

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

TESE

Suscetibilidade *in vitro* de pupas e adultos de pulgas *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1935) por nematoides entomopatogênicos das espécies *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) (Poinar, 1975) e *Heterorhabditis indica* (LPP30) (Poinar, Karunakar, David, 1992)

ANA CAROLINE FERREIRA DE SOUZA

2024



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

Susceptibilidade *in vitro* de pupas e adultos de pulgas *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1935) por nematoides entomopatogênicos das espécies *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) (Poinar, 1975) e *Heterorhabditis indica* (LPP30) (Poinar, Karunakar, David, 1992)

ANA CAROLINE FERREIRA DE SOUZA

Sob a Orientação da Professora
Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli

e Coorientação da Professora
Thaís Ribeiro Correia Azevedo

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências no Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2024

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

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

S719s Souza, Ana Caroline Ferreira de, 19\12\1982-
Suscetibilidade in vitro de pupas e adultos de
pulgas Ctenocephalides felis felis (Bouche, 1935) por
nematoídeos entomopatogênicos das espécies
Heterorhabditis bacteriophora (HP88) (Poinar, 1975) e
Heterorhabditis indica (LPP30) (Poinar, Karunakar,
David, 1992) / Ana Caroline Ferreira de Souza. -
Botucatu, 2024.
48 f.: il.

Orientadora: Melissa Carvalho Machado do Couto
Chambarelli.
Coorientadora: Thais Ribeiro Correia.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS, 2024.

1. Ctenocephalides felis felis. 2. Controle
biológico. 3. Nematoídeos entomopatogênicos. 4.
Controle biológico de pulgas. I. Carvalho Machado do
Couto Chambarelli, Melissa, 08\09\1979-, orient. II.
Ribeiro Correia, Thais, 28\05\1978-, coorient. III.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS.
IV. Título.



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



ATA N° 6506 / 2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.071422/2024-78

Seropédica-RJ, 19 de Dezembro de 2024.

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

ANA CAROLINE FERREIRA DE SOUZA

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

TESE APROVADA EM 18/12/2024

(Assinado digitalmente em 22/12/2024 19:37)
MELISSA CARVALHO MACHADO DO COUTO
CHAMBARELLI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###218#0

(Assinado digitalmente em 19/12/2024 17:25)
RAQUEL DE OLIVEIRA SIMOES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###925#4

(Assinado digitalmente em 22/05/2025 19:55)
NICOLE BRAND EDERLI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.467-##

(Assinado digitalmente em 30/12/2024 14:36)
AMÉRICO DE CASTRO MONTEIRO
SOBRINHO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.757-##

(Assinado digitalmente em 24/12/2024 08:46)
ISABELLA VILHENA FREIRE MARTINS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.547-##

À Deus, aos meus queridos pais, aos meus irmãos e sobrinha, aos meus amigos, ao meu namorado e a todos os animais de estimação que já passaram pela minha vida e me ajudaram a não desistir nos momentos mais difíceis.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli, pelos ensinamentos e conselhos, minha profunda gratidão pela orientação competente e paciência que foram fundamentais ao longo de toda essa jornada, me incentivando a crescer não só como pesquisadora, mas também como pessoa. Agradeço pela confiança no meu trabalho e por ter me guiado com firmeza e sensibilidade até a conclusão desta tese.

A minha mãe Benedita Ferreira de Souza e ao meu pai Carlos Marcílio Fontes Bales-treiro pelo amor, carinho, paciência e seus ensinamentos e que me moldaram na pessoa que sou.

Aos meus cães Amarela, Pretinho, Pitico, Pictuxa e aos meus gatos, Canjica, Gatinha, Mia, Chiquitosa e principalmente “Minhojo” e Tinazinha que estiveram comigo desde a graduação e partiram no ano da defesa, sem eles essa etapa jamais teria sido concluída.

Ao meu namorado Renato Gonçalves Rangel, 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 e Américo de Castro Monteiro Sobrinho, companheiros de trabalho e irmãos na amizade, que fizeram com que esse trabalho fosse mais leve.

A minha co-orientadora Prof. Dra. Thaís Ribeiro Correia Azevedo, por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Avelino José Bittencourt e Prof. Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pelos ensinamentos e ajuda na realização dos experimentos ao ceder o espaço para que pudéssemos realizar os ensaios biológicos.

Ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes, pelo meu desenvolvimento como profissional.

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 Balestreiro, 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-no no 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 desse mesmo ano foi aprovada na seleção de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Iniciou o Mestrado em março de 2018 sendo concluído em março de 2020 sob orientação da Professora Dra. Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli e co-orientação da Professora Dra. Thaís Ribeiro Correia Azevedo. Ingressou no Doutorado do PPGCV em 2020 dando continuidade as pesquisas iniciadas durante o Mestrado, ainda sob orientação e co-orientação das mesmas docentes do Programa de Pós-Graduação.

RESUMO

DE SOUZA, Ana Caroline Ferreira. **Susceptibilidade *in vitro* de pupas e adultos de pulgas *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1935) por nematoides entomopatogênicos das espécies *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) (Poinar, 1975) e *Heterorhabditis indica* (LPP30) (Poinar, Karunaka, David, 1992).** 2024. 48p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024

Diversas pesquisas demonstraram que nematoides entomopatogênicos (NEPs) são capazes de infectar e matar invertebrados de importância médica-veterinária como moscas, pulgas, carapatos e moluscos, tornando-se uma importante alternativa no controle desses animais, podendo ser utilizados isoladamente ou associados a produtos químicos, em espécies alvos que possuem pelo menos uma fase de desenvolvimento no solo. O presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a capacidade dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabditis indica* (LPP30) de penetrar, infectar e matar pupas e adultos de *Ctenocephalides felis felis*. O estudo foi dividido em quatro etapas na qual, a primeira e segunda tiveram como objetivo avaliar a susceptibilidade de pupas nuas e pupas com casulo pupal, respectivamente, de *C. felis felis* pelos NEPs em 600 µL de suspensão contendo 120 JIs/pupa. Os bioensaios foram realizados em dez placas de Petri de 6 cm de diâmetro contendo 11 pupas cada, foram utilizados como grupo controle cinco placas de Petri contendo 11 pupas por placa, na qual foi adicionado 600 µL de água destilada. Os biensaíos com pupas nuas e casulos pupal foram avaliados quanto a repetibilidade seguindo as mesmas características. A terceira e quarta etapa do estudo tiveram como objetivo avaliar a susceptibilidade de pulgas adultas de *C. felis felis* por *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30) utilizando 120 JIs/adulto. Os resultados demonstraram que as pupas nuas apresentaram 100% de susceptibilidade à infecção por *H. Bacteriophora* e 98,18% para *H. indica*, já as pupas com casulo pupal apresentaram valores de 55,44% e 64,99% para *H. bacteriophora* e *H. indica* respectivamente. Com relação aos adultos de *C. felis felis*, a susceptibilidade à infecção por *H. bacteriophora* (HP88) foi de 70,66% para machos e 72% para fêmeas, enquanto *H. indica* (LPP30) obteve 72% e 68% para machos e fêmeas respectivamente. Os dados obtidos sugerem a possibilidade do uso dos NEPs no controle dessas fases biológicas do inseto. Tais resultados são importantes, pois, juntamente com estudos anteriores demonstram que os NEPs das espécies *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30) podem ser uma ferramenta promissora no controle biológico de *C. felis*.

Palavras-chave: pulga-do-gato, nematoides entomopatogênicos, controle biológico.

ABSTRACT

DE SOUZA, Ana Caroline Ferreira. *In vitro susceptibility of pupae and adults of fleas *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1935) to entomopathogenic nematodes of the species *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) (Poinar, 1975) and *Heterorhabditis indica* (LPP30) (Poinar, Karunakar, David, 1992)*. 2024. 48p. Thesis (Doctorare in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024

Several studies have demonstrated that entomopathogenic nematodes (EPNs) are capable of infecting and killing invertebrates of medical and veterinary importance, such as flies, fleas, ticks, and mollusks, making them an important alternative for controlling these organisms. They can be used alone or in combination with chemical products, particularly against target species that have at least one developmental stage in the soil. The present study aimed to evaluate, *in vitro*, the ability of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) and *Heterorhabditis indica* (LPP30) to penetrate, infect, and kill pupae and adults of *Ctenocephalides felis felis*. The study was divided into four stages. The first and second stages aimed to evaluate the susceptibility of naked pupae and pupae within the pupal cocoon, respectively, of *C. felis felis* to the EPNs in 600 µL of suspension containing 120 infective juveniles (IJs) per pupa. Bioassays were conducted using ten 6 cm Petri dishes containing 11 pupae each. Five additional Petri dishes containing 11 pupae each were used as a control group, where 600 µL of distilled water was added. The bioassays for naked pupae and cocooned pupae were assessed for repeatability using the same characteristics. The third and fourth stages of the study aimed to evaluate the susceptibility of adult fleas of *C. felis felis* to *H. bacteriophora* (HP88) and *H. indica* (LPP30), using 120 IJs per adult. The results showed that naked pupae exhibited 100% susceptibility to infection by *H. bacteriophora* and 98.18% to *H. indica*, while pupae with a pupal cocoon showed susceptibility rates of 55.44% and 64.99% for *H. bacteriophora* and *H. indica*, respectively. Regarding *C. felis felis* adults, susceptibility to infection by *H. bacteriophora* (HP88) was 70.66% for males and 72% for females, while *H. indica* (LPP30) resulted in 72% and 68% for males and females, respectively. The data obtained suggest the potential use of EPNs in controlling these biological stages of the insect. These results are significant, as, together with previous studies, they demonstrate that EPNs of the species *H. bacteriophora* (HP88) and *H. indica* (LPP30) may be a promising tool in the biological control of *C. felis*.

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ciclo Biológico de <i>Ctenocephalides felis felis</i> contendo o tempo de desenvolvimento e fatores que podem influenciar na mudança de estágio.	5
Tabela 2. Valores médios da suscetibilidade de pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) e adultos emergidos.	18
Tabela 3. Valores médios da suscetibilidade de pupas com pupário de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) e adultos emergidos.	19
Tabela 4 - Valores médios da suscetibilidade de pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30) e adultos emergidos.....	19
Tabela 5. Valores médios da suscetibilidade de pupas com pupário de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30) e adultos emergidos.	21
Tabela 6. Valores médios da suscetibilidade adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) e adultos emergidos.	21
Tabela 7. Valores médios da suscetibilidade de adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em função da presença de nematoides <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30) e adultos emergidos.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cabeça de fêmea de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Ctenídeo pronotal (seta azul) e ctenídeo genal (seta preta). (Fonte: Arquivo pessoal).....	2
Figura 2. Adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . A - Fêmea. B - Macho.....	3
Figura 3. Ciclo de vida das pulgas demonstrando os quatro estágios (ovo, larva, pupa e adultos)	3
Figura 4. Estágios imaturos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . A - Larva. B - Estádio L3 ou pré-pupa . C - Pupa sem casulo pupal. D - Pupas com casulo pupal (aderência de sujidades).	4
Figura 5. Ciclo biológico dos nematoides entomopatogênicos dos gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	8
Figura 6. Porção anterior de JIs com dente dorsal proeminente.....	9
Figura 7. Produção <i>in vivo</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> (A) e <i>Galleria mellonella</i> (B) infectadas com <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30) em placa de petri contendo papel filtro e suspensão aquosa contendo os juvenis infectantes. C - Armadilha de White (1927) contendo juvenis infectantes.....	11
Figura 8. A - Lâmina de microscopia contendo 12 aliquotas de 10 µL contendo juvenis infectantes. B - Juvenis infectantes observados em microscópia óptica de campo claro (10x) para quantificação.....	14
Figura 9. Dissecção de pupa nua de <i>Ctenocephalides felis felis</i> demostrando a presença de juvenis (seta azul) e adultos (seta preta) de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) em seu interior (Fonte: Arquivo Pessoal).....	15
Figura 10. Distribuição dos grupos utilizados no estudo com adultos. CF - Grupo controle fêmea. CM - Grupo controle macho. E1F a E3F -Grupo tratado fêmea e E1M a E3M - Grupo tratado Macho.....	15
Figura 11. Dissecção de pupa nua de <i>Ctenocephalides felis felis</i> demostrando a presença de juvenis (seta azul) e adultos (seta preta) de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) em seu interior.....	16
Figura 12. Dissecção de pupa com pupário de <i>Ctenocephalides felis felis</i> com juvenis (seta azul) e adultos (seta preta) de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> emergindo de seu interior.....	17
Figura 13. Dissecção de pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> com juvenis (seta azul) e adultos (seta) de <i>Heterorhabditis indica</i> emergindo de seu interior.....	18
Figura 14. Dissecção de pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> com juvenis (seta azul) e adultos (seta) de <i>Heterorhabditis indica</i> emergindo de seu interior.....	19

Figura 15. Dissecção de pupa com pupário de *Ctenocephalides felis felis* com juvenis (Seta laranja) e adultos (seta preta) de *Heterorhabdites indica* emergindo de seu interior.....20

Figura 16. Dissecção de adultos de *Ctenocephalides felis felis* com adultos de *Heterorhabdites bacteriophora* emergindo de seu interior.....21

Figura 17. Dissecção de adultos de *Ctenocephalides felis felis* com juvenis. Seta indicando adultos de *Heterorhabdites indica* emergindo de seu interior.....22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Interação Homem x Animais Domésticos	2
2.2 <i>Ctenocephalides felis felis</i>	2
2.3 Ciclo Biológico da pulga-do-gato	3
2.4 Patógenos e Endossimbiontes Encontrados em <i>Ctenocephalides felis felis</i>.	5
2.5 Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i>: Importância Econômica e Desafios de Controle....	6
2.6 Nematoides Entomopatogênicos (NEPs): Aspectos Relacionados à Biologia e Ecologia.....	7
2.7 Fatores que Interferem na Atividade dos Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) e sua Produção	10
2.8 O Controle Biológico Utilizando Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) e Sua Utilização em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Local e Período de Realização dos Experimentos	13
3.2 Obtenção das Pupas e Adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	13
3.3 Obtenção e Preparação dos Nematoides Entomopatogênicos (NEPs).....	13
3.4 Metodologia	14
3.4.1 Pupas	14
3.4.2 Adultos	15
3.5 Análise Estatística	16
4 RESULTADOS.....	17
4.1 Ensaios Biológicos Utilizando Juvenis Infectantes de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88)	17
4.1.1 Avaliação da suscetibilidade e presença de nematoides infectantes <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88) em pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>.....	17
4.1.2 Avaliação da infecção de pupas com pupário de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88).....	18
4.1.3 Avaliação da infecção de pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30).	19
4.1.4 Avaliação da infecção de pupas com pupario de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30).	20
5. DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	26
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

As pulgas são insetos hematófagos pertencentes à ordem Siphonaptera. Podem parasitar diversas espécies de mamíferos e aves, inclusive o homem.

São conhecidas várias espécies, dentre os quais, destaca-se a subespécie *Ctenocephalides felis felis*, sendo considerada um ectoparasito de importância veterinária devido à sua característica cosmopolita. Este inseto é desprovido de asas e adaptado ao salto, sendo capaz de infestar locais distantes de onde seus hospedeiros dormem.

Seu ciclo de vida possui quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. O acasalamento ocorre no próprio hospedeiro, onde seus ovos são depositados e caem no ambiente, permanecendo por meses, dependendo das condições de temperatura e umidade.

Grandes infestações podem provocar anemia em animais jovens, além de irritações, prurido e dermatites, como a dermatite alérgica em animais mais sensíveis. Também atuam como vetores de diversos patógenos, alguns com potencial zoonótico.

É comum ocorrer infestações, pois apenas cinco por cento das pulgas adultas encontram-se no animal, sendo a maioria encontrada no ambiente onde o animal vive, dificultando assim medidas de controle eficazes, já que seus ovos e larvas podem ficar protegidos em tapetes, carpetes, fendas e materiais em decomposição que servem de alimento para as larvas.

Como prevenção, o controle mecânico pode ser utilizado, nesse método os insetos são retirados manualmente através de catação e banhos no hospedeiro, além de aspirações e limpezas do ambiente. Em locais com grandes infestações se faz necessário a utilização de produtos químicos.

A utilização do controle químico de forma inadequada propiciou o aparecimento de populações resistentes de pulgas em alguns locais do mundo. Além da redução da efetividade de alguns destes compostos, essas substâncias podem provocar intoxicações em animais e seres humanos, além de se dispersar pelo ambiente, contaminando solos e rios.

Com base nesse contexto é preciso buscar medidas de controle alternativas e mais seguras para animais, meio ambiente e seres humanos, como a utilização do controle biológico de pragas, sendo os nematoídeos entomopatogênicos (NEPs) organismos em potencial.

Os NEPs, são helmintos capazes de penetrar nos insetos, liberando de seu trato digestivo bactérias simbiontes que causam septicemia e morte do hospedeiro. São naturalmente encontrados no solo e utilizados há bastante tempo no controle biológico de artrópodes considerados pragas agrícolas. Atualmente diversas pesquisas envolvendo o uso de NEPs demonstraram sua efetividade em penetrar, infectar e matar invertebrados de importância veterinária como carrapatos, moscas, mosquitos e moluscos, sendo os gêneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) os mais utilizados.

Estudos sobre a utilização dos NEPs e seu controle sobre pulgas ainda são escassos, pesquisas recentes realizados por Souza et al., 2024 demonstraram sua eficácia sobre formas imaturas desse ectoparasito. Dessa forma faz-se necessário a realização de mais estudos a respeito desse tema, utilizando o maior número de espécies/linhagens disponíveis, visando determinar quais são os NEPs mais eficazes para cada fase do ciclo evolutivo de *C. felis felis*. Além disso, é preciso avaliar ainda as diversas espécies de NEPs com relação ao ambiente a serem inseridos a fim de não provocar danos a ecologia de nematoídeos entomopatogênicos nativos e outros insetos existentes na região.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a suscetibilidade *in vitro* de pupas e adultos de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) por nematoídeos entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae), espécies *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e *Heterorhabditis indica* (LPP30).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interação Homem x Animais Domésticos

Vestígios achados em sítios arqueológicos apontam que desde a Pré-História havia uma interação entre homens e animais (Berzinz, 2000). Esse relacionamento se alterou significativamente durante o século XX, apontando mudanças no papel do animal na sociedade atual (Faraco, 2004), onde o isolamento social e a solidão aproximaram o homem dos animais domésticos, que passaram a atuar como companheiros e trazem benefícios à saúde humana, como maior socialização e diminuição da ansiedade, (Medeiros; Carvalho, 2014).

No último levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), as populações de cães e gatos correspondiam a 54 e 24 milhões de animais, respectivamente. De acordo com o Instituto Pet Brasil (IPB), em 2021 a população de animais de estimação chegou a 58,1 milhões de cães e 27,1 milhões gatos.

Apesar dessa relação trazer benefícios psicológicos e relativos ao bem-estar, essa maior proximidade entre homens e animais aumenta o risco de transmissão de patógenos (Giumelli; Santos, 2016).

2.2 *Ctenocephalides felis felis*

As pulgas pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Insecta e Ordem Siphonaptera (Fortes, 2004). São artrópodes, ápteros, de coloração acastanhada, possuem o corpo achatado lateralmente e o gênero *Ctenocephalides* possui o corpo revestidos por cerdas, chamados de ctenídeos, que ajudam na fixação e locomoção no hospedeiro, (Linardi, 2011; Linardi, 2017). Em *C. felis* há a presença de um ctenídeo genal composto por cerdas longas e finas, com primeiro par de cerdas apresentando o mesmo comprimento do segundo, o que a diferencia de *C. canis* (Fortes, 1997).

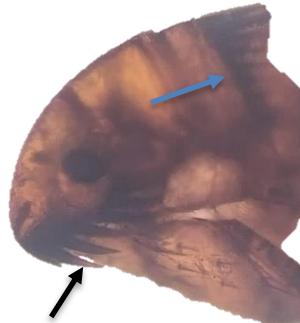


Figura 1. Cabeça de fêmea de *Ctenocephalides felis felis*. Ctenídeo pronotal (seta azul) e ctenídeo genal (seta preta). (Fonte: Arquivo pessoal).

Possuem dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores, com a parte posterior arredondada (Figura 2A) e os machos apresentam aparelho copulador nos seguimentos finais com extremidade posterior voltada para cima (Figura 2B) (Linardi, 2011).



Figura 2. Adultos de *Ctenocephalides felis felis*. **A** - Fêmea. **B** - Macho. (Fonte: Arquivo pessoal).

Ctenocephalides felis felis é considerada a pulga de maior importância no mundo quando se fala em infestação de cães e gatos, possuindo ampla distribuição geográfica, é capaz de gerar grandes infestações, além de possuir uma variedade de hospedeiros, também atua como vetor de patógenos causadores de doenças em humanos e animais (Linardi; Santos, 2012).

2.3 Ciclo Biológico da pulga-do-gato

Seu ciclo biológico é constituído de quatro estágios: ovo, larva (L_1 , L_2 e L_3), pupa e adultos (Figura 3). O tempo para seu desenvolvimento completo é de aproximadamente 30 dias (Linardi; Nagem, 1972; Dryden, 1993), podendo se estender até 140 dias (Dryden; Rust, 1994) (Tabela 1), de acordo com as condições ambientais de umidade, temperatura e alimento disponível para as larvas (Linardi; Nagem, 1972; Silverman; Rust, 1985).

Machos e fêmeas realizam repasto sanguíneo, que dura aproximadamente 15 minutos, durante o repasto as fêmeas continuam se alimentando mesmo estando repletas, pois, o sangue digerido é eliminado através do ânus e utilizado como alimento pelas larvas (Dryden, 1993; Linardi, 2011). O adulto inicia o repasto sanguíneo, e aproximadamente 24-36 horas após se alimentarem ocorre o acasalamento e início da ovipostura (Linardi; Guimarães, 2000).

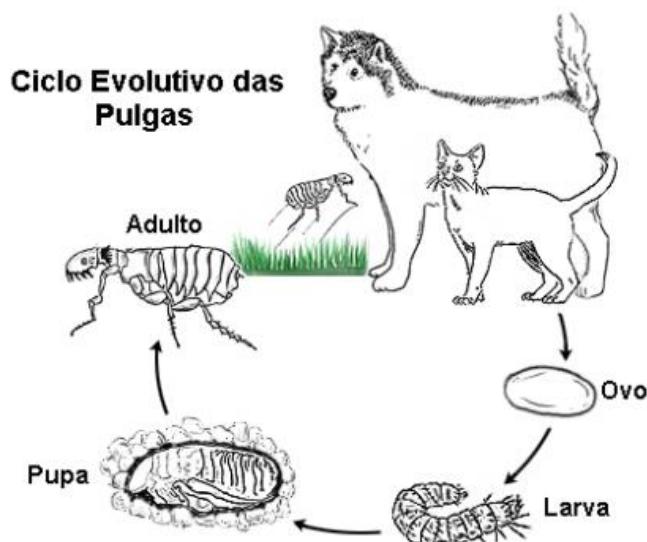


Figura 3. Ciclo de vida das pulgas demonstrando os quatro estágios (ovo, larva, pupa e adultos) (Fonte: Moura, 2008).

Os ovos de *C. felis* são perolados, ovalados e com extremidades arredondadas, a eclosão ocorre dentro de um a seis dias e estes são depositados entre os pelos dos hospedeiros e caem no ambiente, acumulando-se principalmente onde os animais dormem ou frequentam (Rust, 1992; Dryden; Rust, 1994).

Após a eclosão inicia-se o estágio larval, estágio de desenvolvimento não parasitário e que se encontra no ambiente, onde as larvas se alimentam de sangue seco, fezes de pulgas adultas e matéria em decomposição, e caso não encontrem alimento podem realizar canibalismo (Dryden, 1993; Dryden; Rust, 1994).

As larvas são esbranquiçadas (Figura 4A) (Linardi; Guimarães, 2000), procuram ambientes protegidos, são sensíveis a radiação solar, dessecção e altas temperaturas (Rust; Dryden, 1997; Linardi, 2024), necessitam de umidade relativa acima de 50% e do solo entre 1% a 20% (Sousa, 1997). Assim se orientam para locais úmidos, e quando se encontram em ambientes arenosos, penetram no solo para se proteger da luz (Linardi, 2024).

A fase de larva passa por três instares larvares (L1, L2 e L3), onde a larva de terceiro estádio (L3) deixa de se alimentar e esvazia o trato gastrointestinal (Silverman; Rust, 1985; Dryden; Rust, 1994; Rust; Dryden, 1997), dobra-se sobre si e adquire formato de U, unindo a partecefálica com a parte anal (Figura 4B) (Linardi, 2024). Nessa fase ocorre a produção de um fio tênue que dará origem ao casulo pupal (Silverman; Rust, 1985; Dryden; Rust, 1994).

O casulo pupal é viscoso e feito de seda (Figura 4C), e tem como função facilitar a aderência de partículas do ambiente para proteger as larvas (Figura 4D) até o desenvolvimento completo em formas adultas. Podem sobreviver por longos períodos no ambiente se não houver estímulos para emergência do adulto (Silverman; Rust, 1985; Dryden; Rust, 1994).

O estágio de pupa é o mais resistente à dessecção, e as fêmeas possuem o ciclo mais rápido quando comparada aos machos (Linardi; Nagem, 1972).



Figura 4. Estágios imaturos de *Ctenocephalides felis felis*. **A** - Larva. **B** - Estágio L3 ou pré-pupa . **C** - Pupa nua. **D** - Pupas com casulo pupal (aderência de sujidades). (Fonte: Arquivo pessoal).

Os adultos emergem quando estimulados por pressão mecânica (Silverman; Rust, 1985; Linardi, 2024) e também pelo aumento da temperatura (Silverman; Rust, 1985). Os adultos possuem fototropismo positivo e geotropismo negativo, sendo atraídos ao hospedeiro por vibrações, correntes de ar, níveis de CO₂, odores, dentre outros (Dryden; Rust 1994; Linardi, 2024).

Tabela 1. Ciclo Biológico de *Ctenocephalides felis felis* contendo o tempo de desenvolvimento e fatores que podem influenciar na mudança de estágio.

Estágio	Tempo	Fatores que influenciam
Ovo	1-6 dias	-Temperatura,-Umidade Relativa -Umidade Relativa-Luz
Larva	8-34dias	-Temperatura -Matéria orgânica -Alimento
Pré-pupa	1-2	-Proteção do casulo -Vibrações -Pressão mecânica -Temperatura -Presença de hospedeiro
Pupa	6-7 dias chegando a 140 dias	-CO2 -Umidade Relativa -Odores - Umidade alta acelera o desenvolvimento.

Tabela Adaptada de Dryden; Rust (1994)

No Brasil, *C. felis felis* é a pulga mais comum e foi encontrada em: Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco (incluindo o território de Fernando de Noronha), Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Roraima, Santa Catarina e São Paulo (Linardi; Santos, 2012).

2.4 Patógenos e Endossimbiontes Encontrados em *Ctenocephalides felis felis*.

Há diferentes tipos de endossimbiontes ou patógenos associados a *C. felis*, estas pulgas atuam como hospedeiros intermediários ou vetores biológicos de bactérias, protozoários e helmintos (Linardi; Guimarães, 2000).

Ctenocephalides felis atua como hospedeiro intermediário de um cestóide encontrado no intestino delgado dos cães e gatos e que pode afetar humanos, o *Dipylidium caninum* (Rust, 2017; Gutema et al., 2020). A dipilidose é mais prevalente em crianças, que podem acabar ingerindo as pulgas ao beijar, lamber e dormir com os animais de estimação (Ramos et al., 2020).

Coutinho e Linardi (2007) através de técnicas de biologia molecular reconheceram DNA de *Leishmania* em *C. felis* de cães naturalmente infectados em Belo Horizonte (MG), sugerindo que a pulga seja uma possível transmissora mecânica da leishmaniose visceral canina.

Esta espécie de pulga também é o principal vetor da bactéria *Bartonella henselae*, responsável pela doença conhecida como arranhadura do gato (Jacomo et al., 2002), uma zoonose que pode causar o surgimento de pápulas no local da ferida, seguida de linfadenopatia (Florin, 2008).

Ctenocephalides felis é o principal vetor e reservatório da bactéria *Rickettsia felis*, sendo responsável pela febre tifo, uma zoonose emergente em várias partes do mundo (Brown; Macaluso, 2016). No Brasil, os primeiros casos de infecção por *R. felis* em humanos foram descritos por Raoult et al. (2001).

Com relação a doenças em animais domésticos, as pulgas da espécie *C. felis* são os principais vetores da bactéria *Mycoplasma haemofelis*, uma rickettsia que pode causar anemia infeciosa em gatos, também conhecida como micoplasmose felina (Souza et al., 2002).

Foram detectados RNA do vírus da leucemia felina (FeLV) em pulgas e fezes de *C. felis* e os resultados, *in vitro*, demonstraram que essas pulgas são potenciais vetores para o RNA do vírus FeLV, podendo as mesmas desempenhar um papel importante na transmissão do vírus (Vobis et al., 2003).

Um recente estudo realizado por Coelho et al. (2023) relataram pela primeira vez, através de detecção molecular, a presença de *Anaplasma platys* em pulgas da espécie *C. felis*, sendo esta uma possível transmissora de anaplasmosse canina.

Além dos patógenos já mencionados, diversos outros endossimbiontes já foram descritos por pesquisadores em *C. felis*: *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum* (Jellison, 1959); *Hymenolepis* (Rodentolepis) e *Hymenolepis diminuta* (Salem et al., 1980); *Rickettsia burnetii*, *Spirochaeta ctenocephali*, *Nosema ctenocephali*, *Crithidia* sp., *Leptomonas ctenocephalis* (Wenyon, 19926; Jenkins, 1964; Strand, 1977); *Bartonella henselae*, *Hemoplasma* sp. (Shaw et al., 2004); *Nolleria pulicis* (Bears et al., 1990b); *Trypanossoma lewisi* (Molyneux, 1969) (De Avelar, 2006).

2.5 Controle de *Ctenocephalides felis felis*: Importância Econômica e Desafios de Controle

É comum ocorrer infestações por ectoparasitas, especialmente pulgas, tendo eliminação trabalhosa, o que pode levar tempo e gerar gasto financeiro (Blagburn; Dryden, 2009), representando um desafio em medicina veterinária (Rust; Dryden, 1997), pois animais silvestres podem servir como reservatórios para infestações (Rust, 2017).

A maior parte do ciclo biológico da pulga ocorre no ambiente (Linardi; Guimarães, 2000) e para que o controle seja efetivo, muitas vezes é necessário combinar estratégias de combate através do manejo ambiental associado ao controle químico e tratamento dos animais (Dryden; Rust, 1994; Blagburn; Dryden, 2009).

Existem diversas formas de controle desses insetos que podem ser utilizadas, dentre elas o controle mecânico e o controle químico, sendo o segundo mais utilizado, tendo como foco a interferência no ciclo biológico do parasito (Rust, 2005). O controle mecânico é a forma mais simples de controlar esse ectoparasito e consiste na catação manual das pulgas dos animais, limpeza frequente de ambientes através da aspiração e lavagem das roupas e camas dos animais, dessa forma, há uma interrupção do ciclo, o que ajuda a reduzir a presença de ovos e larvas no local em que os animais frequentam (Rust; Dryden, 1997; Linardi, Guimarães, 2000; Rust, 2017).

No controle químico são utilizados diferentes grupos de substâncias, dentre as quais podemos citar os organofosforados, os carbamatos, as formamidinas, os piretroides, os fenilpirazoles, as lactonas macrocíclicas, os reguladores de crescimento (RCIs) e as isoxazolininas (Scott et al., 2002; Rust, 2005; Blagburn; Dryden, 2009; Magalhães et al., 2016).

Alguns estudos relataram a resistência de *C. felis* a alguns compostos, o que tem gerado grande preocupação (Rust, 2017), isso se deve principalmente ao uso incorreto dos compostos químicos, que vem contribuindo para a necessidade de buscar novas estratégias de controle desses insetos (Rust, 2005; Rust, 2017). Nos últimos anos vêm se buscando alternativas mais ecológicas visando interromper o ciclo de vida desse ectoparasito (Rust, 1997; Rust, 2020).

Melo et al. (2007), utilizaram fungos entomopatogênicos em ovos e adultos de *C. felis*, observando que tanto ovos como adultos foram sensíveis a infecção por *Metrahizium anisopliae*.

e *Beauveria bassiana*, possuindo grande potencial como agentes de controle biológico de pulgas.

No que diz respeito a utilização de óleos essenciais, esses apresentaram resultados promissores no controle de *C. felis*. Batista et al. (2016) verificaram a eficácia de óleos essenciais e extratos de *Schinus molle* L. produzidos com frutas e folhas, contra *C. felis*, obtendo resultados positivos no controle dos adultos, porém, tendo baixa eficácia contra ovos.

Freitas et al. (2021), avaliaram a eficácia e o efeito residual dos óleos essenciais de *Illicium verum* (anis-estrelado) e *Pelargonium graveolens* (gerânio rosa) em *C. felis felis*, onde o óleo essencial de *L. verum* apresentou atividade inseticida por aproximadamente 18 dias e esta atividade se manteve acima de 70% durante nove dias, enquanto o óleo essencial de *P. graveolens* apresentou atividade inseticida de 13 dias, conseguindo mantê-la em torno de 41,2% por dois dias.

Assunção et al. (2024) avaliaram a eficácia de *Piper aduncum* L., uma planta medicinal brasileira, no controle de *C. felis*, demonstrando que este óleo essencial apresenta alta eficácia contra o parasita, obtendo 100% de mortalidade de ovos e 100% de mortalidade para pulgas adultas.

Ainda no que se refere ao estudo envolvendo óleos essenciais, Lima et al. (2024) avaliaram a ação inseticida e repelente de *Copaifera reticulata*, *Citrus paradisi*, *Lavanda hybrida* e *Salvia sclarea* em estágios imaturos e adultos de *C. felis*, observando como resultado que tanto o óleo essencial de *L. hybrida*, quanto o de *S. sclarea* apresentaram ação inseticida e repelente contra todos os estágios de *C. felis*, enquanto o óleo essencial de *C. paradisi* não apresentou atividade inseticida ou repelente. O óleo essencial de *C. reticulata* foi o que apresentou melhores resultados contra pupas e adultos de pulgas, e o óleo essencial de *S. sclarea* apresentou o melhor efeito repelente.

Outra forma de controle muito utilizada é o controle biológico, que consiste no controle do número de plantas e animais por inimigos naturais do meio ambiente, mantendo um equilíbrio entre os seres vivos, podendo ser realizado por vírus, bactérias, fungos, nematoides, protozoários, insetos, dentre outros (Parra et al., 2002).

Atualmente, espécies de nematoides entomopatogênicos (NEPs) se mostraram promissores no controle biológico de diversas espécies de artrópodes e são utilizados em diversas partes do mundo no o controle de pragas presentes no solo e em ambientes infestados (Grewal et al., 2001).

2.6 Nematoides Entomopatogênicos (NEPs): Aspectos Relacionados à Biologia e Ecologia

No filo nematoda estão incluídas espécies capazes de provocar doenças em artrópodes, conhecidas como nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Almenara et al., 2012).

Os NEPs pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), nas quais estão inseridas as famílias Steinernematidae (Chitwood; chitwood, 1937) com os gêneros *Steinernema* (Travassos, 1927) e *Neosteirnenema* (Nguyen; Smart, 1992) e a família Heterorhabditidae (Poinar, 1976) que possui até o momento apenas o gênero *Heterorhabditis* (Dowds; Peters, 2002).

Pesquisas referentes ao uso de controle biológico de artrópodes terrestres vêm se concentrando nos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Adams; Nguyen, 2002; Nguyen; Hunt, 2007) que são cosmopolitas e podem ser encontrados no mundo todo (Lawrence et al., 2006). Tais pesquisas vêm crescendo consideravelmente nos últimos anos, e isso se reflete diretamente no número de espécies válidas descritas até o momento. Na década atual, o número de descrições de espécies dentro do gênero *Steinernema* chegou a 100 e o gênero *Heterorhabditis* passou a ter 18 espécies válidas (San-blas et al., 2019; Bhat et al., 2020; Machado et al., 2021). Apesar dos avanços, o gênero *Neosteirnenema* possui apenas uma única espécie descrita até hoje, *Neosteirnenema longicurvicauda* (Nguyen; Smart, 1996; Bhat et al.,

2020).

Os nematoides entomopatogênicos possuem grande potencial dentro do controle biológico de insetos pragas, principalmente no controle daquelas que possuem pelo menos um estágio de desenvolvimento no solo, possuem boa capacidade de locomoção em busca de hospedeiros, podem ser reproduzidos facilmente em laboratório, são resistentes a inseticidas e podem infectar uma variedade de hospedeiros não causando danos a vertebrados e plantas (Dolinski; Moino-Jr, 2006).

Os NEPs dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* possuem em seu trato gastrointestinal bactérias simbióticas dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente (Burnell; Stock, 2000; Almenara, 2012). Após a penetração dos NEPs nos insetos alvos, essas bactérias são liberadas em seu interior provocando septicemia e morte do hospedeiro (Grewal et al., 2001; Forst; Clarke, 2002; Hazir et al., 2003). Essas bactérias possuem a capacidade de produzir substâncias que impedem o desenvolvimento de outros micro-organismos (Ferraz, 1998).

Em relação a busca pelo hospedeiro, os NEPs podem ser divididos em três categorias: cruzador ou *cruiser*, no qual o nematodo se movimenta no solo em busca do hospedeiro; emboscador ou *ambusher*, onde o nematodo espera pelo hospedeiro e quando este se aproxima realiza um movimento de nictação, no qual apoia-se na cauda e salta em direção ao hospedeiro (Lewis et al., 1995; Dolinski; Moino-Jr, 2006), algumas espécies apresentam os dois comportamentos (*cruiser* e *ambusher*) como é o caso de *Steinernema feltiae* (Dolinsl; Moino-Jr, 2006).

O ciclo biológico dos NEPs (Figura 5) possui três estágios de desenvolvimento: ovo, juvenil (J1, J2, J3 e J4) e adultos que podem ser machos, fêmeas ou hermafroditas dependendo do gênero (Forst; Clarke, 2002).

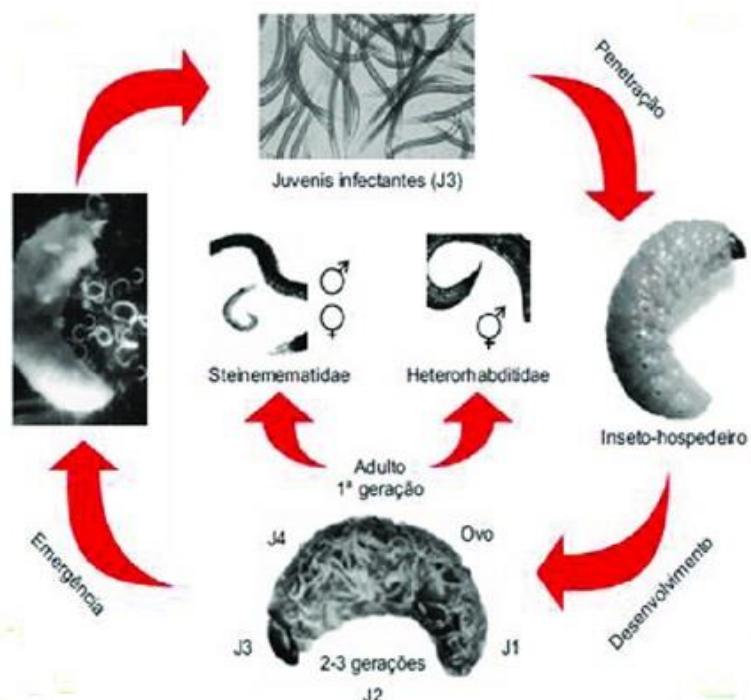


Figura 5. Ciclo biológico dos nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Fonte: Dolinski; Moino-Jr, 2006).

O ciclo de vida dos gêneros *Steinermerma* e *Heterorhabditis* possui o juvenil de terceiro estádio (J3), conhecido como juvenis infectantes (JIs), que são de vida livre e não se alimentam (Gaugler, 1981). Os JIs do gênero *Steinermerma* penetram nos hospedeiros através das aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) (Dolinski; Moino-Jr, 2006), já os JIs de *Heterorhabditis* (Figura 6A), além de penetrarem pelas aberturas naturais, possuem uma estrutura diferenciada em sua porção anterior denominada dente quitinoso (Figura 6B), que ajuda a penetrar também através do tegumento do artrópode alvo (Forst; Clarke, 2002). Ao penetrarem no hospedeiro liberam em sua hemocele as bactérias simbiontes presentes em seu trato gastrointestinal, que se multiplicam causando septicemia e morte do invertebrado (Burman, 1982). No interior do inseto, os juvenis conhecidos como J3 se desenvolvem em J4 e dão origem aos adultos de primeira geração, machos e fêmeas (*Steinermermatidae*) ou hermafroditas (*Heterorhabditidae*), posteriormente, os adultos copulam e dão origem a ovos fertilizados (Adams; Nguyen, 2002; Almenara, 2012).

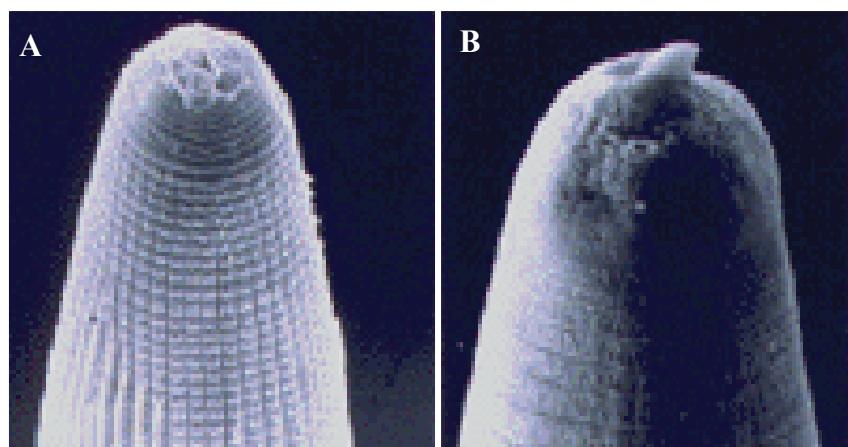


Figura 6. Porção anterior de JIs com dente dorsal proeminente. (Fonte: Khuong, 2010)

No gênero *Steinermerma*, os ovos fertilizados podem ser postos no interior do corpo do inseto hospedeiro ou retidos no interior do corpo da fêmea de nematoide até a eclosão dos J1. Quando retidos no corpo da fêmea, os J1 serão liberados para o interior do inseto e irão se alimentar e mudar para o estádio J2 e J3 (juvenil infectante), no qual os J3 irão reter a cutícula do estádio anterior e posteriormente deixarão o inseto cadáver, sendo liberados no meio ambiente, nesse processo, alguns J1 vão continuar o ciclo de desenvolvimento (J2, J3, J4) e adultos de segunda geração que irão continuar o ciclo até esgotarem os recursos alimentares, (Almenara, 2012).

Os adultos são encontrados no interior de cadáveres dos hospedeiros (machos, fêmeas e hermafroditas) e as fêmeas hermafroditas no gênero *Heterorhabditis* são produzidas apenas na primeira geração, sendo machos e fêmeas produzidos apenas a partir da segunda geração de adultos (Almenara, 2012).

Mesmo um único JI de *Heterorhabditis* é capaz de causar infecção e se reproduzir já que a primeira geração de adultos é hermafrodita e se autofecundam, sendo capaz de produzir ovos fertilizados (Almenara, 2012).

No gênero *Heterorhabditis* as bactérias simbiontes atravessam as células do corpo da fêmea hermafrodita e ficam disponíveis na hemocele do inseto para serem ingeridas pelos novos juvenis (Almenara, 2012), já nas espécies do gênero *Steinermerma* as bactérias são liberadas na hemocele do hospedeiro através do ânus e são ingeridas pelos J2, quando se esgotam os recursos alimentares e estes já possuem uma quantidade aumentada de bactéria em seu interior deixam

de se alimentar e passam a ter a boca e anus fechados para se tornarem J3 infectantes e serem liberados no ambiente em busca de um novo hospedeiro (Ferraz, 1998).

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

Os nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* possuem ampla distribuição geográfica (Dolinski; Moino-JR, 2006); e por serem encontrados naturalmente no solo podem sofrer influência direta do meio ambiente, onde alguns fatores ambientais como porosidade e tipo do solo, umidade relativa, concentração de oxigênio, temperatura, pH e radiação ultravioleta podem interferir na infectividade dos NEPs (Shapiro-Ilan et al., 2006).

Cada nematoide possui sua temperatura ideal e sofre grande influência da mesma (Shapiro-Ilan et al., 2006). Dependem diretamente da umidade do solo para poderem se movimentar, mas são sensíveis a umidade em excesso (Shapiro-Ilan et al., 2006; Rohde et al., 2010), são favorecidos por solos porosos que permitem maior movimentação entre as partículas, mas em solos com porosidade excessiva pode ocorrer retenção de água e prejudicar a movimentação dos JIs, além disso, o excesso de radiação ultravioleta pode provocar a morte de JIs (Shapiro-Ilan et al., 2006).

Alguns fatores devem ser levados em consideração ao escolher as espécies/linhagens de nematoides entomopatogênicos a serem utilizadas, como: apresentar alta virulência, conseguir identificar e ter o mesmo perfil de solo que o inseto praga (umidade, porosidade), conhecer o comportamento de busca pelo hospedeiro do nematoide escolhido; para isso diversos espécimes são testados em laboratório visando alcançar os parâmetros desejados (Santos Neto, 2023).

Os NEPs podem ser produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em pequena, média e larga escala de acordo com a finalidade (Almenara, 2012).

Em produções *in vivo*, o inseto mais utilizado é a fase larvar de *Galleria mellonella* (Grewal et al., 2001); porém os NEPs também podem ser reproduzidos em *Tenebrio molitor*, *Spodoptera frugiperda* e *Bombyx mori* (Molina et al., 2004).

A infecção ocorre através da adição de uma suspensão aquosa contendo os JIs em placas forradas com papel filtro e as larvas do inseto, e após aproximadamente cinco a sete dias as larvas mortas são acondicionadas em armadilhas de White (White, 1927), contendo água destilada, o que permite a saída dos nematoides do inseto para o ambiente aquoso, onde serão coletados (Negrisoli et al., 2015). Essa técnica de produção é simples (Figura 7) e de baixo investimento inicial, sendo bastante utilizada para pesquisas em laboratórios, mas apesar disso, possui como desvantagem baixa produção, depende de mão de obra e espaço físico adequado, além da produção do inseto hospedeiro, estando suscetível a infecções e surtos de doenças (Almenara et al., 2012).

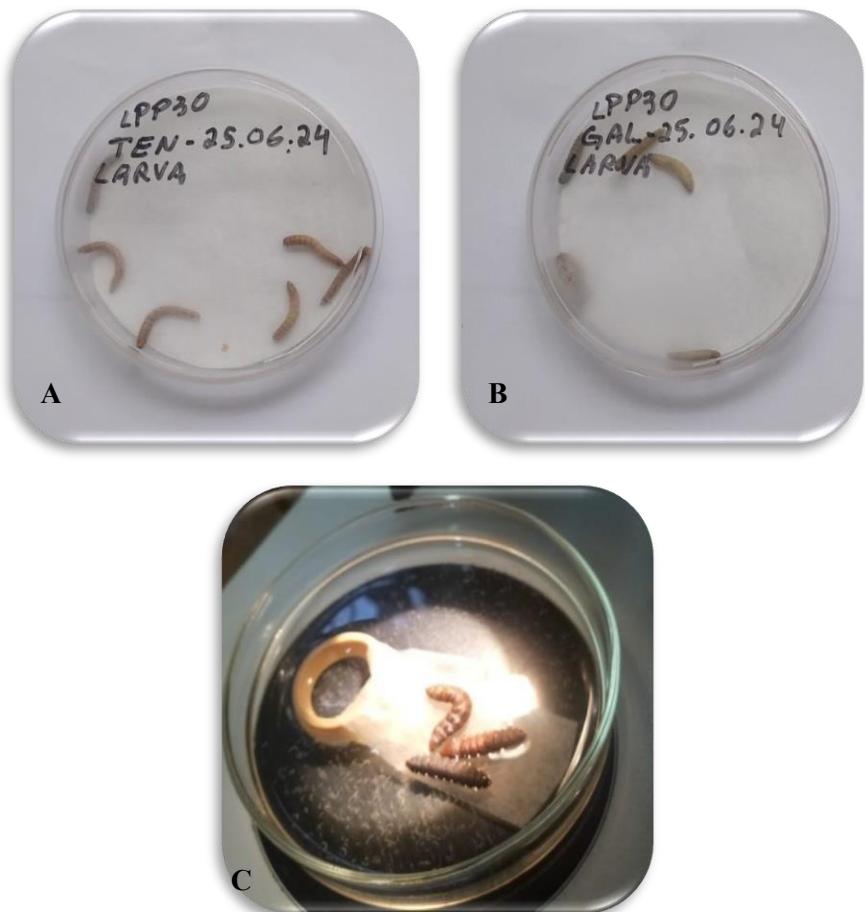


Figura 7. **A** - Produção *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*. **B** - *Galleria mellonella* infectadas com *Heterorhabditis indica* (LPP30) em placa de petri contendo papel filtro e suspensão aquosa contendo os juvenis infectantes. **C** - Armadilha de White (1927) contendo juvenis infectantes (Fonte: Arquivo pessoal).

Existem diferentes técnicas para a produção de NEPs *in vitro*, nas quais são utilizados meios artificiais líquidos e fermentadores, para a produção em larga escala (Almenara, 2012). Esse tipo de produção oferece maior controle, no entanto, exige tecnologias avançadas para simular condições naturais e garantir a viabilidade dos nematoides. Estudos destacam a formulação de meios líquidos e sólidos para produção de NEPs, incluindo estratégias para manter sua virulência (Gaugler, 2002). A formulação e armazenamento dos NEPs pode ser feita de diversas formas, como o uso de esponjas de poliuretano que se dispersam em água, grânulos, vermiculita, iscas, dentre outros (Grewal et al., 2005).

2.8 O Controle Biológico Utilizando Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) e Sua Utilização em *Ctenocephalides felis felis*

A utilização dos NEPS no controle biológico abrange uma ampla gama de insetos que causam prejuízos em diversos tipos de cultivos agrícolas. Dentre os estudos realizados podemos citar alguns como o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* (Alves et al., 2009); o controle de ninfas de cigarrinha da cana (*Mahanarva fimbriolata*) (Leite et al., 2005), 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), da mariposa *Stenoma catenifer*, praga da cultura de abacate (Andaló et al., 2019), dentre

outros.

Além disso, pesquisas vêm sendo realizadas para avaliar a associação dos NEPs com outras formas de controle de pragas, tanto químicos como outros entomopatógenos, e ainda diferentes formas de aplicação dos nematoídeos (Sunanda et al., 2014; Antwi; Reddy, 2016). Estas pesquisas possuem grande importância para avaliar a compatibilidade desses produtos com os nematoídeos e se pode ocorrer interferência na capacidade reprodutiva e infectante dos NEPs diminuindo assim a eficiência do controle da praga alvo (Monteiro, 2014).

Atualmente os NEPs vem sendo avaliados como uma nova forma de controlar invertebrados de importância médica veterinária, que são vetores de patógenos. Dentre estes podemos destacar estudos realizados com carapatos (Monteiro et al., 2010; 2012; 2014; 2020), mosquitos (Cardoso et al., 2015; Ulvedal et al., 2017; Subkrasae, 2022), moscas (Sobrinho et al., 2016; Monteiro Sobrinho et al., 2021; 2023a; 2023b; Archana et al., 2017; Leal et al., 2017; Arriaga; Cortez-Madrigal, 2018) e moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata* e *Pseudosuccinea columella* (Tunholi et al., 2017; Vidal et al., 2021; Amaral et al., 2021; Amaral et al., 2022).

Dentro desta nova área de aplicação dos NEPs pouco se sabe sobre seu uso no controle de pulgas, já que são escassos os estudos envolvendo nematoídeos entomopatogênicos e o controle de *C. felis felis*.

O primeiro relato de estudos envolvendo NEPs e o controle de *C. felis* foi realizado por Silverman et al. (1982), no qual foi avaliado a susceptibilidade de larvas de pulga por nematoídeos entomopatogênicos da espécie *Steinernema carpocapsae*. Neste estudo foi possível observar a infecção de diferentes estágios do ciclo evolutivo do inseto sendo infectados por *S. carpocapsae*, no qual pode ser notada a presença de adultos do NEP no interior das larvas de pulga 48 horas após a infecção, havendo uma maior mortalidade das larvas a medida em que a umidade aumentava. Foi possível ainda perceber a presença dos nematoídeos também dentro de casulos de pré-pupas e pupas. Silverman et al., (1982) relataram ainda em suas descobertas que não foram produzidos JIs no interior das larvas usadas em seu estudo.

Henderson et al. (1995) observaram a infectividade de *S. carpocapsae* em diferentes estágios evolutivos de *C. felis* em substratos distintos. Os autores sugeriram que a aplicação do NEP em solos como areia e cascalho que continham ovos, larvas e pupas de *C. felis* resultou numa redução da emergência das formas adultas.

Samish et al. (2020) avaliaram a infectividade de fungos e quatro espécies de nematoídeos entomopatogenicos no controle de *C. felis* em diferentes temperaturas, substratos e umidade relativa, sendo as espécies *Steinernema feltiae* e *H. bacteriophora* consideradas mais eficientes no controle desse inseto a 28°C e 95% de umidade relativa.

Mais recentemente um estudo realizado por Souza et al. (2024) avaliou a infecção de larvas de sete dias de *C. felis* por NEPs das espécies *H. bacteriophora* e *H. indica*, em três concentrações diferentes de JIs/larva, ocasionando na mortalidade das larvas acima de 80% para *H. bacteriophora* e 70% para *H. indica* nas três concentrações testadas (120JIs, 160 JIs e 200 JIs por larva de pulga).

3 MATERIAIS 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 2020 a agosto de 2024 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 Pupas e Adultos de *Ctenocephalides felis felis*

Para a realização do estudo, foram utilizadas pré-pupas, pupas e adultos de pulgas *C. felis*, 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 *C. 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 e Preparação dos Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)

As espécies de nematoides *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30) utilizadas nos ensaios foram provenientes da colônia mantida no Anexo 1 do LCM. Estes foram produzidos *in vivo* em larvas de sétimo instar de *G. 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 foi realizada através da montagem da armadilha de White (White, 1927). Após a recuperação, os JIs foram armazenados em garrafas de cultivo celular de 40 ml contendo água destilada autoclavada e mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D (Eletrolab®, modelo EL 212) a $16\pm1^{\circ}\text{C}$ e 70-80% UR. Juvenis infectantes recém produzidos foram coletados e quantificados para a realização dos experimentos.

A quantificação dos juvenis infectantes foi realizada através da contagem de 12 alíquotas (Figura 8A) de 10 μL contendo os JIs (Figura 8B) em microscópio óptico de campo claro (objetiva 4X). As alíquotas foram distribuídas em lâmina de vidro, sem lamínula, com o auxílio de um pipetador automático. Na contagem foram descartados o maior e o menor número de juvenis infectantes observados, após a exclusão foi realizado um cálculo de média simples com os valores restantes para a obtenção da quantidade de nematoides dentro de cada frasco (Taylor et al., 1998).

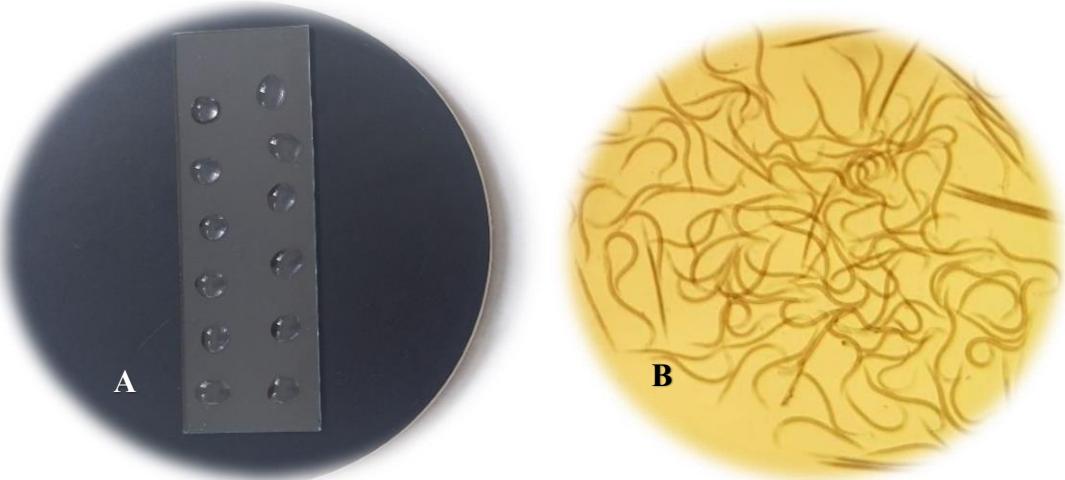


Figura 8. **A** - Lâmina de microscopia contendo 12 aliquotas de 10 µL contendo juvenis infectantes. **B** - Juvenis infectantes observados em microscópia óptica de campo claro (10x) para quantificação (Fonte: Souza, 2020).

3.4 Metodologia

3.4.1 Pupas

Na realização dos ensaios biológicos com pupas nuas foram utilizadas 155 larvas de *C. felis* de terceiro ínstar (pré-pupa). As pré-pupas foram armazenadas em placas de petri de 6 cm de diâmetro, sem a presença de matéria orgânica e observadas pelo período de cinco dias até a pupação, com a formação de um casulo sem proteção (pupa nua).

Para a realização dos ensaios biológicos de pupa com casulo pupal foram utilizadas 155 pupas envoltas em matéria orgânica que foram utilizadas diretamente na realização do experimento.

Todos os ensaios biológicos com pupas (pupa nua e pupa com pupário) receberam 120 JIs/pupa de *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30) em uma suspensão de 600 µL por placa de petri.

Cada tratamento possuía dez repetições, onde cada repetição continha uma placa de Petri (de 6cm de diâmetro) contendo papel filtro previamente esterilizado e 11 pupas de *C. felis*. Além disso, cada grupo experimental continha um grupo controle, com cinco repetições, cada qual possuindo 11 pupas em 600 µL água destilada.

Após a infecção, todas as placas dos bioensaios com pupas foram vedadas com papel filme para evitar risco de fuga das pulgas em caso de emergência de adultos, em seguida foram realizados perfurações no papel filme com agulha (0,30 x 8 mm) para oxigenação e as placas foram mantidas em câmara climatizada a uma temperatura de 25±1°C, 70-80% UR.

A susceptibilidade das pupas nuas foi avaliada quanto a presença de juvenis e adultos dentro das mesmas. Decorridos 48 horas, uma pupa nua de cada placa foi dissecada e observada em lupa para verificar se estas foram infectadas pelos JIs, as demais pupas puderam ser observadas sem dissecção, pois as mesmas se apresentavam translúcidas.

Já para o bioensaio com pupas apresentando pupário, a infecção foi avaliada através da dissecção de todas as pupas após um período de 96 horas (quatro dias). A dissecção em todos os indivíduos infectados precisou ser realizada devido a presença de matéria orgânica aderida ao casulo pupal, o que não permitia a visualização da presença de NEPS no interior do inseto.

O controle foi avaliado quanto a emergência dos adultos, seguidos de dissecção dos mesmos e das pupas não emergidas.

A pupa usada para dissecção foi contabilizada como suscetível quando apresentava formas juvenis ou adultos de NEPs no seu interior.

Em resumo, todos os ensaios biológicos citados acima seguiram a distribuição dos grupos apresentada na Figura 9.

Os ensaios com pupas nuas e pupas com casulo pupal acima foram avaliados quanto a repetibilidade.

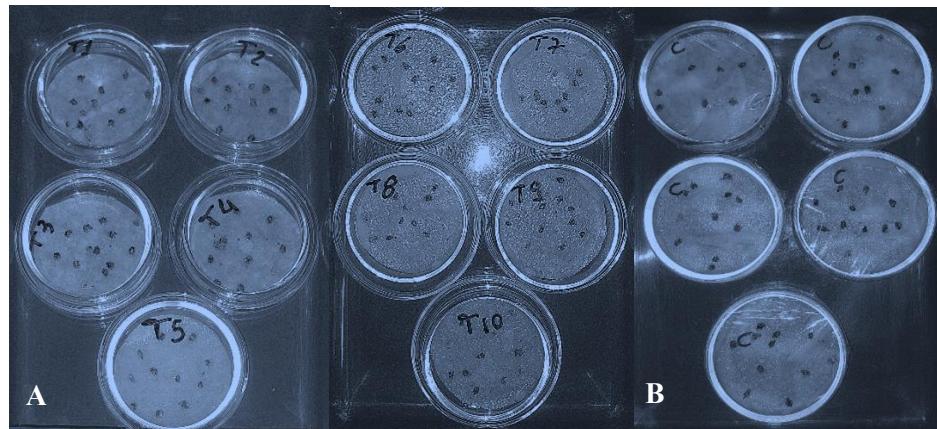


Figura 9. Distribuição dos grupos utilizados no estudo de pupas com pupário. **A** - Grupo Tratado (T1 a T10). **B** - Grupo controle (C1 a C5) . (Fonte: Arquivo pessoal).

Posteriormente a dissecção e observação das pupas nuas, foi realizado a montagem da armadilha de White modificada (White, 1927), com as pupas não dissecadas, na tentativa de recuperar JIs (Figura 10).



Figura 10. Montagem da armadilha de White modificada (White, 1927) com pupas nuas de *Ctenocephalides felis felis*. (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.2 Adultos

Para a realização dos bioensaios com adultos de *C. felis*, foram utilizadas as espécies de NEPs *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30). Foram coletadas pulgas adultas de *C. felis felis*, as quais foram dispostas em recipientes plásticos de 7,5cm de diâmetro por 8 cm de altura, contendo papel filtro, cada qual, com de 25 pulgas por recipiente, contendo três repetições para machos e três repetições para fêmeas. Totalizando 150 pulgas, sendo 75 machos e 75 fêmeas. Em cada recipiente foi utilizado uma suspensão de 1500 µL contendo 120 JIs/pulga. Foi utilizado um grupo controle separado em dois recipientes contendo cada um 25 machos e 25 fêmeas de pulgas adultas *C. felis* sobre papel filtro e 1500 µL de água destilada. A soma total de pulgas utilizadas no bioensaio foi de 200 pulgas adultas, contabilizando grupos tratados mais

grupo controle.

Após a infecção as amostras foram vedadas com papel filme e foram realizados perfurações no papel filme com agulha (0,30 x 8 mm) para oxigenação, sendo posteriormente mantidas em BOD a $25\pm1^{\circ}\text{C}$, 70% UR. Foram feitas avaliações diárias para verificar a mortalidade e após 16 dias os adultos foram avaliados e dissecados para verificar a presença de NEPs em seu interior.

A análise da suscetibilidade foi realizada através da dissecação e observação da presença de NEPs de diferentes fases evolutivas dentro das pulgas adultas. Os ensaios biológicos seguiram a distribuição dos grupos apresentada na Figura 11.



Figura 11. Distribuição dos grupos utilizados no estudo com adultos. **CF** - Grupo controle fêmea. **CM** - Grupo controle macho. **E1F a E3F** - Grupo tratado fêmea e **E1M a E3M** - Grupo tratado Macho. (Fonte: Arquivo pessoal).

3.5 Análise Estatística

A estatística utilizada para avaliar os ensaios biológicos foi realizada através do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados paramétricos foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk seguidos da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p\leq0,05$).

4 RESULTADOS

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

4.1.1 Avaliação da suscetibilidade e presença de nematoides infectantes *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) em pupas nuas de *Ctenocephalides felis felis*

Na avaliação realizada após 24 horas da exposição aos JIs foi possível observar a presença dos NEPs no interior das pupas, pois as mesmas se apresentavam translúcidas. Após 48 horas da infecção, foi realizada a dissecação de uma pupa de cada placa onde foi possível verificar a presença de juvenis e adultos emergindo do interior das pupas (Figura 12). As demais pupas foram observadas através de lupa, e foi possível verificar a presença de NEPs no interior de todas as pupas.

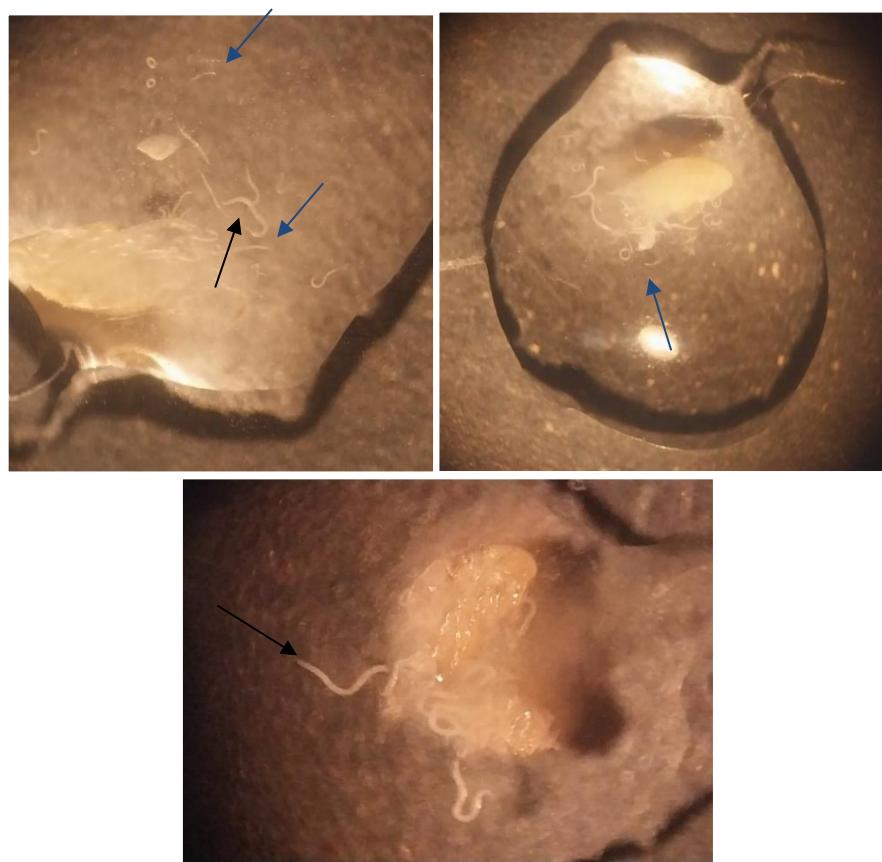


Figura 12. Dissecção de pupa nua de *Ctenocephalides felis felis* demonstrando a presença de juvenis (seta azul) e adultos (seta preta) de *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) em seu interior (Fonte: Arquivo Pessoal).

No grupo controle as pupas se desenvolveram e emergiram como adultos, totalizando 99% de emergência.

Em contraste, no grupo tratamento (ensaio biológico e repetição) não foram observados adultos emergidos, conferindo 100% de suscetibilidade das pupas nuas aos juvenis infectantes (JIs) de *H. bacteriophora* (HP88).

Nos resultados obtidos através da análise de variância (ANOVA), foram identificados efeitos significativos entre os grupos testados e ao realizar o teste de Tukey (Tabela 2), foi possível verificar que as pupas expostas aos JIs apresentam uma diferença significativamente

maior em comparação ao grupo controle.

Tabela 2 - Valores médios da suscetibilidade de pupas nuas de *Ctenocephalides felis felis* por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e adultos emergidos.

Suscetibilidade (%) de pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> a nematoides entomopatogenicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88)		
Grupos	Adultos que emergiram	Presença de nematoides no interior das pupas
Ensaio biológico	0,00 A	100,00A
Repetição	0,00 A	100,00A
Controle	99,00 B	0,00B

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

Após a montagem da armadilha de White (1927), observou-se a emergência de JIs em pequenas quantidades a partir das pupas nuas. Os juvenis coletados da armadilha de White foram utilizados para infecção de *G. melonella* onde foram recuperados novos JIs, desmonstrando que os mesmos possuem capacidade de desenvolver o ciclo completo no interior do inseto e realizar a manutenção do ciclo após infectarem pupas nuas de *C. felis*.

4.1.2 Avaliação da infecção de pupas com pupário de *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88).

A suscetibilidade das pupas com pupário aos JIs de *H. bacteriophora* foi avaliada após 96 horas da realização da infecção e, por meio da dissecação foi possível observar a presença de juvenis e adultos no interior das pupas (Figura 13), alcançando uma taxa de 55,44% de suscetibilidade no grupo exposto (ensaio biológico e repetição) aos JIs. No grupo controle foi observado 96,36% de emergência de pulgas adultas.

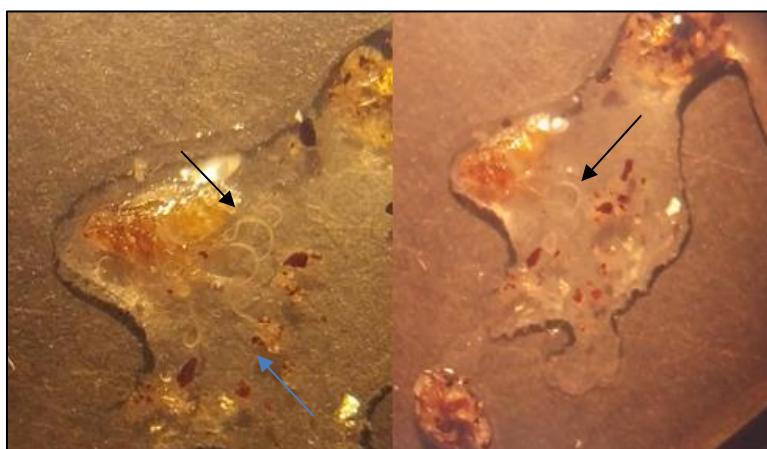


Figura 13. Dissecção de pupa com pupário de *Ctenocephalides felis felis*, juvenis (seta azul) e adultos (seta preta) de *Heterorhabditis bacteriophora* emergendo de seu interior. (Fonte: Arquivo Pessoal).

Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) verificando a presença de diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Ao realizar o teste de Tukey (Tabela 3), foi observado que os grupos expostos aos JIs, apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle, não apresentando diferença significativa quando comparados entre si.

Tabela 3 - Valores médios da suscetibilidade de pupas com pupário de *Ctenocephalides felis felis* por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) e adultos emergidos.

Suscetibilidade (%) de pupas com pupário de <i>Ctenocephalides felis felis</i> a nematoides entomopatogenicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88)		
Grupos	Adultos que emergiram	Presença de nematoides no interior das pupas
Ensaio biológico	0,00 A	60,90 A
Repetição	0,00 A	49,99 A
Controle	96,36 B	0,00 B

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

4.1.3 Avaliação da infecção de pupas nuas de *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis indica* (LPP30).

Na análise realizada após 24 horas de infecção pelos JIs de *H. indica*, foi possível observar a presença de nematoides entomopatogênicos em algumas pupas nuas. Na dissecação de uma pupa de cada placa, após 48 horas, foi possível verificar a presença de juvenis e adultos em seu interior (Figura 14).

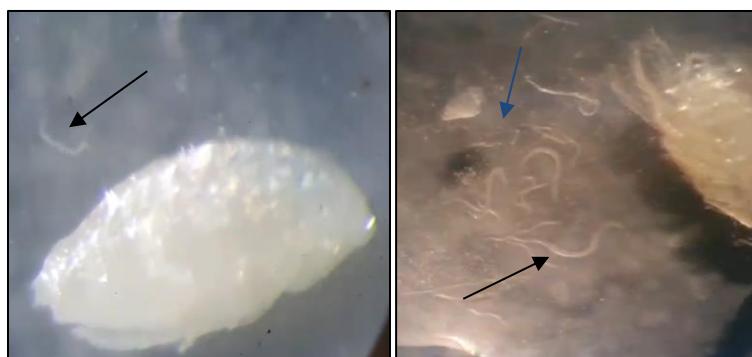


Figura 14. Dissecção de pupas nuas de *Ctenocephalides felis felis* com juvenis (seta azul) e adultos (seta) de *Heterorhabditis indica* emergindo de seu interior. (Fonte: Arquivo pessoal).

As demais pupas (ensaio biológico e repetição) foram avaliadas através de lupa, onde foi observado a presença de NEPs em seu interior, totalizando 98,18% de suscetibilidade.

Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) que demonstraram a ocorrência de diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Esses dados foram analisados através do teste de Tukey (Tabela 4), o qual verificou a diferença de suscetibilidade entre os grupos expostos aos JIs quando comparados ao grupo controle, não ocorrendo diferença significativa quando comparados entre si.

Tabela 4 - Valores médios da suscetibilidade de pupas nuas de *Ctenocephalides felis felis* por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (LPP30) e adultos emergidos.

Suscetibilidade (%) de pupas nuas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> a nematoides entomopatogenicos <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30)		
Grupos	Adultos que emergiram	Presença de nematoides no interior das pupas
Ensaio biológico	0,00 A	96,36 A
Repetição	0,00 A	100,00 A
Controle	98,18 B	0,00 B

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

Após a montagem da armadilha de White, foi possível observar a emergência de juvenis infectantes modificada para realizar a coleta dos JIs e a infecção de *G. mellonella*, onde ocorreu infecção das mesmas demonstrando a capacidade dessa espécie de nematoide entomopatogênico infectar pupas nuas de *C. felis* e manter seu ciclo em outras espécies de artrópodes. No grupo controle ocorreu 98,18% de emergência de pulgas adultas.

4.1.4 Avaliação da infecção de pupas com pupario de *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis indica* (LPP30).

A suscetibilidade das pupas com casulo pupal foi avaliada após 96 horas da infecção, as mesmas foram dissecadas em sua totalidade, onde foi possível observar a presença de juvenis e adultos no interior de algumas pupas (Figura 15), alcançando uma taxa de 64,99% de suscetibilidade (ensaio biológico e repetição). O total de adultos que emergiram no grupo controle foi de 98,18%.



Figura 15. Dissecção de pupa com pupário de *Ctenocephalides felis felis* com juvenis (Seta laranja) e adultos (seta preta) de *Heterorhabditis indica* emergindo de seu interior. (Fonte: Arquivo pessoal).

Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA), a qual demonstrou a presença de diferenças estatísticas entre os grupos testados. Ao avaliar os bioensaios isoladamente através do teste de Tukey (Tabela 5), foi observado que diferenças estatísticas de suscetibilidade ocorreram entre o grupo exposto aos JIs quando comparados ao grupo controle.

Tabela 5 - Valores médios da suscetibilidade de pupas com pupário de *Ctenocephalides felis felis* por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (LPP30) e adultos emergidos.

Suscetibilidade (%) de pupas com pupário de <i>Ctenocephalides felis felis</i> a nematoides entomopatogenicos <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30)		
Grupos	Adultos que emergiram	Presença de nematoides no interior das pupas
Ensaio biológico	0,00 A	68,17 A
Repetição	0,00 A	61,81 A
Controle	98,18 B	0,00 B

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

4.1.3. Avaliação da infecção de adultos de *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88).

A análise da suscetibilidade dos adultos foi realizada 16 dias após a infecção, onde foi observado a presença de NEPs no interior das pulgas (Figura 16), alcançando 70,66% e 72% de suscetibilidade para machos e fêmeas respectivamente, totalizando 71,33% de infectividade dos adultos por JIs *H. bacteriophora* (HP88).



Figura 16. Dissecção de adultos de *Ctenocephalides felis felis* com adultos de *Heterorhabditis bacteriophora* emergindo de seu interior. (Fonte: Arquivo pessoal).

Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) demonstrando a presença de diferenças estatísticas entre os grupos testados.

Ao analisar os dados separadamente através do teste de Tukey (Tabela 6) foi possível observar que ambos os grupos, machos e fêmeas, apresentaram uma maior suscetibilidade a infecção JIs, enquanto o grupo controle não apresentou mortalidade de adultos, com fêmeas apresentando um ligeiro aumento na infectividade quando comparadas aos machos, sendo essa diferença estatística não significante.

Tabela 6 - Valores médios da suscetibilidade de adultos de *Ctenocephalides felis felis* por nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (LPP30) e adultos emergidos.

Suscetibilidade (%) de adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> a nematoides entomopatogenicos <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HP88)	
Machos	70,66 A
Fêmeas	72,00 A
Controle	0,00 B

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

4.1.3. Avaliação da infecção adultos de *Ctenocephalides felis felis* por *Heterorhabditis indica* (LPP30).

Ao analisar a suscetibilidade dos adultos aos JIs de *H. indica* (LPP30) foi observado a presença nematoides em 72% e 68% de pulgas, machos e fêmeas, respectivamente, totalizando 70% de infectividade dos adultos (Figura 17).

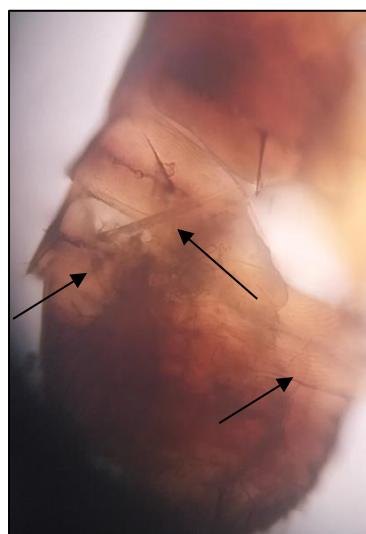


Figura 17. Dissecção de adultos de *Ctenocephalides felis felis* com juvenis. Adultos de *Heterorhabditis indica* emergindo de seu interior. (Fonte: Arquivo pessoal).

Através da análise de variância (ANOVA), foi possível observar diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Os dados foram analisados separadamente através do teste de Tukey (Tabela 7) na qual foi observado que tanto machos quanto fêmeas apresentam suscetibilidade aos JIs quando comparados ao grupo controle. Ao serem analisados isoladamente, machos e fêmeas, não ocorreram diferenças estatísticas significantes entre si.

Tabela 7 - Valores médios da suscetibilidade de adultos de *Ctenocephalides felis felis* em função da presença de nematoides *Heterorhabditis indica* (LPP30).

Suscetibilidade (%) de adultos de <i>Ctenocephalides felis</i> a nematoides entomopatogénicos <i>Heterorhabditis indica</i> (LPP30)	
Machos	72,00 A
Fêmeas	68,00 A
Controle	0,00 B

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

Através das análises realizadas foi possível observar que adultos de *C. felis* foram suscetíveis a JIs de *H. indica* (LPP30).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível observar a suscetibilidade de pupas e adultos de *C. felis* aos nematoides entomopatogênicos das espécies *H. bacteriophora* e *H. indica*, demonstrando que os mesmos são eficazes no controle desse ectoparasita, tal fato pode ser de grande relevância, considerando a busca por alternativas sustentáveis e ambientalmente seguras no controle de ectoparasitas de importância médica veterinária.

A literatura afirma que pulgas da subespécie *C. felis felis* apresentam grande capacidade de desenvolver resistência a inseticidas (Rust, 2005). Linardi; Santos (2012), citam que diversos autores tem relatado a presença de *C. felis felis* resistentes a inseticidas comuns.

Segundo Bossard et al. (1998), em 1952 houve relato de resistência desse ectoparasita ao composto dicloro-dietil-tricloroetano (DDT) em pó, seguido de relatos de resistência ao composto clordane, dieldrin e hexaclorociclohexano, além do isômero gama do lindane. Já Fox et al., (1968) relataram que adultos e larvas de *C. felis* apresentaram resistência a DDT, dieldrina e malation. Ainda no que se refere a este último composto, El-Gazzar et al. (1986) relataram que uma colônia de pulgas originárias da Flórida apresentava resistência ao malation.

Schwinghammer et al. (1985), demonstraram a presença de cepas de *C. felis* resistentes aos organofosforados em Kentucky.

Rust (2017, 2020), cita que o aumento da resistência desse ectoparasito aos piretróides tem gerado grande preocupação, e pesquisas atuais estão buscando uma forma de controle alternativo que seja ecológico e consiga interromper seu ciclo de vida. Corroborando com o intuito do presente estudo, que ao avaliar a suscetibilidade de pulgas *C. felis* aos nematoides entomopatogênicos evidenciou altos índices de suscetibilidade das pulgas e o potencial desses organismos como agentes de controle biológico, o que pode reduzir a utilização aos compostos químicos, diminuindo consequentemente a contaminação do ambiente e o aparecimento de populações resistentes.

Outra vantagem da utilização de nematoides entomopatogênicos no manejo de *C. felis*, é a seletividade e ausência de impacto significativo sobre organismos não-alvo, apresentada por eles, sendo seguros ao meio ambiente e seres humanos (Negrisolli, 2015).

Para que o controle de *C. felis* seja efetivo é necessário combinar estratégias de manejo ambiental associado ao controle químico (Dryden; Rust, 1994; Blagburn; Dryden, 2009), e os NEPS surgem como uma alternativa de controle, podendo ser associados a alguns produtos químicos, ocorrendo sinergismo e ocasionalmente a redução de produtos químicos utilizados na aplicação, gerando menor custo (Koppenhofer; Kaya, 1998).

Os espécimes utilizadas no presente estudo são do gênero *Heterorhabditis*, que são hermafroditas, e mesmo um único juvenil infectante é capaz de causar infecção e se reproduzir dentro do inseto hospedeiro (Burnell; Stock, 2000; Almenara, 2012).

Além disso, possui como vantagem a presença de um dente quitinoso, sendo capaz de penetrar no inseto alvo não só através das aberturas naturais, mas também perfurando a cutícula (Forst; Clarke, 2002), o que pode ser uma vantagem com relação a infecção em adultos desse ectoparasito, pois são insetos com o terceiro par de patas adaptadas ao salto (Linardi, 2011; Linardi, 2017), não ficando o tempo todo em contato direto com o solo, podendo dificultar a penetração de juvenis infectantes.

Nematoides entomopatogênicos *H. bacteriophora* e *H. indica* são da categoria “Cruiser”, com relação à busca pelo hospedeiro, se movimentando no solo e são atraídos pela concentração de CO₂ (Dolinski; Moino-Jr, 2006), o que é considerado uma vantagem na sua utilização no controle de *C. felis*. em especial das pupas que se mantêm imóveis no meio ambiente.

De acordo com Sousa (1997), larvas desse inseto são sensíveis a radiação solar e procuram ambientes protegidos, além de necessitar de umidade relativa ótima para sua

sobrevivência, se orientando para locais úmidos, conseguindo penetrar em solos arenosos (Linardi, 2024), trazendo vantagem à utilização de NEPs no seu controle, contudo deve-se levar em consideração o perfil de solo (umidade e porosidade) ideais para a escolha do nematoide a ser utilizado no seu controle (Santos Neto, 2023).

Estudos realizados por Souza et al. (2024) avaliaram a utilização de NEPs em larvas de sete dias de *C. felis felis*. Foram utilizados no estudo nematoídeos entomopatogênicos *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30) em diferentes concentrações de nematoídeos e umidade, e foi verificado que o excesso de umidade foi prejudicial aos nematoídeos, que ficam com a movimentação prejudicada e também há baixa oxigenação nesse ambiente, o que também foi prejudicial às larvas de pulga, corroborando com Sousa (1997).

Os resultados dos ensaios biológicos evidenciaram alta suscetibilidade de *C. felis felis* aos nematoídeos entomopatogênicos *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30), com taxas de infecção que variaram conforme o estágio de desenvolvimento (papas nuas, papas com pupário e adultos). O casulo pupal é viscoso fazendo com que ocorra a aderência de partículas do ambiente para proteger as larvas até o desenvolvimento completo em pulgas adultas (Silverman; Rust, 1985; Dryden; Rust, 1994), esse estágio é mais resistente à dessecação (Linardi; Nagem, 1972). Alguns autores mencionam a proteção parcial das larvas pelo casulo até a formação do adulto (Silverman; Rust, 1985; Dryden; Rust, 1994).

No estudo realizado por Souza et al. (2024) foi observado que larvas de *C. felis* expostas a JIs de *H. bacteriophora* e *H. indica* apresentaram percentuais de mortalidade acima de 80% e 70% respectivamente.

Com base no que foi observado no presente estudo, ocorreu uma menor suscetibilidade das papas com casulo pupal, oferecendo uma proteção parcial, mas não suficiente para impedir a penetração dos JIs de *H. bacteriophora* e *H. indica*, que ocasionaram a mortalidade de 55,54% para HP88 e 64,99% para LPP30 nas papas estudadas.

Samish et al. (2020), avaliaram a infectividade de nematoídeos entomopatogênicos no controle de *C. felis* em diferentes fases do inseto, obtendo resultados similares aos obtidos no presente estudo, demonstrando alta taxa de mortalidade em papas e adultos.

Apesar de não ser totalmente eficiente, a presença do casulo pupal pode ser considerado importante para a manutenção do ciclo biológico da pulga, pois, na sua ausência permitiu que os NEPs aqui estudados fossem capazes de penetrar e causar mortalidade de 100% para papas de *H. bacteriophora* e 98,18% *H. indica*.

Tais achados corroboram aos descritos por Henderson et al. (1995), onde foi mencionado que todas as papas nuas foram suscetíveis aos nematoídeos, ocorrendo uma maior infecção quando comparadas as papas com casulo pupal.

Quando nos referimos a emergência de adultos, Henderson et al. (1995), observaram que a presença de NEPs (*Steinernema carpocapsae*) em fases imaturas de *C. felis* interferiu na emergência de pulgas adultas, corroborando com presente estudo, no qual não ocorreu emergência de adultos em nenhum dos grupos tratados, onde *H. bacteriophora* apresentou taxa de 70,66% de suscetibilidade para machos e 72% para fêmeas, quanto *H. indica* apresentaram taxas de infecção de 72% para machos e 68% para fêmeas, sugerindo que a mobilidade dos JIs facilita a infecção em adultos móveis, apesar da cutícula mais resistente.

Com relação a manutenção e ciclo de vida dos NEPs dentro do hospedeiro, Souza et al. (2024) verificou que as espécies *H. bacteriophora* e *H. indica* conseguiam infectar, matar e se reproduzir em larvas de sete dias de *C. felis*. No presente estudo, foi possível verificar que essas espécies de NEPs, conseguem infectar papas nuas e completar seu círculo de vida, além de produzir juvenil capaz de infectar *G. mellonella*, fato que discorda dos achados obtidos por Silverman et al. (1982), no qual observaram que a espécie *N. carpocapsae* não consegue completar seu ciclo em larvas e papas de *C. felis*.

Assim, de acordo com o presente estudo, os NEPs são uma ferramenta importante no controle biológico de invertebrados pragas e podem futuramente ajudar no controle de *C. felis*, devido a sua capacidade de atuar de forma eficiente e sustentável, reduzindo a população de pulgas sem a necessidade de produtos químicos ou associado aos mesmos, contribuindo para o equilíbrio ecológico e diminuindo o risco de resistência ao tratamento.

6 CONCLUSÃO

Nematoides das espécies *H. bacteriophora* (HP88) e *H. indica* (LPP30) conseguem penetrar em pupas nuas e completar seu ciclo biológico, liberando juvenis infectantes no ambiente.

Heterorhabditis bacteriophora (HP88) e *H. indica* (LPP30) penetram em pupas com pupário e adultos de *C. felis*, completando seu ciclo biológico, não sendo possível avaliar a recuperação de JIs nesses estágios.

Esses achados contribuem para o entendimento do uso de nematoides no controle biológico integrado desse inseto fornecendo um panorama da eficácia dos NEPs no manejo de *C. felis*, reforçando o potencial de sua aplicação em programas de controle biológico e controle integrado de pragas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, KHUONG B. Taxonomy and systematics. In: **Entomopathogenic nematology**. Wallingford UK: CABI publishing, 2002. p. 1-33.
- ALMENARA, D. P.; ROSSI, C.; NEVES, C. M. R.; WINTER, C. E. **Nematoides entomopatogênicos**. 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, 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.
- AMARAL, L. S. et al. Glycemic profile of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) exposed to *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae): Potential control of schistosomiasis. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p.1401-1411, 2021.
- AMARAL, L. S.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; CASTRO, L. S.; TUNHOLI, V. M.; GAUDÊNCIO, F.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C.; FREIRE-MARTINS, I. V. *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolate HP88, induces reproductive and physiological alterations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae): an alternative for biological control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 230, p. 106396, 2022.
- ANDALÓ, V.; ALVARENGA, C.B.; ZAMPIROLI, R.; CARVALHO, L.S.; JANONI, F.; NAVES, N. Control potential of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) in avocado borer, *Stenoma catenifer* (Lepidoptera: Elachistidae). **Revista Ceres**, v.66, n.2, p.124–13, 2019.
- 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.
- ASSUNÇÃO, J. A. E. S.; MACHADO, D. D. B.; FELISBERTO, J. S.; CHAVES, D. S. D. A., CAMPOS; D. R., CID, Y. P.; MOREIRA, D. D. L. Insecticidal activity of essential oils from *Piper aduncum* against *Ctenocephalides felis felis*: a promising approach for flea control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, n. 3, p. e007624, 2024.
- BATISTA, L. C. D. S.; 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.

BERZINS, M. A. “Velhos, cães e gatos: interpretação de uma relação”. 2000. 163f. (Dissertação de Mestrado em Gerontologia) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo - São Paulo, 2000.

BHAT, A.H.; CHAUBEY, A.K.; Askary, T.H. Global distribution of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 30, p.1-15, 2020.

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.

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.

BRANDÃO, M. V. A. P. D. Saúde Única em articulação com a saúde global: o papel da Medicina Veterinária do coletivo. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 3, p. 77-77, 2016.

BROWN, L. D.; MACALUSO, K. R. *Rickettsia felis*, an emerging flea-borne rickettsiosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 3, p. 27-39, 2016.

BURMAN, M. *Neoaplectana carpocapsae*. Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. **Nematologica**. v. 28, p. 62-70, 1982

BURNELL, A. N. N; STOCK, S. P. *Heterorhabditis, Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. **Nematology**, v. 2, n. 1, p. 31-42, 2000.

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.

COELHO, W. M. D.; CARDOSO, A. M.; DE FREITAS, J. F. A.; FONZAR, J. F.; DOS SANTOS NOGUEIRA, F.; DE AVELAR GOMES, C. R.; BRESCIANI, K. D. S. Detecção molecular de *Anaplasma platys* em pulgas de gatos—nota de pesquisa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 1, p. 4086-4091, 2023.

COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320–325, 2007.

DE AVELAR, D. M. **Endossimbiontes de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) de cães vadios de Belo Horizonte, MG-Brasil**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SAGF-6YELR2>.

DOLINSKI, C. Uso de nematoides entomopatogênicos para o controle de pragas. **Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, Viçosa, p. 261-289, 2006.

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

DOWDS, B. C, A; PETERS, A. R. N. E. Virulence mechanisms. In: **Entomopathogenic nematology**. Wallingford UK: CABI publishing, 2002. p. 79-98.

DRYDEN, M.W. Biology of fleas of dogs and cats. Compendium of Continuing Education Practice Veterinary, v.15, p. 569-579, 1993.

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

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.

FARACO, C. B. **Animais em sala de aula: um estudo das repercussões psicossociais da intervenção mediada por animais.** (Dissertação de mestrado em Psicologia)-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

FERRAZ, L. C. C. B. **Nematóides entomopatogênicos.** In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, p. 541-570, 1998.

FLORIN, T. A.; ZAOUTIS, T. E.; ZAOUTIS, L. B. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of Bartonella henselae infection. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. 1413-1425, 2008.

FORST, STEVEN; CLARKE, David. Bacteria-nematode symbiosis. In: **Entomopathogenic nematology**. Wallingford UK: CABI Publishing, 2002. p. 57-77.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**, 4º edn. Editora Icone, São Paulo, 606p. 2004.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 3º Editora Icone,. São Paulo, 686 p. 1997.

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.

FREITAS, J. P.; DE JESUS, I. L. R.; CHAVES, J. K. D. O.; GIJSEN, I. S., CAMPOS, D. R., BAPTISTA, D. P.; CHAVES, D. S. D. A. Eficácia e efeito residual dos óleos essenciais de *Illicium verum* (anis-estrelado) e *Pelargonium graveolens* (gerânio rosa) em pulgas de gato *Ctenocephalides felis felis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e009321, 2021.

WILSON, M. J. Gaugler, R.(Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. **BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 12, n. 6, p. 757-759, 2002.

GAUGLER, R. Biological control potential of neoaplectanid nematodes. **Journal of Nematology**, v. 13, n. 3, p. 241, 1981.

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.

GIUMELLI, R. D.; SANTOS, M. C. P. Convivência com animais de estimação: um estudo fenomenológico. **Revista da Abordagem Gestáltica: Phenomenological Studies**, v. 22, n. 1, p. 49-58, 2016.

GREWAL, P. S.; DE NARDO, E. B.; AGUILERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v.30, p.191-205, 2001.

GREWAL, P. S.; EHLERS, R.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Ed.). **Nematodes as biocontrol agents**. Cabi publishing, 2005.

GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **Journal Therm Biology**, v. 19, p. 245-253, 1994.

GUTEMA, F. D.; YOHANNES, G. W.; ABDI, R. D.; ABUNA, F.; AYANA, D.; WAKTOLE, H.; AGGA, G. E. *Dipylidium caninum* infection in dogs and humans in Bishoftu Town, **Ethiopia. Diseases**, Basel, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2020.

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

HENDERSON, G. et al. The effects of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) application to different life stages on adult emergence of the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouche). **Veterinary Dermatology**, v. 6, n. 3, p. 159-163, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <https://www.revistapetcenter.com.br/atualidades/ca%CC%83es-e-gatos-domesticos-sera%CC%83o-101-milho%CC%83es-no-brasil-em-2030/#:~:text=No%20%C3%BAltimo%20levantamento%20de%202018,41%2C6%20milh%C3%B3es%20de%20gatos>. Acesso em: 10 de dezembro de 2024.

INSTITUTO PET BRASIL. Censo Pet IPB 2021. [S.I.], [s.d.]. Disponível em: [https://www.crmvpb.org.br/aves-ocupam-segundo-lugar-no-ranking-de-animais-de-estimacao/#:~:text=Os%20dados%20s%C3%A3o%20do%20Censo,\(2%2C5%20milh%C3%B3es\)](https://www.crmvpb.org.br/aves-ocupam-segundo-lugar-no-ranking-de-animais-de-estimacao/#:~:text=Os%20dados%20s%C3%A3o%20do%20Censo,(2%2C5%20milh%C3%B3es).). Acesso em: 10 de dezembro de 2024.

JACOMO, V.; KELLY, P. J.; RAOULT, Didier. Natural history of *Bartonella infections* (an exception to Koch's postulate). **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 1, p. 8-18, 2002.

KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. **Manual of techniques in insect pathology**. Academic Press, p. 281-324, 1997.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 618-623, 1998.

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. E. 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.

LEWIS, E. E.; SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Changes in foraging behaviour during the infective stage of entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, v. 110, n. 5, p. 583- 590, 1995.

LIMA, E. A. S.; CAMPOS, D. R., SOARES, E. F. M. S.; FORTUNATO, A. B. R.; SILVA, T. M. E.; DE FIGUEIREDO PEREIRA, N.; COUMENDOUROS, K.. Insecticidal and repellent activity of essential oils from *Copaifera reticulata*, *Citrus paradisi*, *Lavandula hybrida* and *Salvia sclarea* against immature and adult stages of *Ctenocephalides felis felis* **Acta Parasitologica**, v. 69, n. 3, p. 1426-1438, 2024.

LINARDI, P. M. Capítulo 35: Siphonaptera Latreille, 1825. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia.** 2^a ed. Editora INPA 2024. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/40263>

LINARDI, P. M. Checklist dos siphonaptera do Estado do Mato Grosso do Sul. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 107, p. e2017148, 2017.

LINARDI, P. M. Checklist de Siphonaptera (Insecta) do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 607-617, 2011.

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.

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, p. 345-354, 2012.

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 RAR, B. H; ABOLAFIA J, M. A; BRUNO P, F. P; ARCE C. C. M; TURLINGS, T. C. J; BERNAL JS, K.; WAWERU B.; TOEPFER S. M.; R. MACHADO, R. et al. Multi-locus phylogenetic analyses uncover species boundaries and reveal the occurrence of two new entomopathogenic nematode species, *Heterorhabditis ruandica* n. sp. and *Heterorhabditis zacatecana* n. sp. **Journal of Nematology**. v. 53, p. 1-42, 2021.

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.

MEDEIROS, A. J. S.; CARVALHO, S. D. **Terapia assistida por animais a crianças hospitalizadas: revisão bibliográfica**. Unicamp – universidade estadual de campinas, 2014. Disponível em : <https://prp.unicamp.br/pibic/congressos/xvicongresso/paineis/058832.pdf>

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

MOLINA, J. P. A.; MOINO, A.; CAVALCANTI, R. S. Produção in vivo de nematoides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 347-354, 2004

MONTEIRO SOBRINHO, A. C. S.; DE SOUZA, A. C. F.; DA SILVA, D. P.; SOUZA, G. C.; COSTA, I. L. A.; MONTEIRO, J. L. L. N.; BITTENCOURT, A. J Evaluation of the effect of *Heterorhabditis bacteriophora* (HP88) on *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) larvae (Diptera: Muscidae) in sugarcane bagasse ash. **Revista Brasileira De Medicina Veterinária**, v. 45, p. e002123, 2023b.

MONTEIRO, A. D. C.; COSTA, I. L. A.; SOUZA, G. C.; LEAL; L. C. D. S. R.; MONTEIRO, J. L. L.; CHAMBARELLI, M. C. M. D. C.; BITTENCOURT, A. J. MONTEIRO SOBRINHO, A. C. et al. Infection and reinfection of *Stomoxys calcitrans* larvae (Diptera: Muscidae) by entomopathogenic nematodes in different times of exposure. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. 1, 2021.

MONTEIRO, A. D. C.; LEAL, L. C. D. S. R.; MONTEIRO, J. L. L.; CHAMBARELLI, M. C. M. D. C.; BITTENCOURT, A. J. Evaluation in vitro of the virulence of two entomopathogenic heterorhabditid nematodes in the control of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) larvae in byproducts of the sugar and alcohol industry. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 32, p. 1-8, 2023a.

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.; 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, S. G. (2011). Parasitologia na medicina veterinária (Vol. 1). Roca

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.

MONTEIRO, C.; COELHO, L.; DE PAULA, L. G. F.; FERNANDES, É. K. K.; DOLINSKI, C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DE AZEVEDO PRATA, M. C. MONTEIRO, 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, e 101313, 2020.

MOURA, V. E. Levantamento das espécies de pulgas em cães e gatos capturados no município de São Caetano do Sul-SP. 2008. 39f. (Monografia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP, 2008.

NEGRISOLI J.; A. S.; NEGRISOLI, C. R. C. B; SILVA, A. P. P. O. **Produção e armazenamento de nematoides entomopatogênicos**, 1º Ed. On-line. Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/>

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 steiner nematidae and heterorhabditidae (nemata: rhabditida). **Journal of Nematology**, v. 28, n. 3, p. 286-300, 1996.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: PARRA, J. R. P. et al. (org.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 125-142.

RAMOS, N. V. BARRETO, M. S. BARROS, L. A.; MENDES-DE-ALMEIDA, F. Endoparasites of household and shelter cats in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-15, 2020

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V., FENOLLAR, F.; DE LAMBALLERIE, X. A flea-associated Rickettsia pathogenic for humans. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 1, p. 73, 2001.

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. 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.

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.; DRYDEN, M. W. The biology, ecology, and management of the cat flea. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 451-473, 1997.

SAMISH, M.; ROT, A.; GINDIN, G.; MENT, D.; BEHAR, A.; GLAZER, I. SAMISH, Michael et al. Biocontrol of the cat flea, *Ctenocephalides felis*, by entomopathogenic nematodes and fungi. **Biological Control**, v. 149, p. 104301, 2020.

SAN-BLAS, E.; CAMPOS-HERRERA, R.; DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L. G.; STOCK, S. P. SAN-BLAS, E. et al. Entomopathogenic nematology in Latin America: A brief history, current research and future prospects. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.165, 2019.v. 165, p. 22-45, 2019.

SANTOS NETO, A. R. **Compatibilidade de inseticidas com nematoides entomopatogênicos**. 2023. 49f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, SP, 2023.

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

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

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.

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.

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 *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) em dieta de torta de filtro. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. Supl. 3, p. 9-13, 2016.

SOUZA, C. A. Fleas, flea allergy, and flea control: a review. **Dermatology Online Journal**. v.3. n. 2, 1997.

SOUZA, A. C. F. D.; SILVA, D. P. D.; MONTEIRO, A. D. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; BITTENCOURT, A. J.; CORREIA, T. R.; CHAMBARELLI, M. C. M. D. C. Evaluation of the efficacy of entomopathogenic nematodes on *Ctenocephalides felis felis* larvae (Siphonaptera: Pulicidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, n. 2, p. e019723, 2024.

SOUZA, A. M.; ALMONNY, N. R. P. Hemobartonelose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMONNY, N. R. P. (org.). **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda., 2002. cap. 5, p. 90-101.

SUNANDA B.S.; JEYAKUMAR P.; JACOB, V. V. Bioefficacy of different formulations of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* against Diamond back moth (*Plutella xylostella*) infesting Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). **Journal of Biopestic**, v. 7, p. 210-215, 2014.

TUNHOLI, V. M.; LORENZONI, P. O.; DA SILVA, Y. H.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; BOELONI, J. N.; DA SILVA, M. A.; MARTINS, I. V. F.; TUNHOLI, V. M. Molluscicidal potential of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for biological control of fasciolosis. **Journal Acta Tropica**, 173, 23-29, 2017.

ULVEDAL, C.; BERTOLOTTI, M. A.; CAGNOLO, S. R.; ALMIRÓN, W. R. ULVEDAL, C. et al. Ensayos de sensibilidad de larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* frente al nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en condiciones de laboratório. **Biomédica**, , v. 37, p. 67-76, 2017.v. 37(Supl.2), p.67-76, 2017.

VIDAL, M. L. B.; OLIVEIRA, A. G.; TUNHOLI, V. M.; DA SILVA, Y. H.; DO CARMO SPERÂNDIO, N.; DO COUTO CHAMBARELLI, M. C. M.; MARTINS, I. V. F. VIDAL, M.L.B. et al. Physiological alterations in *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.186, p.107676, 2021.

VOBIS, M..; D'HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. VOBIS, M. et al. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Parasitology research**, v. 91, n. 6, p. 467-470. 2003..

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