implantação de colônia de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e determinação do período de desenvolvimento dos estágios imaturos sob condições controladas. **Ambiência**, v.4, n.3, 2008.

SILVA, C. A. D. da. Microorganismos Entomopatogênicos Associados a Insetos e Ácaros do algodoeiro. (Embrapa-CNPA. Documentos, 77). **Campina Grande: Embrapa CNPA**, p. 45, 2000.

SILVERMAN, J.; RUST, M. K. Extended longevity of the pre-emerged adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) and factors stimulating emergence from the pupal cocoon. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 6, p. 763-768, 1985.

SILVERMAN, J. AND RUST, M.K. Influence of temperature and humidity on the survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 18, p. 78-83, 1981

SILVERMAN, J.; PLATZER, E. G.; RUST, M. K. Infection of cat flea, *Ctenocephalides felis* (Bouche) by *Neoaplectana carpocapsae* (Weiser). **Journal of Nematology**, v.14, p. 394-439, 1982.

TAYLOR, M.A. Recent developments in ectoparasites. **The Veterinary Journal**, v.161, n.3, p.253-268, 2001.

TAYLOR, D. B; SZALANSKI, A. L; ADAMS, B. J; PETERSON, R. D. Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). **Environmental Entomology**; v. 27, n. 6, p. 1514-1519, 1998.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.; JENNINGS, F. **Parasitologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 84-85, 1998.

VAN LENTEREN, J. C. **Measures of success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies**, In: WRATTEN, S.; GURR, G. (Eds.). Measures of success in biological control. **Dordrecht: Kluwer Academic**, p. 77-103, 2000

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v. 66, n. 1709, p. 302-303, 1927.

WU, H.; GONG, Q.; FAN, K.; SUN, R.; XU, Y.; ZHANG, K. Synergistic effect of entomopathogenic nematodes and thiamethoxam in controlling *Bradysia odoriphaga* Yang and Zhang (Diptera: Sciaridae). **Biological Control**, v. 111, p. 53-60, 2017.