

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**EFICÁCIA *in vitro* DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE *Metarhizium
anisopliae* s.l. NO CONTROLE DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***

Michel Ruan dos Santos Nogueira

2014



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

EFICÁCIA *in vitro* DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE *Metarhizium anisopliae* s.l. NO CONTROLE DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus*

MICHEL RUAN DOS SANTOS NOGUEIRA

Sob a Orientação da Professora Dra.
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

E Coorientação do Dr.
Wendell Marcelo de Souza Perinotto

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

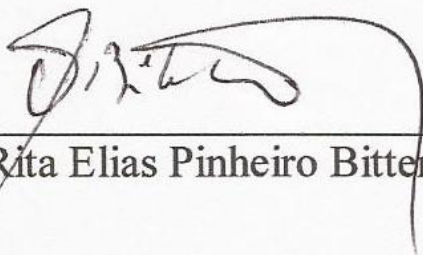
Seropédica, RJ
Setembro de 2014

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

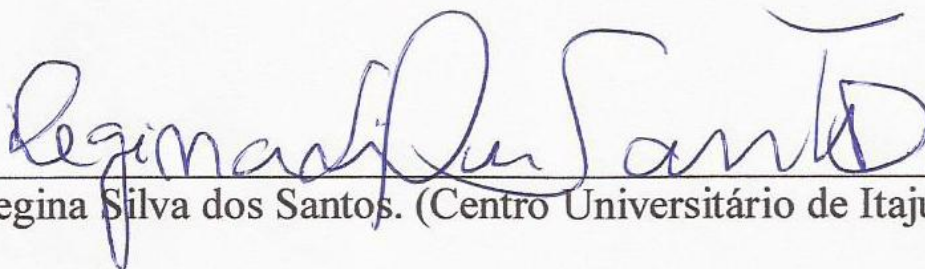
MICHEL RUAN DOS SANTOS NOGUEIRA

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

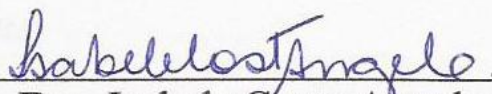
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24 / 09 / 2014



Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. UFRRJ (Orientadora)



Dra. Regina Silva dos Santos. (Centro Universitário de Itajubá)



Dra. Isabele Costa Angelo. (UFRRJ)

595.42

N778e

T

Nogueira, Michel Ruan dos Santos, 1989-

Eficácia in vitro de diferentes formulações de *Metarhizium anisopliae* s.l. no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* / Michel Ruan dos Santos Nogueira. - 2014.

59 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2014.

Bibliografia: f. 36-45.

1. Carrapato - Controle biológico - Teses. 2. *Metarhizium anisopliae* - Teses. 3. Acaricidas - Teses. 4. Fungos patogênicos - Teses. 5. Bovino - Parasito - Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Dedico este trabalho,

A Deus,

Aos meus pais, Rubens Tarcizio Nogueira e Zilda Ap^a Santos Nogueira,

A minha irmã Michely Aparecida Santos Nogueira,

A minha noiva Vanessa Cristina Souza Cortez,

Aos professores,

Aos colegas

E a todos que contribuíram para conclusão de mais uma etapa de minha vida.

Queira!

*Basta ser sincero e desejar profundo,
você será capaz de sacudir o mundo.*

Tente outra vez.

Tente!

E não diga que a vitória está perdida.

Se é de batalhas que se vive a vida,

tente outra vez.”

(Raul Seixas/ Paulo Coelho/ Marcelo Mota)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por estarem sempre presentes em minha vida, me dando força, saúde e sabedoria e por permitirem chegar até aqui, me guiando sempre.

Agradeço aos meus amados pais Rubens e Zilda, que sempre estiveram do meu lado, fazendo de tudo para o meu bem, sempre me apoiando e aconselhando, mostrando o melhor caminho, fazendo ser essa pessoa que sou hoje. Agradeço a eles pelo carinho incondicional e a educação que me deram, pois tudo do pouco que sou hoje devo a eles.

Agradeço a minha irmã Michely pelo carinho, pelos conselhos, pelas brigas de infância, tudo isso também me fez crescer, obrigado Mi.

Agradeço a minha noiva Vanessa, por todo seu amor, carinho, cumplicidade e paciência. Por ser minha confidente estando firme e me apoiando em todas as horas de minha vida. Te amo!

Agradeço a todos os professores do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em especial agradeço minha orientadora Professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança permitindo meu crescimento acadêmico e pessoal. Obrigado Prof^a Vânia por tornar um sonho realidade.

Agradeço ao meu co-orientador Professor Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto pela paciência, disponibilidade em sempre ajudar, pela presença e conselhos tanto em minha vida acadêmica quanto pessoal.

Agradeço a CAPES, pelos recursos ofertados, permitindo o adequado desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todos os professores da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá. De maneira especial quero agradecer a Prof^a Dra. Regina Silva dos Santos, ao Prof^o MSc. Rodolfo Malagó, ao Prof^o Dr. Délcio Bueno e ao Prof^o MSc. Manoel Leite pelos incentivos, ensinamentos, oportunidades e confiança depositada em mim.

Agradeço aos membros que compuseram a banca examinadora, as sugestões e correções abordadas enriqueceram ainda mais este trabalho.

Agradeço a todos meus colegas pelo apoio, convívio, troca de conhecimentos. De maneira especial quero agradecer:

Agradeço de coração aos “irmãos” do Laboratório de Controle Microbiano: Caio Balduino, Didi, Allan, Fillipe, Caio Monteiro, Mariana, Simone, Patrícia, Maria, Tamiris, Jéssica, Isabele Ângelo, Isabelle Campos, Aleana e Luciana. Obrigado pessoal pelo apoio imensurável, nunca esquecerei o que cada um fez por mim durante esta jornada.

Aos colegas de Mestrado: Caio, Marcinho, Camila, Juliana, Aline Quintanilha, Aline Moreno, Thiago, Tiago, Rosangela, Tamires, Tássia e Priscila pela paciência, compreensão e pela amizade construída.

Aos colegas de Alojamento: Gabriel, Rodrigo, Valmir, Gilsonley, David, Alan, Ivis, Diego, Hermes, Felipe, Elias, Samuel, Elcio, Davi, Paraná e Gideão. Obrigado gente pelo convívio, pela troca de conhecimentos e pela amizade construída.

Aos amigos do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores: Marquinhos, Claudinha, Dani, Renata, Maristela e Gabriela pela convivência e amizade construída.

Agradeço a todos os funcionários do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e da Estação Experimental W. O. Neitz, em especial ao Arthur, Ivan, Mauricio, “Sr. Gilson”, pela amizade e disponibilidade em sempre ajudar, em concretizar este sonho.

BIOGRAFIA

Michel Ruan dos Santos Nogueira, filho de Rubens Tarcizio Nogueira e Zilda Aparecida Santos Nogueira, nasceu na cidade de Itajubá-MG, no dia 13 de setembro de 1989. cursou o Ensino Fundamental na Escola Estadual Marquês de Sapucaí e Ensino Médio e Técnico na Fundação ROGE “Escola Técnica Limassis”, formando em Técnico em Pecuária no ano de 2007, ambos na cidade de Delfim Moreira-MG. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá (FEPI) em fevereiro de 2008. Durante toda graduação atuou participando de eventos locais e congressos, sendo no ano de 2011 selecionado como monitor do Laboratório de Parasitologia Animal, desenvolvendo estudos nas áreas de diagnóstico parasitológico e controle biológico de carrapatos com fitoterápicos. Em dezembro de 2012 obteve o título de Médico Veterinário. Em março de 2013 iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt e co-orientação do Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto.

RESUMO

NOGUEIRA, Michel Ruan dos Santos. **Eficácia *in vitro* de diferentes formulações de *Metarhizium anisopliae* s.l. no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2014.45p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é responsável por causar severos prejuízos ao agronegócio. Alternativas de controle são importantes para minimizar os efeitos causados pelo uso indiscriminado de acaricidas químicos. Assim, fungos artropodopatogênicos tornam-se promissores para a manutenção de níveis aceitáveis da população de carrapatos nos bovinos. Atualmente, existem no mercado produtos fúngicos com efeito inseticida reconhecido e com potencial para utilização no controle de carrapatos. Baseado nisso, o presente estudo avaliou a eficácia *in vitro* de Metarril SP Organic e Metarril SC Organic (Koppert Biological Systems®) para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os experimentos foram compostos por 13 grupos: quatro suspensões aquosas de Metarril SP Organic nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL; quatro formulações oleosas de Metarril SC Organic nas mesmas concentrações supracitadas; quatro grupos controle oleosos tratados com a concentração original do óleo vegetal emulsificável (oleoso 4) e com três diluições seriadas de 10 (oleoso 3), 100 (oleoso 2) e 1000 (oleoso 1) vezes e um grupo controle aquoso. Cada grupo continha dez fêmeas, que foram imersas por três minutos nas respectivas suspensões/formulações. No bioensaio com fêmeas ingurgitadas, observou-se os períodos de pré-postura, postura, incubação, eclosão e percentual de eclosão, os índices de produção de ovos e nutricional, a eficiência reprodutiva e o percentual de controle. No experimento com ovos avaliou-se o percentual de eclosão e os períodos de incubação e eclosão. No bioensaio com larvas avaliou-se o percentual de mortalidade em diferentes dias. A normalidade dos dados foi analisada. Para os dados paramétricos foi feita Análise de Variância seguida pelo teste de Tukey, para os não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, verificados com nível de significância de 5%. No ensaio com fêmeas ingurgitadas, Metarril SP Organic reduziu significativamente somente o período de postura na concentração de 10^9 conídios/mL, registrando percentual de controle de 28,6% em comparação ao controle aquoso. Entretanto, Metarril SC Organic foi capaz de reduzir significativamente o período de postura, índices de produção de ovos e nutricional, apresentando percentual de controle de 98,43% e 94,90%, na concentração de 10^9 conídios/mL, quando comparados aos controles aquoso e oleoso 4, respectivamente. No bioensaio com ovos, Metarril SP Organic a 10^9 conídios/mL e Metarril SC Organic na concentração 10^8 conídios/mL reduziram o percentual de eclosão de larvas em 4,9 e 2,7 vezes, respectivamente. Nos outros parâmetros avaliados sobre este estágio houve redução, porém não significativa. No experimento com larvas, no vigésimo dia após o tratamento, o produto Metarril SP Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL apresentou percentual de mortalidade de 74,80% e 97,50%, respectivamente. Já o produto Metarril SC Organic nas mesmas concentrações supracitadas alcançou 100% de mortalidade no décimo dia após o tratamento. A apresentação original do controle oleoso demonstrou efeito deletério para todas as etapas evolutivas de *R. microplus*. Os resultados do estudo revelaram que os produtos testados possuem potencial para serem utilizados no controle *in vitro* dos diferentes estágios de *R. microplus*, principalmente Metarril SC Organic proporcionando expectativas para futuros estudos.

Palavras-chave: controle biológico, fungos artropodopatogênicos, formulações fúngicas, carrapatos.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Michel Ruan dos Santos. *In vitro* efficacy of different formulations of *Metarhizium anisopliae* s.l. in control of *Rhipicephalus microplus*. 2014. 45p. Dissertation (Master of Science, Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Rhipicephalus microplus is responsible for causing severe damage to agribusiness. The development of alternative control methods is important to minimize the effects caused by the indiscriminate use of chemical acaricides. Biological control, using arthropodopathogenic fungi, is a promising option to maintain acceptable levels of tick populations in cattle. Currently, there are commercial fungal products with recognized insecticides effects and potential to be used for ticks control. Therefore, the present study evaluated the *in vitro* efficacy of two different products (Metarril SP Organic and Metarril SC Organic - Koppert Biological Systems[®]) for eggs, larvae and engorged females of *R. microplus*. Thirteen groups were formed: four aqueous suspensions Metarril SP Organic at concentrations of 10^6 , 10^7 , 10^8 and 10^9 conidia/mL; four oil formulations Metarril SC Organic in the same concentrations; four oil groups, compounds by the original concentration of the manufacturer (control 4) and three decimal dilutions of 10 (control 3), 100 (control 2) and 1000 (control 1) times and one group aqueous (sterile distilled water and Tween 80). Each group contained ten females, were immersed for three minutes in the suspensions/formulations. In biological assay with engorged females, periods of pre-laying, laying, incubation, hatching and percentage of hatching were observed; indexes: egg production and nutrition; reproductive efficiency and the percentage of control. The experiment with eggs was evaluated the hatching percentage, periods of incubation and hatching. Biological assay with larvae was evaluated the mortality percentage on different days. The test with engorged females Metarril SP Organic significantly reduced only the period of oviposition, at concentration of 10^9 conidia/mL, reaching maximum control percentage of 28.6% in comparison with aqueous control. However, Metarril SC Organic was able to significantly reduce the period of oviposition, egg production index and nutrient index, presenting control percentage of 98.43% and 98.40% at concentration of 10^9 conidia/mL, in comparison to aqueous and oil 4 control, respectively. The bioassay eggs, Metarril SP Organic 10^9 conidia/mL and Metarril SC Organic 10^8 conidia/mL, were able to reduce the percentage of egg hatch, the results were 36,0% and 20,0%, respectively. The other parameters evaluated on this stage were reduced, but not significant. On the twentieth day after treatment of larvae, the product Metarril SP Organic concentrations 10^8 and 10^9 conidia/mL, the percentage mortality of 74,80% and 97,50%. However, Metarril SC Organic the same concentrations above 100% mortality achieved on the tenth day after treatment. The original presentation of the oily control demonstrated deleterious effect for all the evolutionary stage of *R. microplus*. The results of study showed that the tested products have the potential to be used in the *in vitro* control of different stages of *R. microplus*, especially Metarril SC Organic providing expectations for further studies.

Keywords: biological control, arthropodopathogenic fungi, fungal formulations, ticks.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* avaliados no experimento.....17
- Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão do peso inicial da fêmea, peso da postura, período de pré-postura, período de postura e período de incubação de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP ou formulação oleosa do produto Metarril SC, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$23
- Tabela 3.** Valores médios e desvio padrão do período de eclosão, percentual de eclosão, índice de produção de ovos, índice nutricional e eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP ou formulação oleosa do produto Metarril SC, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$24
- Tabela 4.** Percentual de controle (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP ou formulação oleosa do produto Metarril SC, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$25
- Tabela 5.** Valores médios e desvio padrão do período de incubação, período de eclosão e percentual de eclosão de ovos oriundos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratados por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP ou formulação oleosa do produto Metarril SC, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$27
- Tabela 6.** Valores médios e desvio padrão do percentual de mortalidade no 5°, 10°, 15° e 20° dia após o tratamento de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP ou formulação oleosa do produto Metarril SC, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia de macho de <i>R. microplus</i> - A (face dorsal) e B (face ventral).....	4
Figura 2. Morfologia de fêmea de <i>R. microplus</i> - A (face dorsal) e B (face ventral).....	4
Figura 3. Esquema do ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	5
Figura 4. Microscopia eletrônica demonstrando o ciclo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i> no hospedeiro <i>Rhipicephalus microplus</i>	9
Figura 5. Produtos fornecidos pela empresa Koppert Biological Systems para experimentação <i>in vitro</i>	14
Figura 6. Conídios germinados de <i>M. anisopliae</i> utilizados em suspensão aquosa de Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/mL, 24 horas após o tratamento.....	19
Figura 7. Conídios germinados de <i>M. anisopliae</i> utilizados em formulação oleosa de Metarril SC na concentração 10^9 conídios/mL, 72 horas após o tratamento.....	19
Figura 8. Larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> após tratamento com óleo vegetal emulsificável (Controle oleoso 4).....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2	Métodos e estratégias de controle de <i>Rhipicephalus microplus</i>	6
2.2.1	Controle Químico	6
2.2.2	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	8
2.2.3	Controle Biológico de <i>R. microplus</i> Utilizando Fungos Artropodopatogênicos	9
2.3	Importância dos Fatores Abióticos	10
2.4	Formulação de Fungos Artropodopatogênicos	11
2.5	Seleção de Isolados com Potencial Acaricida e Alternativas de Aplicação	12
2.6	Produtos Comerciais a Base de Fungos Artropodopatogênicos	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Localização do Experimento	14
3.2	Obtenção e Manutenção das Colônias de <i>R. microplus</i>	14
3.3	Obtenção dos Produtos Comerciais à Base de <i>M. anisopliae</i>	14
3.4	Preparo das Suspensões e Formulações	15
3.4.1	Suspensão Aquosa de Metarril SP	15
3.4.2	Formulação Oleosa de Metarril SC	15
3.4.3	Diluição do Controle Oleoso	15
3.5	Delineamento Experimental	15
3.6	Viabilidade dos Conídios	15
3.7	Ensaio biológico com Fêmeas Ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	15
3.8	Ensaio Biológico com Ovos	16
3.9	Ensaio Biológico com Larvas	16
3.10	Análise Estatística	18
4	RESULTADOS	19
4.1	Viabilidade dos Conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	19
4.2	Ensaio Biológico com Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
4.2.1	Peso inicial das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	20
4.2.2	Peso da postura das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	20
4.2.3	Período de pré-postura das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	20
4.2.4	Período de postura das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	20
4.2.5	Período de incubação de ovos oriundos das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	21
4.2.6	Período de eclosão das larvas oriundas das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	21
4.2.7	Percentual de eclosão das larvas das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	21
4.2.8	Índice de produção de ovos das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	21
4.2.9	Índice nutricional das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	21
4.2.10	Eficiência reprodutiva das fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	21
4.2.11	Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	25
4.3	Ensaio Biológico com ovos de <i>R. microplus</i>	25
4.3.1	Período de incubação de ovos de <i>R. microplus</i>	26
4.3.2	Período de eclosão de larvas de <i>R. microplus</i>	26

4.3.3	Percentual de eclosão de larvas de <i>R. microplus</i>	26
4.4	Ensaio Biológico com larvas de <i>R. microplus</i>	28
4.4.1	Percentual de mortalidade de larvas <i>R. microplus</i>	28
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÕES	35
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, pois apresenta como hospedeiro preferencial esta espécie animal. Originário do continente asiático, este parasita difundiu-se pelos países tropicais e subtropicais através da importação de animais provenientes desta região.

O Brasil apresenta um rebanho bovino de aproximadamente 200 milhões de cabeças, sendo considerado um dos maiores do mundo, constituído pelo cruzamento entre raças zebuínas, taurinas e mestiças. Desta forma, animais com grau de sangue europeu apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento das fases parasitárias do carrapato *R. microplus*. Além do mais, as condições climáticas brasileiras de características tropicais favorecem a sobrevivência e o desenvolvimento dos ínstares não parasitários.

O parasitismo por ecto e endoparasitos é responsável por grande impacto na produtividade agropecuária brasileira, as perdas econômicas anualmente ultrapassam os 13 bilhões de dólares. Destes, *R. microplus* é o responsável por um prejuízo de 3,24 bilhões de dólares anuais, representando 23,2% das perdas totais. Os prejuízos desta ectoparasitose estão relacionados principalmente com a diminuição na produção de leite, aumento da mortalidade de animais, redução da natalidade, aumento na compra e/ou consumo de carrapaticidas, perda de peso, gastos com mão de obra, perda na qualidade do couro e transmissão de agentes patogênicos, limitando assim o desenvolvimento da pecuária mundial.

As práticas de controle de carrapatos são baseadas principalmente na utilização de produtos químicos, tendo como objetivos a diminuição da infestação nos animais e nas pastagens e a manutenção da estabilidade das hemoparasitoses. Entretanto, devido à falta de controle estratégico, muitas vezes pela falta de conhecimento por parte dos produtores, são realizados tratamentos excessivos ao longo do ano, favorecendo a ocorrência de resistência aos carrapaticidas químicos. Diante disto, observa-se redução gradativa na eficácia destes produtos sintéticos e na tentativa de contornar esta situação, muitos pecuaristas substituem o princípio ativo e reduzem o intervalo entre tratamentos, tendo estas ações efeitos temporários, ocasionando em resíduos químicos nos produtos e subprodutos de origem animal e na contaminação do meio ambiente.

Diante da utilização inadequada de produtos químicos, mais precisamente a partir da década de 90, aumentaram as buscas por novas formas de controle, podendo se destacar o uso de fitoterápicos e o uso de fungos artropodopatogênicos. Dentre a grande diversidade fúngica com ação sobre pragas destaca-se a espécie *Metarhizium anisopliae*, que apresenta ação biológica comprovada sobre vários estágios de desenvolvimento de espécies de artrópodes.

O mecanismo de ação dos fungos sobre as pragas alvo são extremamente dependentes das condições ambientais, como umidade, temperatura, luz, radiação ultravioleta, condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. A utilização destes agentes a campo é prejudicada pela interferência de tais condições supracitadas, entretanto, em condições laboratoriais, a ação dos fungos artropodopatogênicos no controle do carrapato *R. microplus* tem demonstrado resultados satisfatórios.

Algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de minimizar e/ou dificultar a interferência das variáveis que acometem a ação biológica dos fungos artropodopatogênicos, dando um interesse especial às formulações, destacando assim a utilização de óleos vegetais e minerais. O uso de formulações oleosas permite uma melhor ação dos fungos artropodopatogênicos, propiciando maior adesão dos conídios à superfície cuticular dos carrapatos, além de promover maior proteção contra os fatores ambientais. Diante disso, diferentes óleos vêm sendo testados em formulações fúngicas no controle microbiano de artrópodes.

Algumas indústrias especializadas na produção comercial de biopesticidas, como a fabricante dos produtos da linha Metarril® e Boveril®, tem integrado o cenário do biocontrole no Brasil, sendo os conídios fúngicos o composto ativo destes inseticidas biológicos.

Desta forma, o presente estudo faz parte da linha de pesquisa de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica e Veterinária realizada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, apresentando como objetivo avaliar a eficácia de diferentes concentrações fúngicas das formulações de Metarril SC Organic (Oleosa) e Metarril SP Organic (Aquosa) sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) é um ectoparasita de grande importância para a economia mundial atual. Popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, tem como hospedeiros preferenciais os bovinos, mas também pode utilizar outros mamíferos selvagens e domésticos, incluindo o homem, para o hematofagismo (FORTES, 2004).

Pertence ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). A partir de estudos morfológicos e moleculares que constatarem semelhança filogenética entre dois diferentes gêneros da Família Ixodidae, foi sugerida a reclassificação de *Boophilus* que passou a ser um subgênero de *Rhipicephalus*, passando a espécie a ser denominada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL; BAKER, 2003).

Originário do continente asiático, mais especificamente da Índia e da Ilha de Java (WHARTON, 1974), foi disseminado por vários países tropicais e subtropicais pela importação de animais infestados (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002). Atualmente na região neotropical, este ectoparasita apresenta-se distribuído numa vasta região que abrange do norte argentino ao México, incluindo as ilhas do Caribe e Antilhas (PEREIRA et al., 2008). Acredita-se que, no Brasil, a introdução tenha sido feita a partir da importação de animais comprados do Chile no início do século XVIII (GONZALES, 1995).

Morfologicamente, macho e a fêmea de *R. microplus* são caracterizados pelo escudo dorsal de coloração castanho-avermelhada; palpos curtos, espessos e angulosos; hipostômio com quatro séries de dentes recorrentes de cada lado; peritremas arredondados e coxa I bífida. Além disso, machos ainda apresentam apêndice caudal e quatro placas adanais (FORTES, 2004) (Figura 1 e 2). Antes do processo de ingurgitamento, machos e fêmeas podem apresentar dimensões de 2,5 mm de comprimento por 1,4 mm de largura. Posteriormente, fêmeas podem atingir até 13 mm de comprimento por 8 mm de largura (PEREIRA et al., 2008).

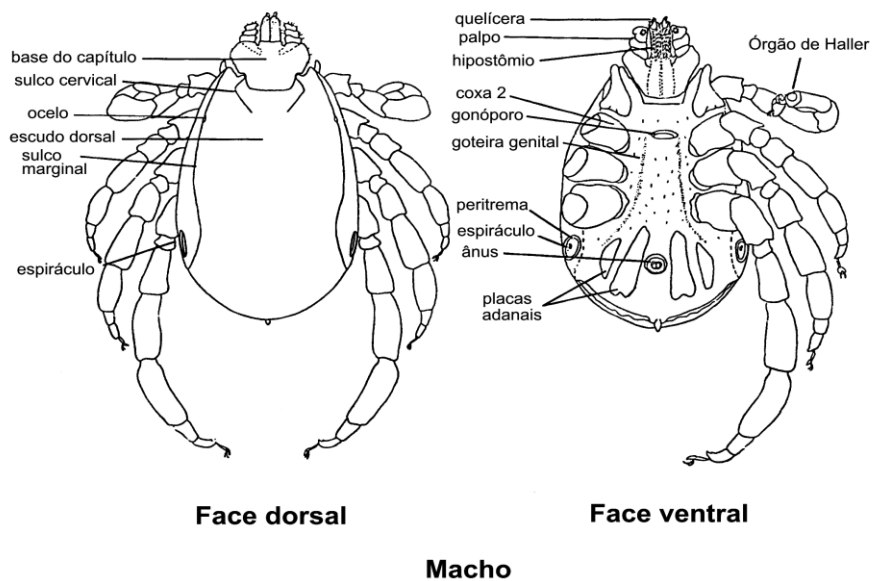


Figura 1. Morfologia de macho de *R. microplus* - A (face dorsal) e B (face ventral). (Wall; Shearer, 2001).

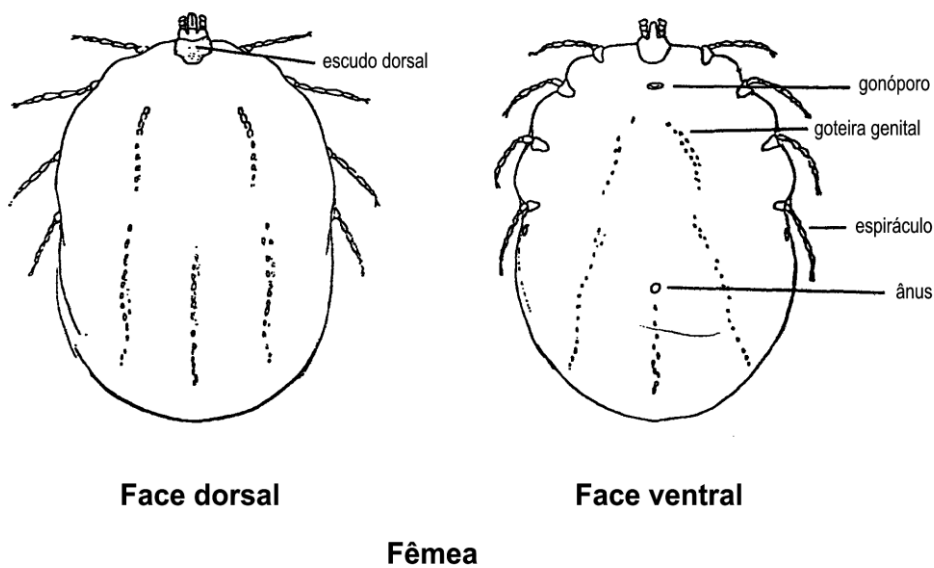


Figura 2. Morfologia de fêmea de *R. microplus* - A (face dorsal) e B (face ventral). (Wall; Shearer, 2001).

Em seu ciclo de vida, *R. microplus* necessita de apenas um hospedeiro (Figura 3). Apresenta duas fases distintas denominadas de parasitária (ocorre sobre a superfície corporal do hospedeiro) e não parasitária (ocorre no ambiente e não envolve hematofagia). A partir da cópula entre machos e fêmeas sobre o hospedeiro, fêmeas fertilizadas e completamente ingurgitadas desprendem-se da pele do hospedeiro e sob a ação da gravidade caem no solo. Após um período variável de dois a seis dias, iniciam a postura de aproximadamente 2000 a 3000 ovos, que permanecem aglutinados (FORTES, 2004). A massa total de ovos pode chegar a representar em torno de 52% do peso da fêmea (FURLONG, 1993). Após o período

de postura que gira em torno de 15 a 20 dias, a fêmea morre (quenógina) e os ovos passam por um período de incubação que corresponde desde a postura do primeiro ovo até a eclosão da primeira larva. O desenvolvimento dos ovos no ambiente é fortemente influenciado pela temperatura e umidade relativa do ar (UR), no qual ambientes que apresentem UR inferior a 60% são capazes de comprometer a viabilidade da postura e eclodibilidade das larvas. Em longos períodos de estiagem é possível observar uma redução na infestação das pastagens, por destruição dos ovos (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002).

As larvas recém-eclodidas medem cerca de 0,5 mm de comprimento e não têm capacidade infestante. Após quatro a seis dias, se tornam larvas infestantes e sobem pelas hastes do capim e aguardam a passagem do hospedeiro. Ao encontrarem hospedeiros, as larvas transferem-se para a superfície corporal do animal, dando início a fase parasitária que durará em média 21 dias. As larvas infestantes fixam-se preferencialmente nas regiões de pele mais fina como períneo, barbela, úbere, orelha e bolsa escrotal no qual nutrem-se de linfa, crescem e se desenvolvem sendo denominadas ninfas (FORTES, 2004).

O estágio ninfal dura em média oito dias, ocorrendo após este período, nova muda e surgindo assim machos e fêmeas impúberes (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002). O macho adulto é encontrado junto a fêmea, ocorrendo assim a cópula. Após a fertilização das fêmeas, estas continuam se alimentando até chegarem ao tamanho máximo de ingurgitamento, recebendo a denominação de teleógina. As teleóginas desprendem-se da pele do hospedeiro caem ao solo para a realização da postura de ovos e iniciarem a fase não parasitária do ciclo evolutivo (FORTES, 2004).

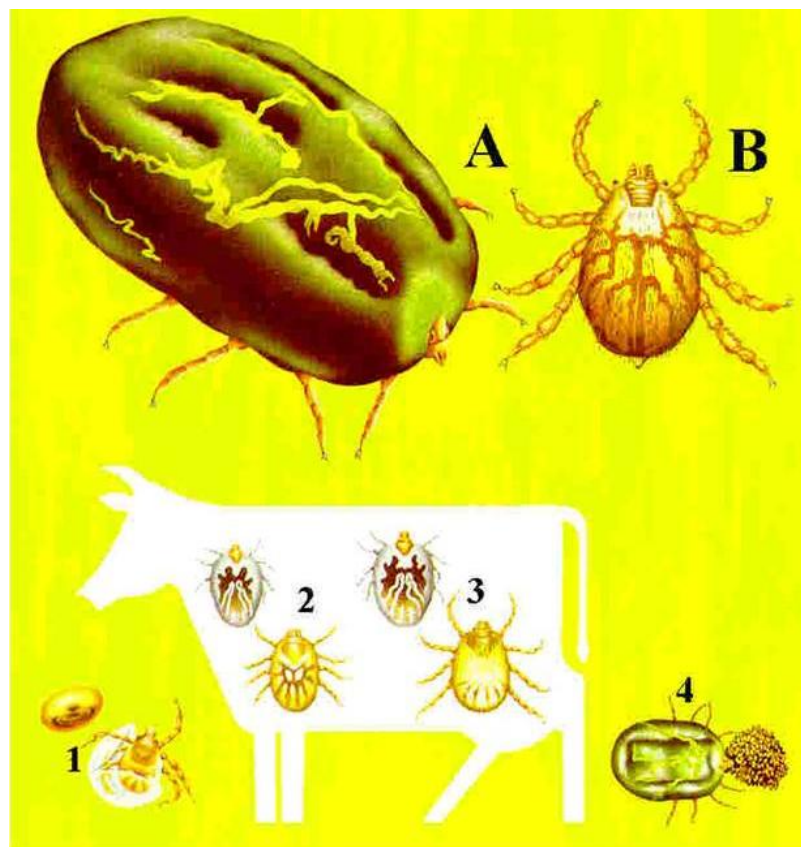


Figura 3. Esquema do ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. **A:** fêmea adulta; **B:** macho adulto **1:** eclosão da larva no ambiente; **2:** ninfas; **3:** adultos e **4:** fêmeas ingurgitadas realizando postura no ambiente. **Fonte:** <http://www.prevprag.blogspot.com.br>.

Devido às condições climáticas favoráveis do nosso país, o desenvolvimento deste parasita ocorre ao longo de todo ano, exceto nos períodos de estiagem prolongada e/ou baixas temperaturas, levando a ocorrência de três a quatro gerações de *R. microplus* anuais (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002).

A população do carrapato dos bovinos está distribuída de maneira não uniforme, no qual cerca de 95% dos parasitos estão no meio ambiente e apenas 5% estão sobre os animais (PEREIRA et al., 2008). O parasitismo realizado pode resultar em problemas como depreciação do couro, diminuição do escore corporal, transmissão de patógenos, predisposição a míases secundárias e principalmente redução da quantidade e qualidade dos produtos de origem animal (HORN; ARTECHE, 1985).

O rebanho nacional bovino possui aproximadamente 200 milhões de animais, distribuídos ao longo de oito milhões de quilômetros quadrados (MAPA, 2014). De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2014), o Brasil apresenta o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 185 milhões de cabeças, sendo exploradas tanto para a produção de carne como de leite e derivados. A agropecuária é uma atividade responsável por movimentar 43% do Produto Interno Bruto (PIB) agropecuário brasileiro, revelando sua grande importância para o país. O Brasil deixa de produzir anualmente 26 milhões de arrobas de carne e quatro bilhões de litros de leite, refletindo em um prejuízo superior a dois bilhões de reais (MARTINEZ et al., 2004). O prejuízo total ocasionado por *R. microplus* pode ser relacionado à 40% por perdas na produção de leite, 27% pela mortalidade de bovinos, 11% sobre o desempenho reprodutivo, 9% em gastos com a compra de carrapaticidas, 5% pela diminuição do ganho de peso, 5% em juros bancários e 3% pela má qualidade do couro e despesas no controle e prevenção das hemoparasitoses (BRITO, 2008). Além desses prejuízos, estipula-se que o produtor gaste anualmente R\$ 800 milhões com produtos químicos no controle dos parasitos (MARTINEZ et al., 2004).

Recentemente, Grisi et al. (2014) avaliaram o impacto econômico dos parasitos sobre os bovinos no Brasil e verificaram que as perdas ocasionadas por endo e ectoparasitos podem chegar a 13,96 bilhões de dólares por ano. Destes, *R. microplus* é o responsável por um prejuízo de 3,24 bilhões de dólares, representando 23,2% das perdas totais.

Neste contexto, o controle de *R. microplus* torna-se imprescindível. Porém, é uma prática bastante complexa por apresentar limitações como a falta de conhecimento dos produtores (ROCHA et al., 2006; AMARAL et al., 2011), alto número de larvas infestantes nas pastagens (KETTLE, 1995), ocorrência de intoxicação de mamíferos e seleção de cepas resistentes devido ao uso indiscriminado de acaricidas químicos (SAMISH et al., 2004).

2.2 Métodos e estratégias de controle de *Rhipicephalus microplus*

2.2.1 Controle Químico

No ano 1896, a utilização de acaricidas passou a ser realizada de forma sistemática, com o uso do arsênico no controle de carrapatos em bovinos. O uso foi liberado nos Estados Unidos a partir de 1910, criando um mercado internacional para este produto. Mas devido à resistência dos carrapatos ao arsênico na Austrália após o ano de 1937, o risco à saúde e as preocupações com resíduos, motivou-se o desenvolvimento de novos produtos como os organoclorados em 1946, ciclodienos e toxafeno em 1947, formamidinas em 1975, piretróides em 1977 e lactonas macrocíclicas em 1981 (ANDREOTTI, 2010).

No ano de 1975 foram lançadas as amidinas, tendo como características poder residual de 14 dias, permitindo um intervalo maior entre tratamentos. Essa droga penetra ativamente no carrapato e é metabolizada em metilformamidina, interferindo na postura de ovos das

teleógenas e apresenta toxicidade para todas as fases de vida, além de inibir enzimas do metabolismo do carrapato (LI et al., 2004).

Com a ocorrência de resistência dos carrapatos dos bovinos aos organofosforados, estimulou-se o uso extensivo de piretróides, sendo existentes pelo menos três subgrupos dessa família (deltametrina, cipermetrina e alfametrina) (GEORGE et al., 2008).

A grande revolução dos antiparasitários no mercado mundial surgiu no início da década de 1980, com o desenvolvimento das lactonas macrocíclicas, apresentando poder residual maior que os piretróides, além de serem eficazes no tratamento de uma ampla variedade de endo e ectoparasitos. Este grupo é produzido pela fermentação do fungo *Streptomyces avermitiles*, sendo existentes quatro subgrupos: ivermectina, moxidectina, doramectina e abamectina (FURLONG; MARTINS, 2000).

No Brasil, as práticas de controle de carrapatos são baseadas principalmente na utilização de produtos químicos, tendo como objetivos a diminuição da infestação dos animais e das pastagens e a manutenção da estabilidade das hemoparasitoses. Entretanto, devido à falta de controle estratégico, muitas vezes pela falta de conhecimento por parte dos produtores, são realizados tratamentos em número excessivo ao ano, favorecendo a ocorrência de resistência aos carrapaticidas químicos (ROCHA et al., 2006).

Os mecanismos de resistência de *R. microplus* a cada classe de acaricida não são completamente conhecidos, mas sabe-se que com o uso prolongado de um produto químico uma parte da população de carrapatos sobrevive. Esta capacidade pode ser conferida a uma população de carrapatos mesmo antes do contato prévio com os produtos, visto que alguns indivíduos são considerados naturalmente resistentes (ROUSH, 1993; FREITAS et al., 2005; JANER et al., 2010; ABBAS et al., 2014). Furlong et al. (2000) ressaltam a existência do gene alelo resistente, devido ao uso frequente e indiscriminado de carrapaticidas causando mutações em alguns indivíduos da população.

Na tentativa de contornar este problema, a substituição do princípio ativo e a redução no intervalo entre tratamentos são as estratégias utilizadas com grande frequência pelos produtores, tendo estas ações efeitos temporários (HEIMERDINGER, 2005), além do aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal e a contaminação ambiental (CHAGAS et al., 2002). A sociedade nos últimos anos tem se preocupado com a contaminação ambiental e também com a presença de resíduos químicos nos alimentos, aumentando assim a preferência por produtos orgânicos (CASTRO et al., 2009).

Deste modo, é crescente o número de estudos buscando métodos alternativos para o controle de pragas, inclusive *R. microplus* (MENDES, 2011). Diante disto, aumentaram as buscas por novas formas de controle, destacando o uso de vacinas (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002), produtos fitoterápicos (HERNANDEZ et al., 1987) e o uso de fungos artropodopatogênicos (BITTENCOURT et al., 1992). A utilização de vacinas para o controle do carrapato dos bovinos encontra-se em fase experimental (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002; PATARROYO et al., 2009; PARIZI et al., 2012; SEIXAS et al., 2012; LEW-TABOR et al., 2014). A flora brasileira é considerada a maior do mundo, possuindo aproximadamente 5.5000 espécies de plantas, mas estudos sobre efeitos terapêuticos são muito escassos, poucas informações são conhecidas sobre a composição química de 99,6% das plantas brasileira (DI STASI, 1996). Desta forma, têm se estudado a ação de fitoterápicos no controle de muitas pragas e/ou doenças (HERNANDEZ et al., 1987; AVANCINI, 1996; ARAÚJO, 2000; HEIMERDINGER, 2005; CASTRO et al., 2009).

Dentre a grande diversidade de fungos com ação artropodopatogênica destaca-se a espécie *Metarhizium anisopliae*, que apresenta ação biológica comprovada sobre vários estágios de desenvolvimento de espécies de artrópodes (BITTENCOURT et al., 1994).

2.2.2 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin 1883 é um fungo filamentososo de grande importância agroecológica mundial. Considerado de ocorrência cosmopolita, é amplamente utilizado para o controle de algumas pragas agrícolas. Comumente tem sido encontrado no solo, próximo as raízes das plantas ou em cadáveres de artrópodes (ZIMMERMANN, 2007a).

Pertencente ao Reino Fungi, Subreino Dikarya, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Clavicipitaceae, Gênero *Metarhizium*, Espécie *Metarhizium anisopliae* (HIBBETT et al., 2007; BISCHOFF et al., 2009), é considerado o responsável por causar uma doença denominada muscardine verde, no qual há registros acerca de 300 espécies de artrópodes diferentes acometidas (ALVES, 1998).

O primeiro relato de sua ocorrência foi registrado pelo pesquisador russo Metschnikoff em 1879. No caso em questão, o espécime foi denominado de *Entomophora anisopliae* a partir de um trabalho utilizando o fungo como agente controlador do besouro *Anisopliae austriaca*. No entanto, em 1883, Sorokin descreveu o fungo como o responsável pela ocorrência da muscardine verde, renomeando-o assim como *Metarhizium anisopliae* (TULLOCH, 1976).

Numa abordagem mais atual, Bischoff et al. (2009) promoveram uma nova classificação de *M. anisopliae*. Através da associação de um estudo morfológico e molecular, foi proposto a formação do complexo *Metarhizium anisopliae*, formado por nove diferentes espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. brunneum*, e duas novas espécies, *M. globosum* e *M. robertsii*. Além disto, foi sugerido que isolados que não estejam classificados segundo o estudo, devem ser referenciados como *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.).

A reprodução pode ocorrer de forma assexuada (anamórfica, no qual a nomenclatura permanece *M. anisopliae*) ou de forma sexuada (teleomórfica, recebendo o nome de *Metacordyceps* spp.) (SUNG et al., 2007). As colônias em crescimento apresentam-se inicialmente esbranquiçadas, podendo evoluir sequencialmente para amareladas e tornando-se esverdeadas durante a fase conidiogênica (BISCHOFF et al., 2009). Morfológicamente, seu micélio é hialino e septado, com conidióforos característicos e conídios normalmente uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e cilíndricos, enquanto as fiálides apresentam-se de forma clavada ou cilíndrica (ALVES, 1998).

Com relação à aplicabilidade, estudos demonstraram que *M. anisopliae* s.l. pode ser considerado seguro a diferentes espécies de animais, bem como ao homem e ao ambiente (ZIMMERMANN, 2007a).

O Brasil apresenta diversos programas de controle de pragas agrícolas envolvendo o uso de fungos artropodopatogênicos (ONOFRE et al., 2002), no qual cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), cigarrinha cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*), broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*), cupim da cana-de-açúcar (*Heterotermes* sp.), broca-dos-citros (*Diploschema rotundicolle*) e percevejo-do-colmo do arroz (*Tibraca limbativentris*) são as espécies de maior ação e importância dentro do programa nacional, visto que são utilizados produtos à base de *M. anisopliae* (ALVES, 1998). Faria e Wraight (2007) relataram que há disponível no mercado diversos produtos micopesticidas destinados ao controle de artrópodes, sendo 33,9% destes a base de *M. anisopliae*.

De maneira geral (Figura 4), o processo de infecção ocorre a partir do contato dos conídios do agente microbiano com o hospedeiro, dando-se início a fase de adesão sobre a superfície cuticular externa do artrópode. Nessa fase, diversos estímulos quimioestáticos e enzimáticos são realizados, permitindo assim a fixação e a ocorrência de uma fase germinativa, na qual se desenvolve uma estrutura diferenciada denominada de tubo

germinativo. Em sequência, ocorre uma dilatação da extremidade posterior do tubo germinativo com conseguinte formação do apressório (estrutura rica em enzimas de ação degradativa). A penetração se dá pela associação da pressão física exercida pela hifa com a ação enzimática sinérgica de proteases, lipases e quitinases na cutícula do hospedeiro. O fungo ao chegar à hemocele pode desenvolver uma estrutura adaptativa denominada de blastosporo. Ao encontrar condições adequadas de adaptação, estas estruturas diferenciam-se em hifas, que levam à morte do hospedeiro possivelmente por compressão dos órgãos internos, produção de metabólitos tóxicos e inanição. O processo finaliza-se com a exteriorização e produção de conídios na sua superfície corporal, levando a dispersão do agente para outros hospedeiros ou mesmo para o solo. A eficácia de todo o processo é dependente de condições favoráveis do ambiente como temperatura, umidade e pH ideais (ALVES, 1998; ZIMMERMAN, 2007).

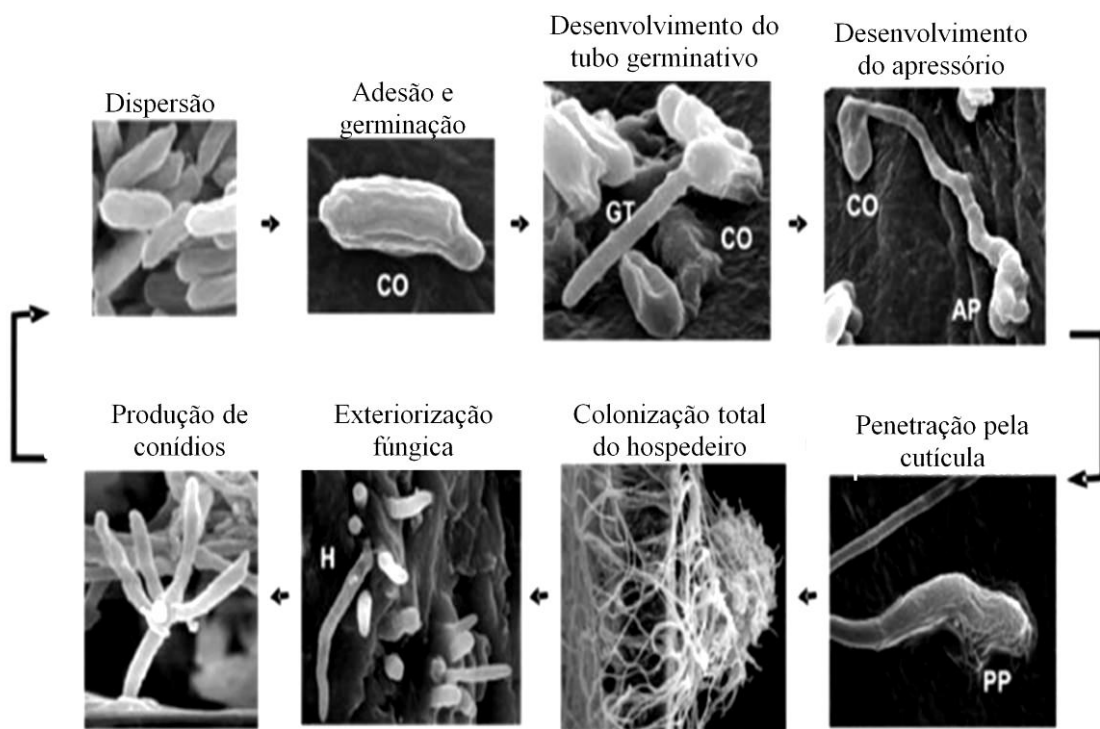


Figura 4. Microscopia eletrônica demonstrando o ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae* no hospedeiro *Rhipicephalus microplus*. **CO:** conídio; **GT:** tubo germinativo; **AP:** apressório; **PP:** penetração; **H:** hifa. (BEYS DA SILVA et al., 2013).

2.2.3 Controle Biológico de *R. microplus* Utilizando Fungos Artropodopatogênicos

Os fungos foram os primeiros microrganismos estudados no controle microbiano de insetos (ALVES, 1998). O primeiro registro do uso de um micoinseticida foi no ano de 1888 na Rússia. Naquela época, desconhecia-se o agente microbiano, mas através de estudos e observações, o espécime utilizado foi *Metarhizium anisopliae*, produzido em massa de cevada e que foi pulverizado no campo controlando uma praga conhecida como bicudo da beterraba, *Cleonus punctiventris* (LORD, 2005). Tais agentes microbianos são considerados patógenos de largo espectro, devida à capacidade de atacar insetos aquáticos, fitófagos e terrestres, causando naturalmente enfermidades sobre o hospedeiro em suas diferentes fases de desenvolvimento (ALVES, 1998).

Esses microrganismos apresentam grande diversidade genética, o que possibilita a seleção de isolados fúngicos de alto potencial para serem utilizados em controle biológico (QUINELATO et al., 2012). Atualmente, existe uma grande variedade de fungos com ação artropodopatogênica, sendo estes considerados potencialmente promissores por apresentarem capacidade de penetração pela cutícula de artrópodes, habilidade de matar a praga alvo em seus diferentes estágios de desenvolvimento e a relativa especificidade de virulência sobre um espécime ou pequeno grupo de pragas (GINSBERG et al., 2002).

Para o controle de carrapato *in vitro*, diferentes trabalhos têm demonstrado a eficácia de *M. anisopliae* para *Dermacentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *A. cajennense*; *Rhipicephalus sanguineus*, *R. appendiculatus* e *R. microplus* (BITTENCOURT et al., 1992; KAAYA et al., 1996; MONTEIRO et al., 1998; GARCIA et al., 2004; LOPES et al., 2007; PERINOTTO et al., 2013), sendo que no Brasil isolados de *M. anisopliae* s.l. já foram encontrados infectando naturalmente fêmeas de *R. microplus* (COSTA et al., 2002).

O processo e a dinâmica de infecção em *R. microplus* foi descrito e demonstrado por Bittencourt et al. (1995; 1999), indicando que a penetração ocorria exclusivamente de forma ativa pela superfície cuticular externa e não por outras quaisquer vias de penetração como pelos espiráculos respiratórios, via vaginal e/ou via oral. Além disto, foi observado a capacidade proliferativa de *M. anisopliae* na hemocele e na superfície de órgãos do carrapato.

Como consequência da infecção, é possível observar alterações nos períodos de postura, índice de produção de ovos, período de incubação, período e percentual de eclosão de ovos (BITTENCOURT et al., 1992; BITTENCOURT et al., 1995; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

2.3 Importância dos Fatores Abióticos

Pelo fato dos fungos agirem sobre a cutícula da praga alvo, tornam-se mais expostos às intempéries ambientais (ROBERTS; YENDOL, 1971). A ação negativa conferida aos fatores bióticos e abióticos sobre a patogenicidade destes microrganismos empregados no biocontrole de artrópodes pode ser superada com o método de preparo do produto, através de formulações (CAMARGO, 2011).

A temperatura considerada ideal para o desenvolvimento dos fungos com ação artropodopatogênica varia entre 25 e 35°C (COONEY; EMERSON, 1964). Segundo Fargues et al. (1992), para o crescimento micelial de *M. anisopliae*, a temperatura adequada varia entre 37 e 40°C, embora para a germinação dos conídios, a temperatura média deva estar entre 25 ± 1°C (ALVES, 1998). Entretanto, no mesmo ano, Yip et al. (1992) verificaram uma considerável variação na germinação de conídios de *M. anisopliae* em diferentes temperaturas e entre distintos isolados da mesma espécie. Além disto, a temperatura média do microclima em que os biopesticidas serão utilizados interfere diretamente na eficácia do tratamento (POLAR et al., 2005). O trabalho realizado por estes autores, avaliou a interferência de diferentes temperaturas da superfície corpórea de bovinos sobre dois isolados de *M. anisopliae* no controle de *R. microplus*, no qual verificou-se que ambos os isolados diminuiram a população de carrapatos, quando comparados ao controle, sendo que um isolado foi mais eficiente que o outro.

A umidade do ambiente pode alterar a germinação dos conídios, auxiliando ou dificultando a ação dos agentes microbianos (LAZZARINI et al., 2006). Em geral, fungos filamentosos necessitam de alta umidade relativa do ar para desenvolverem seu processo de infecção (ALVES, 1998). Entretanto, Zimmermann (2007b) observou crescimento do fungo *Beauveria bassiana* em umidade atmosférica entre 60% e 70%, sendo estas consideravelmente baixas.

A radiação solar é considerada um dos mais importantes fatores abióticos para a aplicabilidade do controle microbiano. A luz solar formada por raios UV-A e UV-B apresenta variações de acordo com hora do dia, estação do ano, altitude e condições atmosféricas (ROBERTS; FLINT, 2002). Rangel et al. (2004) retratam que conídios de *M. anisopliae* produzidos sobre cadáveres de insetos foram mais sensíveis à radiação UV-B quando comparados àqueles produzidos em BDA (batata, dextrose e agar) acrescido de levedura.

Assim, a adição de substâncias protetoras na formulação fúngica como óleos de origem animal ou vegetal, bem como a seleção de isolados que apresentem melhor capacidade adaptativa aos diferentes fatores abióticos são medidas necessárias para que a implementação deste método alternativo seja considerada viável e eficaz no campo.

2.4 Formulação de Fungos Artropodopatogênicos

A formulação de isolados fúngicos proporciona garantias de aplicabilidade através da proteção contra os fatores abióticos presentes no meio ambiente. Os conídios quando adicionados em espalhantes adesivos facilmente dispersam-se em água, porém apresentam eficiência comprometida em umidade e temperatura consideradas inadequadas (JAMES et al., 1998).

A adição de óleo mineral e/ou vegetal à formulação tem como objetivo proteger e melhorar a ação conidial sobre a superfície da praga alvo (ALVES, 1998). Além disso, suspensões oleosas apresentam melhores resultados quando comparados com tratamentos realizados com suspensões aquosas (PRIOR et al., 1988; MARANGA et al., 2005). A utilização de formulações oleosas permite maior adesão dos conídios à superfície dos carrapatos, além de promover proteção contra a radiação solar (SOUZA, 2003).

Diante disso, diferentes óleos vêm sendo testados em formulações fúngicas de *M. anisopliae* no controle de artrópodes, como exemplos, o óleo de amendoim no controle de larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas das espécies *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* (KAAYA; HASSAN, 2000), óleo de coco em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (POLAR et al., 2005), óleo de girassol e óleo mineral sobre os estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (KAAYA et al., 2011; CAMARGO et al., 2012; CAMARGO et al., 2014).

A ação artropodopatogênica do fungo *Lecanicillium lecanii* sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* também obteve uma melhor eficiência com o emprego de formulação oleosa, ocasionando a morte das fêmeas ingurgitadas antes do início da postura de ovos (ANGELO et al., 2010).

Camargo et al. (2012) avaliaram em condições laboratoriais a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre os estágios de desenvolvimento do carrapato dos bovinos, comparando o efeito entre formulações oleosas contendo 10%, 15% e 20% de óleo mineral e suspensão aquosa, todas na concentração 10^8 conídios/mL. As formulações oleosas obtiveram uma melhor ação sobre as fases de desenvolvimento de *R. microplus*, quando comparadas com a suspensão fúngica aquosa.

A eficiência de produtos comerciais no controle de ninfas do carrapato *Amblyomma cajennense* foi avaliada por Lopes et al. (2007) utilizando suspensões pó molhável do isolado ESALQ-PL63 de *B. bassiana* (Boveril WP) e formulação concentrada de óleo emulsionável do isolado ESALQ-1037 de *M. anisopliae* (Metarril SC). A formulação concentrada de óleo emulsionável mostrou uma maior patogenicidade sobre as larvas do carrapato *A. cajennense*, causando 100% de mortalidade no 6º dia após o tratamento, diferentemente, a suspensão de pó molhável de *B. bassiana* ocasionou uma mortalidade apenas de 40% ao décimo dia após o tratamento.

Entretanto, Polar et al. (2005) ressaltaram que alguns óleos podem afetar o processo de germinação dos conídios, dificultando assim a ação dos agentes microbianos, entretanto experimentos utilizando óleo de coco, óleos comerciais e parafina líquida demonstraram que o fungo *M. anisopliae* pode ter sua eficácia aumentada através das formulações empregadas.

2.5 Seleção de Isolados com Potencial Acaricida e Alternativas de Aplicação

É crescente o número de estudos indicando micro-organismos com potencial efetivo no biocontrole dos principais parasitos que interferem nos índices econômicos e sanitários, incluindo o carrapato dos bovinos (JENKINS, 1964; MWANGI et al., 1991, BITTENCOURT et al., 1992; SAMISH et al., 2004).

A patogenicidade e a virulência podem variar em indivíduos do mesmo gênero e até da mesma espécie, sendo de extrema importância realizar testes de ensaio biológico na tentativa de se obter isolados mais adaptados ao ambiente de trabalho (MENDES, 2011).

Correia et al. (1998) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações do isolado E9 de *M. anisopliae* s.l. sobre *R. microplus* de bovinos estabulados, demonstrando excelente eficiência e com percentual registrado de fêmeas infectadas de 97,7% um dia após o tratamento. Já Lubeck et al. (2008) avaliaram o potencial de diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. para o controle biológico do carrapato *R. microplus*, no qual seis isolados foram considerados patogênicos e os isolados E6, CG 47 e CG 97 foram os mais virulentos.

A associação de fungos artropodopatogênicos com produtos químicos também é viável, apresentando resultados satisfatórios e elucidando o auxílio que estes micro-organismos podem fornecer aos pesticidas sintéticos, uma vez que o desenvolvimento destes biopesticidas não é afetado (BAHIENSE et al., 2006; POSADAS; LECUONA, 2009; SHUMACHER; POEHLING, 2012). Entretanto, mais estudos nesse aspecto devem ser realizados na tentativa de determinar a real eficácia da associação de diferentes métodos de controle para carrapatos.

Testes de estábulos utilizando o fungo artropodopatogênico *M. anisopliae* para o controle do carrapato *R. microplus* também vêm demonstrando bons resultados. Bahiense et al. (2007) constataram mortalidade média de 33% de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos submetidas ao tratamento na concentração de 8×10^8 conídios/mL em suspensão aquosa. Já Camargo et al. (2014) após avaliação do produto comercial Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral verificaram uma eficácia de aproximadamente 47%.

O fungo *M. anisopliae* s.l tem evidenciado resultados interessantes a campo. ALONSO-DIAZ et al., (2007) constataram eficácia média de 45% após tratamento com suspensão fúngica aquosa. Kaaya et al., (2011), observaram redução de 83% no número total de carrapatos *R. microplus* após tratamentos de bovinos por pulverização com este biocontrolador formulado em 20% de óleo de girassol.

2.6 Produtos Comerciais a Base de Fungos Artropodopatogênicos

A produção de produtos comerciais a base de fungos, com ação sobre insetos e ácaros vem sendo desenvolvida mundialmente desde os anos 60 (FARIA et al., 2007). Neste mesmo estudo, os autores realizaram levantamento e listaram todos os produtos micoinseticidas e micoacaricidas comercializados em todo mundo e constataram a existência de 171 formulações comerciais de pelo menos 12 espécies de fungos inseticidas e/ou acaricidas. Quatro espécies mais utilizadas foram consideradas as mais importantes como ingredientes ativos, sendo *M. anisopliae* 33,9%, *B. bassiana* 33,9%, *Isaria fumosorosea* 5,8% e *Beauveria brongniartii* 4,1% do total dos produtos comercializados.

Os países da América do Sul representam 42,7% de todos os produtos à base de fungos produzidos em todo mundo, seguido por países da América do Norte 20,5%, europeus 12,3%, asiáticos 12,3%, América Central 7,0%, África 2,9% e Oceania 2,3%, sendo que deste total apenas três produtos são indicados para a utilização em carrapatos (FERNANDES et al., 2012)

O controle biológico no Brasil conta com algumas indústrias especializadas na produção comercial de biopesticidas, como por exemplo, a empresa Koppert Biological Systems com os produtos da linha Metarril[®] e Boveril[®]. Estes inseticidas biológicos apresentam como ingrediente ativo esporos dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* respectivamente, sendo estes microrganismos encontrados na natureza causando doença e morte em alguns insetos. Segundo indicação dos fabricantes, os bioinseticidas são indicados principalmente para controle de pragas agrícolas, como por exemplo, cigarrinhas da cana de açúcar e das pastagens. Entretanto, em condições laboratoriais estes produtos vêm apresentando também ação acaricida (PERINOTTO et al., 2012; CAMARGO et al., 2012).

Em testes *in vivo* realizados em bovinos estabulados, o produto avaliado contendo conídios de *M. anisopliae* mostrou ser eficaz no controle do carrapato dos bovinos (CAMARGO et al., 2014).

A maioria das indústrias produtoras de biopesticidas a base de fungos sugerem que a aplicação dos produtos possa ser semelhante à utilização de pesticidas químicos, porém a produção em massa pode limitar a vida útil e encarecer o produto final (SHELTON; ROUSH, 2000). Nos últimos anos, muitas questões vêm sendo abordadas como, por exemplo, a eficácia, as tendências de mercado futuro e as normas para regulamentação dos pesticidas biológicos (FARIA et al., 2007). Algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de minimizar e/ou dificultar a interferência das variáveis que acometem a ação biológica dos fungos artropodopatogênicos, dando um interesse especial às formulações, ocorrendo assim à utilização de óleos vegetais e minerais (LEEMON; JONSSON, 2008; KAAYA et al., 2011; CAMARGO et al., 2012; CAMARGO et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do Experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes, localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, entre Abril de 2013 e Junho de 2014. Os ensaios biológicos foram repetidos duas vezes.

3.2 Obtenção e Manutenção das Colônias de *R. microplus*

Os espécimes de *R. microplus* utilizados no experimento foram obtidos através de infestação artificial, em bovinos mestiços, machos, com peso e idade aproximados. Estes animais foram mantidos em baias individuais localizadas na EPPWON. Ao decorrer de 21 dias da infestação iniciou-se a queda das fêmeas ingurgitadas, sendo estas coletadas do piso das baias. Em seguida, no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes, foram imersas durante três minutos em hipoclorito de sódio a 1% para higienização da cutícula e secas com papel toalha. Algumas destas fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri e mantidas em câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ para a obtenção de ovos e larvas. Enquanto outras foram divididas em grupos com peso homogêneo e submetidas aos tratamentos pertinentes.

3.3 Obtenção dos Produtos à Base de *M. anisopliae* s.l.

Os produtos utilizados nos experimentos foram cedidos pela empresa Koppert Biological Systems. Para este estudo foram utilizadas duas formulações à base de conídios de *M. anisopliae*: Metarril SC Organic (Formulação Concentrada de Óleo Vegetal Emulsificável, isolado ESALQ E9) disponível pronta para uso na concentração de 1×10^9 conídios/mL, e Metarril SP Organic (Esporos Concentrados, composto pelo isolado ESALQ E9), que é apresentado na forma de pó para ser suspenso em água, contendo uma concentração de $2,2 \times 10^{10}$ conídios/grama (Figura 5).



Figura 5. Produtos fornecidos pela empresa Koppert Biological Systems para experimentação *in vitro*. **A:** Produto Metarril SC Organic (formulação concentrada de óleo vegetal emulsificável). **B:** Produto Metarril SP Organic (esporos concentrados).

3.4 Preparo das Suspensões e Formulações

3.4.1 Suspensão Aquosa de Metarril SP Organic

Para o preparo das suspensões aquosas, o produto foi suspenso em água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%, homogeneizado em aparelho tipo Vórtex e quantificado com auxílio de microscópio óptico em câmara de Neubauer, de acordo com a metodologia de Alves (1998). A suspensão inicial foi ajustada a uma concentração de 10^9 conídios/mL, sendo as demais obtidas a partir de diluições decimais seriadas até 10^6 conídios/mL.

3.4.2 Formulação Oleosa de Metarril SC Organic

O produto utilizado é produzido na concentração inicial de 10^9 conídios/mL. Para obtenção das demais concentrações experimentais, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^6 conídios/mL, tendo como diluente solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%.

3.4.3 Diluição do Controle Oleoso

Para o controle oleoso, a empresa fabricante forneceu o óleo vegetal emulsionável utilizado como base para a formulação de Metarril SC Organic. Foram formados quatro grupos: um com a concentração original do produto (controle oleoso 4) e os demais através de diluições decimais seriadas, com diluições de 10 (controle oleoso 3), 100 (controle oleoso 2) e 1000 (controle oleoso 1) vezes do produto. Os diluentes utilizados para a formação dos grupos foram água destilada estéril acrescida de Tween 80 a 0,001%.

3.5 Delineamento Experimental

Foram formados 13 grupos, cada um com dez unidades experimentais. Quatro destes grupos foram submetidos ao tratamento com as respectivas concentrações de Metarril SC Organic 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL; quatro com Metarril SP Organic 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL; quatro com as diferentes concentrações do controle oleoso e um grupo controle tratado com água destilada estéril acrescida de 0,01% de Tween 80 (Figura 6).

3.6 Viabilidade dos Conídios

Alíquotas de 10 μ L das suspensões e/ou formulações utilizadas neste experimento foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) acrescido de cloranfenicol a 0,5% e permaneceram sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ durante 24, 48 e 72 horas. O cálculo da viabilidade foi feito segundo a metodologia descrita por Alves (1998).

3.7 Ensaio Biológico com Fêmeas Ingurgitadas de *R. microplus*

As fêmeas ingurgitadas foram pesadas individualmente e divididas em 13 classes homogêneas com pesos variando entre 0,200 e 0,300 gramas, baseada na fórmula de Yule (SAMPAIO, 2002). De modo aleatório, foi escolhida uma fêmea de cada classe para a formação dos respectivos grupos. Após a formação dos grupos, cada fêmea foi pesada, identificada e submersa por três minutos em um mL da suspensão e/ou formulação do seu respectivo tratamento. Após o tratamento, as fêmeas foram fixadas em placas de Petri com o

auxílio de fita dupla face, em decúbito dorsal permanecendo sob temperatura de 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$.

Cada fêmea tratada teve sua postura coletada, pesada e armazenada individualmente. Os ovos foram acondicionados em frascos de vidro, vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada a temperatura de 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, para posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas.

Para avaliar o efeito das suspensões e formulações dos produtos e comparar a eficácia, foram analisados os parâmetros biológicos descritos na Tabela 1.

3.8 Ensaio Biológico com Ovos

Para a realização deste experimento, a postura das fêmeas ingurgitadas até o décimo dia foi separada em alíquotas de 50 mg de ovos e colocadas em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo. Para o ensaio, foi acrescentado em cada tubo, um mL do respectivo tratamento e os ovos ficaram submersos durante três minutos. Posteriormente, os tubos foram invertidos para que o excesso de suspensão e/ou formulação fosse absorvido pelo algodão que os vedava. Os tubos foram mantidos em câmara climatizada nas mesmas condições supracitadas no bioensaio com fêmeas ingurgitadas. Os parâmetros biológicos analisados foram: Período de Incubação (P.I.), Período de Eclosão (P.E.) e Percentual de Eclosão das Larvas (P.E.L.).

3.9 Ensaio Biológico com Larvas

Alíquotas de 50 mg de ovos foram separadas obtendo-se após eclosão, larvas para a realização do experimento. Para este ensaio biológico, tubos cuja eclosão larval foi menor que 95 %, foram excluídos da experimentação. A metodologia utilizada para larvas foi semelhante à adotada no bioensaio com ovos. O parâmetro biológico avaliado foi o Percentual de Mortalidade das Larvas (P.M.L.), observado a cada cinco dias até o 20º dia após o tratamento.

Tabela 1. Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* avaliados no experimento.

Peso Inicial da Fêmea (P.I.F.)	Peso individual de cada fêmea ingurgitada antes do tratamento.
Período de pré-postura (P.P.P.)	Número de dias entre a data da coleta da fêmea ingurgitada e o início da postura.
Peso da postura (P.T.M.O.)	Peso total da massa de ovos.
Período de postura (P.P.)	Número de dias entre o início e o final da postura.
Período de incubação (P.I.)	Número de dias entre o início da postura e o início da eclosão das larvas.
Período de eclosão (P.E.)	Número de dias entre o início e o final da eclosão das larvas.
Percentual de eclosão das larvas (P.E.L.)	Quantidade de larvas eclodidas em relação ao total de ovos.
Peso da quenógena (P.Q.)	Peso da fêmea após três dias do término da postura.
Índice de produção de ovos (I.P.O.) (BENNETT, 1974)	$\frac{\text{peso da massa de ovos(g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times 100$
Índice nutricional (I.N.) (BENNETT, 1974)	$\frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso teleógena (g) - peso quenógena (g)}} \times 100$
Eficiência reprodutiva (E.R.) (DRUMMOND et al., 1971)	$\frac{\text{peso da massa de ovos(g)}}{\text{peso teleógena (g)}} \times \% \text{ eclosão}$
Percentual de controle (P.C.) (DRUMMOND et al., 1971)	$\frac{\text{média E.R. (CTR) - média E.R. (TTO)}}{\text{média E.R. (CTR)}} \times 100$

3.10 Análise Estatística

Os dados paramétricos passaram pela Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey e para os não paramétricos foi adotado o Teste de Kruskal Wallis, seguido pelo Teste de Dunn, sendo todos verificados com um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade dos Conídios de *Metarhizium anisopliae*

Os conídios do produto Metarril SP Organic mantidos a 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ apresentaram 100% de germinação em até 24 horas em todas as concentrações testadas (Figura 7). Diferentemente, os conídios do produto Metarril SC Organic conservados sob as mesmas condições supracitadas, apresentaram 100% de germinação em até 72 horas. Este resultado indica que o óleo utilizado na formulação comercial Metarril SC Organic atrasou o processo de germinação dos conídios, entretanto, não afetou a viabilidade e a capacidade destes serem utilizados nos experimentos, conforme pode ser visualizado na figura 8.

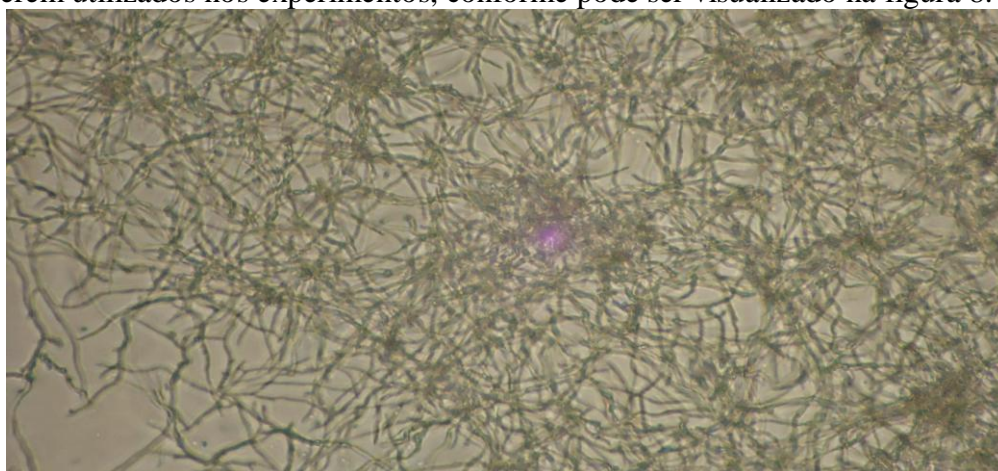


Figura 6. Conídios germinados de *M. anisopliae* utilizados em suspensão aquosa de Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/mL, 24 horas após tratamento.

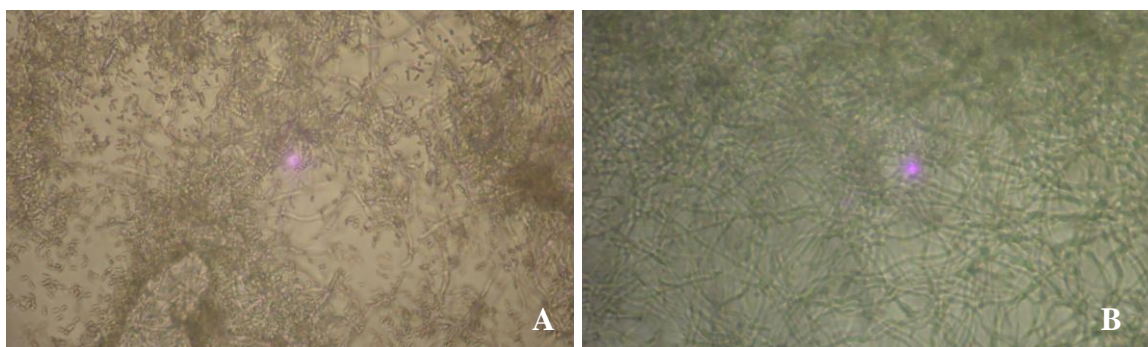


Figura 7. Conídios germinados de *M. anisopliae* utilizados em formulação oleosa Metarril SC na concentração 10^9 conídios/mL. **A.** Viabilidade 24 horas após tratamento, grande quantidade de conídios não germinados, **B.** Viabilidade 72 horas após tratamento.

4.2 Ensaio Biológico com Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

A formulação oleosa de Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL e o óleo vegetal emulsificável em sua apresentação original (controle oleoso 4) foram capazes de ocasionar morte de algumas unidades experimentais antes da postura de ovos, desta forma reduziram o número de amostras, inviabilizando a introdução destes grupos nas análises estatísticas de alguns parâmetros biológicos avaliados.

4.2.1 Peso inicial das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O peso inicial das fêmeas ingurgitadas empregadas nos experimentos não variou estatisticamente entre os grupos controles e os grupos tratados tanto com as suspensões aquosas de Metarril SP Organic quanto com as formulações oleosas de Metarril SC Organic (Tabela 2). Neste caso, todas as alterações ocorridas nos demais parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* podem ser atribuídas a ação dos conídios de *M. anisopliae* presentes tanto nas suspensões aquosas quanto nas formulações oleosas.

4.2.2 Peso da postura das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O produto Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídio/mL reduziu o peso da massa de ovos das fêmeas tratadas em 25,82, 24,40, 27,05 e 25,92 vezes quando comparado aos grupos controle aquoso e controle oleoso 1, 2 e 3, respectivamente, entretanto, não diferiu significativamente do grupo controle oleoso 4. O produto Metarril SC Organic na concentração 10^8 conídio/mL também reduziu significativamente o peso da massa de ovos quando comparado aos grupos controle aquoso, controle oleoso 1, 2 e 3 e o grupo tratado com Metarril SP Organic na concentração 10^7 conídio/mL, entretanto não diferiu dos demais grupos analisados. O produto Metarril SP Organic em todas concentrações avaliadas não diferiram dos grupos controle aquoso e oleosos 1,2 e 3 (Tabela 2).

4.2.3 Período de pré-postura das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O período de pré-postura não sofreu alteração significativa entre os grupos controles e os grupos tratados com as suspensões e/ou formulações fúngicas testadas. O grupo tratado com a formulação de Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL foi removido da estatística por não apresentar número de amostras suficiente, devido mortalidade causada por este grupo antes da ovipostura (Tabela 2).

4.2.4 Período de postura das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O período de postura não foi afetado estatisticamente entre os grupos controles e os grupos tratados com a suspensão aquosa de Metarril SP Organic nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL e também com a formulação oleosa de Metarril SC Organic nas concentrações 10^6 e 10^7 conídios/mL (Tabela 2). Entretanto, houve redução significativa entre os grupos tratados com Metarril SC Organic e Metarril SP Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL, respectivamente. O grupo tratado com a formulação de Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL foi removido da estatística por não apresentar número de amostras suficiente (Tabela 2).

4.2.5 Período de incubação dos ovos oriundos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O período de incubação dos ovos provenientes das fêmeas ingurgitadas tratadas não foi alterado por nenhuma das suspensões/formulações de Metarril utilizadas. Os grupos controle oleoso 4 e Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL foram removidos da estatística (Tabela 2).

4.2.6 Período de eclosão das larvas oriundas das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O período de eclosão das larvas não sofreu alteração com nenhum dos tratamentos testados. Os grupos controle oleoso 4 e Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL foram removidos da estatística (Tabela 3).

4.2.7 Percentual de eclosão das larvas oriundas das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

Não foi observada diferença significativa no percentual de eclosão das larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas tratadas com todas as quatro concentrações de ambos os produtos testados. Os grupos controle oleoso 4 e Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL foram removidos da estatística (Tabela 3).

4.2.8 Índice de produção de ovos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

Foi verificada uma diminuição significativa no índice de produção de ovos de fêmeas ingurgitadas tratadas com o produto Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL quando comparado aos demais grupos. No entanto, o grupo controle oleoso 4 também causou redução significativa neste parâmetro. A formulação Metarril SC Organic na concentração 10^8 conídios/mL reduziu significativamente este parâmetro quando comparada aos grupos controle aquoso, controle oleoso 1, 2 e 3, Metarril SP Organic na concentração 10^6 conídios/mL e Metarril SC Organic nas concentrações 10^6 e 10^7 conídios/mL, como demonstrado na Tabela 3. Cabe salientar a grande redução ocasionada pela formulação Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL, que diminuiu este parâmetro mais de vinte vezes quando comparado aos controles aquoso e oleosos 1, 2 e 3 (Tabela 3).

4.2.9 Índice nutricional das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O grupo tratado com a formulação de Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL e o grupo controle oleoso 4 apresentaram índices nutricionais de 4,94 e 16,50%, respectivamente, valores significativamente inferiores aos observados nos demais grupos, que apresentaram valores variando entre 51,43 e 74,86% (Tabela 3).

4.2.10 Eficiência reprodutiva das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

A formulação de Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL reduziu significativamente a eficiência reprodutiva das fêmeas ingurgitadas em comparação aos demais grupos testados, tendo reduzido este parâmetro 63,46 vezes quando comparado ao grupo controle aquoso. A formulação de Metarril SC Organic contendo 10^8 conídios/mL reduziu significativamente a eficiência reprodutiva das fêmeas em comparação aos grupos controles aquoso e oleoso 1, 2, 3 e ao grupo tratado com Metarril SP Organic na concentração 10^6 conídios/mL, porém não diferiu significativamente dos grupos controle oleoso 4, Metarril

SP Organic 10^7 , 10^8 10^9 conídios/mL e Metarril SC Organic 10^6 e 10^7 conídios/mL, conforme evidenciado na Tabela 3.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do peso inicial da fêmea, peso da postura, período de pré-postura, período de postura e período de incubação de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP Organic ou formulação oleosa do produto Metarril SC Organic, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Peso Inicial da Fêmea (g)	Peso da Postura (g)	Período de Pré-Postura (dias)	Período de Postura (dias)	Período de Incubação (dias)
Controle Aquoso	0,253 \pm 0,003 a	0,1472 \pm 0,02 a	3,6 \pm 0,52 a	10,0 \pm 2,31 a	23,7 \pm 0,48 a
Controle Oleoso 1	0,251 \pm 0,003 a	0,1391 \pm 0,01 a	4,0 \pm 0,47 a	10,4 \pm 1,90 a	23,5 \pm 0,71 a
Controle Oleoso 2	0,252 \pm 0,003 a	0,1542 \pm 0,03 a	4,0 \pm 0,50 a	10,6 \pm 1,00 a	23,4 \pm 0,73 a
Controle Oleoso 3	0,255 \pm 0,003 a	0,1478 \pm 0,02 a	4,0 \pm 0,67 a	11,0 \pm 0,47 a	23,6 \pm 0,52 a
Controle Oleoso 4	0,249 \pm 0,003 a	0,0327 \pm 0,05 b	3,8 \pm 1,98 a	10,5 \pm 1,38 a	20,33 \pm 11,74 (n=5)
Metarril SP 10^6	0,252 \pm 0,003 a	0,1301 \pm 0,03 ac	3,6 \pm 0,52 a	10,0 \pm 2,83 a	24,9 \pm 1,91 a
Metarril SP 10^7	0,252 \pm 0,003 a	0,1316 \pm 0,02 a	3,6 \pm 0,52 a	6,4 \pm 1,26 a	24,7 \pm 2,11 a
Metarril SP 10^8	0,252 \pm 0,003 a	0,1204 \pm 0,04 ac	3,4 \pm 0,52 a	6,4 \pm 1,26 a	24,7 \pm 1,89 a
Metarril SP 10^9	0,251 \pm 0,003 a	0,1081 \pm 0,02 ac	3,5 \pm 0,53 a	4,4 \pm 0,52 b	24,1 \pm 0,88 a
Metarril SC 10^6	0,251 \pm 0,003 a	0,1378 \pm 0,05 ac	3,6 \pm 0,53 a	10,1 \pm 1,76 a	23,4 \pm 0,73 a
Metarril SC 10^7	0,253 \pm 0,002 a	0,1349 \pm 0,02 ac	3,5 \pm 0,53 a	8,5 \pm 2,22 a	23,5 \pm 0,53 a
Metarril SC 10^8	0,258 \pm 0,003 a	0,0989 \pm 0,02 c	3,7 \pm 1,00 a	4,5 \pm 0,73 b	23,2 \pm 0,83 a
Metarril SC 10^9	0,252 \pm 0,002 a	0,0057 \pm 0,01 b	4,0 \pm 0,82 (n=4)	2,5 \pm 1,00 (n=4)	17,0 \pm 6,93 (n=4)

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão do período de eclosão, percentual de eclosão, índice de produção de ovos, índice nutricional e eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP Organic ou formulação oleosa do produto Metarril SC Organic, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Período de Eclosão (dias)	Percentual de Eclosão (%)	Índice de Produção de Ovos (%)	Índice Nutricional (%)	Eficiência Reprodutiva (%)
Controle Aquoso	10,8 ± 4,89 a	90,80 ± 10,51 a	59,97 ± 10,68 a	73,52 ± 15,89 a	55,85 ± 13,97 a
Controle Oleoso 1	9,60 ± 4,38 a	89,40 ± 16,59 a	57,36 ± 3,00 a	74,86 ± 3,01 a	54,54 ± 3,92 a
Controle Oleoso 2	12,00 ± 1,58 a	94,66 ± 4,47 a	55,38 ± 20,10 a	68,85 ± 25,12 a	54,96 ± 6,61 a
Controle Oleoso 3	11,02 ± 1,03 a	94,40 ± 4,77 a	57,99 ± 3,60 a	70,71 ± 5,82 a	54,73 ± 4,11 a
Controle Oleoso 4	13,4 ± 2,51 (n=5)	71,50 ± 36,17 a	12,23 ± 19,16 b	16,50 ± 24,77 b	17,39 ± 23,38 bc
Metarril SP 10^6	14,60 ± 4,84 a	93,30 ± 7,90 a	53,13 ± 6,39 a	61,94 ± 5,40 a	52,96 ± 5,06 a
Metarril SP 10^7	12,80 ± 1,14 a	91,20 ± 9,94 a	52,06 ± 5,07 ac	72,91 ± 17,77 a	42,80 ± 12,05 ab
Metarril SP 10^8	13,30 ± 2,98 a	92,60 ± 8,90 a	46,82 ± 16,22 ac	62,86 ± 22,47 a	40,90 ± 15,25 ab
Metarril SP 10^9	13,10 ± 3,48 a	93,80 ± 4,16 a	42,96 ± 6,98 ac	61,85 ± 7,62 a	39,88 ± 8,28 ab
Metarril SC 10^6	12,00 ± 4,12 a	92,77 ± 5,47 a	54,62 ± 19,38 a	71,00 ± 17,98 a	50,60 ± 17,98 ab
Metarril SC 10^7	14,60 ± 2,80 a	88,88 ± 16,44 a	53,57 ± 7,27 a	69,51 ± 9,03 a	48,22 ± 12,81 ab
Metarril SC 10^8	15,11 ± 3,41 a	93,33 ± 4,82 a	33,23 ± 14,39 c	51,43 ± 19,71 a	28,02 ± 13,63 b
Metarril SC 10^9	4,24 ± 1,89 (n=4)	33,75 ± 4,79 (n=4)	2,60 ± 6,83 b	4,94 ± 11,07 b	0,88 ± 2,77 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

4.2.11 Percentual de controle das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

O produto Metarril SP Organic apresentou percentual de controle, em relação ao grupo controle aquoso, variando entre 5,18 e 28,60%. O produto Metarril SC Organic se mostrou mais eficiente no controle das fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, atingindo um percentual de controle em relação ao grupo controle aquoso de 98,43% com a concentração de 10^9 conídios/mL (Tabela 4).

O percentual de controle das formulações de Metarril SC Organic foi calculado em relação à respectiva diluição do controle oleoso, ou seja, o efeito do óleo foi eliminado. Desta forma, o produto Metarril SC Organic nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL apresentou percentual de controle igual a 7,00, 12,00, 48,80 e 94,90%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de controle (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP Organic ou formulação oleosa do produto Metarril SC Organic, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

Grupos	Percentual de Controle CTR AQ ^a	Percentual de Controle CTR OL 1 ^b	Percentual de Controle CTR OL 2 ^c	Percentual de Controle CTR OL 3 ^d	Percentual de Controle CTR OL 4 ^e
Controle Aquoso	--	--	--	--	--
Controle Oleoso 1	2,35	--	--	--	--
Controle Oleoso 2	1,59	--	--	--	--
Controle Oleoso 3	3,42	--	--	--	--
Controle Oleoso 4	68,86	--	--	--	--
Metarril SP 10^6	5,18	--	--	--	--
Metarril SP 10^7	23,38	--	--	--	--
Metarril SP 10^8	26,78	--	--	--	--
Metarril SP 10^9	28,60	--	--	--	--
Metarril SC 10^6	9,41	7,00	--	--	--
Metarril SC 10^7	13,67	--	12,00	--	--
Metarril SC 10^8	49,83	--	--	48,80	--
Metarril SC 10^9	98,43	--	--	--	94,90

^a Percentual de controle calculado em relação ao grupo controle aquoso.

^b Percentual de controle calculado em relação ao grupo controle oleoso 1.

^c Percentual de controle calculado em relação ao grupo controle oleoso 2.

^d Percentual de controle calculado em relação ao grupo controle oleoso 3.

^e Percentual de controle calculado em relação ao grupo controle oleoso 4.

4.3 Ensaio Biológico com Ovos de *R. microplus*

O produto Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL foi eficaz sobre esta fase de desenvolvimento de *R. microplus*, pois não permitiu a eclosão das larvas após o tratamento. O grupo controle oleoso 4 (óleo emulsificável em sua composição original) também afetou a eclosão larval. Desta forma, estes dois grupos não foram submetidos à análise estatística, por apresentarem número de amostras insuficientes para a realização dos testes (Tabela 5).

4.3.1 Período de incubação de ovos de *R. microplus*

A suspensão de Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/ml aumentou significativamente o período de incubação dos ovos provenientes das fêmeas de *R. microplus* tratadas quando comparada aos grupos controle aquoso, controle oleoso 1, 2 e 3, Metarril SP Organic nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL e Metarril SC Organic na concentração 10^7 conídios/mL (Tabela 5).

4.3.2 Período de eclosão das larvas de *R. microplus*

O período de eclosão das larvas oriundas de ovos do carrapato *R. microplus* foi reduzido significativamente pela suspensão de Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/ml, quando comparado aos grupos controle aquoso, controle oleoso 1, 2 e 3, Metarril SP Organic nas concentrações 10^6 e 10^8 conídios/mL e Metarril SC Organic na concentração 10^7 conídios/mL (Tabela 5).

4.3.3 Percentual de eclosão de larvas de *R. microplus*

As formulações de Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/mL e Metarril SC Organic na concentração 10^8 conídios/mL reduziram o percentual de eclosão das larvas em 4,9 e 2,7 vezes, respectivamente, quando comparadas ao controle aquoso (Tabela 5). O produto Metarril SC Organic utilizado na concentração 10^7 conídios/mL reduziu significativamente o percentual de eclosão das larvas quando comparado ao grupo controle aquoso, entretanto, não diferiu dos grupos controle oleosos 1, 2 e 3, Metarril SP Organic nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL e Metarril SC Organic na concentração 10^6 conídios/mL (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão do período de incubação, período de eclosão e percentual de eclosão de ovos oriundos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratados por imersão em suspensão em suspensão aquosa do produto Metarril SP Organic ou formulação oleosa do produto Metarril SC Organic, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Período de Incubação (dias)	Período de Eclosão (dias)	Percentual de Eclosão (%)
Controle Aquoso	24,80 \pm 1,14 a	14,70 \pm 0,95 a	98,00 \pm 1,70 a
Controle Oleoso 1	24,60 \pm 0,84 a	15,30 \pm 0,95 a	89,40 \pm 3,44 ac
Controle Oleoso 2	25,50 \pm 0,71 a	15,50 \pm 0,71 a	93,00 \pm 3,17 ac
Controle Oleoso 3	24,80 \pm 0,63 a	14,80 \pm 0,92 a	93,00 \pm 4,04 ac
Controle Oleoso 4	27,6 \pm 0,89 (n=5)	10,8 \pm 1,10 (n=5)	19,0 \pm 2,24 (n=5)
Metarril SP 10^6	24,70 \pm 0,95 a	15,40 \pm 0,84 a	86,00 \pm 3,94 ad
Metarril SP 10^7	25,30 \pm 0,48 a	14,80 \pm 0,63 ab	84,00 \pm 5,16 ad
Metarril SP 10^8	24,90 \pm 0,99 a	15,20 \pm 0,92 a	74,00 \pm 3,945 ad
Metarril SP 10^9	28,40 \pm 1,84 b	10,70 \pm 2,31 b	20,00 \pm 6,24 b
Metarril SC 10^6	25,60 \pm 0,70 ab	14,50 \pm 0,71 ab	85,0 \pm 3,33 ad
Metarril SC 10^7	24,70 \pm 0,95 a	15,20 \pm 0,92 a	82,00 \pm 4,12 cd
Metarril SC 10^8	26,60 \pm 1,58 ab	12,6 \pm 2,76 ab	36,00 \pm 10,33 b
Metarril SC 10^9	0,0 (n=10)	0,0 (n=10)	0,0 (n=10)

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

4.4 Ensaio Biológico com Larvas de *R. microplus*

4.4.1 Percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus*

O percentual de mortalidade das larvas do carrapato *R. microplus* sofreu alterações com ambos os produtos avaliados, porém o produto Metarril SC Organic mostrou ser mais eficiente, pois ocasionou a morte das larvas do carrapato dos bovinos em menor tempo (Tabela 6).

A concentração 10^6 conídios/mL dos produtos Metarril SC Organic e Metarril SP Organic apresentou menor ação sobre as larvas de *R. microplus*. O grupo tratado com o controle oleoso na concentração original, apresentou efeito deletério sobre as larvas, ocasionando ao final do experimento alto índice de mortalidade (Tabela 6).

Foi verificada, no quinto dia após o tratamento, diferença estatística no percentual de mortalidade das larvas tratadas com a suspensão de Metarril SP Organic na concentração de 10^9 conídios/mL, causando 7,2% de mortalidade, porém o produto Metarril SC Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL ocasionaram um percentual ainda maior, 89,40 e 98,45%, respectivamente. O controle oleoso em concentração original também mostrou efeito sobre as larvas no quinto dia após o tratamento, conforme demonstrado na Tabela 6.

As formulações de Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/mL, Metarril SC Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL e controle oleoso 4 causaram mortalidade acima de 95% das larvas no 15º dia após o tratamento. Os grupos Metarril SP Organic nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL e Metarril SC Organic nas concentrações 10^6 e 10^7 conídios/mL apresentaram mortalidade variando entre 20,8 e 68,3% quinze dias após o tratamento. Os controles aquoso e oleoso 1, 2 e 3 apresentaram baixa ou nenhuma mortalidade das larvas no mesmo dia de avaliação (Tabela 6).

Ao final do experimento com larvas, no vigésimo dia após o tratamento, ficou constatado que ambas formulações de Metarril, com as diferentes concentrações utilizadas, causaram mortalidade significativa das larvas de *R. microplus*, quando comparadas aos grupos controle aquoso e controles oleosos 1, 2 e 3. Entretanto, no grupo controle oleoso 4 foi observada mortalidade semelhante a mortalidade observada nos grupos tratados com ambas as formulações de Metarril SC Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL (Tabela 6). No entanto, quando comparados com seus respectivos controles oleosos, eles são diferentes, ou seja, a mortalidade pode ser atribuída à ação fúngica. O grupo controle oleoso 4 manteve os espécimes presos as gotículas de óleo (Figura 9). Os grupos tratados com Metarril SP Organic apresentaram mortalidade crescente diretamente proporcional às concentrações fúngicas testadas, como observado na Tabela 6. Os grupos tratados com Metarril SC Organic nas concentrações 10^6 e 10^7 conídios/mL apresentaram mortalidades das larvas de 23,80 e 46,60%, respectivamente (Tabela 6).

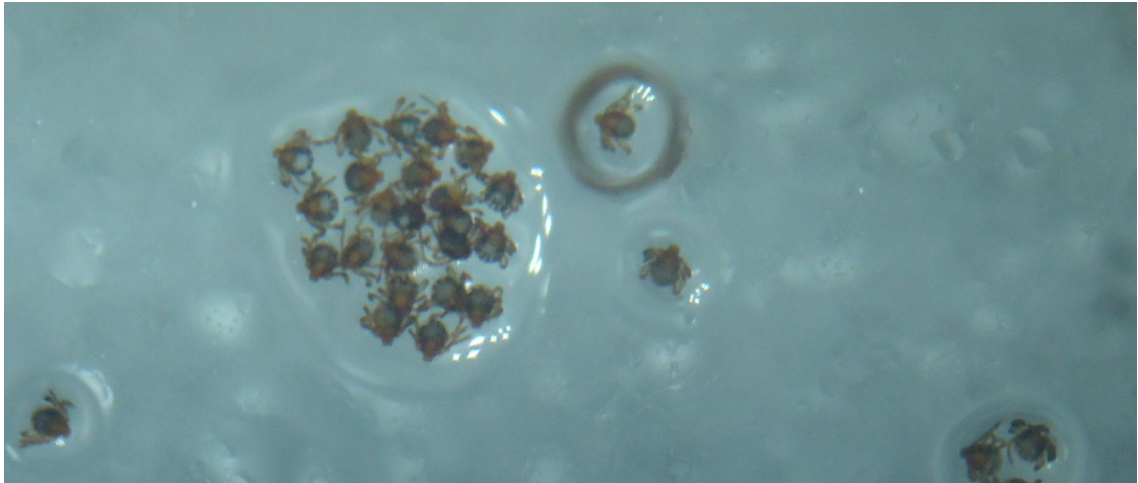


Figura 8. Larvas de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com óleo vegetal emulsificável (Controle oleoso 4). Nota-se o englobamento dos espécimes pelo óleo, comprometendo assim, a sobrevivência dos mesmos.

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão do percentual de mortalidade no 5º, 10º, 15º e 20º dia após o tratamento de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa do produto Metarril SP Organic ou formulação oleosa do produto Metarril SC Organic, ambos nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	5º DIA	10º DIA	15º DIA	20º DIA
Controle Aquoso	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
Controle Oleoso 1	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
Controle Oleoso 2	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
Controle Oleoso 3	0,00 ± 0,00 a	1,2 ± 1,03 a	5,20 ± 5,02 a	5,20 ± 5,02 a
Controle Oleoso 4	27,00 ± 9,48 b	99,20 ± 1,54 c	99,30 ± 1,56 d	99,30 ± 1,56 de
Metarril SP 10^6	0,00 ± 0,00 a	8,50 ± 5,79 b	20,80 ± 12,41 bc	21,30 ± 11,93 c
Metarril SP 10^7	0,00 ± 0,00 a	14,00 ± 6,99 b	43,50 ± 17,32 bc	44,50 ± 14,99 b
Metarril SP 10^8	0,9 ± 0,87 a	39,50 ± 29,10 b	68,30 ± 25,22 b	74,80 ± 24,38 d
Metarril SP 10^9	7,2 ± 0,87 c	46,00 ± 25,14 b	96,50 ± 6,68 d	97,50 ± 4,85 e
Metarril SC 10^6	0,00 ± 0,00 a	9,30 ± 2,21 b	23,20 ± 3,01 c	23,80 ± 2,97 c
Metarril SC 10^7	0,00 ± 0,00 a	33,50 ± 19,15 b	45,00 ± 24,03 bc	46,60 ± 26,12 b
Metarril SC 10^8	89,40 ± 8,51 d	100,00 ± 0,00 c	100,00 ± 0,00 d	100,00 ± 0,00 e
Metarril SC 10^9	98,45 ± 0,35 e	100,00 ± 0,00 c	100,00 ± 0,00 d	100,00 ± 0,00 e

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$)

5 DISCUSSÃO

O processo de resistência dos carrapatos frente aos principais grupos químicos de acaricidas tem sido relatado ao longo dos anos (ROUSH, 1993; FREITAS et al., 2005; JAMER et al., 2010; LOVIS et al., 2013; ABBAS et al., 2014). Desta forma, torna-se importante o emprego de meios alternativos para o controle de pragas. Samish et al., (2004) relataram que os carrapatos apresentam numerosos inimigos naturais, como bactérias, nematoides e fungos, sendo estes últimos considerados os mais promissores, destacando os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. O desenvolvimento de formulações eficazes é fundamental para o controle biológico do carrapato, visto que o processo de infecção fúngica nos artrópodes ocorre principalmente pela cutícula (BITTENCOURT et al., 1999) e assim, os fungos ficam expostos às condições ambientais adversas.

A partir da análise da viabilidade dos conídios, foi possível verificar que ambas as apresentações de Metarril estavam aptas a serem utilizadas, pois apresentaram 100% de germinação. Entretanto, vale ressaltar que a formulação oleosa de Metarril SC Organic germinou mais lentamente quando comparada a suspensão aquosa de Metarril SP Organic. Resultados similares foram observados por Camargo et al. (2012) que, ao estudarem a viabilidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em formulações oleosas e suspensões aquosas, verificaram que as formulações oleosas demoraram 48 horas para atingir 100% de germinação, enquanto que as suspensões aquosas demoraram 24 horas. De acordo com Polar et al. (2005), os conídios de *M. anisopliae* formulados em óleo de coco a 10% apresentaram germinação de 68% em 24 horas e de 100% após 48 horas de incubação. Provavelmente, o atraso na germinação ocorre devido aos componentes presentes na formulação oleosa, entretanto não interferem na viabilidade dos conídios.

A utilização de fungos artropodopatogênicos no controle de carrapatos vem sendo amplamente estudada, merecendo destaque quando os conídios são formulados (KAAYA et al., 2000; OJEDA-CHI et al., 2010; KAAYA et al., 2011). Diferentes constituintes já foram testados, dentre estes os óleos têm apresentado bons resultados (ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

Peng e Xia (2011) analisaram os mecanismos de diferentes constituintes para a formulação de micoinseticidas sobre a eficácia de formulações oleosas do fungo *M. anisopliae*. Os autores concluíram que alguns constituintes das formulações fornecem condições que melhoram significativamente a ação dos conídios sobre a praga alvo.

No presente estudo, através dos ensaios com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, foi possível verificar que as alterações nos parâmetros biológicos analisados foram em decorrência da ação dos tratamentos, pois o grupo controle aquoso apresentou os parâmetros biológicos dentro do padrão para essa espécie de carrapato, segundo Glória et al., (1993).

Analisando os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após os tratamentos, verificou-se que a formulação oleosa de Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL foi capaz de reduzir o peso da postura, além de ter causado morte antes da oviposição, de forma que inviabilizou a introdução deste grupo na análise estatística do percentual de eclosão e dos períodos de pré-postura, postura, eclosão e incubação. Angelo et al., (2010) avaliando a ação do fungo *Lecanicillium lecanii* em formulação oleosa sobre o carrapato dos bovinos, constataram que as fêmeas do carrapato tratadas com a formulação oleosa na concentração de 10^8 conídios/mL morreram antes de realizarem a postura dos ovos. Ojeda-Chi et al., (2010) avaliaram o efeito de *M. anisopliae* em suspensão aquosa a 10^8 conídios/mL e observaram redução considerável da postura de ovos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Diferentemente, o presente estudo verificou que a suspensão aquosa de Metarril SP Organic na concentração 10^8 conídios/mL não afetou a produção de ovos. Esta variação entre os resultados obtidos pelos autores supracitados e o encontrado no presente trabalho pode ser explicada pelas diferenças existentes na patogenicidade de diferentes isolados fúngicos sobre artrópodes (PERINOTTO et al., 2012; QUINELATO et al., 2012; REN et al., 2012). Entretanto, Angelo et al. (2010) observaram que as diferentes concentrações aquosas utilizadas na experimentação, não afetaram o período de pré postura de fêmeas ingurgitadas tratadas. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde este parâmetro biológico não sofreu alterações dentre as diferentes concentrações e formulações.

O índice de produção de ovos e nutricional foram reduzidos consideravelmente pelos tratamentos da formulação oleosa de Metarril SC Organic na concentração 10^9 conídios/mL e do controle oleoso 4, já a eficiência reprodutiva foi alterada pelas formulações oleosas de Metarril SC Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL. Estes resultados corroboram os encontrados por Camargo et al. (2012) ao avaliarem a patogenicidade *in vitro* dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na concentração 10^8 conídios/mL acrescidos de 10%, 15% e 20% de óleo mineral. Estes autores observaram redução dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Reis et al. (2005) ao avaliarem a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* sobre ninfas e adultos de *R. sanguineus*, observaram melhores resultados do fungo quando este foi formulado em concentrado emulsionável e em gel polimerizado de celulose. Os resultados obtidos em ambos trabalhos com a utilização dos fungos formulados demonstram a melhoria que as formulações promovem na ação dos fungos artropodopatogênicos contra os carrapatos.

Segundo Sonenshine (1991), a constituição da cutícula dos carrapatos confere a ela uma característica hidrofóbica, pois a cutícula externa secreta substâncias lipoproteicas, característica esta de extrema importância para garantir a sobrevivência destes organismos em diferentes condições climáticas. Segundo Leemon e Jonsson, (2012), o número de conídios aderidos por unidade de área na cutícula de *R. microplus* é mais importante para o controle eficaz do que o número total de conídios na superfície do carrapato (LEEMON; JONSSON, 2012). Ambas explicações podem facilitar o entendimento do aumento da virulência dos fungos formulados em óleo, já que o fungo terá maior facilidade em aderir-se à cutícula do artrópode-alvo quando em formulação oleosa.

Das formulações de Metarril testadas no presente estudo sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, os melhores resultados foram observados com as formulações oleosas de Metarril SC Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL. No entanto, ao compararmos estes grupos com seus respectivos controles oleosos, observamos que o grupo Metarril SC 10^8 conídios/mL, apresenta os resultados mais satisfatórios. Resultados semelhantes foram encontrados por Camargo et al. (2012), utilizando o fungo *M. anisopliae* em 10% de óleo mineral sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Kaaya et al. (2011), analisando a ação de *M. anisopliae* formulado em 20% de óleo de girassol sobre espécimes de *R. microplus* em bovinos mantidos a campo, constataram redução de 83% do número total de carrapatos sobre os animais.

As diferentes suspensões aquosas do produto Metarril SP Organic testadas, apresentaram percentual de controle máximo de 28,60% com a concentração 10^9 conídios/mL, já com produto Metarril SC Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL foram obtidos percentuais de controle de 49,83% e 98,43%. Alonso-Díaz et al. (2007), após testarem a ação do fungo *M. anisopliae* em suspensão aquosa no controle de *R. microplus* em bovinos infestados naturalmente, verificaram eficácia máxima de 45%. Estes resultados demonstram o efeito benéfico que a formulação pode

oferecer a atividade fúngica e que os resultados laboratoriais podem ser utilizados como bases para futuros testes em estábulos e posteriormente a campo.

O controle oleoso em sua constituição original (controle oleoso 4) promoveu um percentual de controle (68,86%) significativo. Entretanto, quando o percentual de controle das fêmeas tratadas com a formulação oleosa de Metarril SC Organic na concentração de 10^9 conídios/mL foi calculado em relação ao grupo controle oleoso 4, o efeito do óleo foi removido e foi possível constatar que o efeito atribuído exclusivamente ao óleo foi pequeno, já que a diferença do percentual de controle da formulação fúngica oleosa na maior concentração em relação aos grupos controle aquoso (98,43%) e controle oleoso 4 (94,90%) foi baixo. O efeito tóxico de diversos tipos de óleos sobre os estágios de desenvolvimento de carrapatos foi comprovado por Abdel-Shafy e Soliman (2004) após analisarem a toxicidade de diferentes óleos essenciais sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. annulatus*.

As fases “não parasitárias” de desenvolvimento de *R. microplus* sofrem com as alterações ambientais, podendo desta forma ocorrer variações do ciclo de vida deste artrópode (GLORIA et al., 1993; FURLONG, 1993; FUNLONG et al., 2005). Avaliando o efeito dos tratamentos sobre ovos de *R. microplus*, foi possível verificar a eficácia do fungo *M. anisopliae* sobre esta fase de desenvolvimento do carrapato dos bovinos. Desta forma, o aumento do período de incubação dos ovos tratados com o produto Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/mL, pode ser considerado um resultado positivo, pois em condições de campo, esta fase evolutiva poderá sofrer alterações, por maior período de exposição as intempéries ambientais. O percentual de eclosão das larvas provenientes de ovos tratados foi reduzido por Metarril SP Organic na concentração 10^9 conídios/mL e Metarril SC Organic na concentração 10^8 conídios/mL quando comparados aos demais grupos, porém não diferiram estatisticamente entre si. Este resultado demonstra a potencialização da ação fúngica proporcionada pelo óleo, já que a formulação oleosa na concentração 10^8 conídios/mL foi capaz de reduzir significativamente este parâmetro, diferente da suspensão fúngica aquosa com a mesma concentração conidial. Este resultado confirma os dados encontrados em estudos utilizando formulações oleosas, que comprovam o efeito do óleo potencializando a ação fúngica sobre o artrópode alvo (POLAR et al., 2005; ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012; CAMARGO et al., 2014).

De todos os estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*, as larvas apresentaram maior susceptibilidade aos produtos com o fungo artropodopatogênico *M. anisopliae* no presente estudo. Este efeito também foi verificado por Bahiense et al. (2007) em teste de estábulo após pulverizar suspensão de *M. anisopliae* em bovinos. Lopes et al. (2007), avaliaram a ação do produto Metarril SC em diferentes concentrações conidiais sobre ninfas não alimentadas de *Amblyomma cajennense*. Estes autores verificaram que Metarril SC utilizado na concentração 1×10^7 conídios/mL causou mortalidade de 60,6% dez dias após o tratamento. Os resultados obtidos no presente estudo constataram que Metarril SC Organic na concentração 10^7 conídios/mL apresentou efeito sobre larvas de *R. microplus*, porém o percentual de mortalidade máximo observado foi de 46,6% no vigésimo dia após o tratamento. Estes resultados demonstram a diferença na susceptibilidade de *A. cajennense* e *R. microplus* após tratamento com o mesmo produto.

Todos os grupos tratados com ambos os produtos de *M. anisopliae* foram capazes de ocasionar mortalidade das larvas, sendo que, as formulações de Metarril SC Organic nas concentrações 10^8 e 10^9 conídios/mL apresentaram maior eficácia, pois já no quinto dia após o tratamento causaram mortalidade próxima a 100%. Entretanto, o grupo controle oleoso em concentração original alcançou efeitos próximos aos

constatados com o produto Metarril SC Organic nas concentrações mais elevadas a partir do décimo dia após o tratamento das larvas. Nos experimentos realizados por Camargo et al. (2012) foram observados resultados semelhantes, pois estes autores verificaram que o óleo mineral utilizado nas concentrações de 10, 15 e 20%, causou efeito deletério nas larvas de *R. microplus*, apresentando mortalidade variando entre 0 e 41,3%. Segundo Sonenshine (1991), estruturas traqueais encaminham o oxigênio do ambiente para o interior das células corporais dos estágios ninfais e adultos de carrapatos. Já o mecanismo respiratório das larvas destes artrópodes ocorre através da superfície cuticular. Desta forma, o efeito deletério do óleo sobre larvas de *R. microplus* pode ser explicado, por dificultar as trocas gasosas deste estágio evolutivo.

A ação de diferentes constituintes para a formulação de biopesticidas vem despertando o interesse de diversos pesquisadores. (ANGELO et al., 2010; SAHAGUN et al., 2010; PENG; XIA, 2011; CAMARGO et al., 2012; CAMARGO et al., 2014; CHAGAS et al., 2014). Em estudos realizados por Sahagún et al. (2010) para avaliar a virulência *in vitro* de diferentes isolados de fungos artropodopatogênicos sobre larvas de *R. microplus* e a eficácia de diferentes formulações conidiais a campo, concluíram que os constituintes envolvidos no preparo das formulações podem ter grande impacto sobre a eficácia das formulações fúngicas.

A procura por alimentos de origem animal sem resíduos químicos está aumentando ao longo dos tempos, tornando o controle biológico atrativo, pois além de atender uma demanda da sociedade quanto ao fornecimento de produtos orgânicos, torna-se uma alternativa para melhorar as questões de ocorrência de resistência aos quimioterápicos (SAMISH et al., 2004). Camargo et al. (2014) destacaram a importância de avaliar biopesticidas produzidos por empresas especializadas sobre carrapatos, pois são ofertados prontos, facilitando assim o transporte, o armazenamento, a manipulação, a aplicabilidade além de serem produzidos em larga escala. As intempéries ambientais influenciam negativamente na ação dos agentes biocontroladores, limitando o emprego do controle biológico. Desta forma, mais pesquisas são necessárias para encontrar adjuvantes que potencializem a ação dos fungos artropodopatogênicos, melhorando a eficácia destes biopesticidas a campo contra os carrapatos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram elaborar as seguintes conclusões:

Os produtos Metarril SP Organic e Metarril SC Organic da empresa Koppert Biological Systems[®] foram capazes de influenciar na biologia de *Rhipicephalus microplus* após tratamentos *in vitro* somente em altas concentrações conídias (10^8 e 10^9 conídios/mL).

O adjuvante oleoso utilizado na formulação de Metarril SC Organic em sua concentração original apresentou efeito deletério para os três diferentes estágios de *R. microplus*.

O produto formulado em óleo (Metarril SC Organic) apresentou maior eficácia, em relação ao produto suspenso em meio aquoso (Metarril SP Organic) para *Rhipicephalus microplus*.

A formulação Metarril SC apresenta potencial para ser utilizada no controle de *R. microplus*. Entretanto, mais pesquisas serão necessárias para verificar o comportamento da mesma em condições naturais, para então ser efetivamente aplicada e disponibilizada em grande escala para o uso no controle destes carrapatos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6-20, 2014.
- ABDEL-SHAIFY, S.; SOLIMAN, M. M. M. Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodida: Amblyomidae) infesting cattle in Egypt. **Acarology**, v. 44, p. 23-30, 2004.
- ALONSO-DIAZ, M. A.; GARCIA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGUN, C. A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 336-340, 2007.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed., FEALQ, 1998, 1163 p.
- AMARAL, M. A. Z.; ROCHA, C. M. B. M.; FACCINI, J. L.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A. Perceptions and attitudes among milk producers in Minas Gerais regarding cattle tick biology and control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 194-201, 2011.
- ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato do boi *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas no Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC180.pdf>>. Acesso em 25 de julho de 2014.
- ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIENSE, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; MORAES, A. P. R.; TERRA, A. L. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.
- ARAÚJO, F. R. **Introdução à pecuária ecológica: a arte de criar animais sem drogas ou venenos**. Porto Alegre: Digital Store, 2000. 136p.
- AVANCINI, C. A. M. **Sanidade animal na ecologia - atitudes ecológicas de sanidade animal e plantas medicinais em Medicina Veterinária**. Porto Alegre: Fundação Gaia, 2002. 46p.
- BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.243-245, 2007.
- BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v.141, p. 319-324. 2006.

BARCI, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C.; PRADO, A. P. Determinação da CL90 e TL90 do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p.34-39, 2009.

BENNETT, G.F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE). Influence of tick size on egg production. **Acarologia**. v. 16, p. 53–61, 1974.

BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK. **Biocontrol of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the Acaricidal Fungus *Metarhizium anisopliae*. Ticks: disease, management and control**. Ed. Moges Woldemesked, New York, p. 217-246, 2012.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 17, p. 83-88, 1995.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; LIMA, F.; MASSARD, C. L. Uso do *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 197-202, 1992.

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

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 49-55, 1994.

BRITO, L. G. **Carrapatograma: um aliado do produtor na exploração leiteira**. 2008. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/pdf.php/?node=103589>>. Acesso em: 07 de julho de 2014.

BUKHARI, T.; TAKKEN, W.; KOENRAADT, C. J. M. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 23, 2011.

CAMARGO, M. G. **Efeitos de formulações de fungos entomopatogênicos no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effect of oil-based formulations of

acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140-147, 2012.

CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; GÓLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, 2014. In press.

CASTRO, K.N.C; ISHIKAIWA, M.M; CATTO, J.B. Avaliação *in vitro* do pinheiro brasileiro para controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4. 2575-2578, 2009.

CHAGAS, A. C. S.; DOMINGUES, L. F.; FANTATTO, R. R.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, D. H.; NAMO, R. A.; JACOB, R. G. *In vitro* and *in vivo* acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon spp.* and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, 2014. In press.

CHAGAS, A. C; PASSOS, W. M; PRATES, H. T. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp* em *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Veterinária**. São Paulo, v. 39, p. 247-253, 2002.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi. An Account of their biology, activities and classification**. Londres: W.H. Freeman, 1964. 188p.

CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C.; VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.189-191, 1998.

COSTA, M.; SARQUIS, MIM.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro state, Brazil. **Mycopathologia**. v. 154, p. 207-209, 2002.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230p.

DRUMMOND, R.O.; GLADNEY, W.J.; WHETSTONE, T.M.; ERNST, S.E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. **Journal of Economy Entomology**. v. 64, p. 686-688, 1971.

FARGUES, J.; MANIANIA, N. K.; DELMAS, J. C.; SMITS, N. Influence of temperature on *in vitro* growth of entomopathogenic hyphomycetes. **Agronomie**, v. 12, p. 557-564, 1992.

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

FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potencial of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, 300-305, 2012.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 237–243, 2007.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p.71-93, 2008.

FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância médico veterinária**. 3 Ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4ª Ed. São Paulo: Ícone, 2004. 608p.

FREITAS, D. R. J; POHL, P. C; VAZ JR, I. S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 109-117, 2005.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**. v. 8, p. 49-61, 1993.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA. M. C. A. **Carrapatos: problemas e soluções**. EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, p.65, 2005.

FURLONG, J; MARTINS, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. 2000.Disponível em:<<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/pastprod/textos/34Instrucao.pdf>>. Acesso em 25 julho de 2014.

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

GEORGE, J. E; POUND, J. M; DAVEY, R. B. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: BOWMAN A. S.; NUTTALL P. A. **Ticks: Biology, Disease and Control**. U. K: Cambridge University Press, 2008, P. 408-423.

GINSBERG, H. S., LEBRUN, R. A., HEYER, K. & ZHIOUA, E. Potential nontarget effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 1191–1196, 2002.

GLÓRIA, M.A.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E.; GRISI, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *B. microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticida em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 2, p. 79-84, 1993.

GONZALES, J. C. **O controle dos carrapatos do boi**. 2. Ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 79p.

GRISI, I.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potencial economic impacto f cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 23, p. 150-156, 2014.

HEIMERDINGER, A. **Extrato alcoólico de capim cidreira no controle do carrapato de bovinos**. 2005. 64 f. Dissertação (mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

HERNANDEZ, L. E; PARRA, D. G; MARINI, A. C. Ação repelente e acaricida da *Melinis minutiflora* sobre o *Boophilus microplus*. **Revista de Ciências Químico Farmacêuticas**, v.16, p.17-21, 1987.

HIBBETT, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**. v. 111, p.509–547, 2007.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 4, p. 12-32, 1985.

JAMES, R. R.; CROFT, B. A.; SHAFFER, B. T.; LIGHTHAT, B. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a coccinellid. **Environmental Entomology**, v. 27, p. 1506–1513, 1998.

JANER, E. C.; RIFRAN, L.; GONZALEZ, P.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 172-177, 2010.

JENKINS, D.W. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 30, p. 1–150, 1964.

KAAYA, G. P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, p. 913–926, 2000.

KAAYA, G.P.; SAMISH, M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. **Experimental Applied Acarology**, v. 55, p. 273-281, 2011.

KETTLE, D.S. Ixodida-Ixodidae (Hard ticks). In: KETTLE, D.S. **Medical and Veterinary entomology**. 2. Ed. CAB International: Wellingford, 1995. p.423-450.

LAZARINI, G. M. J.; ROCHA, L. F. N.; LUIZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v. 110, p. 1-11, 2006.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 40-49, 2008.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N.N. Comparison of bioassay responses to the potential fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Lucila cuprina*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 236-247, 2012.

LEW-TABOR, A. E.; BRUYERES, A. G.; ZHANG, B.; VALLE, M. R. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 500-510, 2014.

LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J.; GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 193-200, 2004.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; PÉREZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 27-31, 2007.

LORD, J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, V.89, 19–29, 2005.

LOVIS, L.; MENDES, M. C.; PERRET, J. L.; MARTINS, J. R.; BOUVIER, J.; BETSCHAT, B.; SAGER, H. Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 323-331, 2013.

LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B. K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINE, C. R.; SCHARANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 78-88, 2008.

MARANGA, R. O.; KAYA, G. P.; MUEKE, J. M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, v. 159, p.527–532, 2005.

MARTINEZ, M.L.; DA SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, Pirassununga, SP, p. 1-3, 2004.

MELLO, D. R.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, p.157-162, 2006.

MENDES, E. C. **Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) a amitraz e alternativas de controle com extratos vegetais e fungos entomopatogênicos**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Bovinos e Bubalinos**
Ministério da Agricultura. 2014. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso em: 24
de julho de 2014

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A. do C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.109-112, 1998.

MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

MWANGI, E. N., DIPEOLU, O. O., NEWSON, R. M., KAAYA, G. P. & HASSAN, S.M. Predators, parasitoids and pathogens of ticks : a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 1, 147–156, 1991.

OJEDA-CHI, M. M.; VIVAS, R. I. R.; VELASCO, G. E.; GUITIERREZ, R. L. Laboratory and Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 348-354, 2010.

ONOFRE, S.B.; VARGAS, L.R.B.; ROSSATO, M.; BARROS, N.M.; BOLDO, J.T.; NUNES, A.R.F.; AZEVEDO, J.L. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS. 2002. p. 295-317.

PARIZI, L. F.; RECK Jr, J.; OLDIGES, D. P.; GUIZZO, M. G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J. R.; VAZ Jr, I. S. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. **Vaccine**, v. 30, p. 6912-6917, 2012.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; GONZALEZ, C. Z.; GUZMÁN, F.; MARTINS-FILHO, O. A.; AFONSO, L. C. C.; VALENTE, F. L.; PECONICK, A. P.; PATARROYO, A. M. V.; SOSSAI, S. Imune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus microplus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 333-339, 2009.

PENG, G.; XIA, Y. The mechanism of the mycoinsecticide diluent on the efficacy of oil formulation of insecticidal fungus. **Biological Control**, v. 56, p. 893-902, 2011.

PEREIRA, A. A. **Aspectos da ecologia de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae) no município de Franca, nordeste de São Paulo**. 2008. 106 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência**. 1 ed. São Paulo: Med Vet Livros, 2008, 192p.

PERINOTTO W. M. S.; ANGELO I. C.; GOLO O. S.; CAMARGO M. G.; SÁ F. A.; MONTEIRO C. M. O.; COUTINHO-ROGRIGUES C. J. B.; QUINELATO S.; MARCIANO A. F.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Eficiência da formulação comercial de *Beauveria bassiana* no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Supl. 1, v. 34, p. 95-101, 2012.

POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. Comparison of water, oils and adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v. 16, p. 151-157, 2005.

POSADAS, J. B.; LECUONA, R. E. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.46, p.284-291, 2009.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 66-72, 1988.

QUINELATO, S.; GOLO, P. S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D. ; ANDERSON, A.J. ; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p. 77-83, 2004.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade in vitro de formulações fúngicas sobre ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, p. 101-105, 2005.

REN, Q.; LIU, Z.; GUAN, G.; SUN, M.; MA, M.; NIU, Q.; LI, Y.; LIU, A.; LIU, J.; YANG, J.; YIN, H.; LUO, J. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. **Biological Control**, v. 63, p. 98-101, 2012.

ROBERTS, D. W.; YENDOL, W. G. Use of fungi for microbial control of insects. In Burges, H. D.; Hussey, N. W. **Microbial control of insects and mites**. 2^a ed. London, Academic Press, p. 125-146, 1971.

ROBERTS, D.W.; FLINT, S.D. Tools of the UV trade: Light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). **Proceedings of the International Colloquium on Insect Pathology and Microbial Control**. EMBRAPA/Soja, Londrina, PR, Brazil. p. 237-240, 2002.

ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, P. R.; LEITE, R. C.; CARDOSO, D. L.; CALIC, S. B.; FURLONG, J. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, M.G, sobre o carrapato *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**, v. 36, p.1235-1242, 2006.

ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. **Parasitology Today**, v.9, p. 174-179, 1993.

SAHAGUN, C. A. A.; GUTIERREZ, R. L.; OCHOA, J. M.; RUBIO, P. A.; SKODA, S. R.; VARQUEZ, C. C.; LORENZONI, A. G.; VELASCO, E. G.; SANCHEZ, H. F.; FOSTER, J. E. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 278-286, 2010.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 389–403, 2004.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: FEPMZV- Editora, 2002. 265p.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SCHUMACHER, V.; POEHLING, H. M. In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Biology**, v. 116, p. 121-132, 2012.

SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; VAZ Jr, I. S. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, p. 149-156, 2012.

SEQUEIRA, T. C. G. O; AMARANTE, A. F. T. **Parasitologia animal. Animais de produção**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2002. 158p.

SHELTON, A. M. & ROUSH, R. T. Resistance to insect pathogens and strategies to manage resistance. In: **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, p. 829–845, 2000.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal), Mercado Veterinário: classe terapêutica e espécie animais. 2012. **Disponível em:** <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. **Acesso em:** 07 de julho de 2014.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. Old Dominion University, Norfolk, Virginia. Oxford University Press, v. 1, 1991, p. 447.

SOUZA, E. J. DE. **Avaliação da eficácia de bioacaricidas a base de fungos entomopatogênicos, em diferentes formulações, no controle dos carrapatos *Anocentor nitens* e *Boophilus microplus***. 2003. 56 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SUNG, G. H.; HYVEL-JONES, N. L.; SUNG, J. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; SHERTHRA, B.; SPATAFORA, J. W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**. v. 57, p. 1-59, 2007.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transaction of the British Mycological Society**, v. 66, p. 407-411, 1976.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Ectoparasites: Biology Pathology and Control**. Second edition. Blackwell Science, United Kingdom, 2001, p. 75-78.

WHARTON, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: **Control of arthropods of medical and veterinary importance**. London: Pal, R. & R.H. Wharton (ed.). Plenum Press, 1974. p.134-177.

YIP, H. Y.; RATH, A. C.; KOEN, T. B.; Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: Adaryphorus couoni). **Mycological Research**, v. 96, p. 92-96, 1992.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 553-596, 2007 b.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 17, p. 879-920, 2007 a.