

## *Lecanicillium lecanii* NO CONTROLE DE ESTÁGIOS IMATUROS DE *Stomoxys calcitrans*\*

Paula Sant'Anna Alves<sup>1</sup>, Ana Paula Rodrigues Moraes<sup>2</sup>, Cristiane Martins Cardoso de Salles<sup>3</sup>, Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt<sup>4</sup> e Avelino José Bittencourt<sup>5+</sup>

**ABSTRACT.** Alves P.S., Moraes A.P.R., Salles C.M.C., Bittencourt V.R.E.P. & Bittencourt A.J. [*Lecanicillium lecanii* for control of the immature stage of *Stomoxys calcitrans*]. *Lecanicillium lecanii* no controle de estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(Supl. 1):66-72, 2012. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: bittenc@ufrj.br

Different concentrations of the fungal isolate CG 420 of *Lecanicillium lecanii* were used on eggs, larvae and pupae of *S. calcitrans*. Macerate larvae and larval mucus exposed to the fungus and groups control were evaluated by high performance liquid chromatography. The fungus did not show pathogenic effect immediate, because there was no significant difference between the percentages of mortality of the treated and control groups. However, it was able to reduce the emergence of flies from larvae exposed to concentration  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup> (25.45% and 41.82%), differing significantly from the control groups in two repetitions. There were differences between the chromatographic profiles formed from exposed and unexposed larvae.

**KEY WORDS.** *Lecanicillium lecanii*, *Stomoxys calcitrans*, Microbial Control, Entomopathogenic Fungi.

**RESUMO.** Diferentes concentrações do isolado CG 420 de *Verticillium lecanii* foram utilizadas em ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans*. Macerado e muco de larvas expostas ao fungo e as do grupo controle foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência. O fungo não mostrou efeito patogênico imediato, pois não houve diferença significativa entre os percentuais de mortalidade dos tratados e grupos controle. No entanto, o fungo foi capaz de reduzir a emergência de moscas proveniente de larvas expostas a uma concentração de  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup> (25,45% e 41,82%), diferindo signi-

ficativamente dos grupos controle nas duas repetições. Houve diferenças entre os perfis cromatográficos, formados a partir de larvas de expostas e não expostas.

**PALAVRAS-CHAVE.** *Lecanicillium lecanii*, *Stomoxys calcitrans*, controle biológico, fungo entomopatogênico.

### INTRODUÇÃO

O parasitismo realizado pela mosca dos estábulos *Stomoxys calcitrans* ocasiona perdas anuais de 398,9 milhões de dólares nos Estados Unidos (Drummond 1987) e mais de 100 milhões de dóla-

\*Recebido em 9 de novembro de 2012.

Aceito para publicação em 26 de dezembro de 2012.

<sup>1</sup>Médica-veterinária, MSc, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: ps.a@bol.com.br - bolsista CAPES.

<sup>2</sup>Médica-veterinária, DSc, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, DPA, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: aprm\_moraes@yahoo.com.br - bolsista CAPES.

<sup>3</sup>Bióloga, DSc, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: salles.cristiane@gmail.com

<sup>4</sup>Médica-veterinária, PhD, Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

<sup>5</sup>Médico-veterinário, PhD, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

+Autor para correspondência. E-mail: bittenc@ufrj.br

res ao ano no Brasil (Grisi et al. 2002). Estas perdas estão relacionadas ao hábito alimentar hematófago e a irritação dos animais que ocasionam redução na bovinocultura leiteira e decréscimo na conversão alimentar do gado de corte (Wieman et al. 1992). Turell & Knudson (1987) confirmaram experimentalmente que as moscas dos estábulos podem transmitir mecanicamente *Bacillus anthracis* durante repasto sanguíneo e Castro et al. (2008) obtiveram *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Providencia* sp., *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. de moscas dos estábulos capturadas em propriedades rurais.

A redução do uso de inseticidas químicos traz consequências benéficas para a qualidade dos produtos animais e vegetais, com impacto direto sobre a vida e a saúde de produtores rurais e consumidores. A busca por alimentos orgânicos e o interesse por métodos alternativos de controle estão relacionados à maior valorização destes produtos no mercado (Alves 1998, Hogsette 1999).

Fundamentada em análises moleculares, a espécie *Verticillium lecanii* foi agrupada no gênero *Lecanicillium*, sendo classificada atualmente como *Lecanicillium lecanii* (Faria & Wraight 2007). A espécie é considerada patógeno de insetos e usada como biopesticida comercial. Devido a tolerância de *S. calcitrans* aos diferentes inseticidas químicos (Cilek et al. 1994), é necessário buscar alternativas de controle, entretanto poucos estudos são descritos com o uso de fungos entomopatogênicos.

Vários estudos têm investigado os mecanismos pelos quais insetos superam o parasitismo por fungos entomopatogênicos (Alves 1998). De acordo com Lecuona et al. (2005), dependendo dos componentes existentes na cutícula dos insetos, podem apresentar efeitos nutricionais ou inibitórios sobre a germinação dos conídios. Boulanger et al. (2002) identificaram um peptídeo com propriedades antimicrobianas em intestino de moscas *S. calcitrans*. Em outro estudo, Candido-Silva et al. (2007) verificaram o gene BhSGAMP-1 exclusivamente nas glândulas salivares da larva *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae), responsável pela codificação de um peptídeo antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os autores sugerem que os peptídeos na superfície da cutícula criam uma zona que inibe o crescimento de microrganismos patogênicos, mantendo a larva protegida até a pupação.

Este estudo teve como objetivo verificar o efeito

causado pelo isolado CG 420 de *L. lecanii* sobre ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans*, através de ensaios de exposição fúngica e avaliou-se o perfil cromatográfico do muco e macerado das larvas em cromatografia líquida de alta eficiência.

## MATERIAL E MÉTODOS

A colônia de *S. calcitrans* foi mantida adaptando-se a metodologia descrita por Christmans (1970) e Moraes et al. (2008). A dieta de criação foi composta por uma mistura da poupa de cana-de-açúcar (66g), farelo de trigo (25g), bicarbonato de sódio (1g), carne moída bovina (8g) e água destilada estéril (127ml). As moscas foram capturadas e identificadas de acordo com Furman e Cats (1982). Os adultos foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com sangue bovino citratado (0.38%), enquanto os estágios imaturos foram mantidos em dieta de criação autoclavada ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e 70-80% de umidade relativa - UR), segundo Moraes (2007).

O isolado CG 420 de *L. lecanii* foi utilizado nos testes de exposição de ovos, larvas e pupas de *S. calcitrans* com 24 horas, 10 e 14 dias de desenvolvimento, respectivamente. O fungo foi semeado em Agar batata dextrose - BDA (39g/L) acrescido de extrato de levedura - EL (1%). As placas de Petri foram incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $\geq 80\%$  e 15 dias em ausência de luz. Os conídios foram removidos da placa de Petri com auxílio de lâmina de bisturi e adicionados em solução aquosa (10 mL de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 a 0.01%) (Luz et al. 1998). A suspensão conidial foi homogeneizada (2 min.) e quantificada em Câmara de Neubauer (Alves 1998) nas concentrações  $2 \times 10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  con.mL<sup>-1</sup> (Watson et al. 1995, Senna-Nunes et al. 2002). Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  na concentração  $2 \times 10^7$  con.mL<sup>-1</sup> foi inoculada em meio de cultura composto por BDA (39g/L), EL (1%) e cloranfenicol (500 mg/L) para avaliação da viabilidade conidial (Alves 1998).

Quatro grupos compostos por 55 ovos foram imersos (2 min.) em 0,5 mL de cada suspensão fúngica. Em seguida, todo conteúdo foi transferido para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo papel filtro embebido com 2.5 ml da suspensão e 3 g da dieta de criação descrita acima (Moraes et al. 2008). As placas de Petri foram fechadas com Parafilm® e furadas com agulha hipodérmica (13mm x 0,45mm) para a entrada de ar. As larvas foram contadas 5 dias após ensaio. Mesmo procedimento foi realizado para grupos compostos por 55 larvas.

As pupas e adultos formados foram contados após 10 e 15 dias, respectivamente. Similar procedimento foi realizado com grupos formados por 50 pupas, exceto o uso de dieta de criação. O total de moscas emergidas foi contado 10 dias após realização do experimento (Moraes et al. 2008). Grupos controle foram expostos ao diluente nas mesmas condições dos ensaios com o isolado fúngico. Os experimentos foram repetidos duas vezes em dias diferentes para confiabilidade dos resultados. Foi utilizada a Fórmula de Abbott (1925) para correção da mortalidade dos grupos tratados (Alves 1998). Os dados foram analisados pelo Teste de Qui-quadrado ( $p \leq 0.05$ ) (Sampaio 2002).

Ovos, larvas e pupas mortos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 2 min., lavados (2X) em água destilada estéril por 1 min. (Senna-Nunes et al. 2002) e incubados em câmara úmida para permitir o desenvolvimento fúngico. Os fungos foram semeados em placas de Petri contendo meio composto por BDA (39g/L), EL (1%) e cloranfenicol (500 mg/L) e entre lâminas para observação das características macro e microscópicas do isolado CG 420 de *L. lecanii* (Alves 1998).

Para avaliação do perfil cromatográfico do macerado e muco das larvas expostas ao isolado CG 420 de *L. lecanii* e as do grupo controle em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram utilizadas nove larvas com nove dias de desenvolvimento. As larvas foram expostas ao fungo, como metodologia descrita acima. Após três dias de incubação, as larvas foram removidas das placas, lavadas em água destilada estéril e permaneceram em tubos criogênicos estéreis (1,2 mL) por uma hora. Após a produção de muco, as larvas foram retiradas e se adicionou 900  $\mu$ L de tampão fosfato salino - PBS (0.1 M, 1.5 M NaCl, pH 7.4) resfriado (4°C). As larvas foram depositadas em tubos de microcentrífuga acrescidos com 900  $\mu$ L da solução tampão resfriada (4°C) e maceradas (1,5 mL) com bastão cônico. Em seguida, os macerados foram depositados em tubos criogênicos estéreis. As amostras de muco e macerado foram mantidas um ultrafreezer (-80°C). Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar e com as amostras resfriadas em gelo. A suspensão fúngica, diluente e solução tampão (PBS) foram mantidas nas mesmas condições.

A CLAE foi realizada no Laboratório de Micotoxinas da UFRRJ. As amostras de muco e macerado foram centrifugadas (10 min, 10.000 rpm) para uso

do sobrenadante. Foram aplicados 10  $\mu$ L de cada amostra em coluna de fase-reversa - C18 (250 x 4,6 mm). Foi utilizado um sistema isocrático (ácido trifluoroacético 0,1% em água destilada) com fluxo de 0,6 ml/min por um período máximo de 30 minutos para cada amostra. Os picos cromatográficos foram detectados a 220 nm. O diluente, a solução tampão e a solução fúngica também foram avaliados.

## RESULTADOS

Bom crescimento fúngico foi observado nas placas dos ovos expostos as diferentes concentrações ( $2 \times 10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  con.mL<sup>-1</sup>) (Figura 1A). Entretanto, não houve diferença significativa com os percentuais de mortalidade obtidos nas placas do grupo controle (Figura 1B) (Tabela 1). Neste ensaio, não foi possível verificar a emergência de adultos a partir da exposição dos ovos às diferentes concentrações de *L. lecanii*.

Embora as larvas tenham permanecido por até quinze dias em contato com o fungo nas placas de

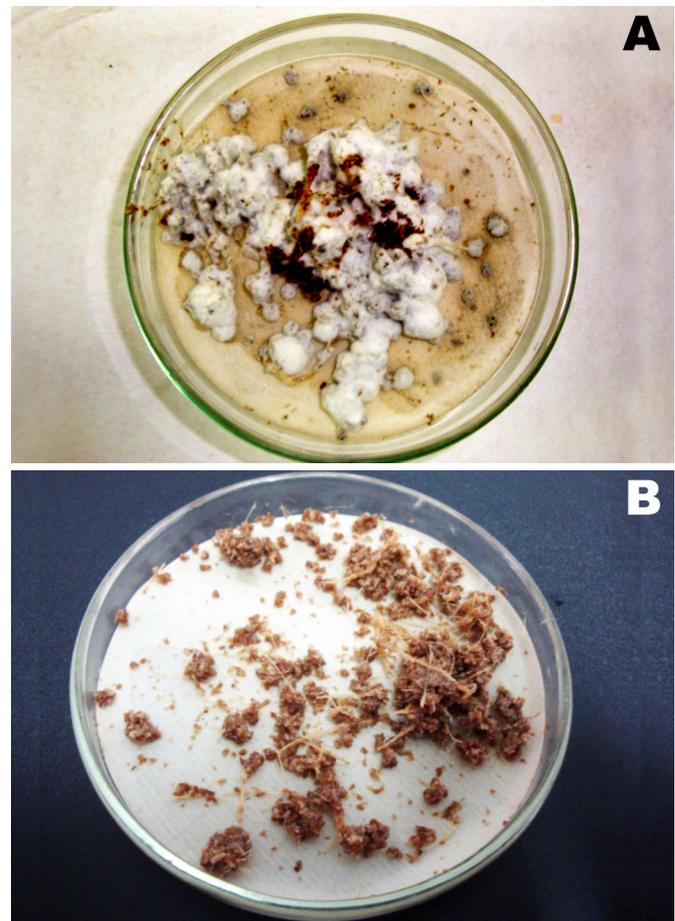


Figura 1. (A) Placa de Petri mostrando desenvolvimento do isolado CG 420 of *Lecanicillium lecanii* sobre dieta de criação de *Stomoxys calcitrans*; (B) Placa de Petri do grupo controle.

Tabela 1. Percentual de mortalidade de ovos, larvas e pupas de *Stomoxys calcitrans* expostas a suspensões aquosas do isolado CG 420 de *Lecanicillium lecanii* em condições laboratoriais.

Tratamentos (conídios/mL)	Primeiro Tratamento		Segundo Tratamento			
	N	Mortalidade (%)	Abbott (%)	N	Mortalidade (%)	Abbott (%)
Ovos - Larvas						
Controle	55	29,09 <sup>a</sup>	0	55	30,91 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>5</sup>	55	29,09 <sup>a</sup>	0	55	32,73 <sup>a</sup>	2,63
2 x 10 <sup>6</sup>	55	34,55 <sup>a</sup>	7,69	55	30,91 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>7</sup>	55	41,82 <sup>a</sup>	17,95	55	41,82 <sup>a</sup>	15,79
2 x 10 <sup>8</sup>	55	45,45 <sup>a</sup>	23,07	55	50,91 <sup>a</sup>	28,95
Larvas - Pupas						
Controle	55	23,64 <sup>a</sup>	0	55	5,45 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>5</sup>	55	25,45 <sup>a</sup>	2,37	55	16,36 <sup>a</sup>	11,53
2 x 10 <sup>6</sup>	55	25,45 <sup>a</sup>	2,37	55	5,45 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>7</sup>	55	14,55 <sup>a</sup>	-11,90	55	16,36 <sup>a</sup>	-11,53
2 x 10 <sup>8</sup>	55	27,27 <sup>a</sup>	4,75	55	18,18 <sup>a</sup>	13,46
Larvas - Adultos						
Controle	55	36,36 <sup>a</sup>	0	55	9,09 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>5</sup>	55	38,18 <sup>a</sup>	2,85	55	16,36 <sup>a</sup>	7,99
2 x 10 <sup>6</sup>	55	43,64 <sup>a</sup>	11,43	55	09,09 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>7</sup>	55	25,45 <sup>a</sup>	-17,14	55	27,27 <sup>b</sup>	19,99
2 x 10 <sup>8</sup>	55	74,55 <sup>b</sup>	60,00	55	56,36 <sup>b</sup>	51,99
Pupas (recuperadas) - Adultos						
Controle	42	16,67 <sup>a</sup>	0	52	3,85 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>5</sup>	41	17,07 <sup>a</sup>	0,48	46	0 <sup>a</sup>	-4,00
2 x 10 <sup>6</sup>	41	24,39 <sup>a</sup>	9,26	52	3,85 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>7</sup>	47	12,77 <sup>a</sup>	-4,68	46	13,04 <sup>a</sup>	9,55
2 x 10 <sup>8</sup>	40	65,00 <sup>b</sup>	57,99	45	46,67 <sup>b</sup>	44,53
Pupas - Adultos						
Controle	50	20,00 <sup>a</sup>	0	50	10,00 <sup>a</sup>	0
2 x 10 <sup>5</sup>	50	16,00 <sup>a</sup>	-5,00	50	12,00 <sup>a</sup>	2,22
2 x 10 <sup>6</sup>	50	22,00 <sup>a</sup>	2,50	50	18,00 <sup>a</sup>	8,88
2 x 10 <sup>7</sup>	50	14,00 <sup>a</sup>	-7,50	50	6,00 <sup>a</sup>	-4,44
2 x 10 <sup>8</sup>	50	36,00 <sup>a</sup>	20,00	50	22,00 <sup>a</sup>	13,33

Valores que possuem a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Qui-quadrado ( $p \leq 0.05$ ), n = número de amostras; Abbott = Correção da mortalidade pela Fórmula de Abbott.

Petri, onde foi observada a ingestão de seus conídios, não houve diferença significativa quando avaliada as pupas formadas (Tabela 1). Por outro lado, quando verificada a emergência dos adultos a partir das larvas expostas ao fungo, a mortalidade foi significativa com a utilização da suspensão na concentração de  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>, pois foram obtidos 74,55% e 58,18% comparados com 36,36% e 9,09% dos grupos controle.

O isolado CG 420 de *L. lecanii* não afetou o desenvolvimento de *S. calcitrans* no interior do pupário, pois os percentuais de emergência de todos os grupos tratados não diferiram dos grupos controle.

Avaliando-se a capacidade de germinação dos conídios, foram verificados 100% de viabilidade nas placas utilizadas para semeadura das suspensões fúngicas. Também foram confirmadas as características macro e microscópicas do isolado CG 420 a partir dos ovos, larvas e pupas inviáveis.

Na CLAE foi constatada que a exposição das lar-

vas ao fungo ocasionou uma diferenciação nos perfis cromatográficos, quando comparados aos perfis cromatográficos de muco e macerado das larvas do grupo controle (Figuras 2A, 2B, 2C, 2C). Os picos observados no perfil cromatográfico da suspensão fúngica (Figura 3A), diluente (Figura 3B) e solução tampão (Figura 3), não afetaram a interpretação dos perfis de muco e macerado.

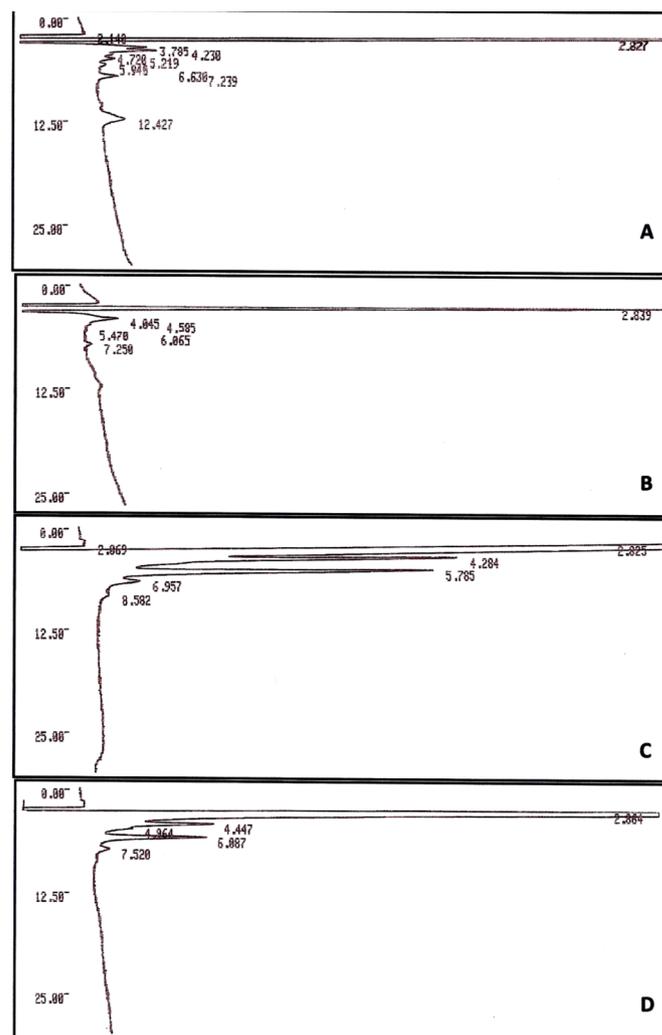


Figura 2. Perfil cromatográfico através de cromatografia líquida de alta eficiência de (A) Muco de larvas expostas ao diluente, (B) Muco de larvas expostas ao isolado CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, (C) Macerado de larvas expostas ao diluente, (D) Macerado de larvas expostas ao isolado CG 420 de *Lecanicillium lecanii*.

## DISCUSSÃO

O método de exposição de ovos foi adaptado de metodologia utilizada por Moraes et al. (2008), que concluiu que o método de imersão de ovos na suspensão fúngica e transferência para tubos contendo meio de desenvolvimento larval foi mais efetivo.

No entanto, neste experimento tubos foram substituídos por placas de Petri, papel de filtro, dieta (3

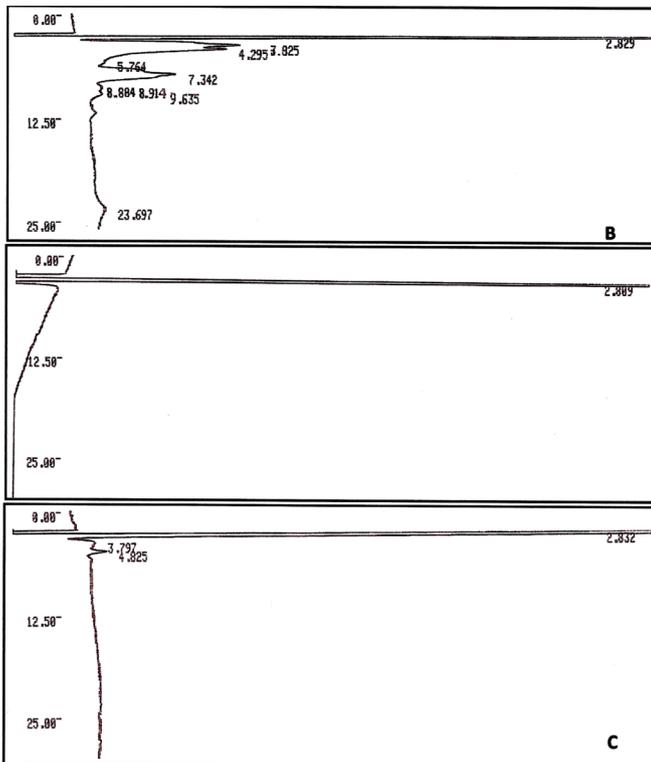


Figura 3. Perfil cromatográfico através de cromatografia líquida de alta eficiência de (A) suspensão aquosa do isolado CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, (B) diluente (água destilada estéril Tween 80 a 0.01%) e (C) solução fosfato salino (PBS).

g) e 3 mL de cada diluição para que os ovos permanecessem em contato com o fungo durante todo o período de avaliação (Figura 1A). Os resultados com ovos e suspensão na concentração  $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup> (tabela 1), diferiram de Moraes et al. (2008), onde 100% dos ovos de *S. calcitrans* tornaram-se inviáveis após exposição ao fungo *Metarhizium anisopliae* ( $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>).

Angel-Sahagúm et al. (2005) relataram que os ovos de *Haematobia irritans* foram susceptíveis aos fungos *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*, pois todos afetaram a emergência de adultos. No presente estudo, não foi possível avaliar a emergência dos adultos a partir da exposição de ovos às diferentes concentrações de *L. lecanii*, pois o método produziu elevada mortalidade das larvas eclodidas, quando mantidas por um período maior que cinco dias em placas de Petri. Em contrapartida, Mochi et al. (2009) avaliaram a eficiência de fungos entomopatogênicos no controle de *H. irritans* e verificaram que isolados de *M. anisopliae* não afetaram ovos e pupas, mas foram capazes de causar mortalidade significativa nas larvas eclodidas. Em teste com *B. bassiana*, os autores não verificaram efeito patogênico sobre ovos de

moscas dos chifres. Entretanto, isolados de *Isaria fumosorosea* ocasionaram inviabilidade de ovos e pupas. Após tratamento dos ovos com *Isaria farinosa* houve uma redução significativa na emergência de adultos em todas as concentrações fúngicas testadas.

As diferenças entre os resultados deste estudo e estudos anteriores estaria relacionado ao isolado fúngico utilizado, como levantado por Angel-Sahagúm et al. (2005) e Mochi et al. (2009). A ineficácia do isolado CG 420 de *L. lecanii* para o controle de ovos pode estar associado ao curto período de eclosão das larvas de *S. calcitrans*, que ocorre principalmente nas primeiras 24 horas (Guimarães 1983). Este período pode não ser suficiente para que o fungo complete os estágios de penetração e colonização dos ovos. Entretanto, se o isolado apresentasse alta atividade entomopatogênica, ele causaria mortalidade significativa em larvas recém-eclodidas durante o período em que estas permaneceram em contato com o fungo, como verificado por Moraes et al. (2008) com *M. anisopliae*.

Os resultados deste estudo mostraram que o isolado CG 420 de *L. lecanii* foi parcialmente efetivo no controle de estágios imaturos de *S. calcitrans*, devido ao efeito inibitório sobre a emergência de adultos (Tabela 1). O fungo não controlou o desenvolvimento das pupas, somente afetou a emergência de moscas quando utilizada a maior concentração fúngica ( $2 \times 10^8$  con.mL<sup>-1</sup>) sobre as larvas. Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes et al. (2008), onde a maioria das larvas expostas as diferentes concentrações de *M. anisopliae* tornaram-se pupas. Lecuona et al. (2005) verificaram que a concentração  $10^8$  con.mL<sup>-1</sup> de *B. bassiana* não afetou as larvas de *Musca domestica* quando comparado ao grupo controle, o que é consistente com os resultados deste estudo. Watson et al. (1995) observaram que larvas de segundo instar de moscas doméstica expostas a *B. bassiana* ( $10^8$  con.mL<sup>-1</sup>) atingiram a idade adulta com mortalidade mínima (16% para cepa L90 e 20% para P89). No entanto, com  $10^{10}$  con.mL<sup>-1</sup> os isolados foram mais eficazes, em 56% e 48%, respectivamente. Estes autores verificaram que moscas dos estábulos adultas, expostas a  $10^8$  conidial/cm<sup>2</sup> de *B. bassiana* apresentaram menores percentuais de mortalidade (70% e 84% com isolados P89 e L90), quando comparadas com a mosca doméstica ( $\geq 90$  com isolados P89 e L90), sugerindo que a *S. calcitrans* é menos suscetível à ação fúngica. A tolerância parcial de larvas de *S. calci-*

*trans* ao isolado CG 420 de *L. lecanii*, pode estar relacionado aos mecanismos de defesa adaptativos desenvolvidos durante sua evolução (Watson et al. 1995).

Com relação à ingestão de conídios, Moraes et al. (2008) verificaram que as larvas de terceiro estágio ingeriram conídios de *M. anisopliae*, e mesmo assim, os percentuais de mortalidade não foram satisfatórios. Esta procura por alimento foi observada apenas nas placas onde as larvas foram expostas ao isolado CG420 de *L. lecanii*, enquanto que as larvas expostas ao diluente se movimentaram por toda placa e rapidamente penetraram na dieta.

Os resultados obtidos com as pupas e *L. lecanii* foram semelhantes aos obtidos por Moraes et al. (2008), pois o fungo *M. anisopliae* também foi incapaz de inviabilizar pupas de *S. calcitrans*. Lecuona et al. (2005) também verificaram que após expor as pupas a concentração de  $10^8$  con.mL<sup>-1</sup> de *B. bassiana*, não obtiveram aumento da mortalidade em relação ao controle. Entretanto, os resultados deste estudo diferiram dos reportados por Angel-Sahagún et al. (2005), que relataram que as pupas de *H. irritans* expostas aos isolados Ma2 e Ma25 de *M. anisopliae* e isolado Pfr10 de *P. fumosorosea* na concentração de  $10^8$  con.mL<sup>-1</sup> apresentaram percentuais de mortalidade de 50% a 71.3%, enquanto o presente estudo observou percentuais de 16% a 36% no primeiro ensaio e 12% a 22% no segundo (Tabela 1). Esta diferença estaria associada à mosca utilizada, pois o uso de uma suspensão com a concentração duas vezes maior ocasionou menor percentual de mortalidade.

Mochi et al. (2010) verificaram mortalidade pupal de 31,6% e 23,3% quando as pupas foram expostas aos isolados IBCB425 e E9 de *M. anisopliae* ( $10^7$  con.mL<sup>-1</sup>) e 30% e 23,3% quando foram expostas aos isolados na concentração de  $10^8$  con.mL<sup>-1</sup>, enquanto o controle mostrou mortalidade de 10%. Com o fungo *B. bassiana*, os autores verificaram que as pupas foram significativamente afetadas, pois houve 36,6% (isolado 09) e 25,0% (isolado JAB07) de mortalidade na concentração de  $10^8$  con.mL<sup>-1</sup>. No entanto, os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* não mostraram efeito em adultos a partir das pupas tratadas. Os isolados de *I. farinosa* foram mais eficazes, pois o isolado CG195 inviabilizou 56,6% na concentração de  $10^8$  con.mL<sup>-1</sup>, ao contrário dos resultados observados neste estudo. A baixa mortalidade das pupas pode estar relacionada à proteção exercida pelo pupário, que dificultaria a colonização fúngica. Alves (1998) mencionou

que em geral os fungos levam de três a cinco dias para penetrar na cutícula dos insetos, embora o autor não especifique o estágio de vida. No entanto, este período pode não ser o suficiente para que o fungo penetre no pupário e afete a mosca em seu interior. Estes resultados não estão relacionados à inviabilidade fúngica, pois a germinação dos conídios provenientes das suspensões foi de 100%, após 24 horas de incubação.

A avaliação inicial dos perfis cromatográficos confirmou que as larvas de *S. calcitrans* reagem ao parasitismo de *L. lecanii* ocasionando uma modificação dos perfis cromatográficos após exposição fúngica (Figura 2B e 2D), que seriam indicativos de produção ou degradação de moléculas relacionadas à defesa (Epanand & Vogel 1999). Boulanger et al. (2002) observaram que os peptídeos antimicrobianos, envolvidos nos mecanismos de imunidade epiteliais no intestino de adultos de *S. calcitrans* são produzidos após estímulo bacteriano. A CLAE mostrou que o peptídeo identificado como estomoxina apresenta um amplo espectro de atividades que afetam o crescimento de microorganismos.

Os resultados deste estudo mostraram que o isolado CG 420 de *L. lecanii* foi capaz de controlar a emergência de moscas de *S. calcitrans*, quando utilizada elevada concentração fúngica sobre as larvas e foi constatado que uma resposta é ativada frente ao parasitismo fúngico. Portanto, os mecanismos desenvolvidos por *S. calcitrans* devem ser investigados com mais detalhes, pois existem poucos estudos nessa área, principalmente os relacionados aos estágios imaturos. O isolamento e a identificação destas moléculas no futuro podem contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos com potencial de antimicrobiano, assim como selecionar microorganismos mais eficazes em seu controle biológico.

**Agradecimentos.** À Dr. Gloria Maria Direito pelo uso do equipamento para realização da Cromatografia líquida de alta eficiência pertencente ao Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Microbiologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18:265-267, 1925.  
Alves, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*, 2ª ed. FEALQ, São Paulo, 1998. 1163 p.  
Angel-Sahagún C.A., Lezama-Gutiérrez R., Molina-Ochoa

- J., Galindo-Velasco E., López-Edwards M., Rebolledo-Domínguez O., Cruz-Varquez C., Reyes-Velázquez W.P., Skoda S.R. & Foster J.E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans* to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). *J. Insect Sc.*, 5:50, 2005.
- Barson G., Renn N. & Bywater A.F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of House Fly (*Musca domestica*, L.) a pest of intensive animal units. *J. Invertebr. Pathol.*, 64:107-113, 1994.
- Boulanger N., Munks R.J.L., Hamilton J.V., Vovelle F., Brun R., Lehane M.J. & Bulet P. Epithelial Innate Immunity - A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J. Biol. Chem.*, 277:49921-49926, 2002.
- Candido-Silva J.A., Zanarotti G.M., Gallina A.P. & Almeida J.C. Developmental Regulation of BhSGAMP-1, a Gene Encoding an Antimicrobial Peptide in the Salivary Glands of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). *Genes*, 45:630-638, 2007.
- Castro B.G., Souza M.M. & Bittencourt A.J. Microbiota bacteriana em segmentos de mosca do estábulo *Stomoxys calcitrans* no Brasil: primeiro relato de espécies. *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60:1029-1031, 2008.
- Christmas P.E. Laboratory rearing of the biting fly *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), 446-449, 1970. Disponível em: <[http://www.ento.org.nz/nzentomologist/free\\_issues/volume%204-4-45-49.pdf](http://www.ento.org.nz/nzentomologist/free_issues/volume%204-4-45-49.pdf)>. Acesso em: 20 mai 2012.
- Cilek J.E. & Greene G.L. Stable fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. *J. Econ. Entomol.*, 87:275-279, 1994.
- Drummond R.O., Bram R.A. & Konnerup N. Animal Pests And World Food Production, p.9-24. In: Leaning H.D & Guerrero J. (Ed.), *The economic impact of parasitism in cattle. Proc. MSD AGVET*, 1987.
- Epanand R.M. & Vogel H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1462:11-28, 1999.
- Faria M.R. & Wraight S.T. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control.*, 43:237-256, 2007.
- Furman D.P. & Catts E.P. *Manual of Medical Entomology*, 4<sup>th</sup> ed. University Press, Cambridge, 1982. 207p.
- Grisi L., Massard C.L., Moya Borja G.E. & Pereira J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.*, 21:8-10, 2002.
- Guimarães J.H. Moscas- Biologia, ecologia e controle. *Agroquímica Ciba-Geigy*, 21:20-26, 1983.
- Hogsette J.A. Management of ectoparasites with biological control organisms. *Int. J. Parasitol.*, 29:147-151, 1999.
- Lecuona R.E., Turica M., Tarocco F. & Crespo D.C. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. *J. Med. Entomol.*, 42:332-336, 2005.
- Luz C., Tigano M.S., Silva I.G., Cordeiro C.M.T. & Aljanabi S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93:839-846, 1998.
- Mochi D.A., Monteiro A.C. & Machado A.C.R. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Vet. Parasitol.*, 167:62-66, 2009.
- Mochi D.A., Monteiro A.C., Machado A.C.R. & Yoshida L. Entomopathogenic fungal activity against pupae and adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Vet. Parasitol.*, 168:105-110, 2010.
- Moraes A.P.R. *Stomoxys calcitrans: estabelecimento de colônia e efeito de Metarhizium anisopliae sobre seus estágios imaturos*. Dissertação. (Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007. 52p. (Disponível em: <[http://bdtd.ufrj.br/tde\\_arquivos/3/TDE-2007-12-03T090639Z-210/Publico/2007-Ana%20Paula%20Rodrigues%20Moraes.pdf](http://bdtd.ufrj.br/tde_arquivos/3/TDE-2007-12-03T090639Z-210/Publico/2007-Ana%20Paula%20Rodrigues%20Moraes.pdf)>).
- Moraes A.P.R., Angelo I.C.A., Fernandes E.K.K., Bittencourt V.R.E.P. & Bittencourt A.J. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to Eggs and Immature Stages of *Stomoxys calcitrans*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1149:384-387, 2008.
- Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*, 2<sup>a</sup> ed. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Senna-Nunes M.S., Costa G.L., Bittencourt V.R.E. & Souza E.J. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophyllum* em larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitol. Latinoam.*, 57:134-140, 2002.
- Turell M.J. & Knudson G.B. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infect. Immun.*, 55:1859-61, 1987.
- Watson D.W., Geden C.J., Long S.J. & Rutz D.A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biol. Control.*, 5:405-411, 1995.
- Wieman G.A., Campbell J.B., Deshazer J.A. & Berry I.L. Effects of Stable flies (Diptera: Muscidae) and heat stress on weight gain and feed efficiency of feeder cattle. *J. Econ. Entomol.*, 85:1835-1842, 1992.