

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

TESE

CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)
COM NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS:
APLICAÇÃO EM FORMULAÇÃO INSETO CADÁVER E
COMPATIBILIDADE COM OUTROS AGENTES DE
CONTROLE

Caio Márcio de Oliveira Monteiro

2014



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

**CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)
COM NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS:
APLICAÇÃO EM FORMULAÇÃO INSETO CADÁVER E
COMPATIBILIDADE COM OUTROS AGENTES DE
CONTROLE**

CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO

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

e Co-orientação da Professora
Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata

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

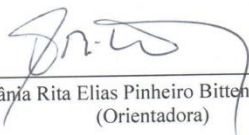
Seropédica, RJ
Janeiro de 2014

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

CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO

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

TESE APROVADA EM 21/01/14.



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



Dra. João Luiz Horacio Faccini. UFRRJ



Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho. UFU



Dr. Erik Daemon de Souza Pinto. UFJF



Dr. José Reck Júnior. IPVDF

Dedicatória:

*A Deus, a Camila, a Maria Clara,
minha tia Yêdda, a minha mãe, aos
meus familiares, aos meus amigos, a
comissão orientadora e a todos que
de alguma forma contribuíram para
realização desse estudo!*

"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas
só pode ser vivida olhando-se para frente."
Soren Kierkegaard

AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pela confiança e oportunidade concedida, permitindo minha entrada como aluno de doutorado no curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pela liberdade no estabelecimento das atividades desenvolvidas na tese e por todo apoio, exemplos e ensinamentos passados ao longo desses anos.

A Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata pela pessoa maravilhosa que é, a qual não tenho palavras para agradecer o quanto foi importante na minha vida nesses últimos dez anos, estando sempre presente e disposta a ajudar com preciosos ensinamentos e incentivos, tanto na vida pessoal quanto profissional.

Ao professor Dr. Erik Daemon pela amizade, pelos preciosos ensinamentos nas mais diversas áreas da parasitologia e pelas inúmeras oportunidades e portas que sempre me abriu, confiando sempre no meu trabalho e na minha capacidade, ajudando no meu amadurecimento profissional.

Ao Dr. John Furlong pelas palavras amigas de incentivo e pelos preciosos ensinamentos que tive o prazer de receber ao longo da minha vida acadêmica, e por ter plantado a semente que deu origem ao desenvolvimento desse trabalho confiado a mim, além de ser o pai dessa linha de pesquisa.

A professora Dra. Claudia Dolinski pelo carinho ao me receber na UENF, pelos ensinamentos, por ter cedido os isolados de nematoides e por toda ajuda que foi fundamental para o desenvolvimento da tese.

Ao Dr. Alexander Machado Auad pelos ensinamentos e contribuições, estando sempre disponível para ajudar, tendo contribuído de maneira imprescindível para realização da tese.

Aos membros da banca Claudia Dolinski, Vanessa Andaló, Erik Daemon e José Reck por terem se dispostos a participar e contribuir com a avaliação final da Tese.

Ao professor Dr. André Flávio Soares Rodrigues pelos ensinamentos e incentivos durante os primeiros passos na vida acadêmica.

A todos os profissionais listados acima, agradeço pelos inúmeros exemplos de como ser um bom pesquisador, um bom orientador e um bom professor. Cada um a sua maneira foi um grande mestre para mim, do qual tirei grandes ensinamentos, e nos quais em tenho orgulho de ter sido em algum momento, conduzido por suas orientações.

A Ana Maria Costa Amoroso Lima e Neusa Salim Miranda pelos conselhos e apoio durante toda minha vida acadêmica.

A Marta Tavares D'Agosto e Alexander Moreria-Almeida que mesmo nunca tendo sido meus orientadores diretos, muito me ensinaram com seus exemplos e formas de conduta na área acadêmica.

Aos técnicos, Klinger Aparecido de Souza e Michele Muniz, pessoas com quem pude contar com importante ajuda e auxílio durante o desenvolvimento da tese.

Aos amigos (as) de Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Roberson, Camila, Giulia, Luana, Vinícius, pela ajuda e amizade durante as atividades do doutorado e em especial para Laryssa e Renata pela ajuda FUNDAMENTAL para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que passaram pela Embrapa durante 2004 e 2013 e em especial para Éder Sebastião, Elder Simões de Paula Batista, Mateus Aparecido Clemente e Julio Cesar Rocha Costa, pelos bons momentos de aprendizado em conjunto.

Aos amigos do Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora, Viviane, Ralph, Aline, Diego, Lúcio pela amizade e boa convivência durante esses anos e em especial para Tatiane, Fernanda e Márcio, Andressa e Jane Dayse no qual eu tive o

prazer de ser co-orientador de suas dissertações, ensinando um pouco do que sei e aprendendo muito com vocês.

Aos colegas do Laboratório de Controle Microbiano, Mariana, Simone, Caio, Ana Paula, Fillipe, Sabrina, Jéssica, Allan e Michel pela agradável convivência e pelos inúmeros ensinamentos recebidos e em especial a Isabele, Patrícia e Wendell pela ajuda fundamental para o desenvolvimento de um dos capítulos dessa Tese.

A todos os companheiros de laboratório citados acima, muito obrigado pela oportunidade de conviver e aprender com vocês durante esses anos. Foi muito bom fazer parte dessas equipes!

Aos doutorandos Geovany Amorim Gomes, Francisco Eduardo Aragão Catunda-Junior e ao professor Mario Geraldo de Carvalho pela preciosa parceria, na qual estamos obtendo bons frutos, inclusive, um dos capítulos dessa Tese.

Aos amigos de curso de pós-graduação com os quais passei por importantes momentos de aprendizagem e amizade, em especial para meus amigos Wendell, Marcos, Gabriel, Hermes e Gideão.

Aos amigos do alojamento de pós-graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelos ótimos momentos de convivência e amizade em especial para Marcos, Gideão, Gabriel, Hermes, Antônio, Jânio, Eduardo e Geovany.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro aos professores do programa, pelos ensinamentos e momentos vividos durante estes quatro anos.

Ao CNPq pela bolsa e financiamento do projeto.

A Camila, tia Yêdda e minha mãe, as pessoas mais importantes da minha vida, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando independente de qualquer coisa; muito de tudo que conquistei e busquei eu devo as vocês que são minha maiores inspirações para correr atrás dos meus objetivos e tentar superar as barreiras que aparecem no caminho.

Aos meus familiares por tudo que fazem e que representam para mim. Pela forma com que me criaram e por toda estrutura que me deram permitindo que eu pudesse me concentrar e completar meus estudos.

Aos amigos pela amizade, pelos momentos especiais e por saber que posso contar sempre com vocês.

A Deus por tudo, pois sei que sem ele não teria alcançado mais essa vitória. Obrigado por guiar meus passos e por ter colocado tantas pessoas especiais no meu caminho, como todas essas listadas acima.

BIOGRAFIA

Caio Márcio de Oliveira Monteiro, filho de Antônio Geraldo Alves e Marta da Consolação de Oliveira, nasceu no município de Juiz de Fora MG, no dia 24 de julho de 1982.

Cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Estevão de Oliveira e o segundo Grau na Escola Estadual Delfim Moreira, na cidade de Juiz de Fora MG.

Em agosto de 2002, ingressou no curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora MG. No ano de 2003 e 2005, atuou como monitor das disciplinas de Zoologia de Invertebrados I e Zoologia dos Vertebrados II, respectivamente. No ano de 2004, junto com outros três alunos, fundou o Centro Acadêmico de Ciências Biológicas, no qual atuou como diretor de capacitação e pesquisa, promovendo a realização de palestras, simpósios e cursos de verão nessa instituição. Entre os anos de 2004 a 2006 foi bolsista de iniciação científica sob orientação do professor Dr. André Flávio Soares Ferreira Rodrigues, trabalhando em projetos de levantamento de ectoparasitos. Nesse mesmo período, foi bolsista do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, sob orientação da Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata, atuando na realização de testes de sensibilidade do carrapato dos bovinos aos carrapaticidas e auxiliando no desenvolvimento de dissertações de mestrado e teses de doutorado sobre o controle desse carrapato.

Em dezembro de 2006, terminou a graduação em licenciatura e foi aprovado na seleção de mestrado do programa de pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG sob orientação do Dr. John Furlong. Durante o mestrado continuou vinculado como estagiário ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, desenvolvendo sua pesquisa e auxiliando no desenvolvimento de dissertações e teses de outros estagiários. Ainda nesse período, também desenvolveu trabalhos paralelos sobre o controle de carrapatos com substâncias de origem vegetal no Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, sob orientação do professor Dr. Erik Daemon. O mestrado foi concluído em fevereiro de 2009.

No ano 2009, atuou como professor nos cursos de Enfermagem e Educação Física da Universidade Estácio de Sá, campus Juiz de Fora, MG e no curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, MG.

Em março de 2010 iniciou o doutorado no curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias sob orientação da professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Nesse período manteve o vínculo com o Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite e com o Laboratório de Artrópodes Parasitos da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, atuando diretamente nas linhas de pesquisas desenvolvidas nesses laboratórios. Em 2013 foi aprovado em primeiro lugar para professor substituto no departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. Durante a graduação e pós-graduação participou de congressos e simpósios, bancas de conclusão de curso e publicou 39 artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais. Atuou também como coorientador e orientador de trabalhos de conclusão de curso e dissertações de mestrado.

RESUMO

MONTEIRO, Caio Márcio de Oliveira. **Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) com nematoides entomopatogênicos: aplicação em formulação inseto cadáver e compatibilidade com outros agentes de controle.** 2014. 175p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) tem sido apontados como promissores agentes de controle biológico do carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*. A tentativa de combater esse carrapato com a utilização de NEPs pode ser direcionada para fase não parasitária, uma vez que fêmeas ingurgitadas no momento da oviposição buscam no solo ambiente com alta umidade e protegidos da irradiação solar, características favoráveis para sobrevivência dos NEPs. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes isolados de nematoides em formulação inseto cadáver para o controle de *R. microplus*, além de avaliar a compatibilidade desses isolados com outras alternativas biológicas, químicas biossintéticas e químicas orgânosintéticas, que também podem ser utilizadas para controle desse ixodídeo. O estudo foi dividido em seis etapas. O primeiro capítulo teve como objetivo selecionar os isolados de NEPs mais virulentos para *R. microplus*, sendo feita a aplicação em formulação inseto cadáver com diferentes quantidades de lagartas de *Galleria mellonella* e avaliar o potencial dos isolados mais virulentos, quando formulados em *G. mellonella* e *Tenebrio molitor*. No segundo capítulo teve-se como objetivo de avaliar a interferência de outros hospedeiros suscetíveis sobre a eficácia de NEPs para o controle de *R. microplus*; assim como avaliar o potencial de NEPs para o controle em conjunto do carrapato dos bovinos e cigarrinha-das-pastagens, *Mahanarva spectabilis*. No terceiro capítulo, o objetivo foi avaliar o potencial dos dois isolados apontados como mais virulentos de acordo com o capítulo 1, e mais dois novos isolados de NEPs em formulação inseto cadáver, para o controle de *R. microplus* em testes em condições semi-naturais. Nos capítulos seguintes (capítulos 4, 5 e 6) foram conduzidos com intuito de avaliar a compatibilidade entre os dois isolados de NEPs mais virulentos, de acordo com os resultados do primeiro capítulo, com os carrapaticidas organossintéticos deltametrina, amitraz e clorfenvinfós (capítulo 4), com os fungos *Metharizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 (capítulo 5) e com o óleo essencial de *Lippia sidoides* (Capítulo 6). No primeiro capítulo, os nematoides *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1 foram os isolados mais virulentos, resultando em percentual de controle de 99% a partir do tratamento com a menor quantidade de cadáveres de *G. mellonella*. Além disso, foi verificado que a formulação em *G. mellonella* foi mais eficaz do que a formulação em *T. molitor*. No segundo capítulo, foi possível observar que a presença de outro hospedeiro susceptível não interferiu negativamente na eficácia de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 para o controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, e que a presença de ninfas de *M. spectabilis* com as fêmeas, potencializou a ação do nematoide, indicando a possibilidade da utilização dessa espécie de NEP para o controle em conjunto de carrapatos e cigarrinhas nas pastagens. Ainda nesse capítulo, foi possível verificar que o nematoide *H. baujardi* LPP7 multiplicou-se em ninfas de cigarrinhas, e que os juvenis infectantes (JIs) produzidos em cadáveres de *M. spectabilis* e *G. mellonella* apresentaram virulência similar para fêmeas de *R. microplus*. No terceiro capítulo, no primeiro experimento foi verificada em teste “*in vitro*” que os JIs de *H. bacteriophora* LPP30 foram altamente virulentos para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo observado percentual de controle superior a 95%, a partir da concentração de 75 JIs/fêmea. No segundo experimento, foi possível observar que *H. bacteriophora* HP88 e *H.*

baujardi LPP7, formulados em cadáveres de *G. mellonella* e aplicados em teste simulando condições naturais, foram as espécies que apresentaram melhor desempenho, sendo observada inibição de postura superior a 90%. Além disso, ainda nesse capítulo foi verificado que esses isolados permaneceram ativos por mais de 65 dias no solo, sendo capazes de infectar fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após esse período. Nos capítulos seguintes, (4, 5 e 6) foi verificado que os JIs de *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram compatíveis com os carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós, com os fungos *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 e com o óleo essencial de *L. sidoides*.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, Nematoides entomopatogênicos, Controle biológico.

ABSTRACT

MONTEIRO, Caio Márcio de Oliveira. **Control *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) with entomopathogenic nematodes: application in formulating insect cadaver and compatibility with other control agents.** 2014. 175p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are considered promising biological control agents against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. Efforts to combat this tick through use of EPNs can be targeted at the non-parasite phase, since engorged females lay their eggs in the soil, a favorable environment for the survival of EPNs. Therefore, the objective of the series of studies reported here was to evaluate the efficacy of different nematode strains in a cadaver insect formulation for the control of *R. microplus*, as well as to assess the compatibility of these strains with other biological and chemical control alternatives. The first chapter describes the process of selecting the most virulent EPN strains against *R. microplus*, which involved the application in a cadaver insect formulation with different quantities of *Galleria mellonella* larvae, to evaluate the potential of the most virulent strains when formulated in *G. mellonella* and *T. molitor* larvae. The second chapter describes tests to evaluate the interference of other susceptible hosts in the efficacy of EPNs to control *R. microplus* and the potential of EPNs for combined control of cattle ticks and spittlebugs. The third chapter describes experiments to assess the potential of the two strains indicated as most virulent according to the results presented in Chapter 1, and two new strains, on engorged *R. microplus* females in semi-natural conditions. The next three chapters (4, 5 and 6) analyze the compatibility of the two EPN strains, with acaricides composed of deltamethrin, amitraz and chlorphenvinphos (Chapter 4), with the fungi *Metharizium anisopliae*, strain IBCB 116, and *Beauveria bassiana*, strain ESALQ 986 (Chapter 5), and with the essential oil of *Lippia sidoides* (Chapter 6). According to the results in the first chapter, the nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and *Heterorhabditis indica* LPP1 were the most virulent, resulting in a control percentage of 99% already in the treatment with the lowest number of *G. mellonella* cadavers. Besides this, the formulation in *G. mellonella* was more effective than that in *T. molitor*. The results of the second chapter show that the presence of another susceptible host did not negatively affect the efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 to control the engorged female cattle ticks, and that the presence of *Mahanarva spectabilis* nymphs with the females enhanced the action of the nematode, indicating the possibility of using EPNs for control of both ticks and spittlebugs. The results of the chapter also indicate that the nematode *H. baujardi* LPP7 multiplied in *M. spectabilis* and *G. mellonella* cadavers had similar virulence to *R. microplus* females. In the third chapter, the results of the first experiment, an *in vitro* test, indicate that the IJs of *H. bacteriophora* LPP30 were highly virulent to engorged *R. microplus* females, with a control percentage higher than 95% starting at the concentration of 75 IJs/female. In the second experiment reported in this chapter, *H. bacteriophora* HP88 and *H. baujardi* LPP7 formulated in *G. mellonella* cadavers performed the best, with oviposition inhibition greater than 90%. Besides this, these strains remained active for 60 days in the soil, and were able to infect engorged female cattle ticks after this period. The results in the remaining chapters (4, 5 and 6) show that IJs of *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 are compatible with the acaricides deltamethrin, amitraz and chlorphenvinphos, the fungi *M. anisopliae* IBCB 116 and *B. bassiana* Bb 986 and the essential oil of *L. sidoides*.

Key words: Cattle tick, Entomopathogenic Nematode, Biological Control.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Tabela 1. Isolados de nematoides entomopatogênicos testados contra <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
--	----

CAPÍTULO I

Tabela 1. Peso das fêmeas ingurgitadas antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão de larvas e percentual de controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> , tratados com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88, <i>Heterorhabditis indica</i> LPP1, <i>Steinernema feltiae</i> SN e <i>Steinernema carpocapsae</i> ALL, aplicados em formulação inseto cadáver em condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR). (Valores da média \pm desvio padrão).....	44
--	----

Tabela 2. Peso das fêmeas ingurgitadas, peso da massa de ovos, percentual de eclosão de larvas e percentual de controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratados com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88, <i>Heterorhabditis indica</i> LPP1, formulados em larvas de <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i> , em condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR). (Valores da média \pm desvio padrão).....	46
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> , ninfas de <i>Mahanarva spectabilis</i> e lagartas de <i>Galleria mellonella</i> expostas ao nematoide <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 na concentração de 400 juvenis infectantes por artrópode em condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$). (média \pm desvio padrão).....	64
---	----

Tabela 2. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratados com 400 JIs de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7, na presença ou não de ninfas de <i>Mahanarva spectabilis</i> ou <i>Galleria mellonella</i> em condições de laboratório ($27^{\circ}1\pm 1$ e UR 80 ± 10). (Média \pm desvio padrão).....	67
--	----

Tabela 3. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratados com diferentes concentrações de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 provenientes de multiplicação em ninfas de <i>Mahanarva spectabilis</i> e lagartas de <i>Galleria mellonella</i> em condições de laboratório ($27^{\circ}1\pm 1$ e UR 80 ± 10). (Média \pm desvio padrão).....	68
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas e percentuais de eclosão larval e controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> LPP30	
---	--

em condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$). (Média \pm desvio padrão)..... 85

Tabela 2. Peso das fêmeas antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas aos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *H. bacteriophora* LPP30, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP1 aplicados em formulação inseto cadáver em teste em condições semi-naturais. (Média \pm desvio padrão)..... 87

Tabela 3. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas aos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis baujardi* LPP7 aplicados em formulação inseto cadáver 65 dias antes do experimento. Teste simulando condições naturais. (Média \pm desvio padrão)..... 88

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Carrapaticidas utilizados no teste de compatibilidade com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1..... 102

Tabela 2. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* (população 1) tratados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, na concentração de 150 JIs/fêmea, associados ou não aos princípios ativos carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós em condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR de $80\pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão)..... 104

Tabela 3. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* (população 2) tratados com *Heterorhabditis indica* LPP1, na concentração de 150 JIs/fêmea, associados ou não aos princípios ativos carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós em condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR de $80\pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão)..... 105

CAPÍTULO V

Tabela 1. Peso médio da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, na concentração de 300 NEPs/fêmea, associados ou não aos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 na concentração de $1,3 \times 10^8$ conídios/mL em condições de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR de $80\pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão)..... 121

Tabela 2. Peso médio da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratados com <i>Heterorhabditis indica</i> LPP1, na concentração de 300 JIs/fêmea, associados ou não aos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 116 e <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ 986 na concentração de $1,3 \times 10^8$ mL em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80 \pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão).....	122
---	-----

CAPÍTULO VI

Tabela 1. Composição química, índice de retenção (IRc) e percentual de compostos identificados do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> *.....	136
--	-----

Tabela 2. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão larval de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratados com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88, <i>Heterorhabditis indica</i> LPP1 na concentração de 300 NEPs/carrapato, associados ou não ao óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> na concentração de $40,0 \mu\text{L}/\text{mL}$ em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e Umidade Relativa de $80 \pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão).....	137
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. A: Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, apresentando coloração avermelhada, característica de infecção por nematoides do gênero *Heterorhabditis*; B: Larvas de *G. mellonella* infectadas por *Steinernema carpocapsae* ALL, apresentando coloração marrom-claro, característica de infecção por nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema*; C: Cadáver de *G. mellonella* infectado por NEPs sendo enterrado na unidade experimental; D: Unidade experimental com cinco fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; E: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* ainda vivas, sendo transferidas para placas de Petri..... 40

Figura 2. A: larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88; B: Larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por *H. bacteriophora* HP88; C: Comparação entre larva de *G. mellonella* e *T. molitor* infectadas com *H. bacteriophora* HP88..... 41

Figura 3. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, expostas a diferentes quantidades de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis indica* LPP1, *Steinernema feltiae* SN e *Steinernema carpocapsae* ALL, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR)..... 42

Figura 4. A: fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* do grupo tratado com *Steinernema carpocapsae* ALL fazendo postura; B: Fêmeas ingurgitadas do grupo controle fazendo postura; C: Fêmeas ingurgitadas mortas pela ação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88; D: Fêmeas ingurgitadas mortas pela ação de *Heterorhabditis indica* LPP1..... 43

Figura 5. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1, formulados em larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR)..... 45

CAPÍTULO II

Figura 1. A: Cinco fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e cinco ninfas de *Mahanarva spectabilis* em pote plástico contendo solo, raízes de *Brachiaria decumbens* e juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7; B: Cinco fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e cinco lagartas de *Galleria mellonella* em pote plástico contendo solo e JIs de *H. baujardi* LPP7; C: Ninfas de *M. spectabilis* colocadas em armadilha de White após morte por *H. baujardi* LPP7; D: Lagartas de *G. mellonella* colocadas em armadilha de White após a morte por JIs de *H. baujardi* LPP7..... 61

Figura 2. A: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* do grupo controle fazendo postura; B: Cinco fêmeas de *R. microplus* (duas vivas fazendo postura e três mortas) em pote com solo e juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7; C:

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e lagartas de *Galleria mellonella* mortas pela ação de *H. baujardi* LPP7; D: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e ninfas de *Mahanarva spectabilis* (indicadas por setas amarelas) mortas pela ação de *H. baujardi* LPP7..... 65

Figura 3. A: Adulto de *Mahanarva spectabilis* oriundo de ninfa do grupo controle; B: ninfa de *M. spectabilis* no quarto dia de avaliação, morta pela infecção por *Heterorhabditis baujardi* LPP7; C: ninfa de *M. spectabilis* do grupo controle no quarto dia de avaliação, morta naturalmente..... 66

CAPÍTULO III

Figura 1. A e B: Vasos preenchidos com solo provenientes de áreas de pastagem da fazenda da Embrapa Gado de Leite, localizada em Coronel Pacheco, MG; C: Mudanças de *Brachiaria decumbens* sendo plantadas; D: Grupos com dez vasos referentes a cada tratamento três meses após as mudas terem sido plantadas..... 81

Figura 2. A: Cinco fêmeas ingurgitadas acondicionadas no interior do vaso; B: Vaso sendo vistoriado para quantificação do número de carrapatos vivos e mortos; C e D: Massa de ovos sendo recolhidas..... 83

Figura 3. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas aos nematoides *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *H. bacteriophora* LPP30, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP1 aplicados em formulação inseto cadáver em teste simulando semi-naturais..... 86

Figura 4. A: Fêmeas do grupo controle fazendo postura; B: Fêmeas do grupo tratado que chegaram a fazer um pouco de postura antes de morrerem; C: Fêmeas ingurgitadas mortas antes de fazerem a postura; D: Grupo tratado contendo três fêmeas mortas e uma fêmea viva fazendo postura..... 86

CAPÍTULO IV

Figura 1. A: Grupo com dez fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; B: Fêmea ingurgitada sendo pesada; C: Adição de 150 JIs por placa de Petri; D: Fêmeas ingurgitadas imersas em solução carrapaticida; E: fêmeas sobre folhas de papel toalha para retirada o excesso do carrapaticida..... 103

CAPÍTULO V

Figura 1. A: Grupo com 10 fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; B e C: Fêmeas ingurgitadas imersas em suspensão de *Metarhizium anisopliae* IBCB 116; D: Adição de 1 mL de suspensão aquosa de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 em placas de Petri contendo fêmeas ingurgitadas..... 119

Figura 2. A: Fêmeas ingurgitadas *Rhipicephalus microplus* mortas após infecção por *Heterorhabditis indica* LPP1; B: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mortas após

infecção por *H. indica* LPP1 associado com *Beauveria bassiana* ESALQ 986; C: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mortas após infecção com *H. indica* LPP1 associado com *Metharizium anisopliae* IBCB 116..... 123

CAPÍTULO VI

Figura 1. A: Grupo com dez fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; B: Fêmeas ingurgitadas sendo pesadas individualmente; C: Adição de 1 mL de NEPs na concentração de 300 JIs em placas de Petri com as fêmeas ingurgitadas; D: Fêmeas imersas no óleo de *Lippia sidoides* na concentração de 40 µL/mL; E: Fêmeas ingurgitadas sobre folhas de papel para retirada do excesso do óleo..... 134

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	01
2 REVISÃO DE LITERATUR.	03
2.1 Bovinocultura no Brasil	03
2.2 <i>Rhipicephalus microplus</i> : posição taxonômica e distribuição geográfica	03
2.3 <i>Rhipicephalus microplus</i> : importância econômica e desafios de controle	04
2.4 Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i> : ênfase na fase não parasitária e exposição aos inimigos naturais	06
2.5 Nematóides Entomopatogênicos – aspectos relacionados à biologia, ecologia.	09
2.6 Breve panorama a respeito das pesquisas com nematoides entomopatogênicos no Brasil: testes contra diferentes pragas e descrição de novos isolados	11
2.7 Fatores abióticos e bióticos que interferem na a atividade de nematoides entomopatogênico.	12
2.8 Aplicação de nematoides entomopatogênicos em formulação inseto cadáver.....	14
2.9 Controle biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i> com a utilização de nematóides entomopatogênicos: conquistas e desafios	15
2.10 Compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários, fungos entomopatogênicos e produtos de origem vegetal	18
2.11 Referências bibliográficas.	22
CAPÍTULO I	
SELEÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM FORMULAÇÃO INSETO CADÁVER PARA CONTROLE DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE)	34
Resumo	35
Abstract	36
1. Introdução	37
2. Material e Métodos	38
2.1 Obtenção de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> , nematoides entomopatogênicos e larvas de <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i>	38
2.2 Obtenção dos cadáveres infectados com NEPs	38
2.3 Experimento I – Seleção de isolados de NEPs formulados em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	39
2.4 Experimento II – Avaliação dos isolados de NEPs mais virulentos formulados em larvas de <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i> para o controle de <i>R. microplus</i>	40
2.5 Análise do solo	41
2.6 Análise estatística	41
3. Resultados	42
4. Discussão	47
5. Referências bibliográficas	50

CAPÍTULO II

AÇÃO DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE), ISOLADO LPP7 PARA FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE) E INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE OUTROS HOSPEDEIROS SUSCEPTÍVEIS	55
Resumo	56
Abstract	57
1. Introdução	58
2. Material e Métodos	59
2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e isolados de nematoides entomopatogênicos, lagartas de <i>Galleria mellonella</i> e ninfas de <i>Mahanarva spectabilis</i>	59
2.2 Preparação das suspensões com nematoides	60
2.3 Experimento I – Influência de outros hospedeiros susceptíveis na eficácia de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 sobre fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	60
2.4 Experimento II – Virulência de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 multiplicados em <i>Galleria mellonella</i> e <i>Mahanarva spectabilis</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	62
2.5 Análise do solo	62
2.6 Análise estatística	62
3. Resultados	63
4. Discussão	68
5. Referências bibliográficas	72

CAPÍTULO III

EFICÁCIA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM FORMULAÇÃO INSETO CADÁVER SOBRE FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE) EM CONDIÇÕES SEMI-NATURAIS	76
Resumo	77
Abstract	78
1. Introdução	79
2. Material e Métodos	80
2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e isolados de nematoides	80
2.2 Quantificação das suspensões contendo nematoides	80
2.3 Preparação dos cadáveres infectados com NEPs	81
2.4 Preparação dos vasos contendo mudas de <i>Brachiaria decumbens</i>	81
2.5 Experimento I – Virulência <i>in vitro</i> de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> LPP30 de sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> .	82
2.6 Experimento II – Avaliação da eficácia de nematoides entomopatogênicos em formulação inseto cadáver para o controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> em testes em condições semi-naturais	82
2.7 Experimento III – Persistência de NEPs em formulação inseto cadáver para o	

controle de <i>R. microplus</i> : avaliação por meio de teste em condições semi-naturais.	84
2.8 Coleta dos dados climatológicos	84
2.9 Análise do solo	84
3. Resultados	84
4. Discussão	88
5. Referências bibliográficas	92

CAPÍTULO IV

ASSOCIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E CARRAPATICIDAS PARA O CONTROLE DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE)	97
Resumo	98
Abstract	99
1. Introdução	100
2. Material e Métodos	101
2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> , nematoides entomopatogênicos e carrapaticidas	101
2.2 Preparação das suspensões com nematoides	101
2.3 Preparação das soluções carrapaticidas	101
2.4 Experimento I – Efeito da associação de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 com carrapaticidas sobre fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	102
2.5 Experimento I – Efeito da associação de <i>Heterorhabditis indica</i> LPP1 com carrapaticidas sobre fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	103
2.6 Análise estatística	103
3. Resultados	104
4. Discussão	106
5. Referências bibliográficas	109

CAPÍTULO V

ASSOCIAÇÃO DE NEMATOIDES E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE)	114
Resumo	115
Abstract	116
1. Introdução	117
2. Material e Métodos	118
2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e isolados de nematoides e fungos entomopatogênicos	118
2.2 Preparação das suspensões com fungos	118
2.3 Preparação das suspensões com nematoides	118
2.4 Experimento I – Efeito da associação de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 com <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 116 e <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ 986 sobre fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .	118
2.5 Experimento II – Efeito da associação de <i>Heterorhabditis indica</i> LPP1 com <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 116 e <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ 986 sobre fêmeas	

ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	120
2.6 Re-isolamento dos fungos	120
2.7 Análise estatística	120
3. Resultados	120
4. Discussão	123
5. Referências bibliográficas	126

CAPÍTULO VI

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia sidoides</i> PARA O CONTROLE DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE)	129
--	-----

Resumo	130
Abstract	131
1. Introdução	132
2. Material e Métodos	133
2.1 – Local de desenvolvimento do estudo e obtenção de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> , nematoides entomopatogênicos e óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	133
2.2 Análise dos constituintes do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	133
2.3 Preparação das suspensões com nematoides	133
2.4 Preparação da solução com o óleo essencial	133
2.5 Experimento – Associação de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 e <i>Heterorhabditis indica</i> LPP1 com o óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> sobre fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	134
2.6 Análise estatística	135
3. Resultados	135
4. Discussão	137
5. Referências bibliográficas	140

CONCLUSÕES GERAIS

Capítulo I	146
Capítulo II	146
Capítulo III	147
Capítulo IV	147
Capítulo V	147
Capítulo VI	148

CONSIDERAÇÕES FINAIS

149

ANEXOS

Anexo A. Criação de <i>Galleria mellonella</i>	152
Anexo B. Criação de <i>Tenebrio molitor</i>	154
Anexo C. Manutenção e multiplicação dos isolados de nematoides entomopatogênicos	156
Anexo D. Manutenção e multiplicação dos isolados de fungos entomopatogênicos	158
Anexo E. Manutenção das colônias de carrapatos	160
Anexo F. Protocolo de aprovação do comitê de ética permitindo manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i> por meio de infestações artificiais em bezerros	163
Anexo G. Obtenção de amostras de carrapatos enviadas para realização de testes de sensibilidade de fêmeas ingurgitadas aos carrapaticidas na Embrapa Gado de Leite	165
Anexo H. Coleta de cigarrinha das pastagens	167
Anexo I. Fórmulas utilizadas para cálculo de eficácia dos tratamentos	169
Anexo J. Identificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	171
Anexo K. Artigo referente ao Capítulo I recomendado para publicação na <i>Veterinary Parasitology</i> após serem feitas as correções sugeridas pelos revisores	173
Anexo L. Artigo referente ao Capítulo V publicado na <i>Parasitology Research</i>	174
Anexo M. Artigo referente ao Capítulo VI publicado na <i>Parasitology Research</i>	175

1 INTRODUÇÃO GERAL

O agronegócio possui fundamental importância para economia do Brasil, representando um terço do PIB nacional, sendo a pecuária bovina um dos principais segmentos, uma vez que o país é um dos maiores produtores de carne, leite e derivados, sendo também um dos principais exportadores de carne. Atualmente, o país possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de aproximadamente 210 milhões de cabeças, sendo 20% com finalidade de produção leiteira e 80% para corte. A produção atende às demandas internas e externas; entretanto, acredita-se que os níveis de produtividade no país estão abaixo da sua real potencialidade. Para melhorar esse quadro, é necessário o aprimoramento dos métodos de criação já existentes, desenvolvimento de novas tecnologias e capacitação da mão de obra, permitindo o aumento na produtividade e qualidade dos produtos. Tais fatores são fundamentais para consolidação do Brasil como grande exportador, além de permitir a ampliação e conquista de novos mercados.

Um dos principais entraves para pecuária bovina brasileira são as perdas econômicas ocasionadas pelo parasitismo do carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae), comumente conhecido como carrapato dos bovinos. Esse ectoparasito apresenta ampla distribuição geográfica, sendo um dos principais problemas sanitários na bovinocultura em diversos países de clima tropical e subtropical. No Brasil, as perdas ocasionadas pelo parasitismo deste ixodídeo foram quantificadas em aproximadamente dois bilhões de dólares anuais.

O uso de carrapaticidas ainda é o método predominante no controle desse carrapato, entretanto, erros cometidos principalmente na escolha do carrapaticida e na época e forma de aplicação, têm resultado em ineficácia dos tratamentos. Como consequência, os produtores insatisfeitos, realizam tratamentos sucessivos e sem critérios técnicos, aumentando a pressão de seleção, acelerando o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes. Por isso, atualmente, a maior parte dos carrapaticidas comercializados no Brasil apresenta baixa eficácia. A utilização indiscriminada desses produtos também pode levar a contaminação do ambiente, morte de organismos não alvo e intoxicação de animais e do homem.

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle desse ectoparasito, reduzindo a dependência pelo uso de carrapaticidas organossintéticos. Nesse contexto, a utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs) representa promissora alternativa a ser empregada em programas de manejo integrado do carrapato dos bovinos. Esses nematoides são produzidos comercialmente em diferentes países de todos os continentes do mundo, sendo utilizados com sucesso no manejo de diversas espécies de insetos, em diferentes culturas. Em condições de laboratório, estudos tem demonstrado que diferentes espécies de NEPs são patogênicas para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Entretanto, os primeiros resultados obtidos *in vivo*, com aplicação de suspensão de nematoides sobre bovinos infestados, não apresentaram resultados satisfatórios. Somado a este fato, deve ser destacada a similaridade de habitats de NEPs e carrapatos durante a fase de vida não parasitária das fêmeas ingurgitadas que no momento da oviposição, buscam no solo, ambientes com alta umidade e protegidos de radiação solar, características que formam um microclima favorável para sobrevivência dos NEPs. Pesquisas que simularam essas condições demonstram que alguns isolados de nematoides foram altamente eficazes contra fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821) (Acari: Ixodidae). Assim, a aplicação de NEPs no controle do carrapato com foco na fase não parasitária merece ser investigada.

A forma de aplicação dos nematoides no solo também é um fator determinante para eficácia desses organismos no controle de pragas. Existem no mercado, produtos à base de nematoides em diferentes formulações, como em pó molhável, esponja e grânulos e, em geral,

esses produtos são diluídos em água e aplicados em sistemas de irrigação ou bombas de aspersão. Uma técnica de aplicação que vem ganhando destaque nos últimos anos é a formulação de nematoides em cadáveres de insetos, utilizando *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). Nessa metodologia, lagartas previamente infectadas são colocadas no solo e servem como fonte de nematoides, que emergem dos cadáveres e buscam novos hospedeiros no ambiente onde foram inseridos, fazendo assim, o controle da praga alvo. Estudos tem demonstrado que NEPs aplicados dessa forma apresentam maior capacidade dispersiva, maior reserva energética e maior persistência no solo, fatores que contribuem para maior eficiência de controle.

Outro aspecto importante é que no solo, além das fêmeas ingurgitadas, também se encontram outros artrópodes que são susceptíveis a infecção por NEPs, e a presença desses organismos pode interferir na eficácia dos NEPs sobre carrapatos, uma vez que pode existir certa predileção de alguns isolados para infectar insetos ao invés de ixodídeos.

A viabilidade e infectividade de NEPs para artrópodes dentro de um determinado ecossistema pode ser influenciada pela presença de diferentes produtos químicos como fertilizantes, herbicidas, fungicidas, nematicidas, inseticidas e acaricidas. Dessa forma, torna-se importante avaliar a compatibilidade dos isolados mais virulentos para determinada praga, com os produtos químicos utilizados no manejo desse sistema, permitindo estabelecer as melhores épocas e formas de aplicação dos NEPs. Caso seja observada compatibilidade, os NEPs podem ser aplicados na mesma época, misturados para preparação da calda e aplicados com o mesmo equipamento. Entretanto, se for verificada incompatibilidade, a aplicação dos NEPs deve ser feita em momentos diferentes dos produtos incompatíveis. Além disso, quando os NEPs têm sido aplicados em conjunto com inseticidas, em alguns casos foram observados efeitos aditivos ou sinérgicos. A respeito de carrapatos, existe apenas um único estudo que demonstrou que uma espécie de NEP apresentou compatibilidade com carrapaticida do grupo dos organofosforados, não sendo encontrado na literatura, nenhum relato sobre o efeito da associação de NEPs com fungos entomopatogênicos ou óleos essenciais, tendo os carrapatos como o alvo. Assim, investigações nesse sentido, podem servir de base para seleção de diferentes agentes que sejam compatíveis, fornecendo informações que no futuro, possam contribuir na elaboração de estratégias que permitam que tais agentes sejam utilizados em conjunto em estratégias de manejo integrado do carrapato dos bovinos.

Assim, o presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa, desenvolvida pela Embrapa Gado de Leite em parceria com o Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro e com o Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tendo como intuito, avaliar as interações entre o carrapato dos bovinos e NEPs, a fim de viabilizar uma nova alternativa para o controle desse ixodídeo. O estudo foi desenvolvido em seis capítulos que são apresentados e discutidos separadamente ao longo da tese. Nos capítulos 1 e 3 são apresentados os estudos de avaliação de diferentes aspectos relacionados ao potencial da formulação inseto cadáver para o controle de *R. microplus*, tais como: seleção de espécies mais virulentas, seleção de larvas de diferentes insetos para formulação de NEPs, testes de avaliação de eficácia de NEPs em condições semi-naturais e avaliação da persistência dos juvenis infectantes (JIs) aplicados em formulação inseto cadáver. No capítulo 2, foi avaliada a influência de outros hospedeiros suscetíveis sobre a eficácia de NEPs para *R. microplus*, enquanto nos capítulos 4, 5 e 6 foram feitas avaliações da interação de NEPs com carrapaticidas, fungos entomopatogênicos e óleo essencial de *Lippia sidoides*, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bovinocultura no Brasil

Os segmentos do agronegócio estão entre as atividades econômicas mais importantes e rentáveis do Brasil, representando um terço do PIB nacional, sendo responsável por criar 37% dos empregos disponíveis no país. Em 2012, 39% dos produtos exportados pelo Brasil estavam ligados às atividades do agronegócio, gerando um saldo comercial de 79 bilhões de dólares. Dentre as atividades do agronegócio brasileiro, destaca-se a Pecuária bovina, que começou a ser desenvolvida no país para subsistência no início da colonização e após cinco séculos, tornou-se um dos pilares da economia nacional. Esse crescimento da bovinocultura no país está associado a características altamente favoráveis como tipo de clima, solo, extensão territorial, tecnologia e recursos humanos disponíveis, fazendo que o Brasil apresente um elevado potencial produtivo de carne e leite (COSTA, 2006).

Atualmente o país possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de aproximadamente 210 milhões de cabeças, sendo 20% com finalidade de produção leiteira e 80% para corte (IBGE, 2011). Nos últimos anos tem-se observado grande aumento na produção e exportação de carne bovina, sendo que o Brasil, desde 2004 tornou-se o segundo maior produtor e o maior exportador (COSTA, 2006). Com relação à bovinocultura de leite, o país atualmente é o sexto maior produtor mundial, tendo 1,3 milhões de produtores e produção de 27,5 bilhões de litros ao ano (BANCO DO BRASIL, 2010).

De acordo com o atual quadro de produtividade da bovinocultura, é notório o papel de destaque que o Brasil atingiu, uma vez que o país produz grande quantidade de carne, leite e derivados, capazes de atender as demandas internas e externas. No entanto, os níveis de produtividade ainda são baixos quando comparados com sua real potencialidade. Para aumentar os níveis de produção permitindo melhor aproveitamento do seu potencial, o país necessita investir no aprimoramento dos métodos de criação já existentes, desenvolvimento de novas tecnologias e capacitação da mão de obra. Tais fatores são fundamentais para a consolidação do Brasil como grande produtor e exportador nesse setor, além de permitir a ampliação e conquista de novos mercados (COSTA, 2006; BANCO DO BRASIL, 2010).

Em países tropicais e subtropicais, um dos principais desafios para os produtores está relacionado com as perdas ocasionadas por diferentes parasitoses (GRISI et al., 2002). No Brasil, boa parte dos produtores apontam os problemas de infestações com carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) como um dos principais entraves para criação de bovinos (GRISI et al., 2002; AMARAL et al., 2011a,b).

2.2 *Rhipicephalus microplus*: posição taxonômica e distribuição geográfica

Rhipicephalus microplus está classificado no Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Ordem Acari, Subordem Ixodida e Família Ixodidae (PEREIRA, 2008). Essa espécie foi primeiramente descrita como *Haemaphysalis micropla* por Canestrini no ano de 1888, e no começo do século XX, foi alocada pela primeira vez no gênero *Boophilus* (Curtice, 1891), passando a ser denominada como *Boophilus microplus*. Durante esse século uma série de novas classificações para essa espécie foram propostas, gerando uma série de sinônimas (COOLEY, 1946; PEREIRA, 2008). No entanto, a classificação como *Boophilus microplus* permaneceu como válida até o início do século XXI. Em 2003, estudo filogenético utilizando ferramentas moleculares evidenciaram problemas na classificação dos carrapatos da subfamília *Rhipicephalinae*, uma vez que a taxonomia não refletia a filogenia, sendo o gênero

Rhipicephalus, parafilético com respeito à *Boophilus*. Dessa forma, seguindo a lei de prioridade (*Rhipicephalus* Koch, 1844 tem prioridade sobre *Boophilus* Curtice, 1891), *Boophilus* tornou-se sinônimo júnior de *Rhipicephalus*, passando as cinco espécies do gênero *Boophilus* para o gênero *Rhipicephalus*, tornando o gênero monofilético (MURREL BARKER, 2003; PEREIRA, 2008).

Esse ixodídeo é originário da Ásia e foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais por meio da importação de gado desse continente, tornando-se um grave problema para bovinocultura de corte e leite em diferentes localidades do mundo (WALKER et al., 2003; MARTINS et al., 2006, PEREIRA & LABRUNA, 2008). A distribuição de *R. microplus* ocorre entre as latitudes de 32° Norte 35° Sul, correspondendo a faixa intertropical abrangendo importantes zonas na América Central, América do Sul, África e Ásia (GUIMARÃES et al., 2001; PEREIRA & LABRUNA, 2008). Acreditava-se que essa espécie também se encontrava presente na Austrália e em outras regiões da Oceania, entretanto, sabe-se hoje que a espécie de carrapato associada a bovinos nessa região é *Rhipicephalus australis* Fuller, 1899 (Acari: Ixodidae), cujas semelhanças morfológicas e biológicas com *R. microplus* fizeram com que os pesquisadores por muito tempo consideraram-se como sendo a mesma espécie LABRUNA et al., 2009; ESTRADA-PEÑA et al., 2012).

2.3 *Rhipicephalus microplus*: importância econômica e desafios de controle

Do ponto de vista econômico, *R. microplus* é a espécie de carrapato mais importante na região Neotropical, a ponto de centralizar a atenção de indústrias de carrapaticidas, órgãos governamentais e instituições de pesquisa (MARTINS et al., 2006). No Brasil, estima-se que esse carrapato seja responsável por danos econômicos de dois bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2002). Esses prejuízos decorrem da perda de sangue do animal e diminuição da produtividade, depreciação do couro, propensão a miíses, stress dos animais, baixa eficácia de boa parte de produtos carrapaticidas e gastos com aquisição de equipamentos, medicamentos e mão de obra especializada para o tratamento dos animais (GUIMARÃES et al., 2001; FURLONG et al., 2004; FURLONG et al., 2007; PEREIRA, 2008, AMARAL et al. 2011a,b). Em casos especiais de infestações maciças, os animais podem ficar anêmicos e bezerras podem ser levados à morte (GUIMARÃES et al., 2001).

Este carrapato também é apontado com vetor da bactéria *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bovis* (Babes, 1888) (Piroplasmida: Babesidae) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Piroplasma: Babesidae), agentes causadores da anaplasmose e babesiose bovina, doenças de alta morbidade que devido a algumas semelhanças na sintomatologia, são agrupadas em um complexo denominado “Tristeza Parasitária Bovina” (GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2005; LABRUNA & MACHADO, 2006; PEREIRA & LABRUNA, 2008).

O uso de carrapaticidas ainda é o método predominante no controle *R. microplus* e os carrapaticidas utilizados podem ser divididos em produtos de contato ou sistêmicos. Os produtos de contato podem ser administrados por aspersão, imersão ou “pour on”, sendo encontrados produtos a base de substância do grupo dos piretroides, amidínicos, organofosforados, fenilpirazóis e “naturalyte”. Também existem produtos compostos pela associação de mais de uma substância desses grupos. Os carrapaticidas sistêmicos são aplicados por aspersão e injeções subcutâneas ou intramusculares, sendo encontrado produtos compostos por substâncias do grupo das lactonas macrocíclicas e benzofenilureas (FURLONG et al., 2007).

A forma de controle mais indicada é a utilização dos carrapaticidas dentro de um programa estratégico, que se baseia no conhecimento da biologia e interações deste carrapato,

planejando banhos carrapaticidas em períodos desfavoráveis para a sobrevivência deste ixodídeo na pastagem, respeitando os intervalos de banho de acordo com o período residual do produto utilizado (MARTINS & FURLONG, 2005; FURLONG et al., 2007; LABRUNA, 2008a). No momento do banho é importante que seja tomado também uma série de cuidados, como tipo e pressão da bomba de aplicação, momento de aplicação, contenção dos animais, preparação da calda de aplicação, quantidade de produto por animal e sentido da aspersão do carrapaticida sobre o corpo do bovino (MARTINS & FURLONG, 2005; FURLONG et al., 2007; LABRUNA, 2008a). Somados a isso, é importante que a propriedade apresente condições mínimas de infraestrutura que permitam que o programa seja implementado, fato nem sempre observado (LABRUNA, 2008a). A escolha do produto também é de fundamental importância e o ideal é que o carrapaticida seja escolhido com base em resultado de teste de sensibilidade (MARTINS & FURLONG, 2005; FURLONG et al., 2007).

Entretanto, na maioria das vezes, os aspectos listados anteriormente não são respeitados ou considerados. Isso se deve muito ao descaso das autoridades sanitárias e políticas do país, haja vista a ausência de um plano de controle desse carrapato nos moldes em que outros problemas sérios de sanidade animal são tratados. Assim, tal fato permite que o produtor controle o carrapato na sua propriedade sem critérios técnicos e as medidas adotadas nem sempre são as melhores escolhas (KOLLER et al., 2009). Dessa forma, na maioria das propriedades do Brasil, o combate a *R. microplus* é feito com tratamentos curativos, onde o fator chave para aplicação de carrapaticidas é o número elevado de fêmeas ingurgitadas no rebanho, não sendo adotadas medidas estratégicas (FURLONG et al., 2004; LABRUNA, 2008). Além disso, a maioria dos produtores não conhece aspectos importantes sobre a biologia deste carrapato, suas interações ecológicas (com hospedeiro e meio ambiente) e métodos seguros e adequados de manuseio de equipamentos utilizados no banho carrapaticida. Nesse tipo de tratamento, geralmente a escolha do carrapaticida utilizado também é feita de modo aleatório ou por indicação de outros produtores ou balconistas de casa agropecuária (FURLONG et al., 2004; ROCHA, 2006; AMARAL et al., 2011a,b). Todos estes fatos contribuem para a ineficiência deste tipo de tratamento, que com o passar dos anos vem sendo cada vez menos eficiente. Desta forma, o produtor insatisfeito com os resultados obtidos, passa a aplicar um maior número de banhos, utilizar doses de carrapaticidas em concentrações acima das recomendadas e fazer a troca constante dos produtos utilizados. Estes fatores levam a um aumento na pressão de seleção, acelerando o surgimento de populações de carrapatos resistentes as formulações comerciais presentes no mercado (FURLONG et al., 2007; LABRUNA, 2008a; KLAFKE, 2008).

O uso excessivo de carrapaticidas, sem se compreender aspectos sobre a biologia e epidemiologia do carrapato dos bovinos, somado a falhas na detecção da resistência, levou ao desenvolvimento de populações resistentes a quase todas as bases químicas presentes disponíveis no Brasil e em outras partes do mundo (FURLONG et al., 2007; KLAFKE, 2008). Atualmente, a maioria dos produtos de aspersão comercializados no Brasil para o controle do carrapato dos bovinos apresenta baixa eficácia (FURLONG et al., 2007). Para agravar ainda mais o atual quadro, existem poucas bases químicas disponíveis para serem utilizadas no combate deste artrópode, e a indústria tem destinado poucos esforços para o lançamento de novas bases carrapaticidas. Isso devido ao elevado custo necessário para o desenvolvimento de uma nova molécula e o curto período que o carrapaticida permanecerá eficaz até que a utilização constante também leve a seleção de carrapatos resistentes a essa molécula. Assim, o desenvolvimento de novas moléculas na maioria dos casos não é rentável para as empresas. Em outros casos, para que esse desenvolvimento seja viável para empresa, é necessário que o produto final tenha um alto custo para o produtor, o que às vezes impossibilita sua ampla comercialização e utilização (KISS et al., 2012). Assim, o que tem sido mais adotado é o

lançamento de produtos com associação de diferentes princípios ativos já existentes, buscando efeito sinérgico que nem sempre é alcançado (FURLONG et al., 2007).

Somado aos problemas de resistência, existe uma crescente preocupação com a utilização indiscriminada de carrapaticidas e outros pesticidas, uma vez que as aplicações sucessivas sem respeitar o período de carência e a concentração recomendada podem deixar resíduos contaminantes na carne, leite e derivados (FURLONG & PRATA, 2005; DE LA FUENTE & KOCAN, 2006). A utilização indiscriminada de pesticidas tem elevado a quantidade de resíduos nos alimentos consumidos pela população mundial e tal fato tem sido relacionado com aumento de certas doenças para população humana. No fim do século XX a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), publicou preocupante relatório em que o Brasil é listado como o terceiro maior consumidor de pesticidas do mundo e, coincidentemente ou não, o terceiro em mortalidade por câncer.

Essa utilização indiscriminada de pesticidas também ocorre na pecuária bovina e para o Brasil, representa um dos principais fatores limitantes para maior exportação de alimentos provenientes dessa atividade, impedindo que o país conquiste novos mercados e rompa algumas barreiras sanitárias que ainda existem (BANCO DO BRASIL, 2010). Em 2011, o Brasil teve um prejuízo de 104 milhões de dólares devido à detecção de resíduos de ivermectina em carne destinada para exportação.

Nos últimos anos, também existe uma crescente onda de conscientização a respeito da produção de alimentos de forma sustentável, sem agredir o meio ambiente e a utilização indiscriminada de carrapaticidas vai contra essas novas tendências. Isso por que o uso inadequado pode ocasionar intoxicação dos animais, contaminação do solo e de corpos d'água e morte de organismos não-alvo (GUIMARÃES et al., 2001, DE LA FUENTE & KOCAN, 2006; JETTER & PAINE, 2004).

Em vista ao atual quadro de resistência de *R. microplus* aos carrapaticidas e dos prejuízos que este ixodídeo gera a economia de diferentes países, somados aos problemas que a utilização indiscriminada dos carrapaticidas podem ocasionar para saúde e meio ambiente, novas alternativas de controle vem sendo estudadas (GOSH et al., 2006; KISS et al., 2012). Entre estas podemos citar o controle através de vacinas, rotação de pastagens, homeopatia, animais resistentes e carrapaticidas de origem vegetal (MARTINS, 2004; CHAGAS, 2004; LABRUNA, 2008a; KISS et al., 2012). Além destes métodos acima citados, podemos destacar também o controle biológico com a utilização de inimigos naturais, como predadores, parasitoides, parasitos e patógenos (SAMISH & REHACEK, 1999; SAMISH et al., 2008).

2.4 Ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*: fase não parasitária e exposição aos inimigos naturais

O ciclo de vida do carrapato dos bovinos, *R. microplus*, pode ser divididos em duas fases distintas e complementares que são a fase parasitária e não parasitária (PEREIRA & LABRUNA, 2008). A fase parasitária tem início quando as larvas infestantes sobem no animal e encontram um sítio ideal para fixação, permitindo fazer o repasto sanguíneo. Após a alimentação, as larvas ingurgitadas passam pelo processo de muda dando origem a ninfas que também vão se alimentar e após a muda, vão dar origem aos adultos (machos e fêmeas). As fêmeas se fixam e após o acasalamento ingerem grande quantidade de sangue que irá servir como fonte de nutrientes para manutenção das atividades metabólicas e para produção de ovos. Após terminar o ingurgitamento, a fêmea se desprende do animal e cai no solo, dando início a fase não parasitária, enquanto os machos permanecem ativos sobre os bovinos por cerca de dois meses fecundando outras fêmeas (GUIMARÃES et al., 2001; FURLONG &

PRATA, 2005; PEREIRA & LABRUNA, 2008). A fase parasitária dura cerca de 21 a 22 dias, não sendo observadas grandes variações, devido a temperatura corporal constante do bovino, entretanto, algumas fêmeas devido à competição intraespecífica, resistência do animal, menor capacidade de ingestão de sangue ou por remoção pelo bovino, podem se desprender do hospedeiro em menor intervalo de tempo, não completando o ingurgitamento por completo.

Já a fase não parasitária é totalmente dependente da temperatura e umidade relativa e taxas superiores a 30°C podem causar grande mortalidade das fêmeas, ovos e larvas, assim como umidades abaixo de 80% (PEREIRA & LABRUNA, 2008). Dessa maneira, a fêmea ingurgitada assim que se desprende do hospedeiro e cai no solo, procura um abrigo mesmo que parcial em baixo de touceiras e estolões de capins, folhas e gravetos, com intuito de encontrar um local com o microclima adequado para que ela possa dar início ao processo de oviposição. Esse deslocamento é direcionado pelo fototropismo negativo das fêmeas e a procura do microclima adequado é importante não apenas para as fêmeas, mas também para incubação dos ovos que serão deixados no ambiente (PEREIRA & LABRUNA, 2008). Em alguns casos, na busca por essas condições ideais, as fêmeas se enterram em fendas no solo ou na base das touceiras da pastagem (BROVINI et al., 2003). A presença de microclima ideal para o desenvolvimento da fase não parasitária é favorecida pela ampla presença de cobertura vegetal propiciada pelas pastagens utilizadas para o forrageio dos animais. Cabe destacar que assim que caem no solo, as fêmeas ainda não apresentam os ovários completamente maduros, sendo necessário um período para que ocorra a maturação permitindo que a fêmea possa iniciar o processo de postura; esse tempo é denominado como período de pré-postura. Então, enquanto as fêmeas se deslocam para encontrarem o local adequado para postura, simultaneamente vai ocorrendo a maturação dos ovários (PEREIRA & LABRUNA, 2008).

Após encontrarem o local adequado e estarem com os ovários maduros, as fêmeas começam a fazer a postura. Os carrapatos da família Ixodidae possuem um dos maiores potenciais bióticos entre os artrópodes (BALASHOV, 1972), podendo cada fêmea de *R. microplus* produzir até 3.000 ovos (GUIMARÃES et al., 2011; FURLONG & PRATA, 2005). Alguns autores demonstraram que a capacidade das fêmeas produzirem ovos está diretamente relacionada com o peso da fêmea (BORGES et al., 2001); uma vez que carrapatos mais pesados ingeriram maior quantidade de sangue, pois possuem maior reserva de nutrientes para ser convertida (SANTOS & FURLONG, 2002). O peso da massa de ovos produzida por uma fêmea equivale a cerca de 50% do seu peso antes de iniciar a postura. O período de postura e a quantidade de ovos produzidos por dia são influenciadas diretamente pela temperatura, mas não pela umidade (HITCHCOCK, 1955; SNOWBALL, 1957 *apud* PEREIRA & LABRUNA, 2008). A quantidade de ovos produzidos pela fêmea cresce diariamente até o quarto dia e após isso, essa quantidade vai diminuindo continuamente até o fim da postura, sendo que os ovos dos primeiros e últimos dias apresentam menor viabilidade (PEREIRA & LABRUNA, 2008).

Mesmo após o início de oviposição, as fêmeas ainda podem se deslocar em pequenas distâncias, procurando novos sítios com microclimas mais adequados, para então, continuarem a fazer a postura, sendo que as fêmeas se deslocam mais durante o inverno e durante o dia, não sendo observado deslocamento durante a noite (CHAGAS et al., 2001; BROVINI et al., 2003). As fêmeas praticamente não se movem em temperaturas a baixo de 15°C e em umidades superiores a 95% e dentro de cada estação (verão e inverno) é possível observar aumento no deslocamento à medida que a temperatura aumenta e a umidade diminui. A incidência de raios solares também parece está correlacionada com as distâncias percorridas pelas fêmeas, uma vez que em dias com sol as fêmeas se deslocaram mais do que em dias nublados com a mesma temperatura. Tais fatos evidenciam que os deslocamentos das fêmeas

está relacionado com a busca de um microclima com condições adequadas de temperatura e umidade para dar continuidade ao processo de oviposição (CHAGAS et al., 2001).

Os ovos são o estágio de desenvolvimento de ixodídeos mais susceptível a dessecação (PEREIRA & LABRUNA, 2008), sendo que eles só completam seu desenvolvimento em ambientes com umidade ao redor de 80% (LABRUNA, 2008b). A temperatura também está relacionada com o período de incubação e a viabilidade dos ovos (PEREIRA & LABRUNA, 2008). Desses ovos eclodem as larvas que permanecem inativas no solo próximo as cascas dos ovos nos primeiros dois ou três dias, onde encontram maior proteção contra os fatores abióticos devido à cobertura vegetal. Esse período é necessário para o enrijecimento da cutícula que logo após a eclosão é translúcida durante os primeiros dias e após a exposição ao ar, assume coloração marrom-avermelhada (FURLONG & PRATA, 2005; PEREIRA & LABRUNA, 2008). Passado esses dias, devido ao geotropismo negativo e ao fototropismo positivo, as larvas sobem na vegetação e se agrupam na ponta do capim. Esse comportamento serve como forma de proteção contra a perda de água para o ambiente e proteção contra a incidência direta de radiação solar (GUIMARÃES et al., 2001). As larvas podem ficar em jejum por meses na pastagem até encontrar um hospedeiro adequado (GUIMARÃES et al., 2001).

É importante mencionar que a fase não parasitária de *R. microplus* também já foi amplamente estudada em condições de laboratório. Em temperatura de 27°C e umidade superior a 80%, os períodos de pré-postura, postura e incubação duram cerca de três, 15 e 25 dias, respectivamente. A massa de ovos produzida por essas fêmeas equivale em média a 50% do peso da fêmea ingurgitada antes da postura e cerca 95% dos ovos produzidos são viáveis (GUIMARÃES, et al., 2001). A biologia dos parâmetros reprodutivos sobre condições controladas são de fundamental importância, uma vez que nos testes de produtos carrapaticidas (químicos organossintéticos e biossintéticos e biológicos), sobre fêmeas ingurgitadas, a eficiência dos tratamentos é medida através do grau de interferência sobre esses parâmetros. Tal fato é recomendado pela FAO e pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1990; FAO, 2004).

Como mencionado anteriormente, o tempo de duração da fase não parasitária está diretamente relacionado com os fatores climáticos, sendo que muitos autores afirmam que a temperatura é o fator mais importante na duração dessa fase (HITCHCOCK, 1955; OLIVEIRA, 1974; GONZÁLES, 1975; SHORT, 1989). Todas essas etapas (períodos de pré-postura, postura e incubação dos ovos) são retardadas em baixas temperaturas e aceleradas em altas temperaturas, sendo que valores superiores a 30°C causam morte de fêmeas, ovos e larvas, enquanto valores inferiores a 15°C ocasionam mortes de fêmeas e ovos (PEREIRA & LABRUNA, 2008). Na região sudeste, a fase não parasitária (queda da fêmea e subida da larva infesta no bovino) se completa em torno de 40 a 50 dias na primavera e verão e 70 a 120 dias no outono e inverno (LABRUNA, 2008b). Cabe destacar também que de forma geral, 95% dos carrapatos de uma população estão no ambiente e apenas 5% estão sobre os animais (FURLONG & PRATA, 2005). Assim, é possível observar que durante o seu ciclo de vida, *R. microplus* passa mais tempo no ambiente do que sobre o bovino e que existem muito mais carrapatos no ambiente do que sobre o animal.

Durante todo esse período em que os carrapatos estão no ambiente, eles passam a fazer parte de uma cadeia trófica dentro da comunidade estabelecida na pastagem e todas as fases de desenvolvimento (fêmea ingurgitada, ovo e larva) são acometidas por diferentes predadores, parasitoides, parasitos e patógenos que utilizam os carrapatos como fonte de recursos energéticos, principalmente as fêmeas ingurgitada por serem um estágio altamente vulnerável e por apresentarem grande valor nutricional (BROVINI et al., 2003).

No ambiente, os carrapatos podem ser predados por uma série de outros artrópodes como ácaros, aranhas, hemípteros, himenópteros da família Formicidae, coleópteros,

lepidópteros e dermápteros (SAMISH & REHACEK, 1999). Rocha et al. (1983b) observaram que fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram predadas pelas aranhas *Phoneutra nigriventer* (Keyserling, 1891) (Araneae: Ctenidae) e *Lycosa erythognata* Lucas, 1836 (Araneae: Lycosidae). Também existem registro de fêmeas ingurgitadas e ovos de *R. microplus* sendo predados pelas formigas *Solenopsis saevissima* (Smith, 1855) (Hymenoptera: Formicidae), *Camponolus rengerii* Emery, 1894 (Hymenoptera: Formicidae), *Ectatomma quadridens* Fabricius, 1793 (Hymenoptera: Formicidae), *Pachycondyla striata* Smith, 1858 (Hymenoptera: Formicidae) (ROCHA et al., 1983a; FALCE & HAMANN, 1991; CHAGAS et al., 2002), por coleópteros da família Lampyridae e por tesourinha da família Forficulidae (BROVINI et al., 2003).

Além de invertebrados, os carrapatos podem ser predados por uma série de vertebrados como anfíbios, répteis, aves e mamíferos (SAMISH & REHACEK, 1999). Existem registros de sapos consumido fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* (FALEIROS et al., 1983) e registros de *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) (Anura: Bufonidae) sendo capturados com a utilização armadilhas contendo fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus* (VERÍSSIMO et al., 1985). Aves são conhecidas como os principais predadores de carrapatos, sendo registradas mais de 50 espécies que possuem esse hábito alimentar. No entanto, na maioria das vezes, as aves consomem os carrapatos que se encontram na fase parasitária (SAMISH, 2000), retirando os indivíduos fixados no hospedeiro. No entanto, algumas espécies como *Numida meleagris* (Linnaeus, 1758) (Galliformes: Numididae) consomem as fêmeas ingurgitadas fixadas no bovino e também as que já estão no solo. Mamíferos da ordem Rodentia como *Rattus rattus* Linnaeus, 1758 (Rodentia: Muridae) e *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) também foram observados predando fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* no campo e em estábulos (FALEIROS et al., 1983; ROCHA, 1984).

Os carrapatos presentes no ambiente também são utilizados como fonte de nutrientes por parasitoides das ordens Diptera e Hymenoptera (família Vespidae, gênero *Ixodiphagus*) (SAMISH et al., 2008) e como exemplo de parasitoide associado ao carrapato dos bovinos podemos citar a mosca *Megaselia scalaris* Loew, 1866 (Diptera: Foridae). As larvas desse díptero se desenvolvem no interior das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, consumido todo o corpo do carrapato (MIRANDA-MIRANDA et al., 2011).

Além de predadores e parasitoides, os carrapatos no ambiente também podem entrar em contato com uma série microrganismos que possuem patogenicidade para os diferentes estágios de desenvolvimento da fase não parasitária como bactérias, fungos e nematoides (SAMISH et al., 2008). Entre esses patógenos de carrapatos, os fungos são os mais bem estudados e apontados como mais promissores para serem utilizados no controle de ixodídeos. Muitos isolados apresentaram patogenicidade para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (FERNANDES & BITTENCOURT, 2008). Embora os fungos tenham sido apontados como organismos de maior potencial para o controle biológico de carrapatos, os nematoides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae também são apontados como promissores agentes para esse fim (SAMISH et al., 2008), pois as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* são altamente suscetíveis a infecção por esses nematoides (MONTEIRO et al., 2010a; SILVA et al., 2012).

2.5 Nematóides entomopatogênicos – aspectos relacionados à biologia e ecologia

Existem inúmeros relatos na literatura que demonstram o potencial de nematoides entomopatogênicos para o controle de diferentes pragas, principalmente no controle de organismos que tenham pelo menos um estágio de desenvolvimento no solo e que esse estágio

seja suscetível a infecção por NEPs (DOLINSKI, 2006, DOLINSKI & MOINO JR, 2006). A produção de nematoides em escala industrial já é feita por empresas no EUA, Canadá, Austrália, Suíça, República Tcheca, Itália, Reino Unido, Suécia, Alemanha, Holanda, Cuba, Japão e Israel. Recentemente no Brasil, a empresa Biocontrole começou a produzir e comercializar um produto a base de NEPs formulados em esponjas de poliuretano para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Laurie 1978 (Coleoptera Curculionidae) (MONTEIRO & PRATA, 2013).

Esses nematoides pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda, Secernetea), na qual estão classificadas as famílias em Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae POINAR, 1976. A primeira é composta pelos gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 (61 espécies) e *Neosteinernema* Nguyen & Smart, 1994 (uma espécie), e a segunda pelo gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (13 espécies) (NGUYEN, 2009).

NEPs do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* são associados com bactérias simbiotes dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* respectivamente (GEORGIS & MANWEILER, 1994; BURNELL & STOCK, 2000). Tais nematoides atuam como veículos para essas bactérias, que são patogênicas, quando introduzidas no corpo dos insetos hospedeiros, onde provocam rápida septicemia, levando-os a morte (FERRAZ, 1998; GREWAL et al., 2001, HAZIR et al., 2003). São observadas três fases durante o desenvolvimento desses nematoides, sendo elas: ovo, juvenil (J1, J2, J3 e J4) e adultos (fêmeas, machos e em determinados casos hermafroditas) (FERRAZ, 1998; DOLINSKI et al., 2005; DOLINSKI & MOINO-JR, 2006).

O ciclo no hospedeiro se inicia pelos juvenis infectantes (JIs) de terceiro estágio (J3), os quais carregam bactérias mutualísticas específicas nos seus intestinos. Os JIs buscam e localizam seus hospedeiros pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura, e ao localizarem, penetram através das aberturas naturais (boca, anus e espiráculos) e migram para hemocele. No entanto, os juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. podem penetrar também diretamente pelo tegumento por meio de uma projeção da cutícula denominada dente quitinoso presente na parte frontal (KAYA & GAUGLER, 1993; DOLINSKI & MOINO-JR, 2006).

Uma vez dentro do hemocele do hospedeiro os juvenis liberam as bactérias que se propagam, multiplicam e por meio de suas toxinas matam o inseto (FERRAZ, 1998; HAZIR et al., 2003) e na sequência, os JIs ingerem tecidos decompostos e as bactérias no interior do hospedeiro. As bactérias também produzem substâncias que inibe o desenvolvimento de outros microrganismos no hospedeiro colonizado. Os adultos irão reproduzir e dar origem a próxima geração. Estes nematoides podem completar de duas a três gerações dentro do inseto, isto vai depender do tamanho do hospedeiro e da disponibilidade de alimento no interior do cadáver. Quando os nutrientes são exauridos, JIs (=J3) retêm as bactérias e deixam o cadáver, para no ambiente, buscar um novo hospedeiro (FERRAZ, 1998; GREWAL et al., 2003; DOLINSKI, 2006).

Existem diferentes tipos de comportamento com relação a busca do hospedeiro, assim, os nematoides entomopatogênicos podem ser divididos em três categorias: (1) cruzador, que busca ativamente seu hospedeiro movimentando-se no ambiente, apresentando curtas pausas para escaneamento; (2) emboscador, que se locomove pouco no ambiente e apresenta maior tempo de escaneamento, exibindo ainda o comportamento de nictação, onde o nematoide ergue o corpo ficando apoiado com a extremidade posterior sobre o substrato, movendo apenas a região anterior (escaneamento) e na presença do hospedeiro “salta” em sua direção; (3) nematoides que apresentam um comportamento misto, ora agindo como cruzador e ora agindo como emboscador (GREWAL et al., 2001; HAZIR et al., 2003; DOLINSKI, 2006).

Os NEPs são importantes agentes no controle biológico, sendo capazes de infectar e matar insetos de diferentes ordens (NEVES, 1999; GREWAL et al., 2001; HAZIR et al.,

2003; DOLINSKI, 2006). Algumas características que os fazem controladores potenciais de pragas são: podem ser produzidos com baixo custo em insetos hospedeiros ou em meios artificiais; podem ser armazenados; são facilmente aplicados no campo por meio de sistemas de irrigação ou pulverizados; possuem habilidade de buscar o hospedeiro; são compatíveis com diversos pesticidas; são seguros a maioria dos invertebrados e vertebrados; e em muitas vezes são bem específicos, não causando mortalidade indiscriminada (NEVES, 1999; GREWAL et al., 2001; DOLINSKI & MOINO JR, 2006).

2.6 Breve panorama a respeito das pesquisas com nematoides entomopatogênicos no Brasil: testes contra diferentes pragas e descrição de novos isolados

O Brasil tem diferentes histórias de sucesso no controle de pragas com vírus, bactérias, fungos e parasitoides, entretanto, a utilização de NEPs no país ainda é pouco explorada e, além de escassos, a maioria dos estudos envolvendo esses organismos é recente (GREWAL et al., 2001). A baixo são listadas algumas pesquisas desenvolvidas por pesquisadores no Brasil, avaliando o potencial de NEPs contra diferentes insetos.

Leite et al. (2003) testaram cinco isolados nativos de NEPs visando o controle de ninfas da cigarrinha das pastagens *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera, Cercopidae), e relataram que *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (Rhabditida, Steinernematidae) e *Heterorhabditis* sp. foram as espécies mais patogênicas causando mortalidade de 84% após cinco dias de infecção.

A patogenicidade de NEPs sobre ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae) foi investigada por Machado et al. (2005), e os resultados obtidos demonstram que *Heterorhabditis indica* Poinar et al., 1992 (Rhabditida, Heterorhabditidae) e *S. glaseri* causaram pequena mortalidade a ovos e alta mortalidade a larvas recém-eclodidas e em estágio final de desenvolvimento.

Em casa de vegetação, Bussola et al. (2004) utilizaram duas concentrações (5,7 e 22,6 JIs/cm²) de *Heterorhabditis* sp. em bandejas de 40x60 cm contendo turfas de violetas, buscando o controle de larvas de *Bradysia* sp. (Diptera, Sciaridae), sendo que a concentração de 22,6 JIs/cm² foi a mais eficiente causando mortalidade de 80% das larvas.

Com o objetivo de observar o desempenho de *Heterorhabditis baujardi* Phan et al. 2003 sobre larvas do gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae), Del Valle et al. (2005) testaram dois isolados desta espécie, e observaram melhor eficiência da linhagem selecionada para tolerância em elevadas temperatura, demonstrando que linhagens com maior tolerância a temperaturas elevadas podem ser mais eficientes.

Em estudo conduzido por Alves et al. (2005), foram testadas duas espécies de NEPs no controle do cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e os resultados obtidos demonstraram que *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Rhabditida, Steinernematidae) foi mais patogênica do que *S. glaseri* e que o estágio de larva foi mais susceptível do que adultos desta espécie. Resultado similar foi obtido por Costa et al. (2007), que observou melhor eficiência de *Steinernema carpocapsae* Weiser, 1955 (Rhabditidae: Heterorhabditidae) no controle deste besouro e também relatou que larvas foram mais susceptíveis que pupas e adultos.

Buscando uma nova alternativa no controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae), Souza (2006) utilizou diferentes espécies de nematoides e observou que para este inseto, indivíduos do gênero *Steinernema*, em geral, foram mais virulentos do que NEPs do gênero *Heterorhabditis*. Estudo sobre o controle de *S. levis* com a utilização de NEPs foi conduzido por Tavares et al. (2007), e os dados alcançados demonstram que *H.*

indica IBCB-n5 e *Steinernema* sp. IBCB-n6 nas dosagens de 60 JIs/cm² causaram mortalidade em laboratório de 95 e 42% e 85 e 73% em casa de vegetação.

Ainda no Brasil, em parceria com uma cooperativa de produtores de Goiaba, pesquisadores da Universidade Federal do Norte Fluminense têm desenvolvido um importante trabalho, fundamentado na aplicação dos NEPs associados à tortas de Neem, que tem reduzido significativamente a população de *C. psidii*, fazendo o controle eficiente da praga, além de reduzir os custos de produção em 40% (DOLINSKI et al., 2012).

Com o crescente aumento no interesse da utilização de NEPs no controle de diferentes pragas, algumas considerações devem ser feitas a respeito do perigo da introdução de espécies (DOLINSKI & MOINO-JR, 2006). Nos EUA *Steinernema feltiae* (Felipjev, 1934) (Rhabditida: Heterorhabditidae) foi introduzida e multiplicada sem critério, o que resultou na crítica de diferentes pesquisadores e posteriormente na proposição e elaboração de um guia para introdução de NEPs, e que mais tarde resultou em uma legislação sobre introdução de espécies exóticas de NEPs (RIVZI et al., 1996; GEORGIS, 2005 *apud*, DOLINSKI & MOINO-JR, 2006). Na Europa foi organizado um comitê onde foi previsto que estes indivíduos são organismos benéficos, inócuos a animais de sangue quente e de poucos riscos ao ambiente, recomendando que estes nematoides não precisam de registro para sua introdução, pois representam menos risco do que pesticidas (RICHARDSON, 1996; DOLINSKI & MOINO-JR, 2006).

Segundo Dolinski & Moino-Jr, (2006) existe um grande potencial na utilização de NEPs como agentes de controle, e a utilização de espécies nativas deve ser prioridade por já estarem adaptados as condições climatológicas e a entomofauna local, e a utilização de espécies exóticas deve ser realizada, em último caso, respeitando-se as condições impostas na legislação. Neste raciocínio, estudos têm sido conduzidos nos países com intuito de identificar espécies de NEPs nativas para que no futuro estes isolados possam ser utilizados com sucesso no controle de diferentes pragas através do desenvolvimento de produtos comerciais. Andaló et al. (2006) coletaram amostras de solo no estado do Amazonas e descreveram uma nova espécie de nematoide classificada como *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al., 2006, (Rhabditida: Heterorhabditidae). Por meio de coleta de amostras de solo no estado de Rondônia, Dolinski et al. (2008) identificaram novos isolados de NEPs das espécies *H. indica* e *Heterorhabditis baujardi* Phan et al. 2003 (Rhabditida: Heterorhabditidae), e entre esses estavam os isolados LPP1 e LPP7. Novas linhagens de *Heterorhabditis* sp. e de *S. glaseri* também foram obtidas por Acevedo et al. (2005) e Machado et al. (2005) através de solos coletados no município de Lavras, MG e Araras, SP, respectivamente. Recentemente, um novo isolado de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1975) (Rhabditida: Heterorhabditidae), denominado como LPP30 foi obtido através de amostras de solo proveniente de uma localidade do município de Campos dos Goytacazes (MINAS, 2011).

2.7 Fatores abióticos e bióticos que interferem na a atividade de nematoides entomopatogênicos

A compreensão das interações ecológicas dos JIs dentro do ecossistema é de fundamental importância para obtenção de sucesso com utilização de NEPs no controle biológico de pragas (LEWIS et al., 2006; SHAPIRO-ILAN et al., 2012). A eficácia de NEPs a campo pode ser influenciada por diferentes fatores abióticos como temperatura, umidade relativa, textura e pH do solo e as condições ótimas desses fatores variam de acordo com a espécie e isolado. A incidência de radiação ultravioleta e presença de produtos químicos no ambiente também são variáveis abióticas que podem reduzir a eficiência de NEPs no campo. Além dos fatores abióticos citados anteriormente, no ambiente, a eficácia dos NEPs também

vai ser influenciada por fatores bióticos como grau de virulência, capacidade de localizar o hospedeiro alvo e presença de patógenos, predadores e outros entomopatógenos que competem pelos mesmos recursos (SHAPIRO-ILAN et al., 2006; SHAPIRO-ILAN et al., 2012).

Com relação à umidade, sabe-se que os NEPs necessitam de filme de água para se locomoverem e dispersarem no solo e níveis baixos de umidade faz com que os JIs fiquem inativos. No entanto, elevadas taxas de umidade também podem restringir a movimentação e reduzir a disponibilidade de oxigênio. Os níveis ótimos de umidade além de variarem de acordo com espécie e isolado, também variam de acordo com a textura do solo. A utilização de sistemas de irrigação favorece a manutenção de níveis ótimos de umidade (GRIFFIN et al., 2005; SHAPIRO et al., 2006; ROHDE et al., 2010).

O limiar de temperatura no qual uma espécie de nematoide pode sobreviver, infectar e reproduzir geralmente está próxima das condições climáticas do local de origem da espécie (MOLYNEUX, 1986). Algumas espécies tem distribuição geográfica restrita a regiões de clima temperado, assim, seu melhor desempenho é obtido em temperaturas mais baixas (HAZIR et al., 2003; SHAPIRO-ILAN, 2006) enquanto algumas espécies possuem distribuição limitada a áreas de clima tropical, sendo mais efetivas em temperaturas mais elevadas. Por último, existem algumas espécies que apresentam ampla distribuição geográfica, estando adaptadas a maiores variações de temperatura (GREWAL et al., 1994; HOMINICK, 2002; ROHDE et al., 2010).

A textura do solo também apresenta importante papel na mobilidade e sobrevivência dos NEPs (KAYA, 1990; BARBERCHECK 1992), sendo relatado que substratos com predomínio de fração de areia geralmente são favoráveis para locomoção e sobrevivência da maioria das espécies (SHAPIRO-ILAN et al., 2006). Tal característica fornece maiores taxas de oxigênio e possibilita maior dispersão dos sinais voláteis emitidos por artrópodes hospedeiros, facilitando que esses sejam localizados pelos JIs. Entretanto, maiores quantidades de argila diminuem a porosidade do solo, limitando a locomoção dos JIs, além de reduzir a disponibilidade de oxigênio (KAYA, 1990, BARBERCHECK & KAYA, 1991, DOLISNKI et al., 2010). O pH também pode ser um fator limitante (SHAPIRO-ILAN et al., 2006). Estudos apontam que valores entre 4 e 8 não tem efeito prejudicial para a maioria das espécies, enquanto taxas acima de 10 são apontadas como prejudiciais (KUNG et al., 1990).

A incidência de radiação ultravioleta é um fator prejudicial aos nematoides, podendo causar a morte dos JIs. A aplicação dos NEPs ao entardecer ou nas primeiras horas da manhã são estratégias que podem minimizar esse efeito, evitando que os JIs fiquem expostos à radiação solar nos horários mais críticos (GAUGLER & BOUSH, 1978; SHAPIRO et al., 2006).

Fertilizantes e pesticidas podem apresentar efeitos positivos, neutros ou negativos sobre NEPs. A maioria dos fertilizantes não afeta os JIs quando são aplicados de acordo com as recomendações do fabricante, no entanto, a utilização de esterco fresco e uréia podem ser prejudiciais, reduzindo a infectividade dos JIs, podendo até ocasionar a morte. Com relação ao efeito dos pesticidas sobre NEPs, tem sido verificada compatibilidade na maioria dos estudos. Entretanto, determinadas substâncias podem ser altamente tóxicos para os JIs e o contato com essas substâncias pode causar a morte ou afetar a infectividade. Assim, para cada sistema de produção no qual se pretende utilizar os NEPs, torna-se importante avaliar a compatibilidade dos isolados mais virulentos para determinado praga com os produtos químicos utilizados no manejo desse sistema (ALVES et al., 1998; GREWAL et al., 2001; KOPPENHÖFER & GREWAL, 2005).

Entre os fatores bióticos que interferem na eficácia de NEPs, o principal é o grau de virulência, sendo que cada espécie ou isolado de nematoide apresenta maior competência para infectar determinados artrópodes. Tal aspecto evidencia a importância da realização de

estudos prévios em laboratório para seleção dos isolados mais virulentos para o artrópode que se pretende controlar. A eficácia de NEPs também pode ser afetada pelo comportamento do hospedeiro. Espécies com comportamento “cruiser” são mais indicadas para o controle para artrópodes que pouco se locomovem, enquanto espécies “ambusher” são mais afetivas contra artrópodes mais ativos no solo (SHAPIRO et al., 2006).

No solo os JIs também podem ser infectados ou predados por uma série de organismos como bactérias, protozoários, fungos, ácaros e outros nematoides e a presença desses organismos pode afetar a utilização dos NEPs. A competição por recursos entre NEPs com outros entomopatógenos como bactérias e fungos também pode afetar a infectividade dos JIs (SHAPIRO et al., 2006).

2.8 Aplicação de nematoides entomopatogênicos em formulação inseto cadáver

Nematóides entomopatogênicos comumente são estocados em suspensões aquosas e geralmente aplicados com a utilização de aspersores ou por sistemas de irrigação. Esses métodos requerem equipamentos adequados e mão de obra especializada para manuseio e tais fatores podem limitar a utilização de NEPs por pequenos produtores rurais (DEL VALLE, 2008). A aplicação de NEPs no ambiente também pode ser feita através de formulação em inseto cadáver. Nessa metodologia, lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepdoptera: Pyralidae) são infectadas com nematoides e liberadas no campo. Após alguns dias, os JIs começam a emergir do cadáver e no solo, irão buscar novos hospedeiros, fazendo assim o controle da praga alvo (SHAPIRO et al., 2001; DOLINSKI, 2006; DEL VALLE, 2008). A implementação desta tecnologia é simples e envolve baixo custo, podendo ser utilizada por produtores de diferentes realidades (DEL VALLE et al., 2008), uma vez que a aplicação por esse método Del VALLE, 2008).

Cabe destacar que a aplicação de NEPs com a formulação de inseto cadáver possui aspectos positivos quando comparada a outras formas de aplicações em campo. Shapiro & Glazer (1996) demonstraram que JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* emergidos de insetos-cadáveres apresentam maior habilidade dispersiva quando comparados a JIs provenientes de suspensões aquosas. A melhor capacidade dispersiva acarreta incremento na procura de novos hospedeiros e tal fato pode contribuir para eficácia dos NEPs. Os JIs emergidos de cadáveres infectados também tem demonstrado maior capacidade de infectar o hospedeiro e maior longevidade no solo quando comparados com JIs provenientes de aplicação em suspensão aquosa (SHAPIRO-ILAN et al., 2003), fazendo que os JIs apresentem maior virulência e persistam por mais tempo no ambiente, aumentando as chances de sucesso com a utilização de NEPs para o controle de pragas. Esse método de aplicação tem apresentado bons resultados em testes em casa de vegetação e em campo contra diferentes insetos (BRUCK, 2000; DEL VALLE et al. 2008a; ANSARI et al., 2009; SHAPIRO et al., 2010).

No Brasil, Del Valle et al. (2008a) demonstraram a aplicação de *H. baujardi* LPP7 formulado em lagartas de *G. mellonella* reduziram o número de indivíduos do gorgulho da goiaba, *C. psidii*. Ainda nesse estudo, os autores verificaram que os JIs proveniente dessa aplicação persistiram por até seis semanas no campo, mas após esse período ocorreu decréscimo significativo na população desse nematoide. Em outro trabalho, Del Valle et al. (2008) verificaram que JIs de *H. baujardi* LPP7 dispersaram por até 90 cm do local de aplicação em formulação inseto cadáver.

Todos os resultados obtidos com *H. baujardi* LPP7 em casa de vegetação e a campo nos resultados citados anteriormente serviram de base para o início de uma iniciativa conduzida por pesquisadores da UENF e produtores de goiaba de uma cooperativa no

município de Cachoeira de Macacu, RJ. Nessa localidade, *H. baujardi* LPP7 vem sendo aplicado por pulverização e por formulação inseto cadáver e os resultados obtidos foram amplamente favoráveis, sendo constatada redução na densidade populacional da praga, além de redução no custo de produção e aumento na produtividade (DOLISNKI et al., 2012).

Um problema enfrentado com esse tipo de formulação seria a ruptura ou adesão dos cadáveres durante a produção, estocagem e manuseio, causando danos que comprometeriam esse tipo de utilização (DEL VALLE, 2008; SHAPIRO et al., 2010). Nos EUA, tem-se priorizado utilizar larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae), que apresentam cutícula mais rígida do que lagartas de *G. mellonella*, facilitando a preservação da integridade do cadáver (SHAPIRO et al., 2008). Para superar essa dificuldade, também têm sido desenvolvidos estudos para avaliar o efeito de cobertura dos cadáveres com uma série de substâncias como argila, glúten, lignina e amido, talco, calcáreo e cápsulas gelatinosas. O resultado obtidos tem demonstrado que algumas dessas coberturas minimizam os problemas de rupturas e adesão dos cadáveres, sem atrapalhar a viabilidade dos JIs, sendo indicadas como importante iniciativa para obtenção de sucesso com esse método de aplicação (SHAPIRO et al., 2001; DEL VALLE et al., 2009; ANSARI et al., 2009). Ainda sobre esse problema, nos EUA foi desenvolvida uma máquina para o envelopamento de cadáveres com fita adesiva, permitindo uma produção em maior escala. Foi verificado que essa fita além de preservar o cadáver, não interferiu na eficiência do método, sendo obtidos bons resultados de controle com a aplicação de NEPs produzidos com essa formulação contra os coleópteros *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Curculionidae) e *Aethina tumida* Muray, 1867 (Coleoptera: Nitidulidae) (SHAPIRO et al., 2010).

A remoção dos cadáveres do local de aplicação feito por diferentes artrópodes também é um problema nesse tipo de abordagem. Del Valle (2008) verificou que formigas retiravam os cadáveres de *G. mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 do local de aplicação. Entretanto, foi verificado que cadáveres aplicados no interior de capsulas gelatinosas reduzem significativamente esse problema (DEL VALLE et al., 2009).

2.9 Controle biológico de *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematóides entomopatogênicos: conquistas e desafios

Nematoides entomopatogênicos são importantes agentes no controle de diferentes pragas (DOLISNKI, 2006; GREWAL et al., 2001). A partir da década de 1990 a utilização destes nematoides também vem despertando o interesse de acarologistas que buscam formas alternativas de controle de carrapatos (SAMISH et al., 2008). O primeiro trabalho nesta linha foi publicado em 1991, tendo sido verificado que fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821) (Acari: Ixodidae) foram susceptíveis a infecções por NEPs (SAMISH & GLAZER, 1991). Em publicação no ano seguinte, os mesmos autores observaram que diferentes concentrações de *S. carpocapsae* causaram pequenas reduções na massa de ovos desse ixodídeo (SAMISH & GLAZER, 1992).

Até o momento sabe-se que aproximadamente dezesseis espécies de ixodídeos e três de argasídeos são susceptíveis a infecções por NEPs (SAMISH et al., 2008; MONTEIRO et al., 2014, YANG et al., 2013), sendo que as fêmeas ingurgitadas são mais vulneráveis a infecção seguido pelos adultos não ingurgitados. As ninfas são pouco susceptíveis, enquanto os demais estágios são altamente resistentes (SAMISH & GLAZER, 2001; SAMISH et al., 2008; CARDOSO et al., 2013). A concentração de JIs necessária para matar 50 e 90% de carrapatos em testes em laboratório é similar às concentrações necessárias para o mesmo fim, sobre insetos, entretanto, o tempo letal para carrapatos é maior (SAMISH et al., 2008). Em geral, estudos também têm demonstrado que os NEPs são mais eficazes contra carrapatos em

temperaturas entre 25 e 28°C, mas algumas espécies de NEPS apresentam maior plasticidade (18-34°C) (SAMISH et al., 2008).

Com relação ao carrapato dos bovinos, o primeiro trabalho foi realizado em 1993, quando pesquisadores avaliaram a patogenicidade de 17 isolados de NEPs para *R. microplus*, *R. annulatus* e *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1974) (Acari: Ixodidae) e verificaram que apenas a segunda espécie foi susceptível a infecção por NEPs, enquanto as outras foram classificadas como resistentes (MAULEON et al., 1993). Essa verdade científica permaneceu por uma década, até que em 2004 foi publicado o primeiro estudo que demonstrou que fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* são suscetíveis a infecção por NEPs (VASCONCELOS et al., 2004). A partir dessa publicação, novos estudos foram conduzidos com intuito de selecionar os isolados de NEPs mais virulentos para o carrapato dos bovinos e até o momento, 11 isolados foram testados, sendo cinco do gênero *Steinernema* e seis do gênero *Heterorhabditis* (Tabela 1) (MONTEIRO & PRATA, 2013).

Tabela 1. Isolados de nematoides entomopatogênicos testados contra *Rhipicephalus microplus*.

Isolados testados	Publicações
<i>Steinernema glaseri</i> Santa Rosa	(VASCONCELOS et al., 2004)
<i>Steinernema glaseri</i> CCA	(CARVALHO et al., 2010)
<i>Steinernema carpocapsae</i> ALL	(FREITAS-RIBEIRO et al., 2005)
<i>Steinernema carpocapsae</i> Santa Rosa	(FREITAS-RIBEIRO et al., 2005)
<i>Steinernema diaprepesi</i>	(MOLINA-OCHOA et al., 2009)
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> CCA	(VASCONCELOS et al., 2004)
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	(MONTEIRO et al., 2010a)
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC-5	(MONTEIRO et al., 2010b)
<i>Heterorhabditis indica</i> LPP1	(SILVA et al., 2012)
<i>Heterorhabditis indica</i> LPP4	(MACHADO, 2008)
<i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7	(MACHADO, 2008)

Fonte: MONTEIRO & PRATA (2013).

Os resultados obtidos revelam que os nematoides do gênero *Heterorhabditis* são mais virulentos para *R. microplus* (MONTEIRO & PRATA, 2013), fato também verificado em relação à susceptibilidade de outras espécies de carrapatos (MAULEON et al., 1993; EL-SADAWY & HABEEB, 1998; HILL, 1998; HASSANAIN et al., 1999; GLAZER et al., 2001; ALEKSEEV et al., 2006). No entanto, mesmo entre os nematoides desse gênero, existe ainda grande variação entre a virulência de acordo com o isolado utilizado. Dentre as espécies de *Heterorhabditis* testadas em laboratório, *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram as mais virulentas, uma vez que a concentração de 75 JIs/fêmea ingurgitada resultou em percentual de controle superior a 90%, em contraste com necessidades de concentrações bem

mais elevadas de outros isolados para efeito semelhante. Em alguns casos nem as maiores concentrações de certos isolados resultaram em taxas de eficácia superiores a 90% (MONTEIRO et al., 2010a; SILVA et al., 2012; MONTEIRO & PRATA, 2013).

Embora NEPs do gênero *Heterorhabditis* tenham sido apontados como os mais virulentos para carrapatos, ainda não foram bem esclarecidos os aspectos relacionados com esse melhor desempenho. Entretanto, pode-se inferir que as bactérias do gênero *Photorhabdus* sejam mais virulentas para esses artrópodes (MONTEIRO & PRATA, 2013), uma vez que os JIs geralmente morrem logo após a penetração, estando à morte das fêmeas relacionada com a ação das bactérias liberadas na hemocele (MAULEON et al., 1993; HILL, 1998; KOCAN et al., 1998; HASSANAIN et al., 1999; SAMISH et al., 2008).

A possibilidade de penetração ativa devido à presença de uma projeção da cutícula denominada como “dente” na extremidade anterior dos JIs infectantes do gênero *Heterorhabditis* (DOLINSKI & MOINO-JR, 2006) também pode estar relacionada com a maior virulência, uma vez que esse processo de penetração causa lesões, fato que poderia acelerar a morte da fêmea (MONTEIRO et al., 2010a; MONTEIRO & PRATA, 2013). Em trabalhos utilizando os nematoides *H. bacteriophora*, isolados HP88 e CCA e *H. indica* LPP1, foi relatado que as fêmeas infectadas apresentavam lesões e extravazamento de sangue e hemolinfa em diferentes regiões do tegumento (VASCONCELOS et al., 2004; MONTEIRO et al., 2010a; SILVA et al., 2012).

Além de causar mortalidade, a infecção por NEPs também causa alterações nos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas, causando redução do período de sobrevivência e como consequência, diminuição do período de postura e quantidade de ovos produzidos (FREITA-RIBEIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2010a; MONTEIRO et al., 2010b). Outro aspecto observado é que as fêmeas infectadas produzem ovos inférteis (Tabela 2) (Figura 6), fato que pode ser ocasionado pela ação deletéria dos nematoides nos processos de oviposição e/ou embrionamento, interferindo nas etapas de oócitos, fertilização e impermeabilização dos ovos pelo órgão de Gené (MACHADO, 2008; MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Assim como existe variação de virulência entre os diferentes isolados de NEPs, também é possível observar diferenças entre o período necessário para que os JIs penetrem nas fêmeas ingurgitadas. A exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* ao nematoide *S. glaseri* CCA por 2h resultou em percentual de controle de 65%, chegando a 78 e 99% após 6h e 24h, respectivamente (CARVALHO et al., 2010). Para *H. bacteriophora* HP88, a exposição das fêmeas por 3h, 6h e 24h resultaram em percentuais de controle de 2%, 12% e 82%, alcançando a taxa de 100% apenas no período de 48h (MONTEIRO et al., 2012), demonstrando que *S. glaseri* CCA possui maior habilidade em localizar e penetrar nas fêmeas ingurgitadas, fazendo isso em um menor intervalo de tempo (MONTEIRO & PRATA, 2013). Essa penetração pode ocorrer por diferentes vias. Pesquisas apontaram que a principal via de penetração de NEPs em *R. annulatus* é o poro anal e poro genital (SAMISH et al., 2008). Para *R. microplus*, foi observada penetração através do espiráculo (MACHADO, 2008; MONTEIRO et al., 2012), além da penetração direta pelo rompimento da cutícula (MONTEIRO et al., 2010a).

Em laboratório, diferentes isolados de NEPs foram altamente virulentos para *R. microplus* (FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; CARVALHO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010a; SILVA et al., 2012), entretanto, o primeiro estudo *in vivo* com aplicação de suspensão aquosa de *S. glaseri* CCA e *H. baujardi* LPP7 sobre bovinos infestados em teste de estábulo não surtiu nenhum efeito. Fatores abióticos como incidência de luz solar e temperatura ambiente, além de características químicas e térmicas dos bovinos podem ter interferido na eficácia dos NEPs (CARVALHO, 2008). Uma possível solução para os problemas

mencionados seria o desenvolvimento de formulações mais elaboradas que forneçam proteção aos JIs contra os fatores mencionados anteriormente.

Outra possibilidade de utilizar esses organismos no controle do carrapato dos bovinos seria direcionar a aplicação no solo, uma vez que fêmeas ingurgitadas no momento da oviposição buscam no solo ambientes com alta umidade e protegido da radiação solar, característica que também são favoráveis à sobrevivência dos NEPs (SAMISH et al., 2008; MONTEIRO & PRATA, 2013). Assim, o método de controle biológico nesse ambiente poderia ser beneficiado através de técnicas de inundação (SAMISH et al., 2008). Resultados obtidos em diferentes estudos que simulam essas condições tem demonstrado que diferentes espécies de NEPs foram eficazes contra carrapatos e que os fatores como cobertura vegetal do solo (solo com pastagem e grama) e presença de sistemas de irrigação aumenta a eficácia dos NEPs. No entanto, alguns fatores também podem interferir na alta eficácia dos NEPs como solos com elevadas concentrações de estrume e silte (SAMISH et al., 1998; SAMISH et al., 1999; ALEKSEEV et al., 2006).

No caso do carrapato dos bovinos que apresenta ampla distribuição geográfica, estando presentes em diferentes regiões do planeta, e cada localidade onde essa espécie está inserida pode apresentar características variadas de temperatura, umidade, tipo de solo, precipitação, entre outras. Assim, determinados isolados de NEPs podem se mostrar mais eficazes de acordo com as peculiaridades do local onde será feita a aplicação, sendo necessário selecionar espécies e isolados de NEPs adequados para cada região na qual se pretende fazer o controle de *R. microplus* (MONTEIRO & PRATA, 2013). Cabe destacar que plasticidade genética de diferentes isolados também permite que características que permitam maior tolerância a esses fatores abióticos podem ser selecionados em trabalhos de melhoramento genético (SAMISH et al., 2008).

Outro desafio a ser levado em consideração para utilização de NEPs para o controle de carrapatos é a forma de aplicação na pastagem. Nos últimos anos a aplicação com a formulação inseto cadáver tem ganhado destaque devido aos bons resultados obtidos com essa técnica, uma vez que alguns isolados aplicados com essa metodologia apresentam maior capacidade dispersiva, persistência e infectividade.

2.10 Compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários, fungos entomopatogênicos e produtos de origem vegetal

A utilização de NEPs para o manejo integrado de pragas na agricultura e pecuária faz que esses organismos sejam inseridos em agrossistemas cujo manejo tradicional inclui a utilização de diferentes produtos químicos como fertilizantes, herbicidas, fungicidas, inseticidas e acaricidas (KOPPENHÖFER & GREWAL, 2005). Assim, torna-se necessário que seja feita avaliações de compatibilidade dos NEPs com esses produtos para determinar as melhores épocas e formas de aplicação. O uso de produtos químicos incompatíveis pode interferir na capacidade de reprodução e infecção desses patógenos afetando o controle da praga alvo (ALVES et al., 1998).

No caso de compatibilidade, a aplicação dos NEPs pode ser feita em conjunto com os produtos químicos, sendo possível até que esses diferentes agentes possam ser misturados para preparação da calda e aplicados com a mesma aparelhagem. No entanto, sendo verificada incompatibilidade, torna-se necessário que a aplicação dos diferentes agentes seja feita em épocas diferentes de acordo o período residual do produto químico (ALVES et al., 1998; KOPPENHÖFER & GREWAL, 2005).

A compatibilidade pode variar de acordo com espécie de nematoide e princípio ativo do produto químico, podendo ocorrer variação até entre produtos compostos pelo mesmo

princípio ativo, mais que presentes diferentes inertes e adjuvantes na formulação (KRISHNAYYA & GREWAL, 2002).

Hara & Kaya (1983) observaram diminuição na movimentação e patogenicidade de *S. carpocapsae* quando em contato com os organofosforado menvifós, fenamifós e triclorfon. Rovesti & Deseo (1990) avaliaram a compatibilidade de *S. carpocapsae* e *S. feltie* com 77 pesticidas, e observaram que a maioria dos produtos testados foi compatível com os nematoides.

Alumai & Grewal (2004) testaram oito pesticidas e observaram que estes não afetaram a viabilidade de *S. carpocapsae*, entretanto, alumínio tris e triclorfon afetaram a infectividade deste nematoide, enquanto que thiametoxam e trochlorfon reduziram a viabilidade de *H. bacteriophora* e halofenozoide, alumínio tris, trichlorfon e carbaryl afetaram a patogenicidade. No Brasil estudo conduzido por Andaló et al. (2004) observaram a compatibilidade de *S. glaseri*, *S. carpocapsae*, *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967) (Rhabditida: Steinernematidae) e *H. bacteriophora* com diferentes produtos fitossanitários utilizados na cultura do café. Os resultados demonstraram que os herbicidas 2,4-D, acetecolor e oxifluorfen diminuíram a viabilidade e infectividade dos nematoides testados, e que de maneira geral *S. glaseri* foi mais resistente a exposição a produtos fitossanitários do que as demais espécies.

Negrisolli et al. (2008) avaliaram a compatibilidade de NEPs com diferentes inseticidas, acaricidas, nematicidas e herbicidas e verificaram que dos 18 produtos testados, tiofanato metílico e aldicarbe foram incompatíveis com *S. carpocapsae*, enquanto tiametoxam, tiofanato metílico, aldicarbe foram incompatíveis com *H. bacteriophora*, reduzindo a viabilidade e infectividade dessas espécies. Ainda destacaram que tiametoxam e imidaclorido reduziram a viabilidade de *S. carpocapsae*, fato também observado para JIs *H. bacteriophora* expostos simazina + ametrina, enquanto o clorpirifós afetou a infectividade desse segundo nematoide. Os demais produtos foram classificados como compatíveis. Esses autores destacaram que em geral, *S. carpocapsae* foi menos afetado com a exposição aos produtos químicos do que *H. bacteriophora*.

Andaló et al. (2009) verificaram o efeito da exposição de JIs infectantes de *H. amazonensis* aos herbicidas composto por clomazona e hexazona (Ranger®) e Simazine e Amitrine (Topeze®) reduziu a infectividade e a quantidade de lipídios de reserva energética dos JIs desse nematoide. Negrisolli et al. (2010) avaliaram a compatibilidade de NEPs com inseticidas utilizados para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepdoptera: Noctuidae) que é uma importante praga em plantações de milho no Brasil. Os resultados revelaram que a maioria dos inseticidas foram compatíveis com *S. glaseri*, *S. carpocapsae* e *H. indica*.

Além da tolerância, trabalhos mostram que o uso de NEPs associados a produtos químicos pode apresentar efeito sinérgico no controle da praga alvo (KOPPENHOFER et al., 2002; KOPPENHÖFER & GREWAL, 2005). Koppenhofer & Kaya relataram que o uso combinado de imadaclorido e *H. bacteriophora* apresentou efeito sinérgico no controle de *Cyclocephala hirta* Le Conte, 1981 Le conte, 1861 (Coleoptera: Dynastidae) e *Cyclocephala pasadenae* Casey, 1915 (Coleoptera: Dynastidae). O inseticida provoca paralisia reduzindo os comportamentos defensivos do inseto, facilitando a colonização pelos JIs (KOPPENHÖFER & GREWAL, 2005).

O sinergismo entre *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* com concentrações variadas de tefluthrin no controle de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 1868 (Coleoptera: Chrysomelidae), foi demonstrado por Nishimatsu & Jackson (1998). Estes autores relataram que o maior grau de sinergismo ocorreu quando foram utilizadas concentrações intermediárias de tefluthrin que possivelmente causaram efeito paralítico e convulsivo, aumentando a susceptibilidade desse inseto aos NEPs.

A compatibilidade de carrapaticidas com os JIs infectantes de *H. amazonensis* RSC-5 já foi investigada e os resultados obtidos revelaram que os NEPs podem permanecer por até 72 horas em contato com os produtos compostos pelos princípios ativos deltametrina, amitraz, amitraz + clorfenvinfós e cipermetrina + clorpirifós + citronelal + butóxido de piperolina e por 24 horas com o princípio ativo clorfenvinfós. Tais produtos nesse intervalo de tempo não reduziram a infectividade dos JIs. Apenas o carrapaticida composto pela associação dos princípios ativos clorfenvinfós + diclorvós não foi compatível após exposição dos JIs por 24 horas (MONTEIRO et al., 2014). Entretanto, em curtos períodos de exposição, foi verificado que o nematoide *S. glaseri* foi compatível com a associação dos princípios ativos clorfenvinfós + diclorvós. Outro aspecto importante que merece ser mencionado é que ocorreu emergência de adultos, a partir das fêmeas tratadas com os JIs de *S. glaseri* associados a esse carrapaticida (REIS-MENINE et al., 2008), fato incomum, uma vez que os JIs morrem pouco tempo após penetrarem nos carrapatos, não dando continuidade ao ciclo (SAMISH et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, para aumentar a eficiência de patógenos, interações entre diferentes agentes de controle biológicos e convencionais têm sido investigadas (KOPPENHOFER & GREWAL, 2005); entretanto, é surpreendente que até o momento, pouca atenção tem sido dada para interações entre entomopatógenos (ANSARI et al., 2005). Sobre a combinação entre NEPs e fungos, embora escassos, existem alguns estudos que demonstram que essa associação pode apresentar efeito aditivo ou sinérgico sobre a mortalidade de determinadas espécies de insetos (BARBERCHECK & KAYA, 1991; SHAPIRO-ILAN et al., 2004; ACEVEDO et al., 2007), entretanto, em alguns casos, a interação entre esses entomopatógenos pode ser antagônica (SHAPIRO-ILAN et al., 2004; ANSARI et al., 2005).

Ansari et al. (2004a) observaram efeito sinérgico entre a associação de *H. megidis* ou *S. glaseri* com *Metharizium anisopliae* sobre o besouro *Hoplia philanthus* (Fuesslin 1775) (Coleoptera: Scarabaeidae) em testes em laboratório e em casa de vegetação, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a aplicação dos fungos semanas antes do nematoide. Em testes em condições de laboratório Shapiro-Ilan et al. (2004) avaliaram o efeito da associação dos nematoides *H. indica* e *S. carpocapsae* com os fungos *Beauveria bassiana*, *M. anisopliae* ou *Paecilomyces fumosoroseus* e com a bactéria *Serratia marcescens* sobre o coleóptero *Curculio caryae* Horn, 1873 (Coleoptera: Curculionidae) Os resultados evidenciaram que a maioria das interações foi antagônica, com exceção da associação de *H. indica* com *M. anisopliae* e para uma das concentrações de *S. carpocapsae* associada aos fungos.

Em condições de campo, Ansari et al. (2006) verificaram que a associação de *H. bacteriophora* com *M. anisopliae* com aplicações em diferentes tempos de aplicação apresentaram efeitos aditivos e sinérgicos para o controle do coleóptero *H. philanthus*.

Acevedo et al. (2007) associando *H. bacteriophora* com dois isolados de *M. anisopliae* constataram que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou o nematoide com o fungo menos virulento e que essa associação causou a morte de larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepdoptera: Crambidae) em menor intervalo de tempo. No entanto, tais autores verificaram que a associação conjunta dos entomopatógenos teve efeito negativo sobre a reprodução dos mesmos. Ansari et al. (2008) verificaram que a utilização combinada dos NEPs *H. bacteriophora*, *S. feltiae* e *Steinernema krausssei* (Steiner, 1923) (Rhabditida: Steinernematidae) com o fungo *M. anisopliae* sobre o besouro *Otiiorhynchus sulcatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Curculionidae) apresentou efeitos aditivos e sinérgicos tanto em testes em laboratório como em casa de vegetação.

Tarasco et al. (2011) avaliaram o efeito da associação de *Steinernema ichnusae* Tarasco et al. 2008 (Rhabditida: Steinernematidae) e *B. bassiana* sobre lagartas de *G.*

mellonella e observaram que essa interação não resultou em efeito sinérgico e nem antagônico. Entretanto, os compostos produzidos por *Xenorhabdus bovienii* (bactérias simbiote de *S. ichnusae*) inibiram o crescimento do fungo, e o mesmo foi observado sobre os compostos do fungo no crescimento da bactéria.

Ainda sobre as interações entre as bactérias simbióticas associadas a NEPs e fungos entomopatogênicos, Ansari et al. (2004b) verificaram que *Photorhabdus luminescens* isolada de *H. megidis* inibiu o crescimento dos fungos *M. anisopliae* CLO, *P. fumosoroseus* CLO 55, *B. bassiana* (ARSEF-4055), *Beauveria brongniartii* (KVL 99-124), entretanto, o mesmo não foi verificado para *Xenorhabdus poinarii* isolada de *S. glaseri*. Nesse mesmo estudo também foi demonstrado que o extrato bruto de *M. anisopliae* teve atividade antibacteriana contra *P. luminescens* e *X. poinarii* na concentração de 1000 µg/ml, no entanto nas menores concentrações (100 e 10 µg/ml) esse efeito não foi observado. Quando foi feita a avaliação do extrato de *M. anisopliae* diretamente sobre os NEPs, não foi observado inibição de migração de *H. megidis* e *S. glaseri*, uma vez que os JIs não foram repelidos, paralisados ou mortos.

Pouco se sabe a respeito da associação de NEPs com óleos essenciais e outros produtos de origem vegetal. Krishnayya & Grewal (2002) relatam a compatibilidade de *S. feltiae* com o óleo de neem. Anastasis et al. (2011) mostraram que o uso combinado de *S. carpocapsae* e dialil dissulfeto (componente volátil de óleo de alho) reduziu significativamente a população de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) (Tylenchida: Heteroderidae). Dolinski et al. (2012) verificaram que a aplicação de *H. baujardi* LPP7 associado com tortas de neem resultou em efeito aditivo no controle de *C. psidii* em plantações de goiaba.

2.11 Referências bibliográficas

ACEVEDO, J.P.M.; MOINO JR, A.; CAVALCANTI, R.S.; DOLINKI, C.; CARVALHO, F.A. Patogenicidade, Multiplicação e biologia de isolados nativos de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) provenientes de Lavras, MG. **Nematologia Brasileira**. v. 29, p. 25-30, 2005.

ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 96, p. 87-192, 2007.

ALEKSEEV, E.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. **BioControl**. v. 51, p. 507-518, 2006.

ALUMAI, A.; GREWAL, P.S. Tank-mix compatibility of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*, with selected chemical pesticides used in turfgrass. **Biocontrol Sci Technol**. v.14, p.725–730, 2004.

ALVES, S.B.; MOINO-JR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos In: ALVES, S.B. (eds). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FAPESP & FEALQ. 1998. p. 217-239.

ALVES, L.F.; ROHDE, A.C.; ALVEZ, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**. v. 34, p. 139-141, 2005.

AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 148-154, 2011a.

AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; 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, 2011b.

ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; CECÍLIA, L.V.C.S. Compatibilidade de Nematoides Entomopatogênicos com Produtos Fitossanitários Utilizados na Cultura do Cafeeiro. **Nematologia Brasileira**. v. 28, p. 149-158, 2004.

ANDALO, V.; NGUYEN, K.N.; MOINO JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brasil. **Nematology**. v. 8, p. 853-867, 2006.

ANDALÓ, V.; MOREIRA, G.F.; MAXIMINIANO, C.; MOINO JUNIOR, A.; CAMPOS, V.P. Influence of herbicides on lipid reserves, mortality and infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Mediterranea**. v. 37, p. 11-15, 2009.

ANASTASIADIS, I.; KIMBARIS, A.C.; KORMPI, M.; POLISSIOU, M.G. The effect of a garlic essential oil component and entomopathogenic nematodes on the suppression of *Meloidogyne javanica* on tomato. **Hellenic Plant Protection Journal**. v. 4, p.21-24, 2011.

ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**. v. 31, p. 172–180, 2004a.

ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**. v. 31, p. 172–180, 2004b.

ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. v. 50, p. 465–475, 2005.

ANSARI, M.A.; SHAH, F.A.; TIRRY, MOENS, M. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. **Biological Control**. v. 39, p. 453–459, 2006.

ANSARI, M.A.; SHAH BUTT, FA. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. **Entomologia Experimentalis Applicata**. v. 129, p. 340–347, 2008.

ANSARI, M.A.; SHAH BUTT, FA. The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in strawberry growbags. **Biocontrol Science Technology**. v. 20, p. 99-105, 2009.

BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**. v. 20, p. 707–712, 1991.

BARBERCHECK, M.E. Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. **Fla. Entomology**. 75, 539–548, 1992.

BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – Vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous publications of the Entomological Society of America**. v. 8, p. 160-376, 1972.

BANCO DO BRASIL. Bovinocultura de Leite: Desenvolvimento Regional sustentável. Banco do Brasil Ed. v.1. 2010. 57p.

BORGES, L.M.F.; CARNEIRO, J.R.; GOMES, A.G.; MOREIRA, P.C. Influência do peso inicial e da estação do ano na conversão em ovos de fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Animal Brasileira**. v. 2, p. 127–131, 2001.

BROVINI, C.N.; FURLONG, J.; CHAGAS, A.C.S. Influência dos fatores climáticos na biologia e no comportamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* a campo. **Bioscience Journal**. v. 19, p. 71-76, 2003.

BRUCK, D.J.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E. Evaluation of application technologies of entomopathogenic nematodes for control of the black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus*. **Journal of Economy Entomology**. v. 98, p. 1884–1889, 2005.

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

BUSSOLA, R.A.; TAVARES, F.M; GOULART, R.M.; LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AMBROS, C.M.G. 2004. Avaliação do nematoide *Heterorhabditis* sp. em cultura de violetas contra larvas de *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae). **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 71, p. 113-114.

CARDOSO, R.; MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A.; BATISTA, E.S.P. Effect of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) Isolate Santa Rosa on the biological parameters of engorged nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 80, p. 237-241, 2013.

CARVALHO, L.B. 2008. Efeitos “in vitro” e “in vivo” de nematoides entomopatogenicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). 2008. 52p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

CARVALHO, L.B.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; REIS, E.S.; BATISTA, E.S.P.; FAZA, A.P.; LEITE, R.C. Evaluation in vitro of the infection times of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* CCA strain. **Ciência Rural**. v. 40, p. 939–943, 2010.

CHAGAS, A.C.S.; NASCIMENTO, C.B.; FURLONG, J. Comportamento e ecologia de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagens de *Brachiaria decumbens* no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, p. , 2001.

CHAGAS, A.C.S.; FURLONG, J.; NASCIMENTO, C.B. Predation of engorged female tick, *Boophilus microplus*, by the ant *Pachycondyla striata* (SMITH, 1858) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) in pastures. **Bioscience Journal (UFU)**. v. 18, p. 77-81, 2002.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, p. 156–160, 2004.

COOLEY, R.A. 1946. The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus* and *Haemaphysalis* (Ixodidae). Federal security agency United States States Public Health Service. 55pp.

COSTA, L.B. A bovinocultura de corte (Ciclo completo) e sua economicidade: Um estudo de multicaso. 2006. 160p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

COSTA, J.C.R.; DIAS, R. J. P.; MORENZ, M J F. Determining the adaptation potential of entomopathogenic nematode multiplication of *Heterorhabditis baujardi* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Parasitology Research**. v. 102, p. 139-144, 2007.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunology**. v. 28, p. 275–283, 2006.

DEL VALLE, E.E.; C. DOLINKI; R.M. SOUZA & R. I. SAMUELS. Performace de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (28) (NEMATODA: RHABDITIDA), selecionada para tolerância de elevadas temperaturas, no controle de *Conotrachelus psidii* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). **Nematologia Brasileira**. v. 29, p. 199-205, 2005.

DEL VALLE, E.E. **Utilização de cadáveres de *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) infectados por *Heterorhabditis baujardi* LPP7 no controle do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**. 75 p. (Tese, Doutorado). Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DEL VALLE, E.E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E.L.S.; SOUZA, R.M., SAMUEL, R.I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria Mellonella* (Lepdoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera, Curculionidae) Larvae. **Biological Control Science Technology**. v.18, p. 33-41, 2008.

DEL VALLE, E.E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E.L.S.; SOUZA, R.M. Effect of cadaver coatings on emergence and infectivity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) and the removal of cadavers by ants. **Biological Control**. v. 50, p. 21-24, 2009.

DOLINSKI, C. Uso de entomopathogenic nematodes para o controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JR, T.J.; PALLINI, A. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças**, Viçosa, UFV. 2006. p. 261-289.

DOLINSKI, C & A. MOINO JR. 2006. Utilização de nematoides entomopatogênicos Nativos ou Exóticos: O Perigo das Introduções. **Nematologia Brasileira**. v. 30, p. 139-149.

DOLINSKI, C.; KAMITAMI, F.L; MACHADO, I.R.; WINTER, C.E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from tropical rainforest in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, p. 150-159, 2008.

DOLINSKI, C.; PINTO, C.C.S.; ROBAINA, R.R; BELLINII, L.L. Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do nematoide entomopatogenicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**. v. 34, p. 123-128, 2010.

DOLINSKI, C.; CHOO, H.Y.; DUCAN, L.W. Grower acceptance of entomopathogenic nematodes: Case studies on three continents. **Journal of Nematology**. v. 44, p. 226-235, 2012.

EL-SADAWY, H.A.E.; HABEEB, S.M. Testing some entomopathogenic nematodes for the biocontrol of *Hyalomma dromedarii* Koch (Acarina: Ixodidae). **Journal of the Union of Arabian Biologists**. v., p. 1–11, 1998.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J.M.; NAVA, S.; MANGOLD, ATILIO.; GUGLIELMONE, A.A. ;LABRUNA, M.B.; DE LA FUENTE, J. Reinstatement of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. **Journal of Medical Entomology**. v. 49, p. 794-802, 2012.

FALCE, H. C.; HAMANN, W. O. O *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) e seu controle nos bovinos leiteiros da microrregião fisiográfica de Curitiba - 1. Predatismo de formigas. *Revista do Setor de Ciências Agrárias*. v. 11, p. 279-281, 1989/1991.

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.

FERRAZ, L.C.C.B. Nematoides entomopatogenicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FAPESP & FEALQ. 1998. p.541-569.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL strain (*Steinernema*: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 23, p. 53–56, 2004.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Org.). *Carrapatos: problemas e soluções*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005. p. 9-20.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 27, p. 53–56, 2007.

GLAZER, I., ALEKSEEV, E.; SAMISH, M. Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged female *Boophilus annulatus*. **Journal of Parasitology**. v. 87, p. 808–812, 2001.

GEORGIS, R.; MANWEILER, S.A. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. **Agricultural Zoology Reviews** v. 6, p. 63-94, 1994.

GREWAL, P.S., WEBER, T.A.; BETTERLEY, D.A.; (1998). Compatibility of *Steinernema feltiae* with chemicals used in mushroom production. *Mushroom News*, 46, 6-10.

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

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

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATESTI, D.M. Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP. 2001. p. 213.

HARA, A.H.; KAYA, H.K. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Environmental Entomology**. v.12, p.496-501, 1983.

HASSANAIN, M.A.; DERBALA, A.A.; ABDEL-BARRY, N.A. EL-SHERIF, M. A. & EL-SADAWY, H. A. E. (1999). Biological control of ticks (Argasidae) by entomopathogenic nematodes. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v.7, p. 41–46.

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

HILL, D.E. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**. v. 84, p. 1124–1127, 1998.

HITCHOCK, L.F. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australia Journal of Zoology**. v. 3, p. 295-311, 1955.

HOMINICK, W.H. Biogeography. In: Gaugler, R., (Ed.). Entomopathogenic nematology. New Jersey: Rutgers University. pp. 115-143, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In: **Pesquisa Pecuária Municipal**. <www.ibge.gov.br>. Acesso em 22/01/2011.

JETTER, K.; PAINE, T.D. Consumer preferences and willingness to pay for biological control in the urban landscape. **Biological Control**. v. 30, p. 312–322, 2004.

KAYA, H.K. Soil Ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (ed). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, CRC Press. 1990. p. 93-115.

KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**. v. 38, p. 181-206, 1993.

KISS, T.; CADAR, D.; SPÎNU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Veterinary Parasitology**. v. 187, p. 357–366, 2012.

KLAFKE, G.M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET. 2008. p. 81–105.

KOCAN, K.M.; PIDHERNEY, M.S.; BLOUIN, E.F.; CLAYPOOL, P.L.; SAMISH, M.; GLAZER, I. Interaction of some entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) with

selected species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 35, p. 514-520, 1998.

KOLLER, W.W.; GOMES, A.; BARROS, A.T.M. Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**. 2009. 45 p.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/bp/BP25.pdf>>

KOPPENHOFER, A.M.; KAYA, H.K. Additive of imidaclorid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of economic entomology**. 91, 618-623, 1998.

KOPPENHOFER, A.M.; COWLES, R.S.; COWLES, E.A.F.E.M.; BAUMGARTNER, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. v. 24, p. 90-97, 2002.

KOPPENHOFER, A.M.; GREWAL, P.S. Compatibility and Interaction with agrochemicals and biocontrol agents. In: GREWAL, P.S.; EHILERS, R.U.; SHAPIRO, D.I. Nematodes as biocontrol agents. Cambridge: CABI: Publishing Cambridge. 2005. p. 364-381.

KRISHNAYYA, P.V.; GREWAL, P.S. Effect of Neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Biocontrol and Science Technology**. v. 12, p. 259-266, 2002.

KUNG, S.; GAUGLER, R.; AND KAYA, H. K. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**. v. 22, p. 440-445, 1990.

LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti DMB, Arzua M, Bechara GH (eds) Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan. 2006. p. 155-164.

LABRUNA, M.B. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET. 2008a. p. 15-56.

LABRUNA, M.B. As gerações anuais. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET. 2008b. p. 57-64.

LABRUNA, M.B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A.J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PENA, A., GUGLIELMONE, A., JONGEJAN, F., FUENTE, J. 2009. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Boophilus microplus*. **BMC Evolutionary Biology**. p. 9: 46, 2009.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AGUILHERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI JR. 2003. Patogenicidade de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (NEMATODA: 90 RHABDITIDA) a ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-acucar (*Mahanava fimbriolata*). **Revista de Agricultura**. v. 78, p.139-148, 2003.

LEWIS, E.E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. v. 38, p. 66–79, 2006.

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, R.M. Patogenicidade de nematoides entomopatogenicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (WESTWOOD, 1863) (COLEOPTERA: VESPERIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, p. 221-226, 2005.

MACHADO, I.R. 2008. Potencial dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP4 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.

MAPA. 1990. **Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura. Diário Oficial de 22.01.90, p. 1506-1509.

MARTINS, J. R. Manejo da resistência aos carrapaticidas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, p. 114-115, 2004.

MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Os carrapatos, os carrapaticidas e a resistência. In: FURLONG, J. (Org.). Carrapatos: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005. p. 21-37.

MARTINS, J.R. Tristeza Parasitária Bovina. In: FURLONG, J. (Org.). Carrapatos: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa. 2005. p. 39-49.

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. 2006. Controle de carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; ARZUA, M.; BRECHARA, G.H. (Eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan. 2006. p. 145–153.

MAULEON, H.; BARRE, N.; PANOMA, S. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). **Experimental and Applied Acarology**. v. 17, p. 831-838, 1993.

MINAS, R.S. 2011. Identificação e estudo da biologia de uma linhagem de nematóide entomopatogênico visando controle do gorgulho da goiaba em dois sistemas de cultivo. 2011. 98p. (Tese Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

MIRNDA-M I R ANDA, E., COSSIO-BAYUG, R.; MARTINEZ-IBANEZ, F.; BAUTISTA-GARFIAS, C.R. *Megaselia scalaris* reared on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* laboratory cultures. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 25, 344–347, 2011.

MOLINA-OCHOA, J.; NGUYEN, K.B.; GONZÁLEZ-RAMIREZ, M.; QUINTANA-MORENO, M.G.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; FOSTER, E.F. *Steinernema diaprepesi*

(Nematoda: Steinernematidae): Its occurrence in Western México and Susceptibility of engorged cattle ticks *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Florida Entomologist**. v. 92, p. 660-663, 2009.

MOLYNEUX, A.S. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (= *Neoplectana*) spp: Temperature and aspects of behaviour and infectivity. **Experimental Parasitology**. v. 62, p. 169-180, 1986.

MONTEIRO, C.M.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; SOARES, A.E.; BATISTITA, E.S.P.; DOLINSKI, C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 355–358, 2010a.

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; FAZZA, A.P.; SILVA, A.M.R.; ANDALÓ, V.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 106, p. 821–826, 2010b.

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

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e desafios. In: Controle do carrapato do boi. Controle no pasto, 2013, Nova Odessa. Controle do carrapato do boi. Controle no pasto, 2013.

MONTEIRO, C. M. O. ; MATOS, R. S. ; BATISTA, E. ; PERINOTTO, W.M.S. ; PRATA, M.C.A. ; BITTENCOURT, V. R. E. P. ; FURLONG, J. . Compatibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolado RSC-5 com diferentes carrapaticidas utilizados no controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Arquivos do Instituto Biológico. 2013b.

MONTEIRO, C.M.O.; MATOS, R.S.; ARAUJO, L.X.; PERINOTTO, W.M.S. ; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DOLINSKI, C.; PRATA, M.C.A. First report of pathogenicity of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* on partially engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 69, p. 78-81, 2014.

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

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

NEGRISOLI, A.S.; GARCIA, M.S.; BARBOSA NEGRISOLI, C.C. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. **Crop Protection**. v. 29, p. 545-549, 2010.

NEVES, J.M.; SIMOES, N.; MOTA, M. 1999. Nematoides Entomopatogenicos: Uso e novas perspectivas. **Boletim de Biotecnologia**. v. 64, p.23-29, 1999.

NISHIMATSU, T.; JACKSON, J.J. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 91, 410-418, 1998.

PEREIRA, M.C. Introdução. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET. 2008a. p.1-5.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET. 2008. p.15-56.

REIS-MENINI, C.M.R.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; SILVA, E.R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 103, p. 1391-1396, 2008.

RICHARDISON, P.N. British and European legislation regulating rhabditid nematodes. **Biocontrol Science and Technology**. v. 6, p. 449-463, 1996.

RIZVI, S.A.; HENNESEY, R.; KNOTT, D. Legislation on the introduction of exotics nematodes in the US. **Biocontrol Science and Technology**. v. 6, p. 477-480, 1996.

ROCHA-WOELZ, C.; ROCHA, U.F. Ecologia de carrapatos. I. Predatismo de formigas sobre carrapatos e seus ovos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 8. 1983, São Paulo. Resumos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1983. p. 133.

ROCHA, U.F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). Jaboticabal: UNESP, 1984. 32p. (Boletim Técnico, 3).

ROCHA, C.M.B.M.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; OLIVEIRA, P.R. Percepção dos produtores de leite do Município de Passos, MG sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**. v. 36, p. 1235-1242, 2006.

ROVESTI, L.; DESEO, K.V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**. v. 36, p. 237-245, 1990.

SAMISH M & I. GLAZER. 1991. Killing ticks with parasitic nematodes insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, **58**: 281-282.

- SAMISH, M.; GLAZER, I. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 29, p. 614–618, 1992.
- SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.A.; GLAZER, I. The effect of soil composition on anti-tick activity of entomopathogenic nematodes. **Annals of the New York Academy of Science** 849, 402–403, 1998.
- SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**. v. 44, p. 159–82, 1999.
- SAMISH, M., ALEKSEEV, E.A.; GLAZER, I. Efficacy of entomopathogenic nematode strains against engorged *Boophilus annulatus* females (Acari: Ixodidae) under simulated field conditions. **Journal of Medical Entomology**. 36, 727–732, 1999.
- SAMISH, M. 2000. Biocontrol of ticks. **Annals of New York Academy of Sciences**. v. 916, p. 172-178, 2000.
- SAMISH, M.; GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. **Trends in Parasitology**. v. 17, p. 368–371, 2001.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (Eds). **Ticks: Biology, Disease and Control**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. p. 447–469.
- SANTOS, A.P.; FURLONG, J. Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**. v. 32, p. 1033–1038, 2002.
- SHAPIRO, D.I.; GLAZER, I. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. **Environment Entomology**. v. 25, p. 1455–1461, 1996.
- SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E.; BEHLE, R.W.; MCGUIRE, M.R. Formulation of entomopathogenic nematode-infected-cadavers. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 78, p. 17–23, 2001
- SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E.; TEDDERS, W.L., SON, Y. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. **Journal Invertebrate Pathology**. 83, 270–272, 2003.
- SHAPIRO-ILAN, D.I.; JACKSON, M.; REILLY, C.C.; HOTCHKISS, M.W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**. v. 30, p. 119–126, 2004.
- SHAPIRO-ILAN, D.I.; GOUGE, D.H.; PIGGOTT, S.J.; FIFE, J.P. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**. v. 38, p. 124-133, 2006.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; Morales-Ramos, J.A.; Rojas, M.G.; Tedders, W.L. Effects of a novel entomopathogenic nematode-infected host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 103, p. 103–108, 2010.

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 62, p. 140-143, 2012.

SOUZA, G.C. Seleção de isolados de nematoides entomopatogenicos para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). 2006. 41p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

TARASCO, E.; ALVAREZ, C.S.; TRIGGIANI, O.; MORAGA, E.Q. Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. **Biocontrol Science and Technology**. v. 21, p. 693–704, 2011.

TAVARES, F.M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; ALMEIDA, L.C.; SILVA, A.C.S.; AMBROS, C.M.G. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do Bicudo da Cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em Laboratório e Casa-de-Vegetacao. **Nematologia Brasileira**. v. 31, p. 12-19, 2007.

YANG, X.; GAO, Z.; YU, Z.; WANG, D.; TANG, Y.; LI; LIU, J. Pathogenicity of five species of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to the ixodid tick *Dermacentor silvarum* Olenov (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**. v. 23, p. 1349-1361, 2013.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 94, p. 201–206, 2004.

VERÍSSIMO, C.J.; ROCHA, U.F.; FERRARI, O.; GARCIA, M.C.C.; MARTUCCI, R.; HOMEM, E. Ecologia de carrapatos IX. Predatismo de sapos *Bufo paracnemis* L., Bufonidae, Anura, sobre fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini), Acari, Ixodidae. **Biológico**. v. 51, p. 157-159, 1985.

WALKER, A.R.; BOUARTTOUR, A.; CAMICAS, J.L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; PRESTON, P. **Ticks of Domestic Animals in Africa. A Guide to identification of Species**. Edinburgh. University of Edinburgh, 2003. p.

CAPÍTULO I

SELEÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM FORMULAÇÃO INSETO CADÁVER PARA CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de quatro isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em formulação inseto cadáver contra fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e comparar a eficácia dos NEPs mais virulentos quando formulados em larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*. Fêmeas ingurgitadas (5) de *R. microplus* foram colocadas em potes preenchidos com solo e diferentes quantidades de larvas de *G. mellonella* infectadas por NEPs. Foram formados treze tratamentos, sendo um controle, com cinco carrapatos em potes isentos de NEPs e os demais tratamentos constituídos por carrapatos na presença de dois, quatro e seis cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com NEPs das espécies *Heterorhabditis bacteriophora* isolado HP88, *Heterorhabditis indica* isolado LPP1, *Steinernema feltiae* isolado SN e *Steinernema carpocapsae* isolado All. Foram feitas dez repetições por tratamento, e os grupos experimentais foram mantidos sob condições controladas ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR). A eficácia dos tratamentos foi medida através do acompanhamento da biologia reprodutiva das fêmeas. Todos os tratamentos, com exceção do grupo exposto a *S. carpocapsae* ALL, tendo como fonte de nematoides, seis lagartas de *G. mellonella*, levaram a redução significativa ($p < 0,05$) no peso da massa de ovos. *S. feltiae* SN aplicados com duas, quatro e seis larvas e *S. carpocapsae* ALL com duas larvas, causaram redução ($p < 0,05$) no percentual de eclosão de larvas de *R. microplus*. O percentual de controle foi superior a 95% em todos os grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 e no tratamento com quatro lagartas infectadas por *S. feltiae* SN. Os demais tratamentos apresentaram percentual de controle inferior a 90%. No segundo experimento, foi seguida a mesma metodologia, sendo utilizadas larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* infectadas pelas duas espécies de NEPs mais virulentos. *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 nas diferentes formulações reduziram o peso da massa de ovos e o percentual de eclosão larval de *R. microplus*. O percentual de controle foi de 82,4 e 84,9% para *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 formulados em *T. molitor*, chegando a 99,9% nos grupos formulados com *G. mellonella*. Dessa forma, verificou-se que os isolados de nematoides testados em formulação inseto cadáver apresentaram patogenicidade para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo que os NEPs do gênero *Heterorhabditis* formulados em larvas de *G. mellonella* apresentaram melhor eficácia.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficacy of four strains of entomopathogenic nematodes (EPNs) in cadaver insect formulation against engorged females of *Rhipicephalus microplus* and to compare the efficacy of the most virulent EPNs when formulated in larvae of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. Engorged *R. microplus* females were placed in pots filled with soil and different quantities of *G. mellonella* larvae infected with EPN. Thirteen treatments were formed, one the control, with five ticks in pots without EPNs, and the others composed of ticks in the presence of two, four or six cadavers of *Galleria mellonella* infected with EPNs of the species *Heterorhabditis bacteriophora*, strain HP88, *Heterorhabditis indica*, strain LPP1, *Steinernema feltiae*, strain SN, and *Steinernema carpocapsae*, strain All. There were ten repetitions per treatment and the experimental groups were kept under controlled conditions (27 ± 1 °C and $80\pm 10\%$ RH). The efficacy of the treatments was measured by monitoring the reproductive biology of the females. All the treatments except the group exposed to *S. carpocapsae* ALL with six *G. mellonella* caterpillars as nematode source led to a significant reduction ($p<0.05$) in the egg mass weight. *S. feltiae* SN applied with two, four and six larvae and *S. carpocapsae* ALL with two larvae caused a reduction ($p<0.05$) in the hatching percentage of the *R. microplus* larvae. The control percentage was higher than 95% in all the groups treated with *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 and in the group treated with four caterpillars infected by *S. feltiae* SN. The same method was followed in the second experiment, using *G. mellonella* and *T. molitor* larvae infected by the two most virulent EPN species. *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 in the different formulations reduced the egg mass weight and hatching percentage of *R. microplus*. The control percentages were 82.4 and 84.9% for *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 formulated in *T. molitor*, reaching 99.9% in the groups formulated with *G. mellonella*. The nematode strains tested in a cadaver insect formulation presented pathogenicity to engorged *R. microplus* females, with EPNs of the genus *Heterorhabditis* formulated in *G. mellonella* larvae being the most effective.

Key word: Cattle tick, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*.

1 INTRODUÇÃO

Desde o século passado, pesquisadores vêm buscando alternativas com a finalidade de combater o carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae), devido ao grande prejuízo econômico que este ixodídeo ocasiona aos sistemas de produção de leite e carne bovina, em diferentes regiões do mundo (WALKER et al., 2003; FURLONG et al., 2004; MARTINS et al., 2006; FURLONG et al., 2007; PEREIRA, 2008). A aplicação de carrapaticidas químicos sintéticos ainda é o principal método de controle; entretanto, a utilização sistemática e em muitas vezes de forma inapropriada, devido a falta de conhecimento dos procedimentos adequados por parte dos produtores (AMARAL et al., 2011a,b) tem resultado na seleção de carrapatos resistentes (MARTINS et al., 2006; FURLONG et al., 2007; LABRUNA, 2008). Somado ao problema da resistência, existe uma crescente demanda por novas alternativas no controle de pragas, visando à utilização mínima de químicos, com intuito de preservar o ambiente e garantir alimentos livres de resíduos (SAMISH et al., 2000; DOLINSKI, 2006).

Estudos em condições de laboratório tem demonstrado que nematoides entomopatogênicos (NEPs), representam promissora alternativa a ser empregada no controle de *R. microplus* (MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012). A utilização do método de controle biológico com NEPs, tendo como foco a fase não parasitária, pode ser beneficiado, uma vez que fêmeas ingurgitadas no momento da oviposição buscam no solo ambientes com alta umidade e protegido da radiação solar, característica que também são favoráveis à sobrevivência dos NEPs (SAMISH & GLAZER, 2001; SAMISH et al., 2008). Resultados obtidos em diferentes estudos que simulam condições naturais, têm demonstrado que diferentes espécies de NEPs quando aplicadas no solo, foram eficazes contra *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821) (Acari: Ixodidae) (SAMISH & GLAZER, 2001; ALEKSEEV et al., 2006).

Dentre os vários fatores que afetam a eficácia da utilização de NEPs, podemos citar a forma de aplicação a campo. Existem diferentes formulações de NEPs, sendo que a técnica de inseto cadáver vem ganhando destaque na última década (DOLINSKI, 2006). Nessa metodologia, lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepoptera: Pyralidae) são infectadas com nematoides e liberadas no campo. Após alguns dias da aplicação, os juvenis infectantes (JIs) começam a abandonar o cadáver e buscar novos hospedeiros no solo, fazendo assim, o controle da praga alvo (SHAPIRO-ILAN et al., 2001). O cadáver confere proteção contra fatores deletérios bióticos e abióticos e os JIs liberados dessa forma, apresentam maior capacidade de dispersar e infectar o hospedeiro e maior longevidade no solo (SHAPIRO-ILAN et al., 2003). A implementação desta tecnologia é simples e envolve baixo custo, podendo ser utilizada por produtores de diferentes realidades (DEL VALLE, 2008), além de poder resolver vários problemas atuais que impedem a utilização mais ampla de NEPs no controle de pragas (ANSARI et al., 2009). O sucesso desse método já foi relatado em testes em laboratório, casa de vegetação e em condições de campo (DEL VALLE et al., 2008; ANSARI et al., 2009). No Brasil, essa metodologia vem sendo utilizada com eficiência no controle de *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) por produtores de Goiaba, no município de Cachoeira de Macacu, Rio de Janeiro (DOLINSKI et al., 2012).

Lagartas de *G. mellonella* têm sido utilizadas para produção de cadáveres infectados por NEPs (DELL VALE et al., 2008), pois são insetos altamente susceptíveis a infecção e por possibilitarem a produção de elevado número JIs (DOLINSKI, 2006). Entretanto, a criação de lagartas de *G. mellonella* é dispendiosa devido aos custos dos ingredientes da dieta e por requerer intenso manejo (COSTA et al., 2007). Outra possibilidade é a utilização de larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) (BATISTA & AUAD, 2010),

cuja criação é menos dispendiosa e envolve menos gastos relacionados com a dieta; entretanto, esse coleóptero geralmente produz menor quantidade de JIs por hospedeiro, quando comparado à produção em *G. mellonella* (SHAPIRO-ILAN et al., 2002; MOLINA et al., 2004).

Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar a eficácia de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1876) (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado HP88, *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1982 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP1, *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae), isolado SN e *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Rhabditida: Steinernematidae), isolado ALL, em formulação inseto cadáver, em diferentes quantidades, contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Além disso, teve-se como objetivo também comparar a eficácia dos NEPs mais virulentos determinados na etapa anterior, quando produzidos e aplicados em cadáveres de *G. mellonella* e *T. molitor*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, nematoides entomopatogênicos e larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Cepa sensível Porto Alegre “POA”), obtidas através de infestações artificiais em bezerros, no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil (registro CEUA-EGL 11/2013) (Anexo E). Para montagem dos experimentos foram utilizadas fêmeas recém desprendidas dos animais. Os nematoides utilizados foram cedidos pela Dra. Cláudia Dolisnki, do laboratório de Nematologia, da Universidade Federal Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e mantidos no banco de NEPs do laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite. A manutenção dos isolados *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1, *S. feltiae* SN e *S. carpocapsae* All foi feita através de multiplicação *in vivo* em *G. mellonella* (LINDEGREN et al., 1993; KAYA & STOCK, 1997) (Anexo C). As larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* foram provenientes de colônias mantidas no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite (Anexos A e B).

2.2 Obtenção dos cadáveres infectados com NEPs

Para produção de insetos cadáveres infectados por NEPs, lagartas de *G. mellonella* (em grupos de 10) com peso médio de 250 ± 22.1 mg, foram colocadas em placas de Petri (9 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro. Na sequência, foram adicionados 2 mL de solução aquosa contendo nematoides (100 NEPs/mL) de cada espécie a ser testada, sendo ela *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1, *S. feltiae* SN e *S. carpocapsae* ALL. A quantificação do inócuo de NEPs foi feita de acordo com Monteiro et al. (2013). Em seguida, as placas foram fechadas, vedadas com parafilme e mantidas por três dias em câmara de climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, as larvas mortas e com sinais de infecção (coloração avermelhada para infecção com NEPs do gênero *Heterorhabditis* e coloração marrom para infecção com NEPs do gênero *Steinernema* – Figura 1A e B) foram transferidas para placas de Petri (9 cm) forradas com papel de filtro, isento da adição de água (câmara seca),

permanecendo acondicionada em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$) por período adicional de quatro dias (DEL VALLE, 2008). Esse procedimento foi feito separadamente para cada espécie de nematoide.

Para preparação de cadáveres de *T. molitor* infectados com NEPs, foi seguido o mesmo procedimento mencionado para *G. mellonella*, sendo utilizadas larvas com peso médio de 110 ± 22.9 mg.

A maior parte dos cadáveres produzidos após a infecção pelos diferentes isolados de NEPs foi utilizada para realização dos experimentos. Entretanto, uma pequena parcela de cadáveres de *G. mellonella* e *T. molitor* foi transferida para armadilhas de White (White, 1927), tendo como intuito, verificar a viabilidade da infecção. Larvas de *G. mellonella* foram expostas aos JIs recuperados dessas armadilhas, para certificação de viabilidade e infectividade.

2.3 Experimento I – Seleção de isolados de NEPs formulados em larvas de *Galeria mellonella*

Potes plásticos com capacidade de 300 mL foram preenchidos com 200 gramas de solo previamente esterilizado, proveniente de área de pastagem do CEJHB. Em cada recipiente foram adicionados 40 mL de água destilada, com a finalidade de manter o solo no limite de sua capacidade de campo. Na sequência, cadáveres com sete dias de infecção foram enterrados nos potes, e, após seis dias, foram adicionadas cinco fêmeas ingurgitadas com pesos homogeneamente distribuídos em cada pote (Figura 1C e D). Também foi formado um grupo controle, constituído de fêmeas ingurgitadas colocadas em potes plásticos isentos de nematoides. Para cada espécie de nematoide foram formados três grupos, cada um com a quantidade de dois, quatro e seis cadáveres por pote, sendo feitas 10 repetições por grupo.

Os potes foram mantidos em câmara climatizada ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR) desde o momento em que os cadáveres foram adicionados nos potes. A temperatura e umidade relativa (UR) do solo nos potes foram aferidas diariamente durante todo o experimento. Após três dias em que foram colocadas nos potes com NEPs, as fêmeas ingurgitadas de cada unidade experimental que ainda estavam vivas foram transferidas para placas de Petri (Figura 1 E). Para avaliação de mortalidade, durante dez dias, foram feitas observações diárias dos carrapatos. A coleta de postura foi realizada diariamente até a morte da última fêmea. As massas de ovos de cada unidade experimental (pote com cinco fêmeas) foram acondicionadas em tubos de ensaio de 10 mL, devidamente identificados e vedados com algodão hidrófilo. Esses tubos foram mantidos em câmara climatizada, nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente. Após 20 dias do término da oviposição, foi feita a avaliação do percentual de eclosão das larvas.

Os seguintes parâmetros biológicos foram analisados: peso das fêmeas antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão de larvas. Esses valores foram utilizados para cálculo do percentual de controle (DRUMMOND et al., 1973) (Anexo H).

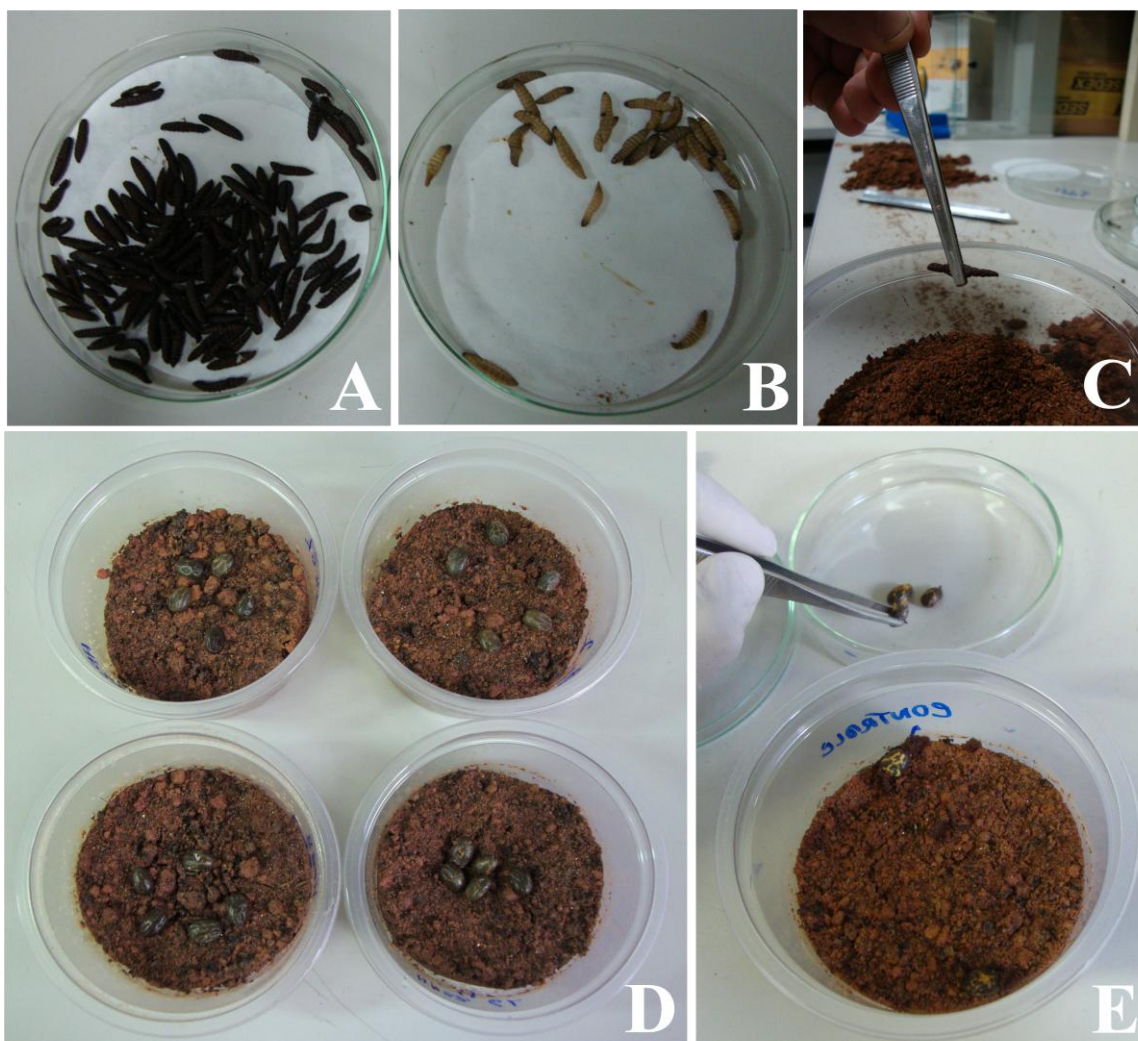


Figura 1. A: Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, apresentando coloração avermelhada, característica de infecção por nematoides do gênero *Heterorhabditis*; B: Larvas de *G. mellonella* infectadas por *Steinernema carpocapsae* ALL, apresentando coloração marrom-claro, característica de infecção por nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema*; C: Cadáver de *G. mellonella* infectado por NEPs sendo enterrado na unidade experimental; D: Unidade experimental com cinco fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; E: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* ainda vivas, sendo transferidas para placas de Petri.

2.4 Experimento II – Avaliação da virulência NEPs formulados em *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* para o controle de *Rhipicephalus microplus*

Essa etapa foi conduzida utilizando a mesma metodologia do experimento anterior, sendo utilizadas as duas espécies de NEPs mais virulentas segundo o resultado do primeiro experimento. Essas espécies foram formuladas em larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* (Figura 2) e, em cada pote foram enterrados dois cadáveres. Também foi formado um grupo controle com carrapatos em potes isentos de nematoides.



Figura 2. A: larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88; B: Larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por *H. bacteriophora* HP88; C: Comparação entre larva de *G. mellonella* e *T. molitor* infectadas com *H. bacteriophora* HP88.

2.5 Análise do solo

Amostra do solo utilizado para o preenchimento dos potes foi enviada para o laboratório de Análises do Solo LTDA, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, para realizações das análises físico-químicas.

2.6 Análise estatística

Para realização da análise estatística dos, foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. As médias dos diferentes parâmetros foram comparadas por teste não paramétrico de Kruskal Wallis e teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

O solo utilizado para o preenchimento dos potes apresentou textura intermediária (entre arenoso e argiloso), sendo classificado como franco argilo arenoso, com 23% de argila, 19% silte, 58% de areia e pH de 5.8. A média de temperatura e umidade relativa (UR) do solo durante os dois experimentos foi de $28\pm 1^\circ\text{C}$ e $85\pm 5\%$, respectivamente.

No primeiro experimento, após dois dias, a taxa de mortalidade de fêmeas ingurgitadas observada nos grupos em que foram utilizados dois, quatro e seis cadáveres infectados com *H. bacteriophora* HP88 foi de 80%, 80% e 100%, respectivamente, chegando a 100% nos demais grupos após seis dias (Figura 3). Nos três grupos tratados com *H. indica* LPP1, a mortalidade foi superior a 80% a partir do terceiro dia. Mortalidade de 100% foi observada após três dias para o grupo com aplicação de seis cadáveres e com seis dias para o grupo com quatro cadáveres. No grupo com dois cadáveres, a mortalidade máxima constatada foi de 98% após 10 dias (Figura 3).

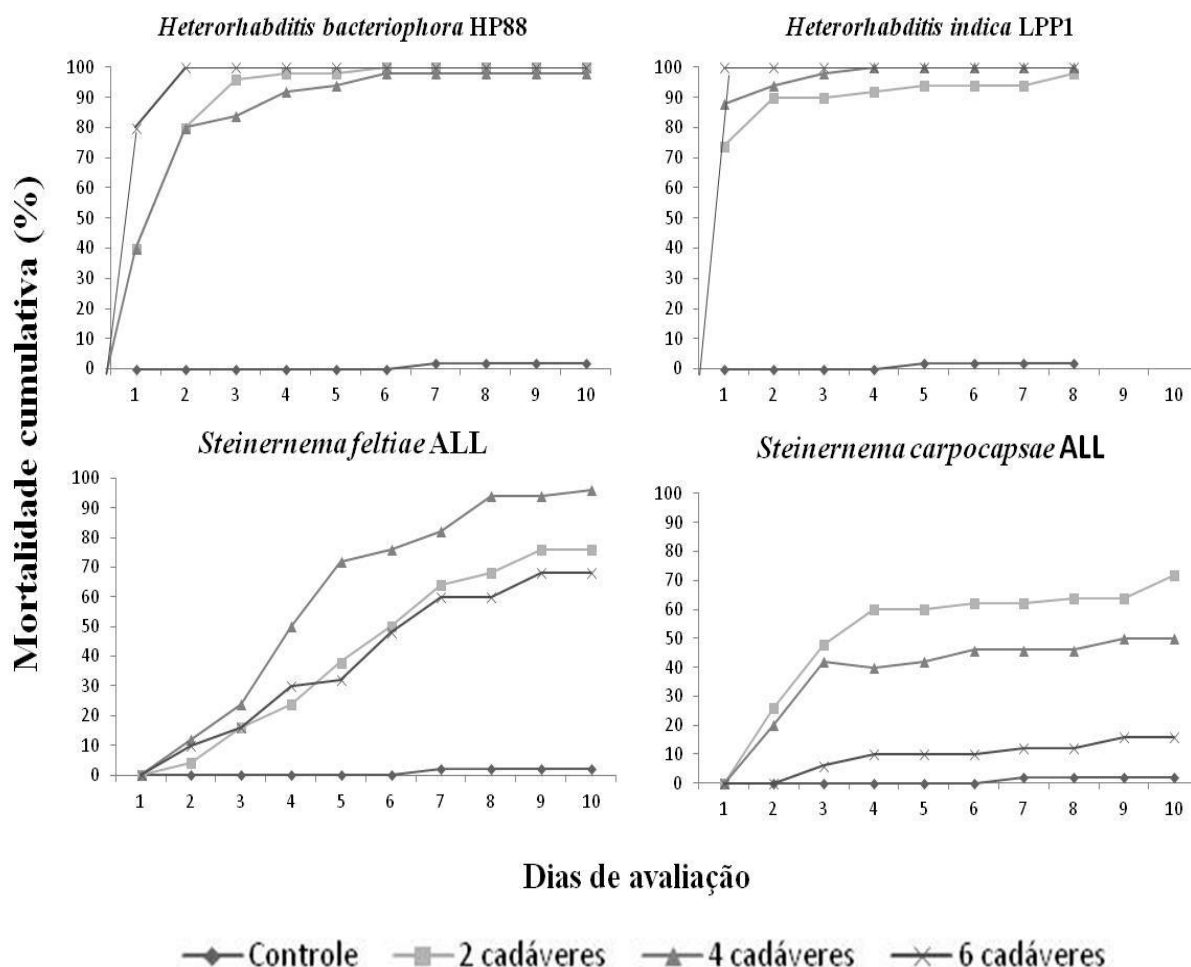


Figura 3. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, expostas a diferentes quantidades de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis indica* LPP1, *Steinernema feltiae* SN e *Steinernema carpocapsae* ALL, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR).

Nos tratamentos com *S. feltiae* SN, foi observada taxa de mortalidade acima de 90% somente no grupo em que os nematoides foram aplicados com quatro cadáveres, após oito dias. Nos grupos com dois e seis cadáveres, a mortalidade foi de aproximadamente 80% e 70%, respectivamente, após 10 dias (Figura 3). Para *S. carpocapsae* ALL, nenhum tratamento resultou em mortalidade superior a 75%, sendo observadas taxas de 72%, 50% e 16%, para os grupos com dois, quatro e seis cadáveres, respectivamente (Figura 3). A mortalidade do controle após 10 dias foi de 2% (Figura 3).

Cabe destacar que a maioria das fêmeas de todos os grupos tratados com NEPs do gênero *Heterorhabditis*, morreu antes de começarem a fazer postura, diferente do observado para os grupos tratados com NEPs do gênero *Steinernema* e do grupo controle (Figura 4).



Figura 4. A: fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* do grupo tratado com *Steinernema carpocapsae* ALL fazendo postura; B: Fêmeas ingurgitadas do grupo controle fazendo postura; C: Fêmeas ingurgitadas mortas pela ação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88; D: Fêmeas ingurgitadas mortas pela ação de *Heterorhabditis indica* LPP1.

Em decorrência do processo de homogeneização, a média do peso das fêmeas ingurgitadas nos diferentes grupos foi estatisticamente similar ($p > 0,05$) (Tabela 1). Não foram constatadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o peso da massa de ovos do grupo em que as fêmeas foram expostas ao nematoide *S. carpocapsae* ALL, com aplicação de seis cadáveres

e o grupo controle (respectivamente 433,0 e 550,0 mg). Nos demais tratamentos, a infecção pelos nematoides levou a redução significativa ($p < 0,05$) do peso da massa de ovos, sendo observada redução mais acentuada nos grupos tratados com os nematoides do gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Tabela 1).

Tabela 1. Peso das fêmeas ingurgitadas antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão de larvas e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus*, tratados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis indica* LPP1, *Steinernema feltiae* SN e *Steinernema carpocapsae* ALL, aplicados em formulação inseto cadáver em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ UR). (Valores da média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Número de insetos cadáveres	Peso de cinco fêmeas ingurgitadas (mg)	Peso da massa de ovos de cinco fêmeas (mg)	Percentual de eclosão de larvas (%)	+Percentual de controle (%)
Controle	0	1295,5 ^a \pm 61,4 (10)	550,0 ^a \pm 54,4 (10)	91,8 ^a \pm 6,3 (10)	
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	2	1260,5 ^a \pm 48,4 (10)	2,2 ^{de} \pm 4,7 (10)	30,0* \pm 28,3 (02)	99,8
	4	1259,1 ^a \pm 70,2 (10)	5,7 ^{de} \pm 37,1 (10)	33,3* \pm 15,3 (02)	99,8
	6	1261,2 ^a \pm 67,8 (10)	0,0 ^e \pm 0,0 (10)	... (10)	100,0
<i>Heterorhabditis indica</i> LPP1	2	1260,9 ^a \pm 98,4 (10)	45,2 ^{cde} \pm 70,6 (10)	51,3* \pm 37,1 (02)	99,5
	4	1270,8 ^a \pm 98,8 (10)	5,4 ^{de} \pm 16,7 (10)	40,0* \pm 56,6 (02)	99,6
	6	1261,0 ^a \pm 87,5 (10)	0,6 ^e \pm 1,9 (10)	15,0* \pm 0,0 (01)	99,8
<i>Steinernema feltiae</i> SN	2	1266,3 ^a \pm 119,4 (10)	152,2 ^{bc} \pm 179,1 (10)	61,1 ^{bc} \pm 34,0 (09)	81,2
	4	1254,8 ^a \pm 93,6 (10)	52,3 ^{cd} \pm 68,4 (10)	38,8 ^c \pm 29,1 (08)	95,8
	6	1260,0 ^a \pm 117,3 (10)	73,8 ^{bc} \pm 190,3 (10)	43,5 ^c \pm 41,4 (10)	84,5
<i>Steinernema carpocapsae</i> ALL	2	1259,5 ^a \pm 117,3 (10)	148,8 ^{cd} \pm 217,2 (10)	65,0 ^{bc} \pm 36,1 (06)	80,6
	4	1259,5 ^a \pm 94,6 (10)	269,0 ^{bc} \pm 242,2 (10)	87,5 ^{ab} \pm 6,9 (06)	52,2
	6	1258,9 ^a \pm 94,6 (10)	433,9 ^{ab} \pm 133,2 (10)	86,0 ^{ab} \pm 9,1 (10)	24,2

Os valores apresentados correspondem à média de cinco fêmeas. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%. () – Tamanho da amostra. *Análise estatística não realizada devido ao tamanho reduzido da amostra. +Calculado segundo Drummond et al. (1973).

Todos os grupos tratados com *S. feltiae* SN e o grupo tratado com *S. carpocapsae* ALL com aplicação de dois cadáveres apresentaram percentuais de eclosão inferiores ($p < 0,05$) aos verificados para o controle (15,0% a 65,0% nos grupos tratados e 91,8% no controle). Nos demais grupos (quatro e seis cadáveres) a ação de *S. carpocapsae* ALL não reduziu significativamente ($p > 0,05$) a viabilidade dos ovos. Nos grupos tratados com os nematoides do gênero *Heterorhabditis*, não foi possível realizar a análise estatística devido ao tamanho reduzido da amostra ($n < 3$), uma vez que muitas fêmeas desses grupos morreram antes de iniciarem a postura (Tabela 1).

O percentual de controle foi superior a 99% para todos os grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1, chegando a 100% no tratamento com a disponibilização de seis cadáveres infectados por *H. bacteriophora* HP88 (Tabela 1). A utilização de dois cadáveres infectados com *S. feltiae* SN resultou em percentual de controle de 81%, chegando a 95,8% no tratamento composto por quatro cadáveres. Entretanto, no grupo com seis cadáveres ocorreu decréscimo na eficácia (84,5 %). Com relação aos grupos tratados com *S. carpocapsae* ALL, a melhor eficácia foi obtida com a utilização de dois cadáveres (80,6 %), sendo observada queda no percentual de controle nos demais grupos (Tabela 1).

No segundo experimento, após dois dias, a mortalidade de fêmeas foi de 86,0% no grupo tratado com *H. bacteriophora* HP88 formulados em *G. mellonella*, chegando a 96,0% no quarto dia, sendo mantido esse valor até a última data de avaliação (Figura 5). No grupo tratado com *H. bacteriophora* HP88 formulado em *T. molitor*, a taxa de mortalidade foi de 35,0% após dois dias, 62,5% com seis dias e 72,0% com dez dias (Figura 5). Para *H. indica* LPP1 formulado em *G. mellonella*, a mortalidade foi superior a 90% com três dias, atingindo valor de 100% após quatro dias (Figura 5). No grupo tratado com *H. indica* LPP1 formulado em *T. molitor*, a mortalidade foi de 35,0; 52,5 e 62,5% após dois, quatro e seis dias, chegando a 72,5% após 10 dias. No controle, a mortalidade foi de 4% após 10 dias (Figura 5).

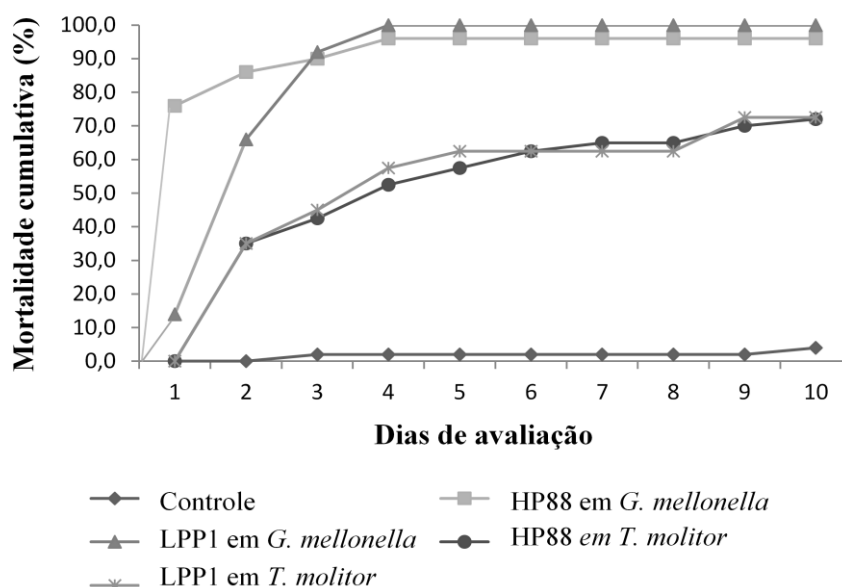


Figura 5. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1, formulados em larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*, em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ UR).

De forma análoga ao experimento anterior, o peso das fêmeas ingurgitadas em todos os grupos foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$). Os pesos da massa de ovos dos grupos tratados com nematoides formulados em *T. molitor* foram de 131,7 e 221,8 mg, para *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1, valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) ao constatado para o controle (563,2 mg). Nos grupos tratados com nematoides formulados em *G. mellonella*, a redução no peso da massa de ovos foi mais acentuada ($p < 0,05$), sendo observados valores de 2,5 e 1,0 mg para *H. bacteriophora* HPP8 e *H. indica* LPP1, respectivamente (Tabela 2).

Com relação ao percentual de eclosão das larvas, os grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 formulados em *T. molitor*, tiveram valores de 52,8% e 35,0%, respectivamente, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) para o controle (91,4%). Nos grupos tratados com nematoides formulados em *G. mellonella*, o percentual de eclosão foi de 10%, entretanto, não foi possível incluir esses resultados na análise estatística devido ao tamanho reduzido da amostra ($n < 3$) (Tabela 2). O percentual de controle dos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 formulados em *T. molitor* foi de 82,4% e 84,9%, respectivamente, chegando a 99,9% nos grupos tratados com NEPs formulados em *G. mellonella* (Tabela 2).

Tabela 2. Peso das fêmeas ingurgitadas, peso da massa de ovos, percentual de eclosão de larvas e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis indica* LPP1, formulados em larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*, em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ UR). (Valores da média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Peso de cinco fêmeas ingurgitadas (mg)	Peso da massa de ovos de cinco fêmeas (mg)	Percentual de eclosão de larvas (%)	[†] Percentual de controle (%)
Controle	1258,7 ^a \pm 45,9 (10)	563,2 ^a \pm 54,4 (10)	91,4 ^a \pm 6,3 (10)	
HP88 formulado em <i>G. mellonella</i>	1251,8 ^a \pm 39,3 (10)	2,5 ^c \pm 7,9 (10)	10,0* (01)	99,9
HP88 formulado em <i>T. molitor</i>	1252,3 ^a \pm 58,9 (10)	131,7 ^b \pm 174,0 (10)	52,8 ^b \pm 15,3 (09)	82,4
LPP1 formulado em <i>G. mellonella</i>	1252,4 ^a \pm 37,9 (10)	1,0 ^c \pm 3,2 (10)	10,0* (01)	99,9
LPP1 formulado em <i>T. molitor</i>	1257,5 ^a \pm 67,4 (10)	221,8 ^b \pm 277,0 (10)	35,0 ^b \pm 21,6 (10)	84,9

Os valores apresentados correspondem à média de cinco fêmeas.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

() – Tamanho da amostra.

*Análise estatística não realizada devido ao tamanho reduzido da amostra.

[†]Calculado segundo Drummond et al. (1973).

4 DISCUSSÃO

Pesquisas em laboratório demonstraram que diferentes isolados de NEPs apresentam patogenicidade para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2010a; SILVA et al., 2012). Com base nos resultados obtidos em laboratório, foi conduzida a primeira tentativa de avaliar o potencial desses nematoides *in vivo*; no entanto, a aplicação de suspensão aquosa de *H. baujardi* LPP7 e *S. glaseri* CCA em animais infestados por *R. microplus* não apresentou resultados satisfatórios (CARVALHO, 2008). Uma vez que a aplicação de NEPs tendo como o foco a fase parasitária não foi bem sucedida, uma nova alternativa seria a aplicação sobre a fase não parasitária. Assim, a aplicação nas pastagens pode ser um método viável para utilização desses nematoides no controle de carrapatos, tendo como modo de aplicação, a formulação inseto cadáver, uma vez que NEPs liberados dessa forma apresentam maior reserva energética, maior capacidade dispersiva e maior longevidade no solo, fatores que podem contribuir para a efetividade do controle (SHAPIRO-ILAN et al., 2001; SHAPIRO-ILAN et al., 2003).

A escolha dos nematoides *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 e *S. carpocapsae* ALL foi pautada no conhecimento prévio, sobre a patogenicidade apresentada por esses isolados sobre o carrapato dos bovinos (FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012). No caso de *S. feltiae* SN, inexistem estudos sobre sua patogenicidade para *R. microplus*; entretanto, optou-se por utilizar esse isolado devido sua patogenicidade para outras espécies de carrapatos (KOCAN et al., 1998).

O solo utilizado foi classificado como franco argilo arenoso, característica apontada na maioria dos trabalhos como favoráveis para ação dos NEPs, uma vez que permite melhor deslocamento devido ao predomínio da fração areia. Essa característica também possibilita maior aeração do solo, fornecendo maiores taxa de oxigênio para os NEPs e permite melhor detecção de voláteis emitidos por artrópodes hospedeiros, aumentando assim, o poder de busca dos JIs (KAYA, 1990, BARBECHECK & KAYA, 1991, DOLISNKI et al., 2010).

Os NEPs do gênero *Heterorhabditis* apresentaram melhor desempenho, causando redução acentuada na quantidade de ovos e larvas, e conseqüentemente, percentuais de controle superiores a 99%. Nos grupos expostos aos nematoides do gênero *Steinernema*, apenas o tratamento com quatro larvas infectadas com *S. feltiae* SN resultou em percentual de controle superior a 95%. Nos grupos tratados com *S. carpocapsae* ALL, a melhor eficácia foi observada no tratamento com duas larvas, com percentual de controle de 80%. Nematoides do gênero *Heterorhabditis* tem apresentado melhor desempenho para carrapatos (SAMISH & GLAZER, 2001; ALEKSEEV et al., 2006), e até o momento, os isolados HP88 e LPP1 foram apontados como os mais virulentos para *R. microplus*, superando isolados do gênero *Steinernema* e até mesmo, outros isolados de *Heterorhabditis* (MONTEIRO et al., 2010a; SILVA et al., 2012). Embora NEPs do gênero *Heterorhabditis* tenham sido apontados como os mais virulentos para carrapatos, os aspectos relacionados com esse melhor desempenho, ainda não foram bem esclarecidos. Entretanto, pode-se inferir que as bactérias do gênero *Photorhabdus* associadas a esses nematoides, sejam mais letais para esses artrópodes, uma vez que os JIs geralmente morrem logo após a penetração no carrapato, estando a morte das fêmeas relacionada com a ação das bactérias liberadas na hemocele (SAMISH et al., 2008).

A possibilidade de penetração ativa devido à presença de um dente quitinoso na extremidade anterior dos JIs infectantes do gênero *Heterorhabditis* (KAYA & GAUGLER, 1993) também pode esta relacionada com a maior virulência, causando lesões e ocasionando a morte da fêmea mais rapidamente. No presente estudo, foi observado o extravazamento de sangue pelo tegumento de algumas fêmeas tratadas com *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica*

LPP1, indicando que o tegumento e órgãos internos foram rompidos. Tal fato foi observado principalmente nos tratamentos com seis cadáveres, em que é maior o número de JIs invasores. O rompimento do tegumento de *R. microplus* por nematoides do gênero *Heterorhabditis* também foi observado por HILL (1998), VASCONCELOS et al. (2004) e MONTEIRO et al. (2010a).

Os melhores resultados obtidos com a utilização de *S. carpocapsae* ALL e *S. feltiae* SN foram observados nos tratamentos com a aplicação de dois e quatro cadáveres, respectivamente, e o aumento de cadáveres nos tratamentos seguintes, resultou em decréscimo na eficácia dos NEPs. O acréscimo de cadáveres nos tratamentos ocasiona considerável aumento no número de nematoides em cada recipiente, uma vez que uma larva de *G. mellonella* produz de 100.000 a 300.000 JIs aproximadamente (POINAR, 1990). Embora em muitos casos exista uma correlação entre o aumento do número de JIs e aumento da eficácia (MONTEIRO et al., 2010a), também é possível encontrar na literatura exemplos de correlação negativa, ocasionada pela competição intraespecífica (MONTEIRO et al., 2010b). Alguns autores levantam a hipótese que o aumento na densidade de nematoides ocasiona maior disputa pelo hospedeiro e queda na infectividade de alguns isolados (BATISTA et al., 2011). KAYA et al. (2000) utilizando dois isolados de *S. carpocapsae* nas concentrações de 100 e 1000 nematoides por fêmeas, também verificaram que a menor concentração resultou em maiores taxas de mortalidade de *Rhipicephalus decoloratus* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) e *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901) (Acari: Ixodidae). Vasconcelos et al. (2004) e Monteiro et al. (2010b) testaram diferentes concentrações de *H. bacteriophora* CCA e *Heterorhabditis amazonenses* Andaló et al. 2006 (Rhabditida: Heterorhabditidae) RSC-5, respectivamente, e concluíram que a melhor eficácia foi obtida na concentração de 300 por fêmea, sendo relatado queda de eficácia, nas concentrações de 600 e 1200 JIs.

A temperatura do solo durante o experimento manteve-se em torno de 28°C, tendo provavelmente influência negativa sobre o desempenho de *S. feltiae* SN. O limiar de temperatura no qual uma espécie de nematoide pode sobreviver, infectar e reproduzir, geralmente está próxima das condições climáticas do local de origem da espécie. (MOLYNEUX, 1986). *S. feltiae* é originária de regiões temperadas, assim, seu melhor desempenho seria obtido em temperaturas mais baixas (HAZIR et al., 2003; SHAPIRO-ILAN, 2006). Grewal et al. (1994) relataram que temperaturas superiores a 25°C, levaram a queda de infectividade de *S. feltiae* em larvas de *G. mellonella*. Já as outras espécies utilizadas no presente estudo são conhecidas por permanecerem viáveis em temperaturas de pelo menos 30°C (GREWAL et al., 1994; HOMINICK, 2002; ROHDE et al., 2010).

Com relação a *S. carpocapsae* ALL, o desempenho inferior aos demais nematoides testados pode estar relacionado com a umidade, uma vez que durante o experimento a UR do solo foi de 85%. Rohde et al. (2010) verificaram baixa virulência de *S. carpocapsae* para *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) em solo mantido no limite da capacidade de campo, entretanto, a taxa de mortalidade aumentou consideravelmente em solos mantidos com 75% dessa capacidade.

O fato dos nematoides *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 terem comportamento “cruiser” para buscar o hospedeiro, movendo-se constantemente no solo e *S. feltiae* SN ter comportamento misto (“cruiser” e “ambusher”) também pode ter contribuído para uma melhor eficácia destes NEPs, permitindo que eles localizassem e penetrassem nas fêmeas de forma mais rápida do que os JIs de *S. carpocapsae*, que têm apenas o comportamento “ambusher”, que consiste em ficar a maior parte do tempo parado esperando a passagem do hospedeiro (DOLISNKI, 2006).

No segundo experimento, os nematoides formulados em *G. mellonella* apresentaram melhor desempenho, causando redução mais acentuada no peso da massa de ovos e taxas de percentual de controle superiores a 99%. Larvas de *G. mellonella* geralmente produzem maior

quantidade de JIs do que larvas de *T. molitor* (MOLINA et al., 2004). Shapiro-Ilan et al. (2002) comparando a produção de JIs por grama de *G. mellonella* e *T. molitor*, verificaram que a produção de *H. bacteriophora* Hb foi de 2,0 a 3,5 vezes maior em *G. mellonella*. Assim, o melhor desempenho dos NEPs do gênero *Heterorhabditis* formulados em *G. mellonella*, provavelmente está relacionado com a maior quantidade de JIs produzidos por esse inseto em cada pote, causando a morte das fêmeas em menor intervalo de tempo, resultando em redução de prole mais acentuada.

Embora o fato de produzir menor quantidade de JIs possa ter contribuído para o desempenho inferior obtido pelos NEPs formulados em *T. molitor*, outro aspecto que chama a atenção foram os altos valores de desvio padrão encontrados nesses tratamentos, demonstrando que as fêmeas morreram rapidamente em algumas repetições produzindo poucos ovos, assim como observado nos grupos tratados com NEPs formulados em *G. mellonella*. Entretanto, em outras repetições dentro do mesmo tratamento, as fêmeas ficaram vivas por mais tempo, produzindo postura similar ao verificado no grupo controle. Com bases nesses resultados, podemos inferir que o microambiente proporcionado pela multiplicação de *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 em *T. molitor* seja mais instável, afetando o sucesso reprodutivo dos NEPs em algumas larvas desse coleóptero, explicando assim, as diferenças observadas entre as unidades experimentais do mesmo tratamento.

Mesmo apresentando desempenho inferior, a formulação dos NEPs em larvas de *T. molitor*, especialmente do gênero *Heterorhabditis*, não deve ser descartada, uma vez que o custo de produção de larvas desse coleóptero é de quatro a cinco vezes menor do que o custo de produção de *G. mellonella*. Shapiro-Ilan et al. (2002) relataram que custo por insetos nos Estados Unidos é de aproximadamente 0,0120 e 0,0025 dólares para *G. mellonella* e *T. molitor*, respectivamente. Assim, o desempenho inferior pode ser compensado pela possibilidade de utilizar um maior número de cadáveres de *T. molitor* por área e ainda assim, ter um menor custo de produção. Outro aspecto que pode favorecer a utilização de larvas de *T. molitor*, especialmente no Brasil, é a existência de várias empresas que criam esse coleóptero para comercialização com diversos fins, como alimentação de aves e peixes. Assim, a aquisição de matéria prima para confecção dos cadáveres infectados por NEPs para aplicação em grande escala seria facilitada. Outro ponto positivo que pode compensar o desempenho inferior da formulação em *T. molitor* é que as larvas desse coleóptero apresentam textura mais rígida após a infecção por NEPs, sendo mais fácil de preservar a integridade do cadáver durante a estocagem, manipulação e aplicação.

Os nematoides *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1, *S. feltiae* SN e *S. carpocapsae* ALL em formulação inseto cadáver, sob condições controladas, apresentaram patogenicidade para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo observado melhor desempenho de NEPs do gênero *Heterorhabditis*. A formulação em larvas de *G. mellonella* apresentou melhor desempenho, mas a possibilidade de produção de NEPs em larvas de *T. molitor*, especialmente do gênero *Heterorhabditis*, também deve ser considerada, pois essa formulação também se mostrou eficaz e apresenta algumas vantagens em relação à formulação em lagartas de *G. mellonella*. Dessa forma, a disponibilização de cadáveres infectados por NEPs em áreas de pastagens pode ser uma alternativa viável para o manejo integrado de *R. microplus* em condições de campo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSEEV, E.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. **BioControl**. v. 51, p. 507-518, 2006.
- AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 148-154, 2011a.
- AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; 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, 2011b.
- ANSARI, A.M.; HUSSAIN, M.A.; MOENS, M. Formulation and application of entomopathogenic nematode-infected cadavers for control of *Hoplia philanthus* in turfgrass. **Pest Management Science**. v. 65, p. 367-374, 2009.
- BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Effect of host condition and soil texture on host finding by entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Environmental Entomology**. v. 20, p. 582-589, 1991.
- BATISTA, E. S. P.; AUAD, A. M. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 1079-1085, 2010.
- BATISTA, E.S.P.; AUAD, A.M.; RESENDE, T.T.; FRIAS, M.P.; MONTEIRO, C.M.O. Nematoides entomopatogênicos infectam ovos e adultos de cigarrinha-das-pastagens? **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 78, p. 475-478, 2011.
- BORGES, L.M.F.; CARNEIRO, J.R.; GOMES, A.G.; MOREIRA, P.C. Influência do peso inicial e da estação do ano na conversão em ovos de fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Animal Brasileira**. v. 2, p. 127-131, 2001.
- CARVALHO, L.B. 2008. Efeitos “in vitro” e “in vivo” de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). 2008. 52p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- COSTA, J.C.R.; DIAS, R. J. P.; MORENZ, M J F. Determining the adaptation potential of entomopathogenic nematode multiplication of *Heterorhabditis baujardi* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Parasitology Research**. v. 102, p. 139-144, 2007.
- DEL VALLE, E.E. **Utilização de cadáveres de *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) infectados por *Heterorhabditis baujardi* LPP7 no controle do gorgulho-**

da-goia *Conotrachelus psidii* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). 75 p. (Tese, Doutorado). Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DEL VALLE, E.E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E.L.S.; SOUZA, R.M., SAMUEL, R.I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera, Curculionidae) Larvae. **Biological Control Science Technology**. v.18, p. 33-41, 2008.

DOLINSKI, C. Uso de entomopatogenic nematodes para o controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JR, T.J.; PALLINI, A. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças**, Viçosa, UFV. 2006. p. 261-289.

DOLINSKI, C.; PINTO, C.C.S.; ROBAINA, R.R; BELLINII, L.L. Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do nematoide entomopatogenicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**. v. 34, p. 123-128, 2010.

DOLINSKI, C.; CHOO, H.Y.; DUCAN, L.W. Grower acceptance of entomopathogenic nematodes: Case studies on three continents. **Journal of Nematology**. v. 44, p. 226-235, 2012.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, p. 30–133, 1973.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL Strains (Steinernema: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 23, p. 53–56, 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 27, p. 53–56, 2007.

GREWAL, P.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**. v. 19, p. 245-253, 1994.

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

HILL, D.E. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**. v. 84, p. 1124–1127, 1998.

HOMINICK, W.H. Biogeography. In: Gaugler, R., (Ed.). Entomopathogenic nematology. New Jersey: Rutgers University. pp. 115-143, 2002.

KAAYA, G.P.; SAMISH, M.; GLAZER, I. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African ticks species. **Annals of the New York Academic of Science**. v. 916, p. 306–308, 2000.

KAYA, H.K. Soil Ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (ed). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, CRC Press. 1990. p. 93-115.

KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**. v. 38, p. 181-206, 1993.

KAYA, H.K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic, CA. 1997. p. 281–324.

KOCAN, K.M.; PIDHERNEY, M.S.; BLOUIN, E.F.; CLAYPOOL, P.L.; SAMISH, M.; GLAZER, I. Interaction of some entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) with selected species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 35, p. 514-520, 1998.

LABRUNA, M.B. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET. 2008a. p. 15–56.

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

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. 2006. Controle de carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; ARZUA, M.; BRECHARA, G.H. (Eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan. 2006. p. 145–153.

MOLYNEUX, A.S. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (= *Neoplectana*) spp: Temperature and aspects of behaviour and infectivity. **Experimental Parasitology**. v. 62, p. 169-180, 1986.

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

MONTEIRO, C.M.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; SOARES, A.E.; BATISTITA, E.S.P.; DOLINSKI, C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 355–358, 2010a.

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; FAZZA, A.P.; SILVA, A.M.R.; ANDALÓ, V.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 106, p. 821–826, 2010b.

PEREIRA, M.C. Introdução. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência*. São Paulo: MEDVET. 2008a. p.1–5.

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

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

SAMISH, M. Biocontrol of ticks. **Annals of the New York Academic of Science**. v. 916, p. 172–178, 2000.

SAMISH, M.; GLAZER, I. Entomopatogenic nematodos for the bioncontrol of ticks. **Trends in Parasitology**. v. 17, p. 368–371, 2001.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (Eds). **Ticks: Biology, Disease and Control**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. p. 447–469.

SANTOS, A.P.; FURLONG, J. Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**. v. 32, p. 1033–1038, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E.; BEHLE, R.W.; MCGUIRE, M.R. formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.78, p.17-23, 2001.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; GAUGLER, R.; TEDDERS W.L.; BROWN, I.; LEWIS, E.E. Optimization of inoculation for In vivo production of entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**. v. 34, p. 343–350, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E.; TEDDERS, W.L. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspensions. **Journal Invertebrate of Pathology**. v.83, p.270-272, 2003.

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

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1

on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 62, p. 140-143, 2012.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 94, p. 201–206, 2004.

WALKER, A.R.; BOUARTTOUR, A.; CAMICAS, J.L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; PRESTON, P. **Ticks of Domestic Animals in Africa. A Guide to identification of Species**. Edinburgh. University of Edinburgh, 2003. p.

WHITE, C.F.A. A method for obtaining larvae from culture. **Science**. v. 66, p. 302-303,

CAPÍTULO II

**AÇÃO DE *Heterorhabditis baujardi* (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE), ISOLADO LPP7 PARA FÊMEAS
INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) E
INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE OUTROS HOSPEDEIROS
SUSCEPTÍVEIS**

RESUMO

O estudo avaliou a influência da presença *Mahanarva spectabilis* (cigarrinha) e *Galleria mellonella* sobre a eficácia de *Heterorhabditis baujardi*, isolado LPP7 para o controle de *Rhipicephalus microplus*, e verificou a virulência desse nematoide para o carrapato dos bovinos, quando multiplicados nesses dois insetos. No primeiro estudo, fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram expostas ao nematoide entomopatogênico (NEP) *H. baujardi* LPP7, tendo a presença ou não de ninfas de *M. spectabilis* ou lagartas de *G. mellonella*. Também foram formados grupos contendo apenas ninfas de *M. spectabilis* ou lagartas de *G. mellonella* expostas aos nematoides, e grupo controle para cada artrópode. No segundo experimento, fêmeas ingurgitadas foram expostas a diferentes concentrações de *H. baujardi* LPP7 proveniente da multiplicação em *M. spectabilis* e *G. mellonella*. No primeiro experimento, após cinco dias, a mortalidade das fêmeas ingurgitadas mantidas em potes com *M. spectabilis* em potes com *G. mellonella* foi de 100%, valor superior ($p < 0,05$) ao verificado para o grupo contendo apenas carrapatos (86%). A mortalidade de *M. spectabilis* e de *G. mellonella*, nos grupos associados ou não com carrapatos também foi de 100% após cinco dias. A ação do nematoide reduziu ($p < 0,05$) o peso da postura, sendo que a redução foi mais acentuada no grupo em que os carrapatos foram colocados juntos com *M. spectabilis*. O índice de inibição de postura foi superior a 90% em todos os grupos, chegando a 99,7% no grupo contendo carrapatos e cigarrinhas. No segundo experimento, a ação do nematoide multiplicado em *M. spectabilis* e em *G. mellonella* também causou redução ($p < 0,05$) do peso da massa de ovos. O índice de inibição de postura foi superior a 80% em todos os tratamentos, chegando a 92% no grupo tratado com nematoides multiplicados em *G. mellonella* na concentração de 800 NEPs/fêmea. Dessa forma, é possível concluir que em condições de laboratório, a presença de outro hospedeiro potencializou a eficácia de *H. baujardi* LPP7 sobre fêmeas ingurgitadas, não ocorrendo preferência dos NEPs para infectar insetos, e que *H. baujardi* LPP7 apresentou virulência para *R. microplus* e *M. spectabilis*, podendo no futuro ser utilizado para o controle em conjunto desses artrópodes nas pastagens. Além disso, foi verificado que os juvenis infectantes desse nematoide multiplicados em *M. spectabilis* ou em *G. mellonella* possuem virulência similar para fêmeas ingurgitadas desse ixodídeo.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, Controle biológico, *Mahanarva spectabilis*, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

The study evaluated the influence of the presence of *Galleria mellonella* and *Mahanarva spectabilis* on the efficacy of *Heterorhabditis baujardi*, strain LPP7, for the control of *Rhipicephalus microplus* and verified the virulence of this nematode to the cattle tick when multiplied in these two insects. In the first experiment, engorged female cattle ticks were exposed to the entomopathogenic nematode (EPN) *H. baujardi* LPP7, in the presence or not of *M. spectabilis* nymphs or *G. mellonella* caterpillars. Groups were formed containing only *M. spectabilis* nymphs or *G. mellonella* caterpillars exposed to the nematodes, and a control group for each arthropod (experimental unit without EPNs). In the second experiment, engorged females were exposed to different concentrations of *H. baujardi* LPP7 from multiplication in *M. spectabilis* and *G. mellonella*. After five days, the mortality of the engorged females kept in pots with *M. spectabilis* or *G. mellonella* was 100%, a higher value ($p < 0.05$) than that for the group containing only ticks (86%). The mortality of *M. spectabilis* and *G. mellonella* in the groups associated or not with ticks was also 100% after five days. The nematode's action reduced ($p < 0.05$) the egg mass weight, with the reduction being more accentuated in the group where the ticks were placed together with the spittlebugs. The oviposition inhibition index was greater than 90% in all the groups, reaching 99.7% in the group containing ticks and spittlebugs. In the second experiment, the action of the nematode multiplied in *M. spectabilis* and in *G. mellonella* also caused a reduction ($p < 0.05$) in the egg mass weight. The oviposition inhibition index was greater than 80% in all the treatments, reaching 92% in the group treated with nematodes multiplied in *G. mellonella* at the concentration of 800 EPNs/female. Therefore, it can be concluded that in laboratory conditions the presence of *M. spectabilis* and *G. mellonella* enhanced the efficacy of *H. baujardi* LPP7 on the engorged females, without predilection of this strain to infect these insects. Also, *H. baujardi* LPP7 presented virulence to *R. microplus* and *M. spectabilis*, so in the future they can be used for control of cattle ticks together with these arthropods in pastures. Finally, infective juveniles of this nematode multiplied in *M. spectabilis* or *G. mellonella* have similar virulence to engorged females of this tick.

Key word: Cattle tick, biological control, *Mahanarva spectabilis*, *Galleria mellonella*.

1 INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são associados com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente (BURNELL & STOCK, 2000). Tais nematoides atuam como veículos para essas bactérias, que são patogênicas quando introduzidas na hemocele dos insetos hospedeiros, onde provocam rápida septicemia, levando-os a morte (GREWAL et al., 2001; HAZIR et al., 2003; DOLINSKI, 2006). Devido às características mencionadas, esses nematoides tem sido estudados e utilizados como agentes de controle biológico de diferentes espécies de insetos que se tornaram pragas agrícolas (DOLINSKI, 2006; SHAPIRO-ILAN et al., 2006).

A partir da última década, também foram conduzidas pesquisas com intuito de avaliar o potencial dos NEPs para o controle de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) (VASCONCELOS et al., 2004; MONTEIRO et al., 2010), carrapato que parasita bovinos, sendo responsável por inúmeras perdas nos sistemas de produção de carne e leite nos países em que ocorre (PEREIRA, 2008). No Brasil, estima-se que são perdidos 2 bilhões de dólares anualmente devido aos prejuízos diretos (espoliação sanguínea e consequências) e indiretos (transmissão de agentes patogênicos e gastos com controle) ocasionados pelo parasitismo desse ixodídeo (GRISI et al., 2002; FURLONG et al., 2007). O controle de *R. microplus* é feito quase que exclusivamente com a utilização de carrapaticidas organossintéticos; no entanto, esse método apresenta alguns pontos negativos, principalmente quando é utilizado de forma abusiva e pouco criteriosa, podendo ocasionar a seleção de carrapatos resistentes, risco de intoxicação dos animais e do homem e contaminação do ambiente e alimentos (KAAYA et al., 2000; FURLONG & PRATA, 2005; FURLONG et al., 2007). Por isso, novas formas de controle, como a utilização de NEPs, têm sido investigadas.

Os resultados obtidos em laboratório demonstraram que fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* são susceptíveis a infecção por diferentes espécies de NEPs (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Embora em laboratório os resultados tenham sido promissores, o mesmo não foi verificado em testes *in vivo*, aplicando suspensão aquosa de NEPs sobre bovinos infestados (CARVALHO, 2008). Dessa forma, novos estudos têm sido conduzidos com intuito de viabilizar uma forma de controle, aplicando os nematoides diretamente nas pastagens. Após desprenderem dos bovinos e caírem no solo, fêmeas ingurgitadas procuram ambientes úmidos e protegidos de radiação solar para fazerem a oviposição (CHAGAS et al., 2001). Essas características propiciam no solo um microclima favorável para sobrevivência e ação dos nematoides sobre as fêmeas ingurgitadas (SAMISH et al., 1999; SAMISH et al., 2004; ALEKSEEV et al., 2006).

Nematoides (“cruiser”) tendem a se mover constantemente no solo para buscar o hospedeiro, utilizando sinais químicos voláteis emitidos pelo artrópode como CO² (O'HALLARAN & BURNELL, 2003), fezes (GREWAL et al., 1993), fluidos do intestino (WANG & GAUGLER, 1998) e ácido úrico (O'HALLARAN & BURNELL, 2003). Sabe-se que os juvenis infectantes (JIs) de certos isolados de NEPs apresentam maior atração para determinadas espécies de insetos em relação a outras (KOPPENHÖFER & FUZY, 2008). Assim, a aplicação de NEPs na pastagem para o controle de *R. microplus* pode ter sua eficácia comprometida devido à presença de outros artrópodes susceptíveis a infecção dentro desse ecossistema, podendo existir certa preferência dos NEPs para infectar esses insetos. Isso por que os JIs podem ser mais fortemente atraídos pela presença de sinais químicos de certos insetos do que de carrapatos, fato ainda não elucidado pelos estudos apresentados na literatura.

Entre os insetos que podem compartilhar o mesmo micro-habitat com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, podemos citar a cigarrinha das pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae). Esse hemíptero, conhecido vulgarmente como cigarrinha da cana-de-açúcar, é comumente associado com gramíneas de grande porte, no entanto, recentemente tem sido apontado como importante praga em pastagens, alimentando-se diretamente da seiva e injetando fitotoxinas na planta (VALÉRIO, 2009), tornando-se fator limitante em sistemas de produção de carne e leite devido à queda na qualidade da pastagem disponível para os bovinos (HOLMANN & PECK, 2002, AUAD et al., 2007). As ninfas desse inseto permanecem na base das forrageiras se alimentando de seiva a partir do sistema radicular, sendo que esse estágio é susceptível a infecção por diferentes espécies de nematoides (BATISTA & AUAD, 2010); enquanto isso, os adultos se alimentam de seiva a partir das folhas e nessa fase são resistentes a infecção por NEPs (BATISTA et al., 2011).

Diferente das cigarrinhas, a mariposa *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepdoptera: Pyralidae), conhecida como traça dos favos de mel, não compartilha o mesmo ambiente que *R. microplus*. Entretanto, esse inseto é altamente susceptível à infecção por juvenis infectantes, sendo utilizado como inseto modelo para estudo com NEPs (EHLERS & SHAPIRO-ILAN, 2005), sendo que já foi demonstrado que certos isolados são mais fortemente atraídos por lagartas de *G. mellonella* do que para outros insetos (KOPPENHÖFER & FUZZI, 2008). Assim, o estudo sobre a influência da presença desse lepidóptero sobre a eficácia de NEPs para *R. microplus* pode fornecer importante informação sobre a possível predileção de NEPs para infectar insetos, e se tal fato pode comprometer a sua utilização no campo para o controle de carrapatos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da presença de *M. spectabilis* e *G. mellonella* sobre a eficácia do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen & Moens 2003 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP7, para o controle de *R. microplus*, além de verificar a virulência desse nematoide para o carrapato dos bovinos, quando multiplicados nesses dois insetos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, isolados de nematoides, lagartas de *Galleria mellonella* e ninfas de *Mahanarva spectabilis*

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foram utilizadas fêmeas ingurgitadas da estirpe sensível Porto Alegre (POA) obtidas através de infestações artificiais em bezerros no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil (registro CEUA-EGL 11/2013) (Anexo E). O nematoide utilizado foi cedido pelo laboratório de Nematologia da Universidade Federal Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e mantido no banco de NEPs do laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite. Sua manutenção foi feita através da multiplicação *in vivo* em *G. mellonella* (Linnaeus, 1758) (LINDEGREN et al., 1993; KAYA & STOCK, 1997) (Anexo A e C).

Como hospedeiros alternativos foram utilizados ninfas do 4º e 5º ínstares de cigarrinha das pastagens *M. spectabilis* coletadas nas pastagens do Campo Experimental Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite, localizado no distrito de Barão de Juparanã, município de Valença, Rio de Janeiro, Brasil (Anexo G). As lagartas do último ínstar de *G.*

mellonella foram obtidas através de colônia mantida no laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite (Anexo A).

2.2 Preparação das suspensões com nematoides

Para obtenção das suspensões com nematoides, foi feita a contagem de 10 alíquotas de 10 µL obtidas a partir de 20 mL de suspensão aquosa de nematoides estocadas em garrafa de cultivo celular de 40 mL, por período inferior a 15 dias em câmara climatizada a 18±1°C. Em seguida foi calculada a média de juvenis infectante (JIs) por amostra e a partir desta média, as suspensões foram ajustadas para concentração de 500 JIs/mL.

2.3 Experimento I – Influência de outros hospedeiros susceptíveis na eficácia de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Potes plásticos com capacidade de 300 mL foram preenchidos com 200 gramas de solo previamente esterilizado. Para o preenchimento dos potes foi utilizado solo proveniente de área de pastagem do CEJHB. Em cada recipiente foi adicionado 40 mL de água destilada, com a finalidade de manter o solo no limite de sua capacidade de campo.

No grupo contendo apenas carrapatos, cinco fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram adicionadas ao pote e na sequência foi aplicado 4 mL de suspensão aquosa contendo 2.000 NEPs (= 400 NEPs por carrapato). Também foi formado um grupo contendo apenas ninfas de *M. spectabilis* e outro contendo lagartas de *G. mellonella* (cinco insetos por pote), todos esses expostos a 2.000 JIs (= 400 JIs por inseto). No grupo contendo carrapatos e cigarrinhas, além das fêmeas ingurgitadas, foram adicionadas cinco ninfas de *M. spectabilis* (Figura 1A) e 4 mL de suspensão aquosa contendo 4.000 JIs (= 400 JIs por artrópode). No grupo contendo carrapatos e *G. mellonella*, foram adicionadas também cinco lagartas desse lepidóptero (Figura 1B) e 4 mL de suspensão aquosa (= 400 JIs por artrópode).

No controle, cinco fêmeas de *R. microplus* foram colocadas em potes isentos de nematoides. O mesmo foi feito nos grupos controle contendo apenas ninfas de *M. spectabilis* ou lagartas de *G. mellonella*. Em todos os grupos contendo ninfas de *M. spectabilis*, foi acrescentado raízes de *Brachiaria decumbens* para servir como fonte de alimento (Figura 1A). Nos demais grupos não houve necessidade de adição de fonte de alimento por se tratar de espécimes com processo de alimentação concluído. Para cada grupo foram feitas 10 repetições e todos os grupos foram mantidos em câmara climatizada a 27±1°C e umidade relativa de 80±10%.

Foram formados oito grupos experimentais, cada um com dez repetições, conforme a seguir:

- *R. microplus* em potes isentos de nematoides;
- *M. spectabilis* em potes isentos de nematoides
- *G. mellonella* em potes isentos de nematoides;
- *R. microplus* em potes com nematoides (400 JIs/carrapato);
- *M. spectabilis* em potes com nematoides (400 JIs/hemíptero);
- *G. mellonella* em potes com nematoides (400 JIs/lepidóptero);
- *R. microplus* e *M. spectabilis* em potes com nematoides (400 JIs/artrópode).
- *R. microplus* e *G. mellonella* em potes com nematoides (400 JIs/artrópode).

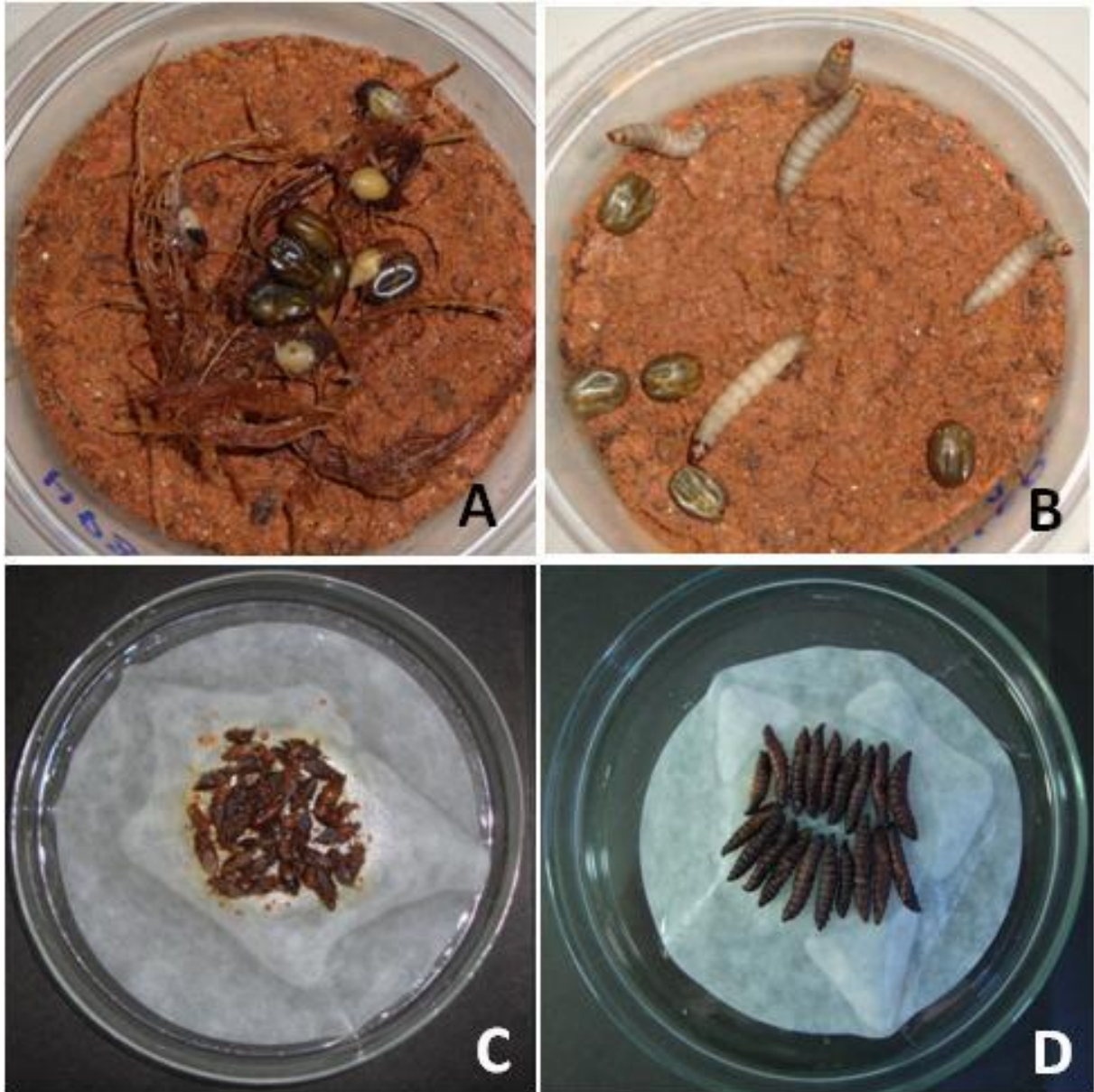


Figura 1. A: Cinco fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e cinco ninfas de *Mahanarva spectabilis* em pote plástico contendo solo, raízes de *Brachiaria decumbens* e juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7; B: Cinco fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e cinco lagartas de *Galleria mellonella* em pote plástico contendo solo e JIs de *H. baujardi* LPP7; C: Ninfas de *M. spectabilis* colocadas em armadilha de White após morte por *H. baujardi* LPP7; D: Lagartas de *G. mellonella* colocadas em armadilha de White após a morte por JIs de *H. baujardi* LPP7.

A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente durante os cinco primeiros dias após o início do experimento. Após cinco dias, as fêmeas ingurgitadas ainda vivas foram transferidas para placa de Petri, para dar continuidade na coleta de postura, a qual foi feita diariamente até a morte do último carrapato de cada unidade experimental. Foram avaliados os parâmetros: peso da fêmea antes da postura e peso da massa de ovos. A eficácia dos tratamentos foi calculada a partir do índice de inibição de postura (GONÇALVES et al., 2007) (Anexo H).

2.4 Experimento II – Virulência de *Heterorhbditis baujardi* LPP7 multiplicados em *Galleria mellonella* e *Maranarva spectabilis* sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Os JIs desse nematoide foram obtidos a partir de armadilhas de White (White, 1927) montadas com insetos mortos no primeiro experimento (Figura 1C e D), sendo coletados os JIs infectantes emergidos nos primeiros cinco dias de coleta.

Para realização do experimento, fêmeas ingurgitadas com pesos previamente homogeneizados ($p > 0,05$) foram divididas em cinco grupos contendo 10 carrapatos cada, sendo cada fêmea acondicionada em placa de Petri (6x6 cm) previamente forrada com duas folhas de papel de filtro esterilizado (cada fêmea = unidade experimental). Nos quatro grupos tratados, foi pipetado em cada placa 1 mL de suspensão aquosa contendo 400 ou 800 JIs provenientes de cadáveres de *M. spectabilis* e *G. mellonella*. Também foi formado um grupo controle, em que foi pipetado 1 mL de água destilada isenta de nematoides.

Assim foram formados os grupos:

Grupo 1 - controle, com fêmeas ingurgitadas em placa isenta de nematoide;

Grupo 2 – fêmeas ingurgitadas em placas com 400 JIs provenientes de cadáver de *M. spectabilis*;

Grupo 3 – fêmeas ingurgitadas em placas com 400 JIs provenientes de cadáver de *G. mellonella*;

Grupo 4 – fêmeas ingurgitadas em placas com 800 JIs provenientes de cadáveres de *M. spectabilis*;

Grupo 5 – fêmeas ingurgitadas em placas com 800 NEPs provenientes de cadáveres de *G. mellonella*.

As placas de Petri de todos os grupos foram vedadas com parafilme durante três dias para manter a umidade no papel de filtro, fornecendo condições favoráveis para os NEPs. A coleta de postura foi feita diariamente até a morte do último carrapato e as massas de ovos de cada fêmea foram pesadas. Assim, como no experimento anterior, os valores referentes ao peso da fêmea antes da oviposição e peso da massa de ovos foram utilizados para o cálculo do índice de inibição de postura (GONÇALVES et al., 2007) (Anexo H). As placas foram mantidas em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ UR) durante todo experimento.

2.5 Análise do solo

Amostra do solo utilizado para o preenchimento dos potes foi enviada para o laboratório de Análises do Solo LTDA, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, para realizações das análises físico-químicas.

2.6 Análise estatística

Para realização da análise estatística dos experimentos, foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. Para

a comparação das médias, devido à distribuição não normal dos dados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguindo do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

O solo utilizado para o preenchimento dos potes utilizados no primeiro experimento apresentou textura intermediária (entre arenoso e argiloso), sendo classificado como franco argilo arenoso, com 21% de argila, 18% silte, 61% de areia e pH de 5.8. A média de temperatura e UR do solo durante os dois experimentos foi de 28°C e 85%, respectivamente.

No experimento I, verificou-se no primeiro dia de avaliação, as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em todos os tratamentos ainda estavam vivas. A partir do segundo dia, o percentual de mortalidade de todos os tratamentos apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para o controle, onde não foi observada a morte de nenhuma fêmea durante os cinco dias de avaliação. Ainda sobre o segundo dia, o percentual de mortalidade das fêmeas ingurgitadas foi de 26% no grupo contendo apenas carrapatos e 48% no grupo com carrapatos e cigarrinhas, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferindo ($p < 0,05$) do grupo contendo carrapatos e lagartas de *G. mellonella*, cuja mortalidade foi de 62% (Tabela 1). No terceiro e quarto dias, o percentual de mortalidade das fêmeas ingurgitadas observado no grupo com carrapatos e cigarrinhas diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos outros tratamentos, chegando a 100% no quarto dia (Tabela 1). No quinto dia, o percentual de mortalidade das fêmeas ingurgitadas no grupo contendo carrapatos e *G. mellonella* também atingiu o valor de 100%, sendo semelhante ($p > 0,05$) ao grupo com carrapatos e cigarrinhas e diferindo ($p < 0,05$) do tratamento contendo apenas carrapatos (86%) (Tabela 1).

Com relação à mortalidade das cigarrinhas, no primeiro dia, a mortalidade também foi nula para as ninfas de *M. spectabilis* em todos os tratamentos. No segundo dia a mortalidade foi de 60,5 e 65,5%, para os grupos contendo apenas ninfas das cigarrinhas e ninfas juntamente com carrapatos. No terceiro dia, o percentual de mortalidade foi de 98% para os dois grupos tratados com NEPs, chegando a 100% no quarto dia. A partir do segundo dia, o percentual de mortalidade de todos os grupos tratados com NEPs apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para o grupo controle, em que as taxas de mortalidade foram de 0,0; 0,0; 6,5; 15,0 e 20,2% nos dias um, dois, três, quatro e cinco, respectivamente (Tabela 1).

Assim, como observado nos outros grupos, também não ocorreu morte de nenhuma lagarta de *G. mellonella* no primeiro dia de avaliação. A partir do segundo dia, as taxas de mortalidade de todos os grupos tratados com nematoides foram significativamente superiores ($p < 0,05$) ao controle, cuja mortalidade não chegou a 5% após cinco dias. A mortalidade observada no grupo contendo apenas lagartas de *G. mellonella* no segundo dia foi de 90%, valor superior ($p < 0,05$) ao verificado no grupo contendo *G. mellonella* e carrapatos (66,0%). Nos demais períodos de observação, a mortalidade verificada nos grupos tratados foi semelhante ($p > 0,05$), chegando a 100% no quinto dia de avaliação (Tabela 1).

A taxa de mortalidade em todos os tratamentos aumentou significativamente ($p < 0,05$) ao longo do tempo, com exceção dos grupos controle contendo apenas carrapatos ou lagartas de *G. mellonella* (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, ninfas de *Mahanarva spectabilis* e lagartas de *Galleria mellonella* expostas ao nematoide *Heterorhabditis baujardi* LPP7 na concentração de 400 juvenis infectantes por artrópode em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$). (média \pm desvio padrão).

Tratamentos*	Dias de avaliação (mortalidade %)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Controle Rm	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0	0,0 ^a \pm 0,0
Rm + LPP7	0,0 ^{aA} \pm 0,0	26,0 ^{bAB} \pm 35,3	64,0 ^{bBC} \pm 22,7	74,0 ^{bC} \pm 19,0	86,0 ^{bC} \pm 16,5
Rm e Ms + LPP7	0,0 ^{aA} \pm 0,0	48,0 ^{bCB} \pm 27,0	92,0 ^{cC} \pm 16,9	100,0 ^{cC} \pm 0,0	100,0 ^{cC} \pm 0,0
Rm e Gm + LPP7	0,0 ^{aA} \pm 0,0	62,0 ^{cB} \pm 25,7	82,0 ^{bBC} \pm 25,7	88,0 ^{bBC} \pm 19,3	100,0 ^{cC} \pm 0,0
Controle – Ms	0,0 ^{aA} \pm 0,0	0,0 ^{aA} \pm 0,0	6,5 ^{aAB} \pm 10,6	15,0 ^{aB} \pm 11,3	20,0 ^{aB} \pm 14,6
Ms + LPP7	0,0 ^{aA} \pm 0,0	60,5 ^{bB} \pm 27,3	98,0 ^{bC} \pm 6,3	100,0 ^{bC} \pm 0,0	100,0 ^{bC} \pm 0,0
Ms e Rm + LPP7	0,0 ^{aA} \pm 0,0	65,5 ^{bB} \pm 13,0	98,0 ^{bC} \pm 6,3	100,0 ^{bC} \pm 0,0	100,0 ^{bC} \pm 0,0
Controle – Gm	0,0 ^{aA} \pm 0,0	0,0 ^{aA} \pm 0,0	0,0 ^{aA} \pm 0,0	4,0 ^{aA} \pm 8,4	4,0 ^{aA} \pm 8,4
Gm + LPP7	0,0 ^{aA} \pm 0,0	90,8 ^{bB} \pm 17,0	94,0 ^{bB} \pm 13,5	98,0 ^{bB} \pm 6,3	100,0 ^{bB} \pm 0,0
Gm e Rm + LPP7	0,0 ^{aA} \pm 0,0	66,0 ^{bB} \pm 23,2	92,0 ^{bC} \pm 14,0	98,0 ^{bC} \pm 6,3	100,0 ^{bC} \pm 0,0

Médias de mortalidade de determinada espécie seguidas de letras minúsculas na coluna apresentam diferenças significativas á nível de 5%. Médias seguidas de letras maiúscula diferentes na linha apresentam diferenças significativas á nível de 5%. * - Em cada linha foi expressa a mortalidade do primeiro artrópode mencionado em cada tratamento. Rm – *Rhipicephalus microplus*; Ms – *Mahanarva spectabilis*; Gm – *Galleria mellonella*; LPP7 – *Heterorhabditis baujardi*.

No grupo controle contendo fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, todos os carrapatos fizeram postura (Figura 2A). Foi observado que no grupo contendo apenas carrapatos expostos a JIs de *H. baujardi* LPP7, algumas fêmeas ficaram vivas por tempo suficiente para realizar a oviposição (Figura 2B), no entanto, nos grupos em que as fêmeas foram mantidas nos recipientes com os diferentes insetos, praticamente não se recuperou postura, uma vez que a maior parte das fêmeas morreu antes de iniciarem a oviposição ou no início desse processo (Figura 2C e D).

Durantes esses cinco dias, as ninfas que não morreram deram origem a adultos (Figura 3A). A taxa de mortalidade no controle contendo apenas cigarrinhas esta dentro do normal para espécie quando mantida em laboratório; e embora tenham sido encontradas ninfas mortas no controle, cabe destacar que essas apresentavam características bem distintas das ninfas mortas nos grupos tratados com NEPs (coloração avermelhada - sinal de infecção por NEPs do gênero *Heterorhabditis*) (Figura 3B e C).



Figura 2. A: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* do grupo controle fazendo postura; B: Cinco fêmeas de *R. microplus* (duas vivas fazendo postura e três mortas) em pote com solo e juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7; C: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e lagartas de *Galleria mellonella* mortas pela ação de *H. baujardi* LPP7; D: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e ninfas de *Mahanarva spectabilis* (indicadas por setas amarelas) mortas pela ação de *H. baujardi* LPP7.



Figura 3. A: Adulto de *Mahanarva spectabilis* oriundo de ninfa do grupo controle; B: ninfa de *M. spectabilis* no quarto dia de avaliação, morta pela infecção por *Heterorhabditis baujardi* LPP7; C: ninfa de *M. spectabilis* do grupo controle no quarto dia de avaliação, morta naturalmente.

O peso das fêmeas ingurgitadas antes da oviposição foi estatisticamente semelhante ($p>0,05$) em todos os grupos. O peso da massa de ovos dos grupos contendo apenas carrapatos e carrapatos juntos com *G. mellonella* foi de 43,9 e 11,2 mg, respectivamente, diferindo significativamente ($p<0,05$) dos valores observados para o controle (547,2 mg). Nos grupos contendo carrapatos com cigarrinhas, o peso da massa de ovos foi 1,8 mg, diferindo significativamente ($p<0,05$) dos valores observados para o grupo controle e para o grupo contendo apenas carrapatos (Tabela 2). O cálculo do índice de inibição de postura revelou valores superiores a 90% em todos os grupos, chegando a 99,7% nos grupo contendo carrapatos e cigarrinhas (Tabela 2).

Tabela 2. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de *Rhipicephalus microplus* tratados com 400 JIs de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, na presença ou não de ninfas de *Mahanarva spectabilis* ou *Galleria mellonella* em condições de laboratório ($27^{\circ}1\pm 1$ e UR 80 ± 10). (Média \pm desvio padrão).

Tratamento	Peso das fêmeas antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	*Índice de inibição de postura (%)
Controle – <i>R. microplus</i> sem nematoide	1167,1 ^a \pm 64,4 (10)	547,2 ^a \pm 41,1 (10)	
<i>R. microplus</i> + <i>H. baujardi</i> LPP7	1166,3 ^a \pm 42,2 (10)	43,9 ^b \pm 41,3 (10)	91,9
<i>R. microplus</i> na presença de <i>M. spectabilis</i> + <i>H. baujardi</i> LPP7	1167,2 ^a \pm 53,1 (10)	1,8 ^c \pm 4,6 (10)	99,7
<i>R. microplus</i> na presença de <i>G. mellonella</i> + <i>H. baujardi</i> LPP7	1166,3 ^a \pm 43,9 (10)	11,2 ^{bc} \pm 15,2 (10)	98,0

Os valores apresentados correspondem a média de cinco fêmeas.

Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferenças significativas à nível de 5%.

() – Tamanho da amostra.

Calculado segundo Gonçalves et al. (2007).

No segundo experimento, o peso das fêmeas ingurgitadas antes da postura variou entre 175,3 a 180,5 mg, não sendo constatadas diferenças significativas ($p>0,05$). O peso da massa de ovos dos grupos tratados foi reduzido significativamente ($p<0,05$) sendo verificados valores entre 7,5 e 14,9 mg no quatro tratamentos, enquanto no controle o peso foi de 90 mg. Entre os grupos tratados não foram verificadas diferenças significativas ($p>0,05$) (Tabela 2). Todos os tratamentos apresentaram índice de inibição de postura superior a 80%, chegando a 92,1% no grupo tratado com a concentração de 800 JIs/fêmea proveniente de multiplicação em lagartas de *G. mellonella* (Tabela 2).

Tabela 3. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de *Rhipicephalus microplus* tratados com diferentes concentrações de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 provenientes de multiplicação em ninfas de *Mahanarva spectabilis* e lagartas de *Galleria mellonella* em condições de laboratório (27°1±1 e UR 80±10). (Média ± desvio padrão).

Tratamentos	Peso das fêmeas antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	*Índice de inibição postura (%)
Controle	180,5 ^a ±14,1 (10)	90,4 ^a ±9,7 (10)	
LPP7 (400 JIs) multiplicados em <i>M. spectabilis</i>	175,3 ^a ±20,3 (10)	14,1 ^b ±21,1 (10)	84,0
LPP7 (400 JIs) multiplicados em <i>G. mellonella</i>	176,6 ^a ±16,5 (10)	14,9 ^b ±26,3 (10)	83,3
LPP7 (800 JIs) multiplicados em <i>M. spectabilis</i>	176,2 ^a ±19,5 (10)	10,2 ^b ±8,4 (10)	88,5
LPP7 (800 JIs) multiplicados em <i>G. mellonella</i>	175,6 ^a ±17,9 (10)	7,5 ^b ±8,6 (10)	92,1

Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferenças significativas à nível de 5%.

() Tamanho da amostra.

LPP7 – *Heterorhabditis baujardi*

Calculado segundo Gonçalves et al. (2007)

4 DISCUSSÃO

A eficácia de NEPs a campo para o controle de uma determinada praga pode ser influenciada por fatores abióticos como temperatura, umidade relativa, textura e pH do solo, além de fatores bióticos como grau de virulência, capacidade de localizar o hospedeiro e presença de patógenos, predadores e outros entomopatógenos que competem pelos mesmos recursos (SHAPIRO-ILAN et al., 2006; SHAPIRO-ILAN et al., 2012). Assim, o entendimento das interações biológicas e ecológicas dos NEPs, apresenta primordial importância para o sucesso na implementação de estratégias de controle, sendo necessário compreender as interações que os JIs apresentam com o ambiente e organismos que compõem o ecossistema no qual serão inseridos para combater determinada praga (LEWIS et al., 2006; SHAPIRO-ILAN et al., 2006).

A característica do solo apresenta importante papel na mobilidade e sobrevivência dos NEPs (KAYA, 1990; BARBERCHECK 1992), sendo relatado que substratos com predomínio da fração areia são favoráveis à locomoção e sobrevivência da maioria das espécies (SHAPIRO-ILAN et al., 2006), fornecendo maiores taxas de oxigênio e melhor capacidade de detectar os voláteis emitidos por artrópodes hospedeiros (KAYA, 1990;

BARBECHECK & KAYA, 1991; DOLISNKI et al., 2010). No presente estudo, o solo foi classificado como franco argilo arenoso, apresentando textura favorável para o deslocamento de JIs de *H. baujardi* LPP7, permitindo a localização do hospedeiro (DOLISNKI et al., 2010). O pH também pode ser um fator limitante (SHAPIRO-ILAN et al., 2006), sendo que valores acima de 10 são prejudiciais, enquanto valores entre 4 e 8 não tem efeito negativo sobre os JIs (KUNG et al., 1990). Como o valor de pH do solo utilizado para o preenchimento dos potes foi de 5,8, podemos inferir que essa variável não apresentou influência negativa sobre a sobrevivência e infectividade de *H. baujardi* LPP7.

Heterorhabditis baujardi LPP7 foi altamente virulento para todas as espécies de hospedeiros testados. Lagartas de *G. mellonella* foram os hospedeiros mais sensíveis à infecção, sendo verificada taxa de mortalidade superior a 90% a partir do segundo dia avaliação, chegando a 100% após cinco dias. Tal fato já era esperado, uma vez que lagartas desse lepidóptero são altamente sensíveis à infecção por diferentes isolados, sendo adotadas como inseto modelo para estudos com NEPs (EHLERS & SHAPIRO-ILAN, 2005; DOLINSKI, 2006). Inclusive, dados a respeito da biologia de *H. baujardi* LPP7 já foram elucidados a partir da utilização de lagartas de *G. mellonella* como hospedeiro modelo (LARA et al., 2008; DOLINSKI et al., 2008). As ninfas de *M. spectabilis* apresentaram susceptibilidade similar ao verificado para *G. mellonella*, sendo observado percentual de mortalidade superior a 90% a partir do terceiro dia e 100% no quarto dia. Batista (2010) e Batista & Auad (2010) demonstraram que ninfas de *M. spectabilis* foram susceptíveis a infecção para quatro espécies do gênero *Heterorhabditis* e cinco de *Steinernema*, sendo que as espécies *Steinernema riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994 (Rhabditida: Steinernematidae) e *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae) foram apontadas como as mais virulentas, causando mortalidade de 92% em condições de laboratório. Esse é o primeiro relato sobre eficácia de *H. baujardi* LPP7 para ninfas de *M. spectabilis*, e os resultados obtidos superam os valores de mortalidade verificados para os outros isolados anteriormente testados contra esse cercopídeo. No entanto, a alta virulência deste isolado já tinha sido demonstrada para cigarrinhas da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) (BATISTA et al., 2011).

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram menos sensíveis à infecção do que as lagartas de *G. mellonella* e ninfas de *M. spectabilis*, sendo observada mortalidade máxima de 86% após 5 cinco dias, quando os carrapatos foram expostos aos NEPs sem a presença de alguns desses insetos. Embora a mortalidade não tenha chegado a 100%, foi possível verificar que o tratamento com *H. baujardi* LPP7 levou à redução na quantidade de ovos produzidos, uma vez que muitas fêmeas morreram antes de começarem a fazer postura, ou no início desse processo, resultando em eficácia de 91,9%. A patogenicidade desse isolado já tinha sido demonstrada para *R. microplus* por MACHADO (2008) que também verificou que a ação dos JIs de *H. baujardi* LPP7 reduziu a quantidade de ovos de fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes a carrapaticidas.

A presença de outros hospedeiros influenciou positivamente na eficácia de *H. baujardi* LPP7 sobre as fêmeas ingurgitadas, sendo observados maiores percentuais de mortalidade nesses grupos ao longo dos cinco dias de avaliação e eficácias de 99,7 e 98,0% nos grupos em que as fêmeas foram expostas junto com ninfas de *M. spectabilis* ou larvas de *G. mellonella*, respectivamente. A ecologia comportamental de NEPs cruzadores implica na busca ativa do inseto através de captação de sinais químicos emitidos pelo hospedeiro (CO₂, fezes, fluido intestinal e ácido úrico). Juvenis infectantes podem ser mais fortemente atraídos para determinada espécie de artrópode devido aos tipos e quantidades de sinais químicos emitidos por esses (LEWIS et al., 2006; KOPPENHÖFER, 2008). O melhor desempenho de *H. baujardi* LPP7 para *R. microplus*, nos grupos contendo carrapatos e cigarrinhas ou *G. mellonella*, portanto, possivelmente está relacionado com o aumento da densidade de

hospedeiros por área e conseqüentemente, aumento na emissão de sinais químicos. Tal fato pode ter deixado os JIs mais ativos, permitindo que eles se deslocassem mais rapidamente no solo, facilitando e acelerando os processos de busca, localização e penetração no hospedeiro, conforme constatado em estudos anteriores. Gaugler et al. (1991) verificaram que diferenças na quantidade de eliminação de CO₂ entre diferentes espécies de insetos estavam correlacionadas com a capacidade de *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Rhabditida: Steinernematidae) localizar o hospedeiro. Koppenhöfer et al. (2008) especularam que JIs de *Steinernema scarabaei* Stock & Koppenhofer, 2003 (Rhabditida: Heterorhabditidae) e *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1975) (Rhabditida: Heterorhabditidae) foram mais fortemente atraídos para larvas de *G. mellonella* do que para larvas de *Popillia japonica* Newman, 1841 (Coleoptera: Scarabaeidae) devido ao fato das larvas desse lepidóptero liberarem três vezes mais CO₂.

O melhor desempenho de *H. baujardi* LPP7 para *R. microplus* foi obtido no grupo em que os carrapatos foram expostos juntamente com as ninfas de *M. spectabilis*, sendo observada mortalidade de 100% em menor intervalo de tempo. Além da emissão de sinais químicos pelo hospedeiro, JIs também podem ser atraídos por substâncias liberadas pelas raízes de vegetais atacados por insetos, uma vez que essas substâncias funcionam como sinais que indicam a presença do hospedeiro (VAN TOL et al., 2001; RASMANN et al., 2005; LEWIS et al., 2006). Assim, o processo de alimentação das ninfas de cigarrinhas pode ter liberado outros sinais químicos além dos emitidos diretamente pelos hospedeiros, deixando os JIs mais ativos.

A presença de fêmeas ingurgitadas não apresentou efeito positivo ou negativo sobre a eficácia desse mesmo nematoide para *M. spectabilis*, uma vez que a mortalidade das cigarrinhas com presença ou não de carrapatos foi similar durante todos os dias de avaliação. Como a presença de cigarrinhas potencializou a ação de *H. baujardi* LPP7 sobre carrapatos, e a presença de carrapatos não influenciou a ação desse nematoide sobre cigarrinhas, podemos inferir que aplicações deste isolado em pastagens pode representar uma forma de combater em conjunto esses dois artrópodes que causam sérios prejuízos econômicos para pecuária bovina no Brasil (HOLMANN & PECK, 2002; GRISI et al., 2002) em propriedades que seja observada a presença dos dois.

A presença de fêmeas ingurgitadas resultou em efeito negativo sobre a eficácia de *H. baujardi* LPP7 para *G. mellonella* no segundo dia de avaliação, uma vez que a mortalidade das lagartas no grupo com carrapatos foi de 60%, enquanto no grupo sem carrapatos, a mortalidade foi de 90%. Nos demais dias de avaliação, os valores foram similares. Esses resultados fornecem indícios que um número maior de JIs penetraram nas lagartas de *G. mellonella* no grupo sem a presença de carrapatos, enquanto no grupo contendo fêmeas, os JIs foram mais fortemente atraídos para carrapatos, reduzindo o número de JIs em larvas de *G. mellonella*, gerando essa diferença de mortalidade no segundo dia de avaliação. Entretanto, como larvas de *G. mellonella* são altamente sensíveis à infecção por NEPs (EHLERS & SHAPIRO-ILAN, 2005; DOLISNKI, 2006), mesmo em menor quantidade, os JIs que penetraram foram capazes de infectar e matar essas larvas, igualando os percentuais de mortalidade desses dois grupos nos dias seguintes de avaliação.

No segundo experimento, foi possível observar que NEPs produzidos em larvas de *G. mellonella* ou ninfas de *M. spectabilis* apresentaram virulência similar para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Tais dados diferem de alguns estudos que demonstram que a virulência de alguns isolados pode variar de acordo com o hospedeiro utilizado para multiplicação (LEWIS et al., 2006). A multiplicação em ninfas de *M. spectabilis* no ambiente pode ser um importante fator para manutenção desses agentes na pastagem, permitindo a propagação e posterior infecção de outras gerações desses artrópodes. Em carrapatos não se observa a reprodução de NEPs (SAMISH et al., 2008); assim, a manutenção no ambiente

ficaria limitada a novas aplicações, ou multiplicação em outros hospedeiros suscetíveis presentes na pastagem. Estudos demonstram aumento considerável na persistência de NEPs no ambiente com a presença de hospedeiros suscetíveis que permitam que eles se multipliquem (MINAS, 2011), tal como a cigarrinha *M. spectabilis*.

A eficácia de *H. baujardi* LPP7 no primeiro experimento foi de 91%, superando os valores obtidos no segundo experimento com a utilização de 400 JIs/fêmea multiplicados em *M. spectabilis* e *G. mellonella*, que foram de 84 e 83%, respectivamente. A diferença no desempenho possivelmente está relacionada com o substrato, uma vez que foi utilizado solo no primeiro experimento e papel de filtro no segundo. Estudos tem demonstrado que NEPs cruzadores apresentam melhor desempenho em areia ou em solo do que em papel de filtro em testes *in vitro*. Situação semelhante foi constatada por Kaaya et al. (2000), que demonstraram que alguns isolados foram mais efetivos contra *Rhipicephalus decoloratus* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) quando aplicados em placa de Petri contendo areia ao invés de papel de filtro.

A presença de *M. spectabilis* e *G. mellonella* apresentou influência positiva sobre a eficácia de *H. baujardi* LPP7 para o controle de carrapatos, demonstrando que esse isolado possui potencial para o controle em conjunto do carrapato do boi *R. microplus* e das cigarrinhas das pastagens, *M. spectabilis*. O conhecimento da influência de *G. mellonella* sobre a eficácia de *H. baujardi* LPP7 para *R. microplus* fornece importantes informações à respeito de interações que possam acontecer no solo com a presença de outros insetos. O presente estudo foi realizado em laboratório com potes fechados e sobre condições de temperatura e umidade controladas. Futuramente, estudos em campo podem nos fornecer dados mais precisos à respeito dessas interações.

5 REFERÊNCIAS

- ALEKSEEV, E., GLAZER, I., SAMISH, M. Effect of soil texture and moisture on the activity entomopathogenic nematodes against females *Boophilus annulatus* ticks. **BioControl** v. 51, p. 507-518, 2006.
- AUAD, A. M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V.; BRAGA, A.L.F.; SOUZA-SOBRINHO, F.; LÉDO, J.F.S.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, RB. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto a resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, p. 1077-1081, 2007.
- BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Effect of host condition and soil texture on host finding by entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Environmental Entomology**. v. 20, p. 582-589, 1991.
- BARBERCHECK, M.E. Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. **Fla. Entomology**. 75, 539–548, 1992..
- BATISTA, E.SP. Nematoides entomopatogênicos como controladores biológicos de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae). 64p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2010.
- BATISTA, E.S.P.; AUAD, A.M. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). **Biocontrol Science and Technology**. v. 20, p. 1079-1085, 2010.
- BATISTA, E.S.P.; AUAD, A.M.; RESENDE, T.T.; FRIAS, M.P.; MONTEIRO, C.M.O. Nematoides entomopatogênicos infectam ovos e adultos de cigarrinha-das-pastagens? **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 78, p. 475-478, 2011.
- BURNELL, A.N.N.M.; STOCK, S.P. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. **Nematology**. v. 2, p. 31-42, 2000.
- CARVALHO, L.B. 2008. Efeitos “in vitro” e “in vivo” de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). 2008. 52p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- CHAGAS, A.C.S.; NASCIMENTO, C.B.; FURLONG, J. Comportamento e ecologia de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagens de *Brachiaria decumbens* no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, n.4, 2001.
- DOLINSKI, C. Uso de entomopathogenic nematodes para o controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JR, T.J.; PALLINI, A. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças**, Viçosa, UFV. 2006. p. 261-289.

DOLINSKI, C.; DIAS, P.V C.; MOLINA, J.P.A. Influência da Dose dos Juvenis Infectantes e Peso das Larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) na produção in vivo de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**. v. 32, p. 317-321, 2008.

DOLINSKI, C.; PINTO, C.C.S.; ROBAINA, R.R.; BELLINI, L.L. Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**. v. 34, p. 123-128, 2010.

EHLERS R.U.; SHAPIRO-ILAN, D.I Mass production. In: GREWAL, P.S.; EHLERS, R.U.; SHAPIRO, D.I. (Eds.) **Nematodes as Biocontrol agents**. Cambridge: CABI Publishing. 2005. p. 295-316.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL Strains (Steinernema: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Conhecimento básico para o controle do carrapato dos bovinos. In: FURLONG, J. **Carrapato: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005. p. 51-65.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 27, p. 53–56, 2007.

GAUGLER, R.; CAMPBELL, J.F.; GUPTA, P. Characterization and basis of enhanced host-finding in a genetically improved strain of *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 57, p. 234–241, 1991.

GREWAL, P.S.; GAUGLER, R.; SELVAN, S. Host recognition by entomopathogenic nematodes: behavioral response to contract with host feces. **Journal of Chemical Ecology**. v. 119, p. 1219–1231, 1993.

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

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

GONÇALVES, K., TOIGO, E., ASCOLI, B., VON POSER, G., RIBEIRO, V. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**. v. 100, p. 1267–1270, 2007.

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

HOLMANN, F.; PECK, D. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. **Neotropical Entomology**. v.31, p.275-284, 2002.

KAAYA, G.P.; SAMISH, M.; GLAZER, I. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African ticks species. **Annals of the New York Academic of Science**. v. 916, p. 306–308, 2000.

KAYA, H.K. Soil Ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (ed). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, CRC Press. 1990. p. 93-115.

KAYA, H.K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic, CA. 1997. p. 281–324.

KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M. Attraction of four entomopathogenic nematodes to four white grub species. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 99, p. 227–234, 2008.

KUNG, S.; GAUGLER, R.; AND KAYA, H. K. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**. v. 22, p. 440–445, 1990.

LARA, J.C; DOLINSKI, C.; FERNANDES, E. Viability, Infectivity, and search capability of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) under Different Pressure and temperature Conditions. **Nematologia Brasileira**. v. 32, p. 200-205, 2008.

LEWIS, E.E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. v. 38, p. 66–79, 2006.

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

MACHADO, I.R. 2008. Potencial dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP4 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.

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

O'HALLARAN, D.M.; BURNELL, A.M. An investigation of chemotaxis in the insect parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **Parasitology**. v. 127, p. 375–385, 2008.

PEREIRA, M.C. INTRODUÇÃO. IN: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência*. MEDVET, São Paulo. 2008. p. 1–5.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S., KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, C.J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**. v. 434, p. 732–737, 2005.

SAMISH, M., ALEKSEEV, E. A. & GLAZER, I. Efficacy of entomopathogenic nematode strains against engorged *Boophilus annulatus* females (Acari: Ixodidae) under simulated field conditions. **Journal of Medical Entomology**. v. 36, p. 727–732, 1999.

SAMISH, M., GINSBERG, H., GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**. 129, 389-403, 2004.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (Eds). **Ticks: Biology, Disease and Control**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. p. 447–469.

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

SHAPIRO-ILAN, D.I.; RICHOU, H.A.N.; DOLINKSI, C. Entomopathogenic nematode: Production and Application Technology. **Journal of Nematology**. v. 44, p. 206–217, 2012.

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 62, p. 140-143, 2012.

VAN TOL, R.W.H.M.; VAN DER SOMMEN, A.T.C.M.; BOV, I.C.; VAN BEZOOIJEN, J.; SABELIS, M.W.; SMITS, P.H. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. **Ecology Lett**. v. 4, p. 292–294, 2001.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 94, p. 201–206, 2004.

CAPÍTULO III

EFICÁCIA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM FORMULAÇÃO INSETO CADÁVER SOBRE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) EM CONDIÇÕES SEMI-NATURAIS

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a patogenicidade de *Heterorhabditis bacteriophora* LPP30 “*in vitro*” para fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, além do efeito da aplicação de quatro isolados do gênero *Heterorhabditis* em formulação inseto cadáver sobre a fase na parasitária desse mesmo ixodídeo em condições semi-naturais. No primeiro experimento, fêmeas ingurgitadas foram expostas ao isolado LPP30 em diferentes concentrações para verificação de patogenicidade. No segundo experimento, cinco fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e quatro cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com nematoides foram colocadas em vasos plantados com *Brachiaria decumbens* mantidos em condições de ambiente. Foram utilizados os isolados *H. bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis baujardi* LPP7, *Heterorhabditis indica* LPP1 e *H. bacteriophora* LPP30, sendo cada isolado um tratamento com 10 repetições. No terceiro experimento, 65 dias após os cadáveres terem sido colocados nos vasos do segundo experimento, uma nova remessa de carrapatos foi adicionada nas unidades experimentais correspondentes aos dois tratamentos de melhor eficácia para avaliação da persistência dos NEPs. No primeiro experimento, todas as concentrações utilizadas causaram redução ($p < 0,05$) no peso da massa de ovos, ocorrendo redução ($p < 0,05$) também no percentual de eclosão no grupo tratado com a concentração de 75 Juvenis infectantes (JIs)/fêmea. O percentual de controle foi superior a 95% em todos os tratamentos. No segundo experimento, após 22 dias, a mortalidade foi de 78% nos grupos expostos a juvenis infectantes de *H. bacteriophora* LPP30 e *H. indica* LPP1, chegando a 100 e 98% para os tratamentos com *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7, respectivamente. Nesse experimento, a ação dos nematoides reduziu ($p < 0,05$) o peso da massa dos grupos tratados e o percentual de inibição de postura foi superior a 90% nos tratamentos com *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7. No terceiro experimento, *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7 também causaram redução ($p < 0,05$) na massa de ovos produzidas pelas fêmeas ingurgitadas, sendo observado índice de inibição de postura de 59,1 e 43,1%, respectivamente. Conclui-se que o isolado LPP30 foi altamente virulento em condições de laboratório e que em condições semi-naturais, os isolados HP88 e LPP7 foram os mais eficazes. Além disso, foi possível verificar que esses nematoides permaneceram ativos por mais de 65 dias após terem sido aplicados no solo.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis baujardi*, *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis bacteriophora*.

ABSTRACT

The present study evaluated the virulence of *Heterorhabditis bacteriophora* LPP30 *in vitro* against engorged females of *Rhipicephalus microplus* and the effect of applying four strains of the genus *Heterorhabditis* in a cadaver insect formulation on the non-parasite phase of the tick under semi-natural conditions. In the first experiment, engorged females were exposed to the LPP30 strain at different concentration to verify the virulence. In the second experiment, five engorged females and four cadavers of *Galleria mellonella* infected with nematodes were placed in posts planted with *Brachiaria decumbens* kept open area at ambient conditions. The strains used were *H. bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis baujardi* LPP7, *Heterorhabditis indica* LPP1 and *H. bacteriophora* LPP30, with each strain composing a treatment with 10 repetitions. In the third experiment, 65 days after the cadavers had been placed in the pots in the second experiment; a new group of ticks was placed in the pots of the groups treated with *H. bacteriophora* HP88 and *H. baujardi* LPP7, to assess the persistence. In the first experiment, all the concentrations used caused a reduction ($p<0.05$) in the egg mass weight, and there was also a reduction ($p<0.05$) in the hatching rate in the group treated with the concentration of 75 EPNs/female. The percentage of control was greater than 95% in all the treatments. In the second experiment, the action of the nematodes also reduced ($p<0.05$) the egg mass weight of the treated groups, after 22 days, the mortality was 78% in the groups treated with infective juveniles of *H. bacteriophora* LPP30 and *H. indica* LPP1, and reached 100% and 98% for the treatments with *H. bacteriophora* HP88 and *H. baujardi* LPP7, respectively. In this experiment, the oviposition inhibition percentage was greater than 90% in the treatments with *H. bacteriophora* HP88 and *H. baujardi* LPP7. In the third experiment, *H. bacteriophora* HP88 and *H. baujardi* LPP7 also caused a decrease ($p<0.05$) in the egg mass weight, and the oviposition inhibition index was 59.1% and 43.1%, respectively. It can be concluded that strain LPP30 was highly virulent under laboratory conditions and that in semi-natural conditions, strains HP88 and LPP7 were the most effective of those tested. Besides this, these nematodes remained active for over 65 days after application in the soil because they were able to infect engorged female cattle ticks.

Key word: Cattle tick, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis baujardi*, *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis bacteriophora*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, cuja produtividade representa grande parcela do PIB nacional, fazendo que o país seja um dos principais produtores e exportadores de carne, leite e derivados (IBGE, 2012). Entretanto, acredita-se que produtividade esteja abaixo do real potencial que o país apresenta e um dos principais entraves para pecuária brasileira e a presença do carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). As condições climáticas do Brasil, somadas às deficiências de manejo, fazem com que grande parte do gado criado no país seja parasitado por esse artrópode. Estima-se que no Brasil os prejuízos econômicos ocasionados por esse ectoparasito sejam de dois bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2002; AMARAL et al., 2011). Esse carrapato também representa um sério problema para pecuária em vários outros países na América do Sul, América Central, África e Ásia (WALKER et al., 2003; MARTINS et al., 2006; PEREIRA & LABRUNA, 2008).

O parasitismo dos bovinos por *R. microplus* causa prejuízos que vão desde a perda de sangue, estresse e surgimento de reações alérgicas, fatores que ocasionam queda na produtividade dos animais. Durante o ato de hematofagia, as peças bucais desse carrapato também dão origem a feridas que geram desvalorização no valor comercial do couro e são portas de entradas para miíses e infecções bacterianas. *R. microplus* também pode atuar como vetor da bactéria *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bigemina* *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Piroplasmida: Babesidae) e *Babesia bovis* (Babes, 1888) (Piroplasmida: Babesidae) (Piroplasmida: Babesidae), agentes etiológicos de doenças agrupadas no complexo “Tristeza Parasitária Bovina”. Somados aos prejuízos ditos biológicos, também se encontram os prejuízos mais claramente percebidos pelo produtor devido aos gastos com carrapaticidas, medicamentos, equipamentos e mão de obra especializada para o tratamento dos animais (FURLONG et al., 2004; FURLONG & PRATA; 2005; LABRUNA & MACHADO; 2006; MARTINS et al., 2006).

A utilização de carrapaticidas organossintéticos é a principal forma de controle desse ixodídeo; entretanto, a dependência quase que exclusiva desses produtos, aliado em muitas vezes ao uso sem critérios técnicos adequados, tem resultado na seleção de carrapatos resistentes (FURLONG et al., 2007; KLAFKE, 2008; LABRUNA, 2008). Somado aos problemas de resistência, existe crescente demanda pelo desenvolvimento de novas alternativas no controle de pragas visando à utilização mínima de químicos, reduzindo as chances de contaminação do ambiente e alimentos e intoxicação do homem e dos animais (SAMISH, 2000). Nesse contexto, o controle biológico com a utilização de nematóides entomopatogênicos representa promissora alternativa a ser utilizada em programas de manejo integrado do carrapato dos bovinos (VASCONCELOS et al., 2004; MONTEIRO et al., 2012).

Em condições de laboratórios, estudos tem demonstrado que diferentes isolados de NEPs são patogênicos para fêmeas ingurgitadas e semi-ingurgitadas de *R. microplus* (FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2012), reduzindo consideravelmente o potencial biótico desse carrapato (MONTEIRO et al., 2010). Entretanto, os primeiros resultados obtidos em testes “*in vivo*” com aplicação de suspensão de dois isolados de nematóides sobre bovinos infestados não apresentaram resultados satisfatórios (CARVALHO, 2008). Uma alternativa para utilização de NEPs para do controle do carrapato dos bovinos seria a aplicação diretamente na pastagem. Isso por que fêmeas ingurgitadas no momento da oviposição buscam no solo ambiente úmido e protegidos de radiação solar, características que também são favoráveis para sobrevivência dos NEPs (SAMISH et al., 2008). Resultados obtidos em estudos que simulam essas condições têm demonstrado que diferentes espécies de

NEPs foram eficazes contra carrapatos (SAMISH et al., 1998; SAMISH et al., 1999; ALEKSEEV et al., 2006).

O tipo de formulação e a forma de aplicação a campo são fatores determinantes para o sucesso na utilização de NEPs (GREWAL & PETERS, 2005). Geralmente as aplicações são feitas com suspensões aquosas por meio de sistemas de irrigação ou pulverizadores (GREWAL et al., 2006), no entanto, a aplicação dos NEPs também pode ser feita através da formulação inseto cadáver (SHAPIRO-ILAN et al., 2003; BRUCK et al., 2005; DEL VALLE et al., 2008). Nessa abordagem, cadáveres de insetos infectados por NEPs são liberados no ambiente e assim que os recursos no interior do inseto sejam exauridos, os juvenis infectantes (JIs) irão abandonar o cadáver para buscar novos hospedeiros no solo, fazendo assim o controle da praga alvo (DOLISNKI, 2006). Estudos têm demonstrado que NEPs aplicados com essa metodologia apresentam maior capacidade dispersiva e maiores níveis de infectividade e sobrevivência no solo. Tais fatores contribuem para eficácia no controle do artrópode alvo, aumentando a chance dos JIs localizarem e infectarem o hospedeiro (SHAPIRO & GLAZER, 1996; SHAPIRO & LEWIS, 1999; PEREZ et al., 2003; DEL VALLE, 2008). No Brasil, a aplicação de NEPs em formulação inseto cadáver tem sido feita em plantações de goiaba no município de Cachoeira de Macacu, RJ, sendo obtido bons resultados para controle do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (DOLISNKI et al., 2012).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a patogenicidade de um novo isolado de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 (Rhabditida: Heterorhabditidae) em condições de laboratório, além de avaliar o potencial de quatro isolados do gênero *Heterorhabditis* em formulação inseto cadáver para o controle de *R. microplus* por meio de testes em condições semi-naturais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e isolados de nematoides

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Parasitologia e instalações externas da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Cepa sensível Porto Alegre “POA”), obtidas através de infestações artificiais em bezerros, no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil (registro CEUA-EGL 11/2013) (Anexo E). Os nematoides utilizados foram cedidos pela pesquisadora Claudia Dolisnki, do laboratório de Nematologia da Universidade Federal Norte Fluminense Darcy Ribeiro, RJ, Brasil. Esses isolados foram mantidos no banco de NEPs do laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite através de multiplicação *in vivo* em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepdoptera: Pyralidae) e *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) (LINDEGREN et al. 1993; KAYA & STOCK, 1997) (Anexo C). Os JIs coletados foram estocados em garrafas de cultivo celular e armazenados em câmara climatizada a 18°C.

2.2 Quantificação das suspensões contendo nematoides

Para quantificação das suspensões contendo os NEPs utilizadas no experimento I, foi feita contagem de 10 alíquotas de 10 µL obtidas a partir de 20 mL de suspensão aquosa de estocadas em garrafa de cultivo celular (40 mL) por menos de 15 dias em câmara climatizada

($18\pm 1^\circ\text{C}$). Em seguida foi calculada a média de juvenis infectante (JIs) por amostra e a partir desta média, as suspensões foram ajustadas para concentração desejadas.

2.3 Preparação dos cadáveres infectados com NEPs

Para produção de insetos cadáveres infectados por NEPs, lagartas de *G. mellonella* (em grupos de 10) com peso médio de 250 ± 41.1 mg, foram colocadas em placas de Petri (9 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro. Na sequência, foram adicionados 2 mL de suspensão aquosa contendo nematoides (100 JIs/mL) de cada espécie a ser testada. Em seguida, as placas foram fechadas, vedadas com parafilme e mantidas por três dias em câmara climatizada a $27\pm 1^\circ\text{C}$. As lagartas mortas e com sinais de infecção (coloração avermelhada para infecção com NEPs do gênero *Heterorhabditis*) foram transferidas para placas de Petri (9 cm) forradas com papel de filtro, isento da adição de água (câmara seca), permanecendo acondicionada em câmara climatizada (25°C) por período adicional de quatro dias (DEL VALLE, 2008). Esse procedimento foi feito separadamente para cada espécie de nematoide.

2.4 Preparação dos vasos contendo mudas de *Brachiaria decumbens*

Três meses antes do início do experimento II, mudas de *Brachiaria decumbens* foram plantadas em vasos de plástico com dimensões de 25 cm de altura e 26 cm de diâmetro. Para o preenchimento dos vasos foram utilizados 20 kg de solo proveniente de áreas de pastagem da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco (Figura 1A e B). Na sequência, aproximadamente seis mudas de *B. decumbens* foram adicionadas em cada vaso (Figura 1C).

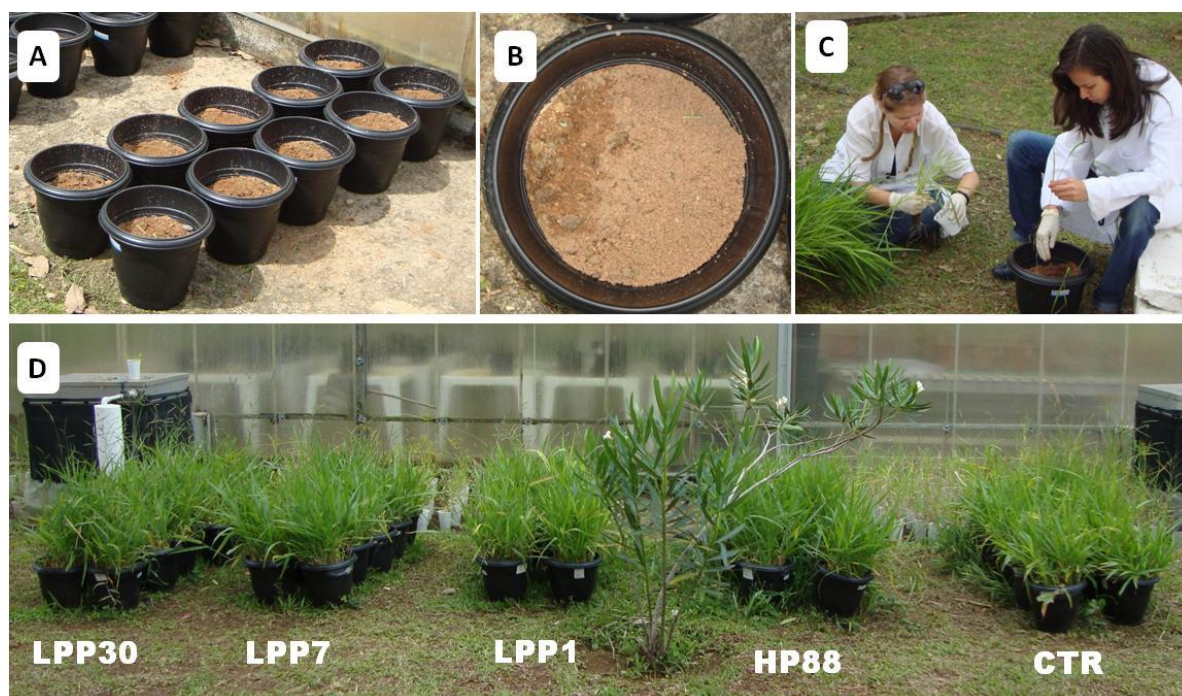


Figura 1. A e B: Vasos preenchidos com solo provenientes de áreas de pastagem da fazenda da Embrapa Gado de Leite, localizada em Coronel Pacheco, MG; C: Mudas de *Brachiaria decumbens* sendo plantadas; D: Grupos com dez vasos referentes a cada tratamento três meses após as mudas terem sido plantadas.

Todos os vasos foram mantidos em área gramada com incidência direta de sol e chuva nas instalações externas da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Juiz de Fora (Figura 1C). Os vasos foram molhados diariamente durante todo o período antes do início do experimento, sendo feita também adubação com uréia para acelerar o crescimento da vegetação. No entanto, 20 dias antes do início do experimento, as adubações com uréia foram interrompidas para evitar resíduos desse composto que é tóxico para *R. microplus* (CUNHA et al., 2010).

2.5 Experimento I – Virulência *in vitro* de *Heterorhabditis bacteriophora* LPP30 de sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Nesse estudo foi utilizado um novo isolado de *H. bacteriophora* denominado LPP30, com intuito de avaliar sua virulência para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições de laboratório. Esse isolado foi obtido a partir de amostras de solo provenientes de uma propriedade localizada no município de Campos dos Goytacazes (MINAS, 2011). Os JIs utilizados no experimento foram obtidos através da multiplicação *in vivo* em larvas de *T. molitor* Linnaeus, 1958.

Para realização do estudo, fêmeas ingurgitadas foram divididas em setes grupos com pesos previamente homogêneos ($p > 0,05$), tendo cada grupo 10 carrapatos. As fêmeas de cada grupo foram acondicionadas individualmente em placas de Petri (6 x 6 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro previamente esterilizados. Na sequência, cada grupo foi tratado com diferentes concentrações de nematoides (75, 150, 300, 600, 1200 e 2400 JIs/fêmea). Para aplicação, foi pipetado em cada placa de Petri 1 mL de suspensão aquosa contendo a concentração estipulada para cada grupo. No grupo controle, foi pipetado 1 mL de água destilada isenta de NEPs.

Após os tratamentos, as placas de Petri de todos os grupos foram vedadas com parafilme durante três dias para permitir que os papéis de filtro permanecessem úmidos, possibilitando a locomoção dos NEPs. Passado esse tempo, foi feita a remoção do parafilme juntamente com as folhas de papel de filtro. Todos os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $80 \pm 10\%$. Após a morte das fêmeas, a postura de cada placa foi coletada e acondicionada em tudo de ensaio com extremidade vedada com algodão hidrófilo e mantidas nas mesmas condições de temperatura citadas anteriormente. Foram coletados os dados referentes ao peso da fêmea antes da oviposição, peso da massa de ovos e percentual de eclosão de larvas. As médias desses valores foram utilizadas para o cálculo de percentual de controle (DRUMMOND et al. 1973).

2.6 Experimento II – Avaliação da eficácia de nematoides entomopatogênicos em formulação isento cadáver para o controle de *Rhipicephalus microplus* em condições semi-naturais

Esse experimento foi realizado entre os dias 18 de janeiro a 09 de fevereiro de 2013. Além do isolado LPP30, também foram utilizados os isolados *H. bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* Poinar, Kranukar & David, 1992 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP1 e *Heterorhabditis baujardi* Phan et al. 2003 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP7.

Uma semana antes do início do experimento (dia -7), quatro cadáveres infectados com cada isolado foram enterrados a cinco centímetros de profundidade em 10 vasos (cada vaso = uma repetição) e no dia zero, cinco fêmeas ingurgitadas foram adicionadas. No grupo controle, cinco fêmeas foram colocadas em vasos isentos de cadáveres infectados com

nematoides (Figura 2A). Os vasos forma vistoriados diariamente para avaliação do número de carrapatos vivos e mortos durante 22 dias (Figura 2B).

Após esse período, as massas de ovos foram recolhidas (Figura 2C e D) e pesadas com utilização de balança analítica. Devido a dificuldade de avaliar a incubação dos ovos em condições semi-naturais, optou-se por avaliar a eficácia dos NEPs apenas pela a redução na quantidade de ovos produzidos, não sendo avaliado a viabilidade (percentual de eclosão). Assim, os valores referentes ao peso da fêmea antes da postura e peso da massa de ovos foram utilizados para o cálculo do índice de inibição de postura (GONÇALVES et al., 2007).



Figura 2. A: Cinco fêmeas ingurgitadas acondicionadas no interior do vaso; B: Vaso sendo vistoriado para quantificação do número de carrapatos vivos e mortos; C e D: Massa de ovos sendo recolhidas.

2.7 Experimento III – Persistência de NEPs em formulação inseto cadáver para o controle de *Rhipicephalus microplus* em condições semi-naturais

Esse experimento foi realizado entre os dias 16 de março e 07 de abril de 2013. Para tanto, cinco fêmeas ingurgitadas foram adicionadas nos vasos correspondentes aos dois tratamentos com melhor eficácia no experimento anterior. Nesses tratamentos não foram feitas novas adições de cadáveres infectados com NEPs e os JIs presentes em cada unidade experimental (vaso) são provenientes dos cadáveres enterrados sete dias antes do início do experimento II, o que corresponde a 65 dias antes desse experimento (experimento III). Também foi formado um grupo controle com fêmeas em vasos isentos de nematoides.

Nesse estudo não foram feitas avaliações diárias do número de fêmeas vivas e mortas em cada tratamento e a massa de ovos foi recolhida 22 dias após o início do experimento (mesmo período do experimento anterior). Foram avaliados os parâmetros, peso das fêmeas antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura.

2.8 Coleta dos dados climatológicos

Os dados climáticos referentes à temperatura, umidade relativa e precipitação total foram cedidos pela professora Cássia de Castro Martins Ferreira do Laboratório de Climatologia e Análise Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora.

2.9 Análise do solo

Uma parcela do solo utilizada para o preenchimento dos vasos foi enviada para o laboratório de análises de solos LTDA, localizado no município de Viçosa, MG, Brasil, para verificação das características físico-químicas.

2.10 Análise estatística

Para realização da análise estatística de todos os experimentos, foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$ e analisados por teste não paramétrico de Kruskal Wallis e Dunn ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

O peso médio das fêmeas antes da postura dos diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si (Tabela 1). Os JIs infectantes de *H. bacteriophora* LPP30 em todas as concentrações testadas causaram redução ($p < 0,05$) no peso da massa de ovos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo observados valores entre 13,0 a 0,7 mg, enquanto no controle o peso médio da massa de ovos foi de 143,7 mg. Nenhuma fêmea fez postura no grupo tratado com a concentração de 2400 JIs/fêmea (Tabela 1).

A infecção por *H. bacteriophora* LPP30 também afetou a viabilidade dos ovos produzidos ($p < 0,05$) no tratamento com 75 JIs/fêmea. Os demais tratamentos (150, 300, 600, 1200 JIs/fêmea) não foram incluídos na análise estatística devido ao tamanho reduzido da amostra, visto que apenas duas fêmeas fizeram postura em cada um desses grupos (Tabela 1). Na maior concentração essa análise também não foi realizada devido à ausência de postura. O percentual de controle no tratamento com 75 JIs/fêmea foi de 97%. Nos outros tratamentos

(150, 300, 600, 1200 JIs/fêmea) o percentual de controle foi superior a 99%, atingindo o valor de 100% na concentração de 2400 JIs/fêmea (Tabela 1).

Tabela 1. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas e percentuais de eclosão larval e controle de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* LPP30 em condições de laboratório (27±1°C e UR 80±10%). (Média ± desvio padrão).

Concentração	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão (%)	[†] Percentual de controle (%)
Controle	267,7 ^a ±33,3 (10)	143,7 ^a ±21,3 (10)	90,1 ^a ±11,6 (10)	
75	268,4 ^a ±44,9 (10)	13,0 ^b ±28,5 (10)	30,0 ^b ±34,8 (6)	97,2
150	267,5 ^a ±48,3 (10)	2,2 ^{bc} ±7,0 (10)	17,5*±24,7 (2)	99,7
300	267,7 ^a ±42,3 (10)	0,7 ^{bc} ±2,3 (10)	45,0*±63,6 (2)	99,7
600	267,5 ^a ±33,6 (10)	0,8 ^{bc} ±2,5 (10)	38,5*±54,4 (2)	99,7
1200	266,8 ^a ±36,3 (10)	1,6 ^{bc} ±5,1 (10)	90,0*±0,0 (2)	99,1
2400	268,5 ^a ±48,7 (10)	0,0 ^c ±0,0 (10)	...	100,0

Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferenças significativas em nível de 5%.

() – tamanho da amostra.

* - Análise estatística não realizada devido ao tratamento reduzido da amostra.

[†]Calculado segundo Drummond et al. (1973).

No segundo experimento, o solo utilizado para o preenchimento dos vasos apresentou textura arenosa, sendo classificado como franco arenoso, com 12% de argila, 14% silte, 74% de areia.

Entre os dias -7 e dia 0, as médias de temperatura, umidade relativa e precipitação total foram de 20,5±1,4°C, 88,8±5,2% e 11,9±16,7 mm. Durante os 22 dias de avaliação do experimento II, as médias de temperatura, umidade relativa e precipitação total foram de 20,1±1,6°C, 90,0±5,7% e 8,0±8,8 mm.

Nos três primeiros dias de avaliação, a mortalidade das fêmeas ingurgitadas foi inferior a 10% em todos os tratamentos. Com seis dias, o percentual de mortalidade chegou a 42% nos tratamentos com *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7, enquanto para os outros dois isolados foram verificados valores próximos de 20%. Após 12 dias, a mortalidade nos tratamentos com *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7 foi de 90 e 74%, respectivamente, chegando a 100 e 98% após 22 dias. Para os isolados *H. bacteriophora* LPP30 e *H. indica* LPP1, foram observadas taxas de mortalidade máxima de 76% após 22 dias (Figura 3).

No grupo controle, todas as fêmeas realizaram postura (Figura 4A), sendo que após 22 dias, o percentual de mortalidade foi de 6,0%, enquanto nos grupos tratados, muitas fêmeas foram mortas no início, ou antes de começarem a fazer a postura (Figura 4B, C e D).

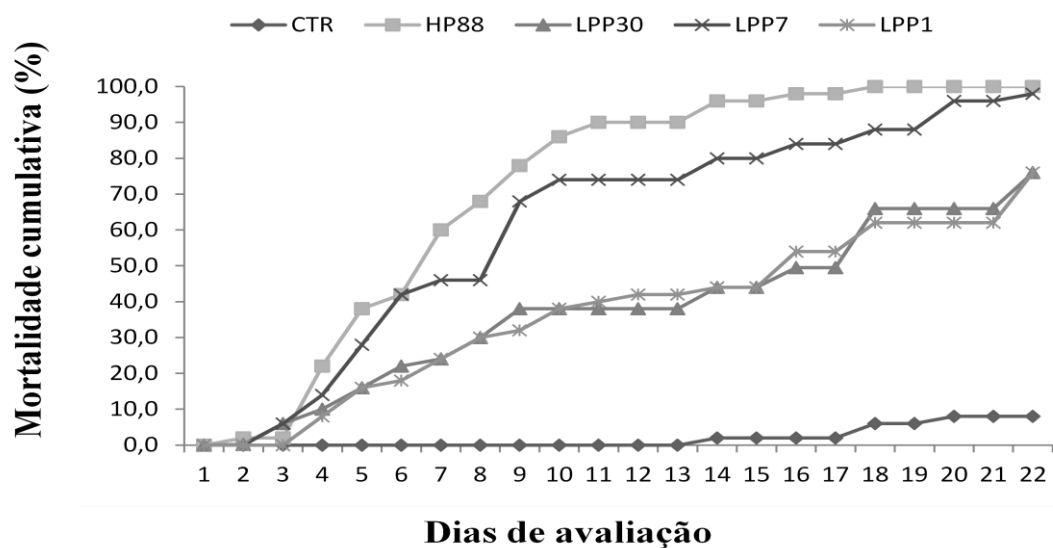


Figura 3. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas aos nematoides *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *H. bacteriophora* LPP30, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP1 aplicados em formulação inseto cadáver em teste simulando semi-naturais.



Figura 4. A: Fêmeas do grupo controle fazendo postura; B: Fêmeas do grupo tratado que chegaram a fazer um pouco de postura antes de morrerem; C: Fêmeas ingurgitadas mortas antes de fazerem a postura; D: Grupo tratado contendo três fêmeas mortas e uma fêmea viva fazendo postura.

Comparação entre os valores do peso das fêmeas antes da postura nos diferentes grupos não revelaram diferenças significativas ($p>0,05$). Ocorreu redução no peso da massa de ovos em todos os tratamentos ($p<0,05$). Nos grupos em que as fêmeas foram expostas aos isolados HP88 e LPP7 a redução foi mais acentuada, sendo verificadas diferenças significativas ($p<0,05$) em relação ao controle e aos demais tratamentos. Os percentuais de inibição de postura dos grupos tratados com os isolados LPP1 e LPP30 foram de 50,2 e 61,2%, respectivamente. Os demais tratamentos resultaram em percentuais de inibição de postura superior 90%, chegando a 97% no grupo tratado com *H. bacteriophora* HP88 (Tabela 2).

Tabela 2. Peso das fêmeas antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas aos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *H. bacteriophora* LPP30, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP1 aplicados em formulação inseto cadáver em teste em condições semi-naturais. (Média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Peso das fêmeas antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	[†] Índice de inibição de postura (%)
Controle	1234,6 ^a \pm 113,9 (10)	392,0 ^a \pm 114,0 (10)	
<i>H. bacteriophora</i> HP88	1215,0 ^a \pm 79,0 (10)	10,9 ^c \pm 14,3 (10)	97,2
<i>H. bacteriophora</i> LPP30	1214,2 ^a \pm 88,4 (10)	149,5 ^b \pm 114,8 (10)	61,2
<i>H. baujardi</i> LPP7	1230,5 ^a \pm 71,2 (10)	31,8 ^c \pm 26,4 (10)	91,9
<i>H. indica</i> LPP1	1217,6 ^a \pm 63,1 (10)	192,4 ^b \pm 115,6 (10)	50,2

Os valores apresentados correspondem à média de cinco fêmeas. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferenças significativas em nível de 5%.

() – Tamanho da amostra.

[†]Calculado segundo GONÇALVES et al. (2007).

No período entre os experimentos II e III, as médias de temperatura, umidade relativa e precipitação total foram de 18,3 \pm 1,9°C; 76,9 \pm 18,9% e 2,2 \pm 5,7 mm. Durante os 22 dias de avaliação do experimento III, as médias de temperatura, umidade relativa e precipitação total foram de 19,3 \pm 2,6°C; 68,9 \pm 27,6% e 5,2 \pm 7,71 mm.

Assim como nos experimentos anteriores, não foram verificadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os valores do peso das fêmeas antes da postura nos diferentes grupos. O peso médio da massa de ovos produzidos pelas fêmeas do grupo controle foi de 267,3 mg, diferindo ($p<0,05$) dos valores obtidos nos tratamentos com *H. bacteriophora* HP88 (110,0 mg) e LPP7 (153, 1 mg). O índice de inibição de postura no tratamento com *H. baujardi* LPP7 foi de 43,1%, enquanto no tratamento com *H. bacteriophora* HP88 o valor foi de 59,1% (Tabela 3).

Tabela 3. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e índice de inibição de postura de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas aos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis baujardi* LPP7 aplicados em formulação inseto cadáver 65 dias antes do experimento. Teste simulando condições naturais. (Média ± desvio padrão).

Tratamentos	Peso das fêmeas antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Índice de inibição de postura (%)
Controle	1182,2 ^a ±41,6 (10)	267,3 ^a ±109,0 (10)	
<i>H. bacteriophora</i> HP88	1190,6 ^a ±34,7 (10)	110,0 ^b ±98,8 (10)	59,1
<i>H. baujardi</i> LPP7	1194,7 ^a ±46,4 (10)	153,1 ^b ±113,7 (10)	43,1

Os valores apresentados correspondem à média de cinco fêmeas. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferenças significativas em nível de 5%.

() – Tamanho da amostra.

[†]Calculado segundo GONÇALVES et al. (2007).

4 DISCUSSÃO

Uma série de pesquisas tem sido desenvolvida nos últimos anos com intuito de desenvolver novas tecnologias para o controle do carrapato dos bovinos, e essas investigações tem sido impulsionadas pela importância econômica que essa espécie desperta, pelos problemas de resistência às bases químicas disponíveis para seu controle e pela necessidade do desenvolvimento de métodos de manejo que sejam mais seguros e menos agressivas ao ambiente (MONTEIRO et al., 2010; CUNHA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012; FERNADES et al., 2012; PARIZI et al., 2012). Estudos feitos na última década tem apontado que NEPs são promissores agentes para serem utilizados no controle de *R. microplus*, isso devido ao elevado grau de virulência que esses organismos apresentam para fêmeas ingurgitadas em testes *in vitro* (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; REIS-MENINE et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012; SILVA et al., 2012). O conjunto de resultados do presente estudo reforça tal fato, demonstrando o potencial dos NEPs para esse fim, em testes simulando condições naturais.

No primeiro experimento, todas as concentrações de *H. bacteriophora* LPP30 causaram elevada redução no potencial biótico de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, diminuindo a quantidade e a viabilidade dos ovos produzidos, sendo observado percentual de controle superior a 90% a partir da menor concentração (75 JIs/fêmea). Esses resultados são equivalentes aos obtidos com a utilização de *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1, que até o momento são apontados como os isolados mais promissores para o controle do carrapato dos bovinos com base nos testes *in vitro* (MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Assim, devido aos resultados do primeiro experimento, optou-se por utilizar *H. bacteriophora* LPP30 no experimento em condições semi-naturais.

Nos experimentos II e III o solo utilizado para preenchimento dos vasos foi classificado como franco arenoso, apresentando predomínio da fração areia (74%), característica favorável para locomoção e sobrevivência da maioria das espécies de NEPs. Tal característica também permite maior difusão de voláteis emitidos por artrópodes hospedeiros, facilitando que esses sejam localizados pelos JIs (KAYA, 1990, BARBECHECK & KAYA,

1991; SHAPIRO-ILAN et al., 2006; DOLISNKI et al., 2010). Dessa forma, podemos inferir que o tipo de solo utilizado não apresentou efeito negativo sobre a ação dos isolados testados.

No segundo experimento, foi verificado que *H. bacteriophora* HP88 apresentou melhor desempenho, sendo observado índice de inibição de postura de 97% e percentual de mortalidade de 100% após 18 dias. O resultado obtido em condições semi-naturais com a utilização desse isolado confirma o potencial promissor observado anteriormente em testes em laboratório (MONTEIRO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012). *H. bacteriophora* HP88 também tem sido apontado como um dos isolados mais virulentos para outras espécies de carrapatos. Em laboratório seu alto grau de virulência já foi demonstrado para *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821) (Acari: Ixodidae) (SAMISH & GLAZER, 1992), *Ixodes scapularis* (Say, 1821) (Acari: Ixodidae) (HILL, 1998); *Amblyomma variegatum* Fabricius, 1794 (Acari: Ixodidae), *Rhipicephalus decoloratus* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) (KAAYA et al., 2000), *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) (MONTEIRO et al., 2013) e *Argas persicus* (Oken, 1818) (Acari: Argasidae) (HASSANAIN et al., 1999). Em testes simulando condições naturais em casa de vegetação, Samish et al. (1999) avaliaram a mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. annulatus* mantidas em vasos preenchidos com solo arenoso. Esses autores verificaram que *H. bacteriophora* HP88 (50 JIs/cm²) foi o terceiro isolado mais virulento entre os 9 testados, causando mortalidade de 82% após 14 dias. Em teste similar o mesmo foi verificado por Alekseev et al. (2006), sendo observado mortalidade próxima de 70% para fêmeas ingurgitadas de *R. annulatus* após três dias.

Heterorhabditis baujardi LPP7 também apresentou bom desempenho, resultando em inibição de postura de 91% e percentual de mortalidade de 98% (após 22 dias), sendo o segundo isolado mais eficiente entre os quatro testados. A patogenicidade de *H. baujardi* LPP7 para fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos já tinha sido anteriormente demonstrada em testes *in vitro* (MACHADO, 2008). Entretanto, o primeiro teste *in vivo* utilizando esse isolado para controle de *R. microplus*, foi feito com aplicação de suspensão aquosa sobre animais infestados, tendo como foco, atingir as fêmeas em fase final de ingurgitamento. No entanto, tal estratégia não apresentou resultado satisfatório, uma vez que as fêmeas recuperadas após o desprendimento dos bovinos não estavam infectadas por *H. baujardi* LPP7 (CARVALHO, 2008). A diferença encontrada nos resultados utilizando o mesmo isolado indica que a melhor forma de utilização de NEPs no controle de carrapatos seja através do investimento em formas de aplicação na pastagem.

Ainda sobre *H. baujardi* LPP7, cabe destacar que sua aplicação em formulação inseto cadáver vem sendo utilizado com sucesso no Brasil por produtores de goiaba de uma cooperativa localizada no município de Cachoeira de Macacu, RJ, para o controle de *C. psidii* (gorgulho da goiaba). Tal iniciativa tem sido feita em parceria com pesquisadores da Universidade Federal Norte Fluminense e tem propiciado redução na densidade populacional da praga, redução no custo de produção e aumento de produtividade (DOLINSKI et al., 2012).

O alto grau de virulência obtido em testes em *in vitro* com a utilização de *H. bacteriophora* LPP30 (presente estudo) e *H. indica* LPP1 (SILVA et al., 2012) não foram repetidos no teste em condições semi-naturais, sendo observados índices de inibição de postura de 60 e 51%, respectivamente, e mortalidade de 78% (após 22 dias). Avaliações na eficácia de NEPs contra carrapatos em testes *in vitro* (em placa de *petri*) e *in vivo* (vasos) utilizando os mesmos isolados muitas vezes tem apresentado resultados consideravelmente diferentes (SAMISH et al. 2008). Essas diferenças provavelmente estão relacionadas com fatores abióticos como incidência de radiação ultravioleta, textura, umidade e temperatura do solo, e o efeito que essas variáveis podem exercer sobre a biologia e comportamento dos JIs, interferindo diretamente na relação nematoide/carrapato em condições naturais (SAMISH et al. 2008).

A temperatura do solo exerce importante influência sobre a atividade de NEPs (KAYA, 1990), sendo que temperaturas ótimas para a infecção e reprodução variam de acordo com a espécie e isolado (GREWAL et al., 1994). No presente estudo, a menor eficácia dos isolados *H. bacteriophora* LPP30 e *H. indica* LPP1 em condições semi-naturais pode estar relacionada com a temperatura verificada durante o desenvolvimento do segundo experimento, que foi em média de 20°C (temperatura ambiente). Embora a temperatura do solo não tenha sido aferida, estudos têm demonstrado que solos com cobertura vegetal apresentam temperaturas levemente inferiores ao observado no ambiente (OLIVEIRA et al. 2005). Assim, a média de temperatura do solo nesse período provavelmente foi inferior de 20°C, enquanto nos experimentos *in vitro*, os grupos experimentais são mantidos em câmara climatizada a 27°C. Dessa forma, essas diferenças de temperatura podem ter tido influência negativa na eficiência desses isolados. MINAS (2011) estudando o efeito de diferentes temperaturas sobre a virulência de LPP30 para larvas de *C. psidii*, verificou que esse isolado apresentou melhor desempenho em temperaturas entre 28-32°C, sendo que temperaturas a baixo de 20°C reduziram significativamente sua eficiência. Resultados similares foram obtidos com a utilização de *H. indica* HOM1 contra *Conotrachelus nenuphar* (Herbst 1797) (Coleoptera: Curculionidae) (SHAPIRO-ILLAN et al. 2011).

A umidade do solo também é um fator importante para NEPS, podendo interferir na locomoção, sobrevivência e persistência dos JIs, e assim como mencionado anteriormente para temperatura, o intervalo ótimo de umidade varia de acordo com a espécie e isolado (SHAPIRO et al. 2006; ARUN & LALRAMLIANA, 2012). Dessa forma, a melhor eficácia de HP88 e LPP7 em relação a LPP30 e LPP1 também pode ter sido influenciada por essa variável. Entretanto, os valores referentes a umidade do solo não foram aferidos, impossibilitando relacionar a eficácia dos isolados testados com as taxas de umidade, sendo necessário a realização de estudos futuros para obtenção de tais respostas.

A eficácia de *H. bacteriophora* LPP30 também pode estar relacionada ao método de aplicação. MINAS (2011) avaliando diferentes métodos de aplicação de JIs de *H. bacteriophora* LPP30 para o controle de *C. psidii*, verificou que a aplicação em suspensão aquosa apresentou eficácia superior a aplicação em formulação inseto cadáver. Embora a maioria dos estudos tenha demonstrado vantagens sobre a persistência, dispersão e infectividade de JIs aplicados em formulação inseto cadáver (SHAPIRO & GLAZER, 1996; SHAPIRO & LEWIS, 1999; PEREZ et al., 2003; DEL VALLE, 2008), tais vantagens podem não serem observadas para todos isolados. Assim, torna-se pertinente a avaliação da eficácia dos isolados LPP30 e LPP1 utilizando outros métodos de aplicação, através da aspersão de suspensões aquosas de JIs.

No terceiro experimento foi possível verificar a permanência de JIs ativos nos tratamentos com *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7 após 65 dias. No entanto, a eficácia nesses tratamentos foi reduzida, sendo observados índices de inibição de postura de 59 e 43%. Resultados similares foram obtidos por Del Valle et al. (2008) através da avaliação de persistência de JIs de *H. baujardi* LPP7 por meio da recuperação de lagartas de *G. mellonella* infectadas. Tais autores observaram a redução significativa no número de lagartas infectadas a partir de oitos semanas de avaliação, demonstrando queda na eficácia de *H. baujardi* LPP7 após 56 dias. A queda na eficiência se deve provavelmente redução nas reservas energéticas dos NEPs. OS JIs enquanto estão no solo não se alimentam, apresentando grande quantidade de reservas lipídicas que permitir a manutenção das atividades metabólicas (PATEL & WRIGHT, 1997; GLAZER, 2002) e a redução dessas reservas afeta a viabilidade desses nematoides.

Mesmo sendo observada queda na eficácia dos NEPs no terceiro experimento, para métodos de controle biológico, os resultados obtidos principalmente no tratamento com isolado HP88 (59%) podem ser considerados satisfatórios. Isso por que a repetição desses

valores em condições de campo representa a redução de milhares de carrapatos nas próximas gerações.

Assim, é possível concluir que o isolado LPP30 foi altamente virulento em condições de laboratório e que em condições semi-naturais, os isolados HP88 e LPP7 aplicados em formulação inseto cadáver apresentaram melhor eficácia, sendo as espécies mais indicadas para testes a campo. Além disso, foi possível verificar que esses nematoides permaneceram ativos após 65 dias da aplicação no solo, apresentando ainda boa eficácia.

5 REFERÊNCIAS

- ALEKSEEV, E.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. **BioControl**. v. 51, p. 507-518, 2006.
- AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; 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.
- BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Effect of host condition and soil texture on host finding by entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Environmental Entomology**. v. 20, p. 582-589, 1991.
- BRUCK, D.J.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E. Evaluation of application technologies of entomopathogenic nematodes for control of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*. **Journal of Economy Entomology**. v. 98, p. 1884–1889, 2005.
- CARVALHO, L.B. 2008. Efeitos “in vitro” e “in vivo” de nematoides entomopatogenicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). 2008. 52p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- CUNHA, A.P.; BELLO, A.C.P.; DOMINGUES, L.N.; MARTINS, J. R.; OLIVEIRA, P.R.; FREITAS, C.M.V.; BASTIANETTO, E.; SILVA, M.X.; LEITE, R. C. Effects of ureia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 174, p. 300-304, 2010.
- DEL VALLE, E.E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E.L.S.; SOUZA, R.M., SAMUEL, R.I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria Mellonella* (Lepdoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera, Curculionidae) Larvae. **Biological Control Science Technology**. v.18, p. 33-41, 2008.
- DOLINSKI, C. Uso de entomopathogenic nematodes para o controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JR, T.J.; PALLINI, A. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças**, Viçosa, UFV. 2006. p. 261-289.
- DOLINSKI, C.; PINTO, C.C.S.; ROBAINA, R.R; BELLINII, L.L. Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do nematoide entomopatogenicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**. v. 34, p. 123-128, 2010.
- DOLINSKI, C.; CHOO, H.Y.; DUCAN, L.W. Grower acceptance of entomopathogenic nematodes: Case studies on three continents. **Journal of Nematology**. v. 44, p. 226-235, 2012.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, p. 30–133, 1973.

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

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL strain (*Steinernema*: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 23, p. 53–56, 2004.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Org.). Carrapatos: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005. p. 9-20.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 27, p. 53–56, 2007.

GREWAL, P.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**. v. 19, p. 245-253, 1994.

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

GONÇALVES, K., TOIGO, E., ASCOLI, B., VON POSER, G., RIBEIRO, V. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**. v. 100, p. 1267–1270, 2007.

HASSANAIN, M. A., DERBALA, A. A., ABDEL-BARRY, N. A., EL-SHERIF, M. A. & EL-SADAWY, H. A. E. Biological control of ticks (*Argasidae*) by entomopathogenic nematodes. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 7, p. 41–46, 1999.

HILL, D. E. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**. v. 84, p. 1124–1127, 1998.

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

KAYA, H.K. Soil Ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (ed). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, CRC Press. 1990. p. 93-115.

KAYA, H.K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic, CA. 1997. p. 281–324.

KLAFKE, G.M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET. 2008. p. 81–105.

LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti DMB, Arzua M, Bechara GH (eds) Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan. 2006. p. 155–164.

LABRUNA, M.B. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET. 2008a. p. 15–56.

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

MACHADO, I.R. 2008. Potencial dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP4 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. 2006. Controle de carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; ARZUA, M.; BRECHARA, G.H. (Eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan. 2006. p. 145–153.

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

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

MONTEIRO, C.M.O.; MATOS, R.S.; ARAUJO, L.X.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DOLINSKI, C.; PRATA, M.C.A. First report of pathogenicity of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* on partially engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. 2013. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.11.003.

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

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (eds) ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET. 2008. p.15–56.

PEREZ, E.E.; LEWIS, E.E.; SHAPIRO-ILAN, D.I. Impact of host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under desiccating conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 82, p. 111–118, 2003.

REIS-MENINI, C.M.R.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; SILVA, E.R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 103, p. 1391-1396, 2008.

SAMISH, M. & GLAZER, I. (1992). Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Arachnida, Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 29, 614–618.

SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.A.; GLAZER, I. The effect of soil composition on anti-tick activity of entomopathogenic nematodes. **Annals of the New York Academy of Science** 849, 402–403, 1998.

SAMISH, M., ALEKSEEV, E.A.; GLAZER, I. Efficacy of entomopathogenic nematode strains against engorged *Boophilus annulatus* females (Acari: Ixodidae) under simulated field conditions. **Journal of Medical Entomology**. 36, 727–732, 1999.

SAMISH, M. 2000. Biocontrol of ticks. **Annals of New York Academy of Sciences**. v. 916, p. 172-178, 2000.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (Eds). **Ticks: Biology, Disease and Control**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. p. 447–469.

SHAPIRO, D.I.; GLAZER, I. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. **Environment Entomology**. v. 25, p. 1455–1461, 1996.

SHAPIRO, D.I.; LEWIS, E.E. Comparison of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. **Environment Entomology**. v. 28, p. 907–911, 1999.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; LEWIS, E.E.; TEDDERS, W.L., SON, Y. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. **Journal Invertebrate Pathology**. 83, 270–272, 2003.

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

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 62, p. 140-143, 2012.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 94, p. 201–206, 2004.

WALKER, A.R.; BOUARTTOUR, A.; CAMICAS, J.L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; PRESTON, P. **Ticks of Domestic Animals in Africa. A Guide to identification of Species**. Edinburgh. University of Edinburgh, 2003. p.

CAPÍTULO IV

ASSOCIAÇÃO ENTRE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E CARRAPATICIDAS PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1 com deltametrina, amitraz e clorfenvinfós sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Foram utilizadas duas populações distintas de *R. microplus*, uma para o experimento com *H. bacteriophora* HP88 e outra para o experimento com *H. indica* LPP1. Fêmeas ingurgitadas foram divididas em grupos contendo 10 carrapatos com pesos previamente homogêneos ($p>0,05$). Nos grupos tratados apenas com os carrapaticidas, as fêmeas foram imersas por cinco minutos em cada produto e na sequência, colocadas individualmente em placas de Petri (6x6 cm). Nos grupos tratados com nematoides, foi pipetado 1 mL de suspensão contendo 150 NEPs/fêmea. Nos tratamentos com nematoides associados aos carrapaticidas, as fêmeas foram imersas nos produtos e depois transferidas para placa de Petri para aplicação dos nematoides. Foram avaliados os parâmetros peso das fêmeas antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão de larvas e percentual de controle. Nas duas populações, a deltametrina não causou redução significativa ($p>0,05$) no peso da massa de ovos, sendo observado o mesmo para deltametrina e amitraz em relação ao percentual de eclosão. Os outros tratamentos reduziram significativamente ($p<0,05$) o peso da massa de ovos e o percentual de eclosão. Os tratamentos apenas com os carrapaticidas resultaram em percentual de controle inferior a 70%, com exceção do grupo tratado com clorfenvinfós no segundo experimento (84,3%). Todos os grupos tratados com nematoides associado ou não aos carrapaticidas, apresentaram percentual de controle superior a 90%, exceto no grupo tratado com *H. bacteriophora* HP88 e deltametrina. O percentual de controle chegou a 100% no tratamento com LPP1 + amitraz. Conclui-se que os NEPs nas concentrações testadas foram compatíveis com os carrapaticidas compostos por deltametrina, amitraz e clorfenvinfós, entretanto, o efeito aditivo da associação esta relacionado com o perfil de resistência da população de carrapato.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, piretroide, amidínico, organofosforado, controle biológico.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the effect of the association of *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and *Heterorhabditis indica* LPP1 with deltamethrin, amitraz and chlorphenvinphos on engorged females of *Rhipicephalus microplus*. The females were divided into groups containing 10 each ticks each, with previously homogenized weights ($p>0.05$). In the groups treated only with the acaricides, the females were immersed for five minutes in each product and then were placed individually in Petri dishes (6x6 cm). In the groups treated only with nematodes, 1 mL of a suspension containing 150 EPNs/female was pipetted on each tick. In the treatments with nematodes in combination with the acaricides, the females were immersed in the products and then transferred to the Petri dishes for application of the nematodes. The parameters evaluated were female weight before oviposition, egg mass weight, hatching percentage of larvae and percentage of control. In the two populations, deltamethrin did not cause a significant reduction ($p>0.05$) in the egg mass weight, and the same was observed for deltamethrin and amitraz in relation to hatching percentage of larvae. The other treatments significantly reduced ($p<0.05$) the egg mass weight and hatching percentage of larvae. The treatments with the acaricides alone resulted in a control percentage lower than 70%, except in the group treated with chlorphenvinphos in the second experiment (84.3%). The control percentage was greater than 90% in all the groups treated with nematodes associated or not with the acaricides, and reached 100% in the treatment with LPP1 + amitraz. It can be concluded that the EPNs at the concentrations tested were compatible with the acaricides composed of deltamethrin, amitraz and chlorphenvinphos.

Key word: Cattle tick, pyrethroid, formamidine, organophosphate, biological control

1 INTRODUÇÃO

Na região Neotropical, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) conhecido popularmente como carrapato dos bovinos, é a espécie que desperta maior interesse econômico, centralizando a atenção de indústrias de carrapaticidas, órgãos governamentais e instituições de pesquisa (MARTINS et al., 2006). Além dos prejuízos diretos causados pela espoliação sanguínea, este artrópode também é responsável por prejuízos indiretos causados pela transmissão de agentes patogênicos e gastos com a aquisição de medicamentos e mão de obra especializada para tratamento dos animais (GUIMARÃES et al., 2001; FURLONG et al., 2004). Estima-se que no Brasil, os prejuízos econômicos gerados por este carrapato cheguem a dois bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2002).

A utilização de carrapaticidas organossintéticos é a principal forma de controle desse ixodídeo; entretanto, a administração sistemática e em muitas vezes de forma inapropriada devido a falta de conhecimento dos produtores (AMARAL et al., 2011a,b), vem resultando na seleção de carrapatos resistentes (FURLONG et al., 2007; LABRUNA, 2008), gerando a necessidade de busca por novas alternativas para o manejo desse carrapato. Entre essas, podemos citar estudos sobre métodos de controle biológico com a utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs) (VASCONCELOS et al., 2004; MONTERIO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Esses nematoides pertencem às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae e atuam como veículos de bactérias altamente patogênicas que introduzidas na hemocele de insetos, provocam rápida septicemia, levando-os a morte (GREWAL et al., 2001; HAZIR et al., 2003). Sabe-se que diferentes espécies desses NEPs apresentam patogenicidade para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Os juvenis infectantes (JIs) destes nematoides são tolerantes à exposições a fertilizantes, herbicidas, fungicidas, inseticidas e acaricidas, porém, esta tolerância varia de acordo com a espécie de nematoide, tempo de exposição ao químico, princípio ativo e inertes e adjuvantes utilizados (GREWAL et al., 2001; KOPPENHÖFER & GREWAL, 2005). Além da tolerância, trabalhos demonstram que o uso de NEPs associados a determinado inseticida podem apresentar efeito sinérgico ou aditivo no controle da praga alvo (KOPPENHÖFER et al., 2002; KOPPENHÖFER & GREWAL, 2005).

Na área veterinária, poucas pesquisas têm sido conduzidas no sentido de verificar o efeito da associação de produtos químicos com entomopatógenos com potencial para controle de parasitos (BARCI et al., 2006) e a maior parte dos estudos foi feita com intuito de avaliar a compatibilidade de carrapaticidas com fungos entomopatogênicos (BAHIENSE & BITTENCOURT, 2004; BAHIANSE et al., 2006; BAHIANSE et al., 2008; SUN et al., 2011). Sobre NEPs, o único estudo conduzido nesse sentido, foi realizado por Reis-Menine et al. (2008), que constataram compatibilidade entre um carrapaticida composto pela associação de dois organofosforados e o nematoide *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (Rhabditida: Steinernematidae).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação dos nematoides *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado HP88 e *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1982 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP1 com os carrapaticidas compostos pelos princípios ativos deltametrina, amitraz e clorfenvinfós sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, nematoides entomopatogênicos e carrapaticidas

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do primeiro experimento, foram utilizados carrapatos coletados de bovinos naturalmente infestados em propriedade localizada no município de Edéia, Goiás, Brasil (população 1), enquanto para o segundo experimento, foram utilizados carrapatos provenientes de propriedade rural do município de Pato de Minas, Minas Gerais, Brasil (população 2) (Anexo F). Optou-se por utilizar carrapatos de cepas de campo ao invés de utilizar carrapatos de uma cepa de referência, sabidamente sensível aos carrapaticidas. Essa escolha foi feita com intuito de investigar a associação dos NEPs com os carrapaticidas, tendo como alvo, carrapatos com diferentes graus de sensibilidade a esses produtos, a fim de averiguar quais interações podem ocorrer nessas associações, caso a população estudada seja pouco, médio ou totalmente sensível aos diferentes princípios ativos.

Os nematoides *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram cedidos pelo laboratório de Nematologia da Universidade Federal Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e mantidos no banco de NEPs do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite. A manutenção dos isolados foi feita através de multiplicação *in vivo* em lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepdoptera: Pyralidae) (LINDEGREN et al., 1993; KAYA & STOCK, 1997) (Anexo A e C). Foram utilizados os carrapaticidas compostos pelos princípios ativos deltrametrina (Butox P®, Intervet), amitraz (Triatox®, Coopers), clorfenvinfós (UBC®, Uzinias Químicas Brasileiras) (Tabela 1).

2.2 Preparação das suspensões com nematoides

Foi feita contagem de 10 alíquotas de 10 µL obtidas a partir de 20 mL de suspensão aquosa de nematoides estocadas em garrafa de cultivo celular de 40 mL por menos de 15 dias em câmara climatizada (18±1°C). Em seguida, foi calculada a média de juvenis infectante (JIs) por amostra e a partir desta média, as suspensões foram ajustadas para concentração de 150 JIs/mL.

2.3 Preparação das soluções carrapaticidas

Os carrapaticidas foram diluídos de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes. Para diluição dos produtos, 0,5 mL dos carrapaticidas foi pipetado em balão volumétrico contendo 500, 250 e 500 mL de água destilada, para obtenção da concentração comercial dos carrapaticidas a base dos princípios ativos deltametrina (Butox P®, Intervet), amitraz (Triatox®, Coopers), clorfenvinfós (Carrapaticida e Sarnicida UBC®, Uzinias Químicas Brasileiras) (Tabela 1).

Tabela 1. Carrapaticidas utilizados no teste de compatibilidade com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1.

Nome comercial	Empresa	Grupo químico	Princípio ativo	Fórmula
Butox P [®]	Intervet	Piretroide	Deltametrina	100 mL – 5,0g
Triatox [®]	Coopers	Amidínico	Amitraz	100 mL – 12,5 g
Carrapaticida e sarnicida UCB [®]	Uzinas Químicas Brasileiras	Organofosforado	Clorfenvinfós	100 mL – 50,0g

2.4 Experimento I – Efeito da associação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 com carrapaticidas sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Nesse experimento foram utilizados carrapatos provenientes do município de Edéia, Goiás, Brasil (população 1). Fêmeas ingurgitadas com pesos previamente homogêneos ($p > 0,05$) foram divididas em oito grupos contendo 10 carrapatos (cada fêmea = unidade experimental) (Figura 1A). No grupo tratado apenas com *H. bacteriophora* HP88, cada fêmea foi pesada (Figura 1B) e colocada em uma placa de Petri (6x6 cm) previamente forrada com duas folhas de papel de filtro e na sequência foi pipetado 1,0 mL de suspensão contendo 150 JIs (Figura 1C). Nos grupos tratados com os carrapaticidas, as fêmeas foram imersas por cinco minutos em solução com a concentração comercial de cada produto (Figura 1C), sendo em seguida colocadas sobre duas folhas de papel toalha para absorção do excesso do líquido. Após essa etapa, cada fêmea foi pesada (Figura 1B) e acondicionada em uma placa de Petri (6x6 cm) forrada com duas folhas de papel de filtro molhado com 1,0 mL de água destilada. Nos grupos tratados com a associação *H. bacteriophora* HP88 + carrapaticidas, as fêmeas foram imersas nas soluções e após cinco minutos, foram transferidas para placas de Petri. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de suspensão aquosa contendo 150 JIs. No grupo controle, as fêmeas foram imersas por cinco minutos em água destilada e em seguida, pesadas e colocadas individualmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel filtro. Para cada tratamento foram feitas dez repetições.

As placas de Petri de todos os grupos ficaram vedadas com parafilme por três dias para permitir que os papéis de filtro permanecessem úmidos, permitindo a locomoção dos JIs. Passado esse tempo, foi feita a remoção do parafilme juntamente com as folhas de papel filtro. Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ UR) e a coleta de postura foi feita diariamente até a morte do último carrapato. As massas de ovos de cada fêmea foram acondicionadas em tubo de ensaio de 10 mL devidamente identificados, vedados com algodão hidrófilo e mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão de larvas. A partir desses valores foi feito o cálculo de percentual de controle (DRUMMOND et al., 1973) (Anexo H).

2.5 Experimento II – Efeito da associação de *H. indica* LPP1 com carrapaticidas sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

Nesse experimento, foi seguida a mesma metodologia do experimento anterior, entretanto, foi utilizado o nematoide *H. indica* LPP1 e carrapatos provenientes da população de Pato de Minas, Minas Gerais, Brasil (população 2).

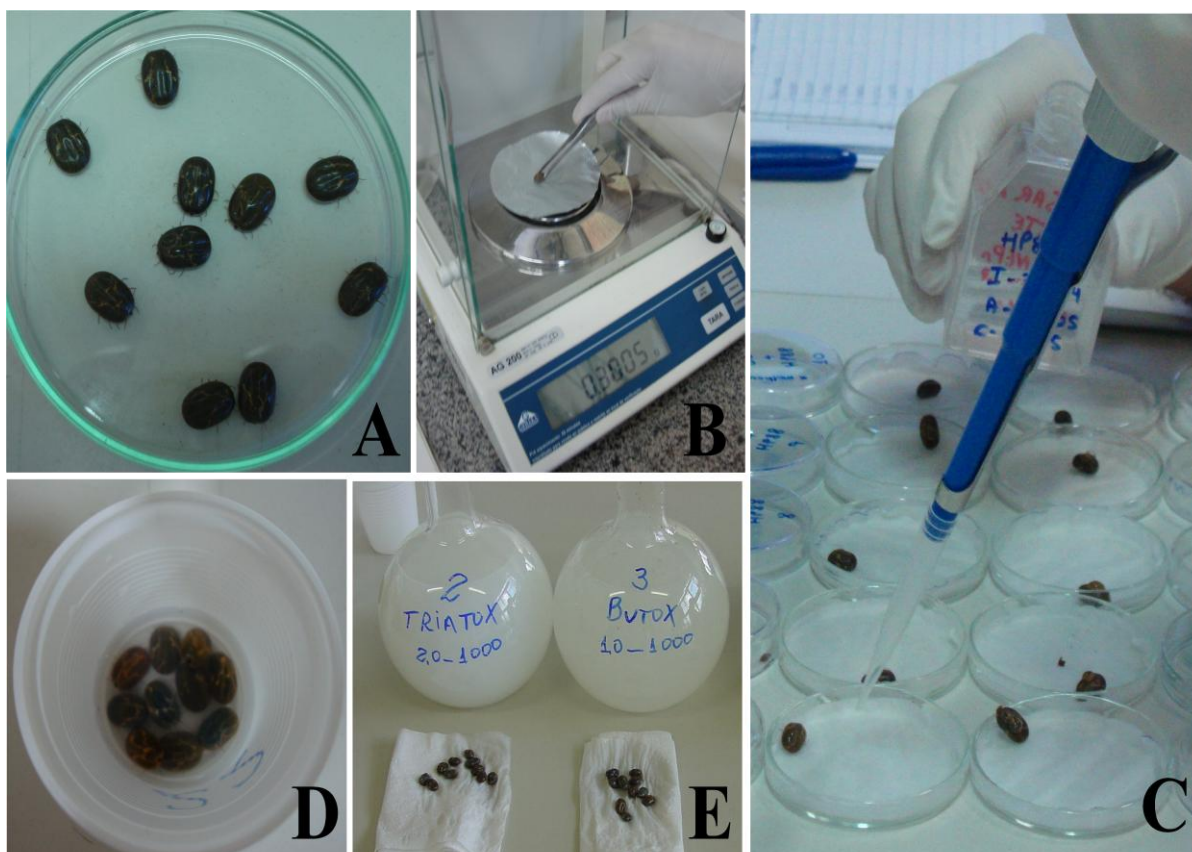


Figura 1. A: Grupo com dez fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; B: Fêmea ingurgitada sendo pesada; C: Adição de 150 JIs por placa de Petri; D: Fêmeas ingurgitadas imersas em solução carrapaticida; E: fêmeas sobre folhas de papel toalha para retirada o excesso do carrapaticida.

2.6 Análise estatística

Para realização da análise estatística de todos os experimentos, foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. As médias dos diferentes parâmetros foram comparadas por teste não paramétrico de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

No primeiro experimento conduzido com carrapatos da população 1, os valores do peso das fêmeas antes da postura foram estatisticamente iguais ($p>0,05$). O peso da massa de ovos do grupo tratado com deltametrina foi de 123,4 mg, não apresentando diferenças significativas ($p>0,05$) em relação ao controle (122,3 mg). Os tratamentos com amitraz, clorfenvinfós, *H. bacteriophora* HP88 e *H. bacteriophora* HP88 + deltametrina, levaram a redução significativa ($p<0,05$) no peso da massa de ovos, sendo observados valores de 69,4; 75,5; 20,9 e 35,8 mg, respectivamente.

Tabela 2. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* (população 1) tratados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, na concentração de 150 JIs/fêmea, associados ou não aos princípios ativos carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80\pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão das larvas (%)	Percentual de controle*
Controle	250,1 ^a \pm 36,3 (10)	122,3 ^a \pm 28,0 (10)	95,3 ^a \pm 24,4 (10)	
Deltametrina	251,4 ^a \pm 44,4 (10)	123,4 ^a \pm 40,9 (10)	91,7 ^a \pm 25,3 (10)	3,4
Amitraz	250,9 ^a \pm 46,5 (10)	69,4 ^b \pm 51,1 (10)	90,8 ^a \pm 26,0 (09)	46,0
Clorfenvinfós	249,7 ^a \pm 41,0 (10)	75,5 ^b \pm 56,3 (10)	75,6 ^b \pm 27,4 (10)	50,9
HP88	251,6 ^a \pm 16,5 (10)	20,9 ^{bc} \pm 19,1 (10)	55,0 ^b \pm 19,8 (09)	90,1
HP88 + Deltametrina	251,2 ^a \pm 32,3 (10)	35,8 ^b \pm 34,5 (10)	49,8 ^b \pm 6,4 (10)	84,8
HP88 + Amitraz	250,8 ^a \pm 25,5 (10)	2,2 ^c \pm 3,4 (10)	45,1 ^b \pm 4,5 (05)	99,1
HP88 + Clorfenvinfós	250,9 ^a \pm 27,5 (10)	10,1 ^c \pm 10,8 (10)	32,3 ^c \pm 10,7 (09)	97,2

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente a nível de 5%.

() – Tamanho da amostra. *Calculado segundo Drummond et al. (1973).

HP88 = *Heterorhabditis bacteriophora*. População 1 – Obtida de Edeia, Goiás, Brasil.

Nos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 associados ao amitraz e ao clorfenvinfós o peso da massa de ovos foi de 2,2 e 10,1 mg, evidenciando redução mais acentuada ($p<0,05$) nesses grupos (Tabela 2).

Os percentuais de eclosão verificados para o grupo controle e para os grupos tratados com deltametrina e amitraz foram de 95,3; 91,7; e 90,8%, respectivamente, não sendo constatadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre esses grupos. Nos demais tratamentos foram observados valores entre 75,6 a 32,3%, significativamente ($p<0,05$) inferiores ao verificado para o controle. No tratamento com *H. bacteriophora* HP88 associado ao

clorfenvinfós, a redução no percentual de eclosão foi mais acentuada (32%), diferindo dos demais tratamentos.

Nos grupos tratados com deltametrina, amitraz e clorfenvinfós, os percentuais de controle foram de 3,4%, 46,0% e 50,9%. No tratamento com *H. bacteriophora* HP88 o percentual de controle foi de 90,1%, chegando a 99,1 e 97,2% nos grupos em que o nematoide foi associado ao amitraz e ao clorfenvinfós, respectivamente. No tratamento com *H. bacteriophora* HP88 associado com deltametrina, foi observado percentual de controle de 84,8%, valor inferior ao observado no tratamento utilizando apenas *H. bacteriophora* HP88 (Tabela 2).

No segundo experimento, em que foram utilizados carrapatos da população 2, também não foram constatadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre o peso médio das fêmeas antes da postura nos diferentes grupos. O peso da massa de ovos do grupo tratado com deltametrina foi de 124,9 mg, sendo estatisticamente semelhante ($p>0,05$) ao valor verificado para o controle (146,5 mg). Os demais tratamentos causaram redução significativa ($p<0,05$) no peso da massa de ovos, sendo observados valores entre 74,7 a 11,2 mg. No grupo tratado com *H. indica* LPP1 associado ao amitraz a redução foi mais acentuada (11,2 mg), não sendo observada postura nesse grupo (Tabela 3).

Tabela 3. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* (população 2) tratados com *Heterorhabditis indica* LPP1, na concentração de 150 JIs/fêmea, associados ou não aos princípios ativos carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80\pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão das larvas (%)	Percentual de controle* (%)
Controle	275,4 ^a \pm 23,7 (10)	146,5 ^a \pm 13,2 (10)	88,0 ^a \pm 12,6 (10)	
Deltametrina	274,1 ^a \pm 31,4 (10)	124,9 ^a \pm 31,6 (10)	52,5 ^{ab} \pm 25,1 (10)	48,9
Amitraz	271,1 ^a \pm 32,1 (10)	74,7 ^b \pm 75,1 (10)	57,5 ^{ab} \pm 32,3 (10)	66,1
Clorfenvinfós	274,2 ^a \pm 32,4 (10)	67,1 ^b \pm 62,6 (10)	30,0 ^{bc} \pm 24,1 (10)	84,3
LPP1	275,8 ^a \pm 29,2 (10)	28,2 ^b \pm 12,8 (10)	34,3 ^{bc} \pm 40,7 (10)	92,5
LPP1 + Deltametrina	276,0 ^a \pm 11,0 (10)	17,0 ^b \pm 8,3 (10)	25,3 ^{bc} \pm 34,1 (10)	96,7
LPP1 + Amitraz	176,8 ^a \pm 39,1 (10)	0,0 ^c \pm 0,0 (10)	...	100,0
LPP1 + Clorfenvinfós	274,1 ^a \pm 34,3 (10)	11,2 ^{bc} \pm 11,0 (10)	16,8 ^c \pm 29,9 (10)	98,5

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente em nível de 5%.

() – Tamanho da amostra. *Calculado segundo Drummond et al. (1973).

LPP1 = *Heterorhabditis indica*.

... – Análise não realizada devido ausência de postura no tratamento.

População 2 – Obtida de Pato de Minas, Minas Gerais, Brasil.

O percentual de eclosão de larvas dos grupos tratados com deltametrina e amitraz foi de 52,5 e 57,5%, sendo estatisticamente semelhante ($p>0,05$) ao controle (88,0%). Nos demais tratamentos, o percentual de eclosão diferiu do controle, sendo observados valores entre 16,8 e 34,3%. O percentual de controle foi de 48,9; 66,1 e 84,3% nos tratamentos com deltametrina, amitraz e clorfenvinfós, respectivamente. Nos demais tratamentos o percentual de controle foi superior a 90%, chegando a 100% no grupo tratado com *H. indica* LPP1 associado ao amitraz (Tabela 3).

4 DISCUSSÃO

O efeito da exposição de NEPs a diferentes produtos químicos utilizados na agricultura e pecuária, como fertilizantes, herbicidas, fungicidas, inseticidas e acaricidas, tem sido avaliado com intuito de estabelecer melhores épocas e formas de aplicação dos NEPs para o controle de pragas em diferentes culturas. A compatibilidade pode ser afetada de acordo com a espécie de nematoide e o princípio ativo do produto químico, podendo haver variação até entre produtos compostos pelo mesmo princípio ativo, mas que apresentam diferentes inertes e adjuvantes na formulação (KRISHNAYYA & GREWAL, 2002). Assim, para cada sistema de produção no qual se pretende utilizar os NEPs, torna-se importante avaliar a compatibilidade dos isolados mais virulentos com os produtos químicos utilizados no manejo desse sistema. No caso do controle de carrapatos, a maior parte das pesquisas tem direcionado a aplicação dos NEPs para as pastagens; assim, torna-se importante verificar se o prévio contato das fêmeas ingurgitadas com os carrapaticidas, através do banho dos animais surtirá algum efeito (aditivo, sinérgico ou antagônico) na infectividade dos NEPs.

Para população 1, os três carrapaticidas utilizados apresentaram baixa eficácia, sendo observados percentuais de controle próximos de 50% para o amitraz e clorfenvinfós, e de 3,4% para deltametrina, evidenciando que essa população apresenta baixa sensibilidade para esses princípios ativos. Para população 2, a eficácia para deltametrina e para o amitraz foram de 48,9 e 66,1%, indicando também baixa sensibilidade; no entanto, para o clorfenvinfós a eficácia foi de 84,3%, o que denota que já existe uma perda de sensibilidade dessa população a esse princípio ativo, mas essa perda ainda não é tão acentuada como observado para o piretróide e o amidínico. A resistência de *R. microplus* a piretróides sintéticos, e organofosforados tem sido amplamente observada em diferentes regiões do mundo (FAO, 2004; KLAFKE, 2008; RODRIGUES-VIVAS et al., 2006a; RODRIGUES-VIVAS et al., 2011; MENDES et al., 2011; ANDREOTTI et al., 2011), sendo que também já existem registros de populações desse ixodídeo resistentes ao amitraz (LI et al., 2004; RODRIGUES-VIVAS et al., 2006b). Os resultados observados para essas duas populações refletem a realidade que tem sido encontrada no Brasil, cuja maioria dos carrapaticidas comercializados no país apresentam baixa eficácia para diferentes populações de campo de *R. microplus* (FURLONG et al., 2007; KLAFKE 2008). A baixa eficácia encontrada reforça a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de controle, com a utilização de agentes biológicos, químicos de origem vegetal e vacinas.

Os isolados *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 na concentração de 150 JIs/fêmea resultaram em eficácia superior 90%, sendo constatada redução considerável na quantidade e viabilidade dos ovos produzidos pelas fêmeas ingurgitadas, fato que também foi observado por Monteiro et al. (2010a) e Silva et al. (2012). Esses autores utilizando a mesma concentração, também verificaram redução na quantidade e viabilidade dos ovos e percentual de controle superior a 90%. Através de comparação entre os resultados de experimentos *in*

vitro, esses dois isolados tem sido apontados por tais autores como os mais virulentos para *R. microplus*, superando a eficácia obtida para NEPs do gênero *Steinernema* (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; MOLINA-OCHOA et al., 2009; CARVALHO et al., 2010) e outros isolados do gênero *Heterorhabditis* (VASCONCELOS et al., 2004; MONTEIRO et al., 2010b).

No grupo tratado com a associação de *H. bacteriophora* HP88 com deltametrina, a eficácia foi inferior ao verificado com a utilização apenas de *H. bacteriophora* HP88. Para penetrarem nas fêmeas ingurgitadas, os JIs ao se locomoverem sobre os carrapatos, entram em contato com o carrapaticida impregnado na cutícula e tal fato pode ter influenciado negativamente a infectividade desse nematoide. Embora a maioria dos estudos que avaliaram o efeito de inseticidas a base de deltametrina sobre NEPs tenham apontado compatibilidade (ROVESTI et al., 1988; ROVESTI & DESEÖ, 1990; NEGRISOLI et al., 2008), é possível observar taxas de sobrevivência e infectividade dos JIs, inferiores aos valores do controle, indicando que mesmo quando compatível, alguns juvenis da amostra avaliada são afetados negativamente. Monteiro et al. (dados não publicados) observaram a compatibilidade de um carrapaticida a base de deltametrina com *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. 2006 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado RSC-5; no entanto, o percentual de sobrevivência dos JIs dessa espécie expostos por 24 h a esse princípio ativo, foi inferior ao valor do controle. Além disso, a exposição dos JIs a deltametrina também retardou a infectividade dos NEPs, sendo necessários cinco dias para que os JIs expostos a deltametrina levassem a morte de 100% das lagartas de *G. mellonella*, enquanto no controle, foi necessário apenas três dias (MONTEIRO et al. 2013). Esse atraso na infectividade após o contato com a deltametrina pode ser o fator responsável pela menor eficácia no tratamento com *H. bacteriophora* HP88 e deltametrina, permitindo que fêmeas ficassem vivas por mais tempo e produzissem maior massa de ovos, reduzindo assim a eficácia do tratamento.

Na população 2, a associação de *H. indica* LPP1 e deltametrina apresentou percentual de controle levemente superior ao verificado com a utilização apenas do nematoide, fato diferente do observado para utilização em conjunto de *H. bacteriophora* HP88 e deltametrina, cuja associação resultou leve queda na eficácia. Essa variação provavelmente está ligada a diferença de sensibilidade das duas populações para deltametrina. No primeiro estudo, a eficácia da deltametrina foi de apenas 3,4%, enquanto no segundo estudo, a eficácia foi de 48,9%. No segundo experimento, mesmo que alguns JIs possam ter sido afetados com a presença de deltametrina sobre as fêmeas, tal fato foi compensado pela atividade que esse princípio ativo apresentou para os carrapatos, deixando as fêmeas mais debilitadas e susceptíveis à infecção pelos JIs de *H. indica* LPP1 não afetados pela deltametrina. Tal hipótese também foi levantada a respeito da associação de NEPs com fungos entomopatogênicos, em que fungos atuariam como um fator de estresse, quebrando a homeostase e debilitando o hospedeiro, que dessa forma, ficaria mais susceptível à infecção por nematoides (ANSARI et al., 2004; MONTEIRO et al., 2013).

As associações de NEPs com amitraz e com o clorfenvinfós foram compatíveis, sendo ainda observado efeito aditivo para *H. indica* LPP1 + amitraz sobre a redução na quantidade de ovos produzidos e *H. bacteriophora* HP88 + clorfenvinfós sobre a viabilidade dos ovos. Os valores de percentual de controle dos grupos tratados com os nematoides associados a esses dois princípios ativos foram superiores aos obtidos com a utilização somente do carrapaticida, e levemente superiores aos valores observados com a utilização apenas dos NEPs, com eficácia de 100% para associação de *H. indica* LPP1 com o amitraz. Estudos a respeito da compatibilidade de inseticidas a base de amitraz e NEPs tem apresentado resultados divergentes, sendo observada compatibilidade para algumas espécies (ROVESTI et al., 1988) e incompatibilidade de outras (ROVESTI & DESEO, 1990), enquanto os organofosforados geralmente têm sido apontados como as mais tóxicas, apresentando incompatibilidade com os

NEPs na maioria dos casos (HARA & KAYA, 1983; ZIMMERMAN & CRANSHAW, 1990; ROVESTI & DESÊO, 1990; ROVESTI & DESÊO, 1991). Monteiro et al. (2013) verificaram que a exposição por 24h de *H. amazonensis* RSC-5 ao amitraz e ao clorfenvinfós causou redução no percentual de sobrevivência e retardou a infectividade dos JIs, assim como mencionado anteriormente para deltametrina. No presente trabalho, o contato com o carrapaticida foi bem menor, tendo os JIs ficado expostos apenas durante a locomoção sobre o tegumento das fêmeas ingurgitadas; mesmo que o amitraz ou o clorfenvinfós possa ter afetado alguns JIs, tal fato possivelmente foi compensado pela atividade que o carrapaticida apresentou para as fêmeas, fazendo que essas ficassem mais susceptíveis à infecção pelos NEPs, assim como mencionado para a associação de deltametrina e *H. indica* LPP1 sobre a população 2.

Os resultados obtidos permitem concluir que os princípios ativos deltametrina, amitraz e clorfenvinfós foram compatíveis com os isolados testados. Entretanto, é possível que a presença do princípio ativo sobre a cutícula das fêmeas cause leve efeito deletério sobre os NEPs, que é compensado pela sensibilidade que os carrapatos apresentam a esse princípio ativo, ficando assim, mais susceptíveis a infecção pelos JIs que não foram afetados pelos carrapaticidas. Tal aspecto, assim como a viabilidade da utilização em conjunto de NEPs e carrapaticidas em campo merecem ser investigados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F.D.; SOARES, M.A.; BARROS, J.C.; MILLER, R.J.; LÉON, A.P. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 20, p. 127-133, 2011
- ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philanthus*. *Biological Control*. v. 31, p. 172–180, 2004.
- AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 20, p. 148-154, 2011a.
- AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; 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, 2011b.
- BARCI, L.A.; WENZEL, I.N.; ALMEIDA, J.E.M.; NOGUEIRA, A.H.C.; PRADO, A.P. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 18, p. 63-68, 2009.
- BAHIENSE, T.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Laboratory evaluation of the compatibility and the synergism between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and deltamethrin to Resistant Strains of *Boophilus microplus*. *Annals of the. New York Academic of Science*. v. 1026, p.319–322, 2004.
- 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.
- BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; ÂNGELO, C.A.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Performance of *Metarhizium anisopliae* and Its Combination with Deltamethrin against a Pyrethroid-Resistant Strain of *Boophilus microplus* in a Stall Test. *Annals of the. New York Academic of Science*. v. 1149, p. 242–245, 2008.
- CARVALHO, L.B.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; REIS, E.S.; BATISTA, E.S.P.; FAZA, A.P.; LEITE, R.C. Evaluation in vitro of the infection times of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* CCA strain. *Ciência Rural*. v. 40, p. 939–943, 2010.
- DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economy Entomology*. v. 66, p. 30–133, 1973.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL Strains (Steinernema: Rhabditida). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 23, p. 53–56, 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 27, p. 53–56, 2007.

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

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PERREIRA J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**. v. 21, p. 8–10, 2001.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATESTI, D.M. Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária. Sao Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 213p.

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

HARA, A.H.; KAYA, H.K. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomopatogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environmental Entomology*, v.12, p.496–501, 1983.

KAYA, H.K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic, CA. 1997. p. 281–324.

KLAFKE, G.M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: MEDVET. 2008. p. 81–105.

KOPPENHOFER, A.M.; COWLES, R.S., COWLES, E.A.F.E.M.; BAUMGARTNER, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. 24:90–97, 2002.

KOPPENHOFER, A.M.; GREWAL, P.S. Compatibility and Interaction with agrochemicals and biocontrol agents. In: GREWAL, P.S.; EHILERS, R.U.; SHAPIRO, D.I. Nematodes as biocontrol agents. Cambridge: CABI: Publishing Cambridge. 2005. p. 364–381.

KRISHNAYYA, P.V.; GREWAL, P.S. Effect of Neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Biocontrol and Science Technology**. v. 12, p. 259-266, 2002.

LABRUNA, M.B. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET. 2008. p. 15-56.

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.

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

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. 2006. Controle de carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; ARZUA, M.; BRECHARA, G.H. (Eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan. 2006. p. 145-153.

MOLINA-OCHOA, J.; NGUYEN, K.B.; GONZÁLEZ-RAMIREZ, M.; QUINTANA-MORENO, M.G.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; FOSTER, E.F. *Steinernema diaprepesi* (Nematoda: Steinernematidae): Its occurrence in Western México and Susceptibility of engorged cattle ticks *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Florida Entomologist**. v. 92, p. 660-663, 2009.

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

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; FAZZA, A.P.; SILVA, A.M.R.; ANDALÓ, V.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 106, p. 821-826, 2010b.

MONTEIRO, C.O.M.; ARAÚJO, L.X.; MATOS, R.S.; GOLO, P.S.; ÂNGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; RODRIGUES, C.A.C.; FURLONG, J. BITTENCOURT, V.R.E.P.; PRATA, M.C.A. Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. doi: 10.1007/s00436-013-3552-7

MENDES, M.C.; LIMA, C.K.P.; NOGUEIRA, A.H.C.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D.P.; GABRIEL, F.H.L.; UENO, T.H.E.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 178, p. 383-388, 2011.

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

PRAKASA, R.P.S.; DAS, P.K.; PANDHI, G. Note of compatibility of DD-136 (*Neoaplectana dutkyi*), an insect parasitic nematode with some insecticides and fertilizers. **Indian Journal of Agriculture Science**. v. 45, p. 2757-277, 1975.

REIS-MENINI, C.M.R.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; SILVA, E.R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 103, p. 1391-1396, 2008.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; ALONSO-DIAZ, M.A.; RODRIGUEZ-AREVALO, F.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; SANTAMARIA, V.M.; ROSARIO-CRUZ, R. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. **Veterinary Parasitology**. v. 136, p. 335-342, 2006a.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; RODRIGUEZ-AREVALO, F.; ALONSO-DIAZ, M.A.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; SANTAMARIA, V.M.; ROSARIO-CRUZ, R. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 75, p. 280-286, 2006b.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; TREES, A.J.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; VILLEGAS-PEREZ, S.L.; HODGKINSON, J.E. Evolution of acaricide resistance: Phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to pyrethroid selection pressure. **International Journal for Parasitology**. v. 41, p. 895-903, 2011.

ROVESTI, L.; HEINZPETER, E.W.; TAGLIENTE, F.; DESEÖ, K.V. Compatibility of pesticides with entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). **Nematology**. v.34, p.462-476, 1988.

ROVESTI, L.; DESEO, K.V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**. v. 36, p. 237-245, 1990.

ROVESTI, L.; DESEO, K.V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis heliothidis*. **Nematologica**. v.37, p.1113-1122, 1991.

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 62, p. 140-143, 2012.

SUN, M.; REN, Q.; LIU, Z.; GUAN, G.; GOU, H.; MA, M.; LI, Y.; LIU, A.; YANG, J.; YIN, H.; LUO, J. *Beauveria bassiana*: Synergistic effect with acaricides against the tick *Hyalomma*

anatolicum anatolicum (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**. v. 128, p. 192-195, 2011.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 94, p. 201–206, 2004.

ZIMMERMAN, R.J.; CRANSHAW, W.S. Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. **Journal of Economic Entomology**. v. 83, p. 97-100, 1990.

CAPÍTULO V

ASSOCIAÇÃO ENTRE NEMATOIDES E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus* *microplus* (ACARI: IXODIDAE)

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da associação de nematoides e fungos entomopatogênicos sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Foram utilizados os nematoides *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1 e os fungos *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986. Nos grupos tratados com fungos, as fêmeas foram imersas por três minutos em suspensão de conídios ($1,3 \times 10^8$ conídios/mL) e nos grupos tratados com nematoides, cada fêmea foi exposta a concentração de 300 nematoides. Para avaliação da interação entre os entomopatógenos, as fêmeas foram primeiramente imersas em suspensão de conídios e logo na sequência, expostas aos nematoides. Também foi formado um grupo em que as fêmeas foram imersas nas suspensões de conídios 24 h antes da exposição aos NEPs. No grupo controle as fêmeas ingurgitadas foram imersas em água destilada, sendo feitas 10 repetições por grupo. Foram avaliados os parâmetros peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão, e os valores obtidos foram utilizados para cálculo do percentual de controle. Os valores referentes ao peso da massa de ovos e percentual de controle dos grupos tratados com *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 nos dois experimentos foi estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) aos valores verificados para o controle. Nos grupos tratados apenas com nematoides, ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) no peso da massa de ovos, fato também observado para o percentual de eclosão do grupo tratado com *H. indica* LPP1. Em todos os grupos tratados com nematoides associados aos fungos foi constatada redução significativa ($p < 0,05$) no peso da massa de ovos e percentual de eclosão. Os percentuais de controle dos grupos tratados apenas com fungos variaram entre 31% a 55%. Nos grupos tratados com nematoides associados ou não aos fungos, o percentual de controle foi sempre superior a 90%, chegando a 100% no tratamento com *H. bacteriophora* HP88 associado ao fungo *M. anisopliae* IBCB 116. Conclui-se que os isolados de nematoides e fungos nas concentrações testadas foram compatíveis para o controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the association of entomopathogenic nematodes and fungi on engorged females of *Rhipicephalus microplus*. The nematodes studied were *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and *Heterorhabditis indica* LPP1 and the fungi were *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 and *Beauveria bassiana* ESALQ 986. In the groups treated with the fungi alone, the females were immersed for three minutes in a conidial suspension (1.3×10^8 conidia/mL) and in the groups treated just with the nematodes, each female was exposed to a concentration of 300 nematodes. To assess the interaction of the entomopathogens, the females were first immersed in the conidial suspension and then exposed to the nematodes at the same concentration. A group was also formed in which the females were immersed in the conidial suspensions 24 h before exposure to the EPNs. In the control group, the engorged females were immersed in distilled water. There were 10 repetitions for all groups. The parameters evaluated were female weight before oviposition, egg mass weight and egg hatching percentage of larvae and the values obtained were used to calculate the percentage of control. The egg mass weight and control percentage values of the groups treated with *M. anisopliae* IBCB 116 and *B. bassiana* ESALQ 986 in the two experiments were statistically similar ($p > 0.05$) to those of the control group. In the groups treated only with the nematodes, there was a significant decrease ($p < 0.05$) in the egg mass weight, a fact also observed for the egg hatching percentage of the group treated with *H. indica* LPP1. In all the groups treated with nematodes associated with fungi there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the egg mass weight and hatching percentage of larvae. The control percentages in the groups treated only with the fungi varied from 31% to 55%. In the groups treated with nematodes associated or not with fungi, the control percentages were greater than 90%, and reached 100% in the treatment with *H. bacteriophora* HP88 associated with the fungus *M. anisopliae* IBCB 116. It can be concluded that the nematodes and fungi tested were compatible to control *R. microplus*.

Key word: Cattle tick, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae), comumente conhecido como carrapato dos bovinos, é um ectoparasito hematófago que apresenta ampla distribuição geográfica (LEAL et al., 2003), sendo um dos principais problemas sanitários na bovinocultura em diversos países de clima tropical e subtropical (PEREIRA, 2008; MARTINS et al., 2006). Embora de difícil quantificação, acredita-se que as perdas econômicas ocasionadas por esse ixodídeo no Brasil, cheguem a dois bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2002).

Atualmente as infestações são controladas principalmente através da utilização de carrapaticidas organossintéticos, entretanto, o uso indiscriminado e sem critérios técnicos adequados (AMARAL et al., 2011a,b) resultou na seleção de carrapatos resistentes a quase todas as bases químicas disponíveis para seu controle (FURLONG et al., 2007; KLAFKE, 2008). Aliado aos problemas relacionados com a resistência, existe crescente preocupação com a segurança do meio ambiente, saúde humana e de animais, resíduos nos alimentos e morte de organismos não alvo, fatores que tornam o uso do controle biológico uma alternativa atrativa (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; FERNANDES & BITTENCOURT, 2007).

Dentre os diversos métodos estudados para o controle biológico de carrapatos, a utilização de fungos entomopatogênicos é uma opção promissora devido à capacidade de dispersão, espectro de hospedeiros e capacidade de penetrar via cutícula dos carrapatos (SAMISH et al., 2008). *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os fungos entomopatogênicos mais bem caracterizados e amplamente utilizados em programas de controle biológico de pragas (ZIMMERMAN, 2007a; ZIMMERMAN, 2007b; FERNANDES & BITTENCOURT, 2008; SCHRANK & VAINSTEIN, 2010). Esses ascomicetos já tiveram sua patogenicidade evidenciada para diferentes estágios de desenvolvimento de várias espécies de carrapatos (FERNANDES & BITTENCOURT, 2008; SAMISH et al., 2008).

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são importantes agentes no controle de insetos praga (GREWAL et al., 2001; DOLINSKI, 2006) e nas últimas décadas, o potencial desses nematoides para o controle de carrapatos também vem sendo investigado (SAMISH et al., 2008). Estudos têm demonstrado que fêmeas ingurgitadas de diferentes espécies de ixodídeos são susceptíveis a infecções por NEPs (SAMISH et al., 2008) e entre as espécies testadas para carrapato dos bovinos, *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado HP88 e *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1982 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP1 foram apontadas até o momento como as mais virulentas (MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Para aumentar a eficiência de patógenos, interações entre diferentes agentes de controle biológico e convencional têm sido investigadas (KOPPENHOFER & GREWAL, 2005); entretanto, é surpreendente que até o momento, pouca atenção tem sido dada para interações entre entomopatógenos (ANSARI et al., 2005). Sobre a combinação entre NEPs e fungos, embora escassos, existem alguns estudos que demonstram que essa associação pode apresentar efeito aditivo ou sinérgico sobre a mortalidade de determinadas espécies de insetos (BARBERCHECK & KAYA, 1991; SHAPIRO et al., 2004; ACEVEDO et al., 2007), entretanto, em alguns casos, a interação entre esses entomopatógenos pode ser antagonista (SHAPIRO et al., 2004; ANSARI et al., 2005). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a compatibilidade entre os nematoides *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 com os fungos *M. anisopliae* IBCB116 e *B. bassiana* ESALQ 986 para o controle de *R. microplus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* e isolados de nematoides e fungos entomopatogênicos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foi utilizada uma estirpe de *R. microplus* obtida através de infestações artificiais em bezerros (registro 23083.009241/2011-16.) mantidos na estação experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (Anexo E).

Os nematoides *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram cedidos pelo laboratório de Nematologia da Universidade Federal Norte Fluminense Darcy Ribeiro Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e mantidos no banco de NEPs do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, através de multiplicação *in vivo* em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepdoptera: Pyralidae) de acordo com Lindegren et al. (1993) e Kaya & Stock (1997) (Anexo A e C). Os fungos *M. anisopliae* IBCB116 e *B. bassiana* 986 são mantidos na micoteca do Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ (Anexo D). A escolha dos nematoides foi devido a alta virulência apresentada por esses isolados para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (MONTEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Com relação aos fungos, foram escolhidos isolados com virulência moderada, aumentando assim, a chance de compatibilidade entre os entomopatógenos (ACEVEDO et al., 2007).

2.2 Preparação das suspensões com fungos

As suspensões conidiais foram preparadas a partir do crescimento dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em placas de Petri, contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Para o preparo da suspensão conidial, a superfície da placa de Petri foi raspada com auxílio de um cabo e lâmina de bisturi e os conídios suspensos em 30 mL de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 (0,1%). A suspensão foi quantificada com auxílio da Câmara de Neubauer com utilização de microscópio óptico, segundo Alves (1998) e ajustada a concentração $1,3 \times 10^8$ conídios/mL. Amostra de 10 μ L de cada suspensão conidial foi incubada em meio BDA contendo cloranfenicol 0,05% a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ para avaliação da viabilidade (ALVES, 1998).

2.3 Preparação das suspensões com nematoides

Foi feita contagem de 10 alíquotas de 10 μ L obtidas a partir de 20 mL de suspensão aquosa de nematoides estocadas em garrafa de cultivo celular de 40 mL. Em seguida foi calculada a média de juvenis infectante (JIs) por amostra e a partir desta média, as suspensões foram ajustadas para concentração de 300 JIs/mL.

2.4 Experimento I – Efeito da associação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 com *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Fêmeas ingurgitadas com pesos previamente homogêneos ($p > 0,05$) foram divididas em oito grupos contendo 10 carrapatos (cada fêmea = unidade experimental) (Figura 1A). No grupo tratado apenas com os fungos, cada fêmea foi colocada dentro de tubo

de ensaio contendo 1,0 mL da suspensão de conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana*, permanecendo imersa por três minutos (Figura 1B e C). Na sequência, as fêmeas foram transferidas individualmente para placas de Petri (6 x 6 cm) previamente forrada com duas folhas de papel de filtro. No grupo tratado apenas com *H. bacteriophora* HP88, cada fêmea foi colocada em uma placa de Petri (6 x 6 cm) previamente forrada com duas folhas de papel de filtro e na sequência foi pipetado 1,0 mL de suspensão com a concentração de 300 JIs (Figura 1D).

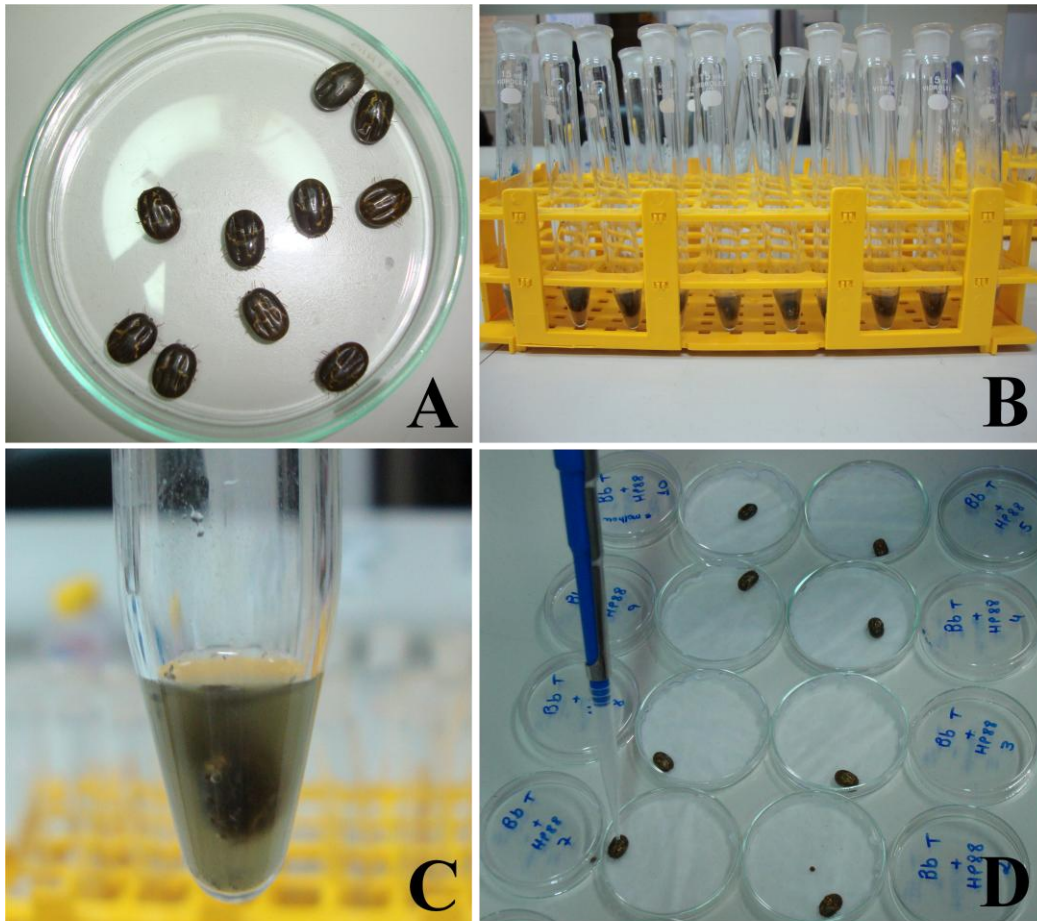


Figura 1. A: Grupo com 10 fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; B e C: Fêmeas ingurgitadas imersas em suspensão de *Metarhizium anisopliae* IBCB 116; D: Adição de 1 mL de suspensão aquosa de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 em placas de Petri contendo fêmeas ingurgitadas.

Nos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 associado aos fungos, às fêmeas foram individualmente imersas na suspensão de conídios por três minutos e em seguida, transferidas para placa de Petri (6x6 cm). Na sequência, foi feita a aspersão de 1,0 mL da suspensão contendo 300 JIs. Também foi formado um grupo em que as fêmeas foram imersas na suspensão fúngica e os nematoides só foram adicionados a placa de Petri após 24h (*M. anisopliae* IBCB 116 24 h + *H. bacteriophora* HP88 e *B. bassiana* 986 24 h + *H. bacteriophora* HP88). No grupo controle, as fêmeas foram imersas individualmente em água destilada por três minutos e acondicionadas em placa de Petri.

As placas de Petri de todos os grupos foram vedadas com parafilme durante três dias. Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR) e a coleta de postura foi feita diariamente até a morte do último carrapato. As massas de ovos de cada fêmea foram acondicionadas em tubo de ensaio de 10 mL devidamente identificadas, vedados com algodão hidrófilo e mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão de larvas. A partir desses valores foi feito o cálculo do percentual de controle (DRUMMOND et al., 1973) (Anexo H).

2.5 Experimento II – Efeito da associação de *Heterorhabditis indica* LPP1 com *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Nesse experimento, foi seguida a mesma metodologia do experimento anterior, entretanto, foi utilizado o nematoide *H. indica* LPP1.

2.6 Re-isolamento dos fungos

Para o re-isolamento, uma fêmea de cada tratamento com fungo foi colocada em câmara úmida (placa de Petri com papel de filtro umidificado com 1 mL de água destilada) para propiciar o crescimento fúngico na cutícula (esporulação). Após sete dias, as colônias fúngicas que cresceram sobre a cutícula das fêmeas foram repicadas em meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol (0,05%) e incubadas em câmara climatizada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$ durante 15 dias. Decorrido esse período, foi realizada a avaliação das características micromorfológicas através da utilização da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula. As placas com as culturas foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade durante 14 dias. Decorrido esse período, foram confeccionadas lâminas temporárias coradas em Lactofenol de Amman com azul de algodão para a identificação dos fungos.

2.7 Análise estatística

Para realização da análise estatística de todos os experimentos, foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. Para a comparação das médias, devido à distribuição não normal dos dados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguindo do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

As suspensões conidiais de *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 utilizadas nos dois experimentos apresentaram viabilidade superior a 98%.

Os resultados referentes ao experimento com *H. bacteriophora* HP88 associado ou não aos fungos *M. anisopliae* IBCB 116 ou *B. bassiana* ESALQ 986 são apresentados na tabela 1. Os valores do peso das fêmeas antes da postura foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Tabela 1. Peso médio da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, na concentração de 300 NEPs/fêmea, associados ou não aos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 na concentração de $1,3 \times 10^8$ conídios mL em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80 \pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão das larvas (%)	Percentual de controle* (%)
Controle	295,1 ^a \pm 40,5 (10)	157,6 ^a \pm 35,7 (10)	87,8 ^a \pm 18,6 (10)	
IBCB 116	295,2 ^a \pm 49,7 (10)	122,9 ^a \pm 15,9 (10)	70,6 ^{ab} \pm 26,6 (10)	41,4
ESALQ 986	294,6 ^a \pm 43,3 (10)	133,9 ^a \pm 62,1 (10)	71,0 ^{ab} \pm 29,0 (10)	31,3
HP88	294,1 ^a \pm 28,5 (10)	10,3 ^b \pm 4,8 (10)	58,9 ^{ab} \pm 32,1 (4)	95,6
IBCB 116 + HP88	294,6 ^a \pm 43,3 (10)	2,2 ^b \pm 3,4 (10)	0,0 ^c \pm 0,0 (4)	100,0
ESALQ 986 + HP88	294,9 ^a \pm 39,1 (10)	1,8 ^b \pm 3,3 (10)	18,8 ^c \pm 37,5 (4)	99,6
⁺ IBCB 116 + 24h HP88	295,2 ^a \pm 29,9 (10)	5,2 ^b \pm 3,3 (10)	42,0 ^{bc} \pm 28,0 (3)	98,4
⁺ ESALQ 986 + 24h HP88	294,6 ^a \pm 52,2 (10)	9,2 ^b \pm 3,1 (10)	30,1 ^{bc} \pm 42,3 (5)	98,0

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente a nível de 5%.

() – Tamanho da amostra. *Calculado segundo Drummond et al. (1973).

HP88 = *Heterorhabditis bacteriophora*; IBCB 116 = *Metarhizium anisopliae*; ESALQ 986 = *Beauveria bassiana*.

Os valores referentes ao peso da massa de ovos dos grupos tratados com *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 foram de 122,9 e 133,9 mg, respectivamente, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) do valor verificado para o controle (157,6 mg). Entretanto, a utilização de *H. bacteriophora* HP88 reduziu significativamente ($p < 0,05$) o peso da massa de ovos (10,3 mg). Nos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 associado aos fungos simultaneamente ou após 24h, os valores do peso da massa de ovos variaram entre 9,2 a 1,8 mg, sendo verificado diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle (Tabela 1).

Os percentuais de eclosão das larvas oriundas dos grupos tratados somente com os fungos ou com *H. bacteriophora* HP88 não diferiram significativamente ($p > 0,05$) do controle (87,8%), sendo constatados valores próximos a 70% para os fungos e de 58,9% para o nematoide. Nos outros tratamentos, ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, sendo verificados valores entre 0,0 a 42,0%. O percentual de controle dos grupos tratados com os fungos *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 foram de 41 e 31%, respectivamente. Nos demais grupos, o percentual de controle foi superior a 97%, chegando a 100% no tratamento com *H. bacteriophora* HP88 associado simultaneamente ao fungo *M. anisopliae* IBCB 116 (Tabela 1).

Os resultados referentes ao experimento com *H. indica* LPP1 associado com os fungos *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 são apresentados na tabela 2. Os valores encontrados nesse experimento são similares ao anterior, em que não há diferenças significativas ($p>0,05$) do peso das fêmeas antes da postura entre os grupos. Também não foi verificado diferenças significativas ($p>0,05$) entre o peso da massa de ovos dos grupos tratados com os fungos *M. anisopliae* IBCB 116 (76,9 mg) e *B. bassiana* ESALQ 986 (106,2 mg), quando comparados ao grupo controle (131,1 mg). O tratamento apenas com *H. indica* LPP1 e os tratamentos em que esse isolado de nematoide foi associado aos fungos causaram redução ($p<0,05$) na quantidade de ovos produzidos (13,5%) (Tabela 2).

O percentual de eclosão verificado nos grupos tratados com *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 foram de 86,6 e 72,0%, respectivamente, sendo semelhante ($p>0,05$) ao valor observado para o controle (90,2%); enquanto no grupo tratado com *H. indica* LPP1, foi observado valor de 51,4% ($p<0,05$). Nos grupos tratados com *H. indica* LPP1 associados aos fungos simultaneamente ou após 24h, ocorreu redução significativa ($p<0,05$) no percentual de eclosão, com valores variando de 19,9% a 50,3%. O percentual de controle foi de 55% e 34% nos grupos tratados com *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986, respectivamente; enquanto, nos demais grupos, o percentual de controle foi superior a 90%, chegando a 99% no tratamento com *B. bassiana* ESALQ 986 associado simultaneamente ao nematoide *H. indica* LPP1.

Tabela 2. Peso médio da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos, percentual de eclosão larval e percentual de controle de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Heterorhabditis indica* LPP1, na concentração de 300 JIs/fêmea, associados ou não aos fungos *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 na concentração de $1,3 \times 10^8$ mL em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $80 \pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão (%)	Percentual de controle* (%)
Controle	272,3 ^a \pm 39,1 (10)	131,1 ^a \pm 26,9 (10)	90,2 ^a \pm 8,0 (10)	
IBCB 116	269,5 ^a \pm 19,1 (10)	76,9 ^a \pm 33,0 (10)	68,6 ^a \pm 24,6 (9)	55,0
ESALQ 986	270,0 ^a \pm 25,5 (10)	106,2 ^a \pm 31,9 (10)	72,0 ^a \pm 29,8 (10)	34,9
LPP1	270,2 ^a \pm 16,9 (10)	13,5 ^b \pm 26,9 (10)	51,4 ^b \pm 34,0 (7)	94,1
IBCB 116 + LPP1	269,7 ^a \pm 24,6 (10)	7,3 ^b \pm 4,0 (10)	19,9 ^b \pm 23,2 (8)	98,8
ESALQ 986 + LPP1	269,3 ^a \pm 28,2 (10)	5,2 ^b \pm 4,7 (10)	22,6 ^b \pm 23,1 (8)	99,0
IBCB 116 + 24h LPP1	270,7 ^a \pm 31,6 (10)	17,8 ^b \pm 11,9 (10)	50,3 ^b \pm 36,4 (8)	92,4
ESALQ 986 + 24h LPP1	269,7 ^a \pm 13,8 (10)	7,1 ^b \pm 5,6 (10)	40,7 ^b \pm 31,0 (7)	97,5

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente a nível de 5%.

() – Tamanho da amostra. *Calculado segundo Drummond et al. (1973).

LPP1 = *Heterorhabditis indica*; IBCB 116 = *Metarhizium anisopliae*;

ESALQ 986 = *Beauveria bassiana*.

Ocorreu conidiogênese em cadáveres de fêmeas ingurgitadas de todos os grupos tratados com fungos nos dois experimentos, inclusive nos grupos tratados com fungos associados aos nematoides (Figura 2), permitindo assim, o re-isolamento e confirmação da infecção através das características macro e micromorfológicas de ambos os fungos.

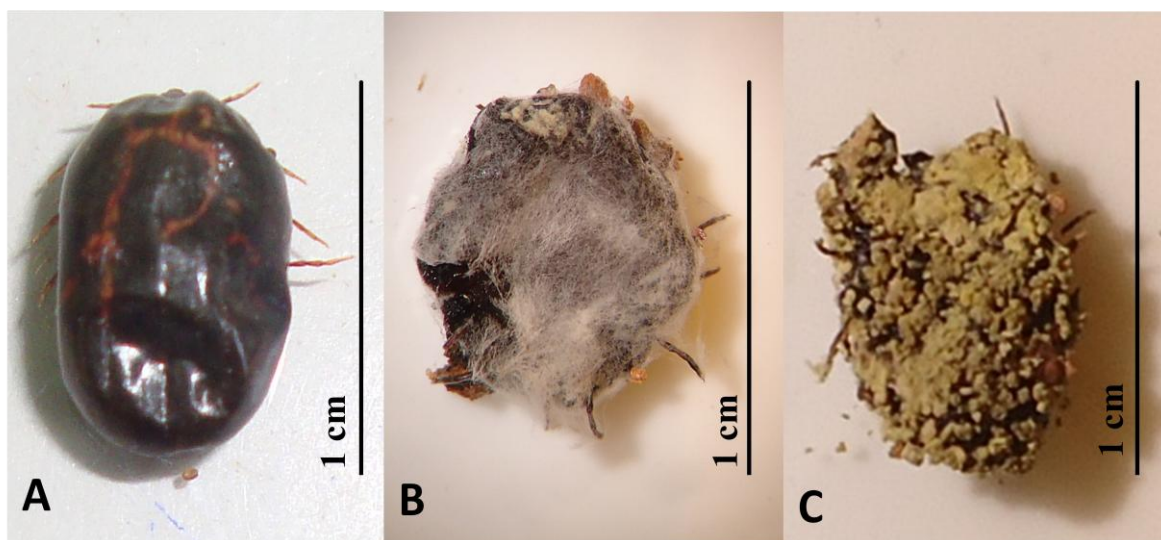


Figura 2. A: Fêmeas ingurgitadas *Rhipicephalus microplus* mortas após infecção por *Heterorhabditis indica* LPP1; B: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mortas após infecção por *H. indica* LPP1 associado com *Beauveria bassiana* ESALQ 986; C: Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mortas após infecção com *H. indica* LPP1 associado com *Metharizium anisopliae* IBCB 116.

4 DISCUSSÃO

Existem poucos registros a respeito da associação entre nematoides e fungos entomopatogênicos, estando esses estudos direcionados para avaliação do efeito sobre a mortalidade de espécies de insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera (BARBERCHECK & KAYA, 1990; ANSARI et al., 2004; KOPPENHOFER & GREWAL, 2005, ANSARI et al., 2005; ANSARI et al., 2006; ACEVEDO et al., 2007; ANSARI et al., 2008). Esse foi o primeiro estudo que investigou a interação entre esses entomopatógenos sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*.

A associação dos nematoides *H. bacteriophora* HP88 ou *H. indica* LPP1 com os fungos *M. anisopliae* IBCB 116 ou *B. bassiana* ESALQ 986 foi compatível, sendo observado percentual de controle superior a 90% em todos os grupos em que as fêmeas foram tratadas com nematoides associados aos fungos, chegando a 100% no grupo tratado com a associação de *H. bacteriophora* HP88 + *M. anisopliae* IBCB 116. Entretanto, não foi possível verificar efeito sinérgico, devido a elevada eficácia obtida com a utilização apenas dos nematoides. Esses resultados são similares aos obtidos por Koppenhofer & Grewal (2005) que relataram que mesmo que entomopatógenos sejam compatíveis, nem sempre é possível observar um efeito sinérgico, uma vez que em muitos casos, a utilização isolada de um desses organismos em laboratório já apresenta alta eficiência.

Embora não se tenha obtido efeito sinérgico em laboratório, foi possível verificar ligeiro aumento no percentual de controle de *R. microplus* na maioria dos grupos tratados com

nematoides associados aos fungos. Efeitos positivos obtidos através da associação de nematoides e fungos já foram reportados por diferentes autores (ANSARI et al., 2004; KOPPENHOFER & SHAPIRO-ILAN, 2005; ACEVEDO et al., 2007; ANSARI et al., 2008); sendo relatada inclusive compatibilidade entre outros isolados de *H. bacteriophora* com *B. bassiana* (BARBERCHECK & KAYA, 1991) e *H. indica* com *M. anisopliae* (SHAPIRO-ILAN et al., 2004). Os mecanismos dessa associação que resultam em efeito positivo ainda são incertos, mas acredita-se que os fungos atuem como um fator de estresse, quebrando a homeostase e debilitando os hospedeiros, que dessa forma, ficariam mais susceptíveis à infecção por nematoides (ANSARI et al., 2004). Especula-se também, que os artrópodes debilitados pelos fungos fariam a troca gasosa de forma mais intensa, atraindo maior número de JIs, que utilizam o CO₂ como um dos sinais para localizarem o hospedeiro (ANSARI et al., 2008).

Observando o desempenho dos nematoides e fungos separadamente, é possível observar que os isolados *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 apresentaram virulência para *R. microplus* superior quando comparados aos fungos *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986. Acevedo et al. (2007) avaliando o efeito da associação do nematoide *Heterorhabditis* sp., isolado JPM4, com diferentes isolados de *M. anisopliae* sobre larvas do lepidóptero *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepdoptera: Crambidae), concluíram que o nematoide foi mais virulento. O mesmo foi verificado por Shapiro-Ilan et al. (2004), utilizando *H. indica*, *M. anisopliae* e *B. bassiana*, associados ou não, sobre *Curculio caryae* Horn, 1873 (Coleoptera: Curculionidae). Tais autores atribuíram a maior virulência dos nematoides ao fato desses entomopatógenos e suas bactérias simbiotes conseguirem colonizar o hospedeiro em menos tempo do que os fungos (ACEVEDO et al., 2007), causando a morte em menor intervalo de tempo. Em carrapatos, onde a eficiência dos agentes de controles é medida pela redução de prole, isso reflete diretamente na eficácia dos tratamentos, pois as fêmeas tratadas com os nematoides morrem em período inferior ao observado para fêmeas tratadas com os fungos; apresentando assim menor período de sobrevivência e como consequência, menor período de postura. Cabe destacar que a escolha de fungos de virulência moderada e nematoides altamente virulentos com intuito de aumentar a chance de sucesso na associação desses entomopatógenos (ACEVEDO et al., 2007) contribuiu para a diferença nos resultados a respeito da eficiência dos isolados de nematoides e fungos testados.

Nos grupos em que as fêmeas ingurgitadas foram tratadas com os nematoides após 24 h do tratamento com os fungos, também foi verificada eficácia superior a 90% em todos os tratamentos. Esses resultados indicam que o contato das fêmeas com os fungos 24 horas antes da exposição aos nematoides não interferiu na associação entre os entomopatógenos; demonstrando que a fixação dos conídios na cutícula do carrapato e os processos químicos subsequentes não foram empecilhos para a penetração dos JIs. Tais fatos podem ser suportados pelos resultados obtidos por Ansari et al. (2005), que verificaram que o comportamento de dispersão dos JIs de *Heterorhabditis megidis* Poinar et al. 1987 (Rhabditida: Heterorhabditidae) e *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (Rhabditida: Steinernematidae) não foi afetado pelo extrato bruto de *M. anisopliae*, uma vez que os nematoides não foram repelidos, paralisados nem mortos. Outros estudos tem demonstrado que a aplicação dos fungos em dias e até semanas antes, não tem sido um fator limitante para posterior infecção pelos nematoides em insetos, sendo possível observar efeito aditivo e sinérgico nessas associações (BARBERCHECK & KAYA, 1990; ANSARI et al., 2004; ACEVEDO et al., 2007).

Um ponto negativo mencionado por diferentes autores sobre a associação de nematoides e fungos entomopatogênicos é a interferência que cada um desses entomopatógenos pode exercer sobre a reprodução do outro (BARBERCHECK & KAYA,

1991; ANSARI et al., 2004; ACEVEDO et al., 2007). Entretanto, esse fato não seria um problema com relação aos nematoides, uma vez que esses organismos não se reproduzem em carrapatos, ocorrendo a morte dos JIs logo após a penetração no hemocele, sendo a morte dos ixodídeos, atribuída à alta taxa de multiplicação e metabólicos das bactérias simbiontes (SAMISH et al., 2008).

A respeito da reprodução dos fungos, foi possível observar conidiogênese no tegumento de fêmeas ingurgitadas proveniente de todos os grupos infectados por *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986, demonstrando que os fungos conseguiram se desenvolver mesmo em carrapatos infectados pelos nematoides. Tal aspecto é altamente positivo, pois a reprodução do patógeno em hospedeiros infectados à campo é um importante mecanismo para manutenção do agente no ambiente, permitindo a propagação e posterior infecção de outras gerações do artrópode alvo. Cabe destacar que as bactérias associadas aos NEPs produzem substâncias antimicrobianas (BARBERCHECK & KAYA, 1990; TARASCO et al., 2011) que podem não inibir totalmente a reprodução dos fungos, mas ocasionar menor produção de conídios (ACEVEDO et al., 2007). Assim, torna-se pertinente a realização de estudos futuros mais detalhados para melhor compreensão a respeito da associação entre esses microorganismos sobre carrapatos e o efeito sobre a reprodução dos fungos.

Estudos sobre a compatibilidade entre diferentes agentes de controle são fundamentais, uma vez que a utilização simultânea só é viável caso não exista efeito antagônico entre os métodos propostos. Esse conjunto de resultados apresenta a primeira investigação a respeito da associação de fungos e NEPs sobre carrapatos. Em laboratório, a utilização isolada dos NEPs já resultou em percentual de controle superior a 90%, dificultando a verificação de sinergismo entre a associação dos entomopatógenos. Entretanto, em condições de campo, dificilmente se obteria eficácia superior a 90% utilizando apenas os NEPs, assim, a avaliação de compatibilidade entre esses microorganismos a resposta que os isolados são compatíveis torna-se fundamental para que sejam realizados estudos futuros em campo, e nessas condições, a soma da eficácia dos fungos e NEPs pode vir apresentar efeito sinérgico.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que os isolados investigados nas concentrações testadas são compatíveis em condições de laboratório. A compatibilidade entre esses entomopatógenos abre espaço para o possível desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias que possibilitem a utilização em conjunto desses microrganismos no manejo integrado de carrapatos. Assim, tal interação merece ser investigada futuramente em condições de campo.

5 REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 96, p. 87-192, 2007.

ALONSO-DIAZ, M.A.; GARCIA, L.; GALINDO-VELASKO, E.; LEZAMA-GUITIERREZ, 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. Piracicaba: FEALQ. 1998.

AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 148-154, 2011a.

AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; 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, 2011b.

ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**. v. 31, p. 172–180, 2004.

ANSARI, M.A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**. v. 50, p. 465–475, 2005.

ANSARI, M.A.; SHAH, F.A.; TIRRY, MOENS, M. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. **Biological Control**. v. 39, p. 453–459, 2006.

ANSARI, M.A.; SHAH BUTT, FA. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. **Entomologia Experimentalis Applicata**. v. 129, p. 340–347, 2008.

BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Interactions between *Beauveria bassiana* and the Entomogenous Nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 55, p. 225-234, 1990.

BARBERCHECK, M.E.; KAYA, H.K. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) in soilborne larvae of

Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**. v. 20, p. 707–712, 1991.

DOLINSKI, C. Uso de nematoides entomopatogênicos para o controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JR, T.J.; PALLINI, A. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças**, Viçosa, UFV. 2006. p. 261-289.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, p. 30–133, 1973.

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.

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

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PERREIRA J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**. v. 21, p. 8-10, 2001.

KAYA, H.K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic, CA. 1997. p. 281–324.

KLAFKE, G.M. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M.C., Labruna, M.B., Szabo, M.P.J., Klafke, G.M. (Eds.), **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle, e Resistência**. São Paulo: MEDVE. 2008. p. 65-80.

KOPPENHOFER, A.M.; GREWAL, P.S. Compatibility and Interaction with agrochemicals and biocontrol agents. In: GREWAL, P.S.; EHILERS, R.U.; SHAPIRO, D.I. Nematodes as biocontrol agents. Cambridge: CABI: Publishing Cambridge. 2005. p.364-381.

LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J.; VAZ JR, I.S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientia Veterinariae**. v. 31, p. 01-11, 2003.

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

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. 2006. Controle de carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; ARZUA, M.; BRECHARA, G.H. (Eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan. 2006. p. 145–153.

MONTEIRO, C.M.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; SOARES, A.E.; BATISTITA, E.S.P.; DOLINSKI, C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 355–358, 2010.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. (Eds.), ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET. 2008. p. 15–56.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; JACKSON, M.; REILLY, C.C.; HOTCHKISS, M.W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**. v. 30, p. 119–126, 2004.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (Eds). **Ticks: Biology, Disease and Control**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. p. 447–469.

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

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 62, p. 140-143, 2012.

TARASCO, E.; ALVAREZ, C.S.; TRIGGIANI, O.; MORAGA, E.Q. Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. **Biocontrol Science and Technology**. v. 21, p. 693–704, 2011.

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

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

CAPÍTULO VI

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)

RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido com objetivo de avaliar o efeito *in vitro* da associação dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1 com o óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram divididas em seis grupos (com dez carrapatos) com o peso previamente homogeneizados (cada fêmea = uma unidade experimental). Nos grupos tratados, as fêmeas foram expostas ao óleo (40 µL/mL) e aos nematoides (300 NEPs/fêmea) separadamente, e também expostas aos nematoides associados com o óleo; enquanto no grupo controle, as fêmeas foram imersas em tween 80 (30 µL/mL), sendo feitas dez repetições por grupo. Foram avaliados os parâmetros peso da fêmea antes postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão de larvas e a partir desses valores foi feito o cálculo de percentual de controle. Todos os tratamentos levaram a redução significativa ($p < 0,05$) no peso da massa ovos. O percentual de eclosão foi reduzido ($p < 0,05$) nos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 e *H. bacteriophora* HP88 associado ao óleo; no grupo tratado somente com o óleo, o valor obtido para o percentual de eclosão foi similar ($p > 0,05$) ao observado para controle. No tratamento com *H. indica* LPP1 associado ao óleo não ocorreu eclosão de nenhuma larva. O valor referente ao percentual de controle no grupo tratado apenas com o óleo foi de 50,7%. Nos demais tratamentos, o percentual de controle foi superior a 95%, chegando a 100% no grupo tratado com *H. indica* LPP1 associado ao óleo de *L. sidoides*. A compatibilidade da associação dos *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 com óleo essencial de *L. sidoides* nas concentrações testadas indica viabilidade do uso em conjunto destes agentes para o controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, controle biológico, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*, alecrim pimenta.

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the effect *in vitro* of the association of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and *Heterorhabditis indica* LPP1 with the essential oil of *Lippia sidoides* on engorged females of *Rhipicephalus microplus*. The females were divided into six groups of ten ticks each, with previously homogenized weights (each female = an experimental unit). In the treated groups, the females were exposed to the oil (40 µL/mL) and nematodes (300 EPNs/female) separately, and were also exposed to the nematodes associated with the oil, while in ticks in the control group were immersed in Tween 80 (30 µL/mL), with 10 repetitions for each group. The parameters evaluated were female weight before oviposition, egg mass weight and hatching percentage of larvae, and from these values the percentage of control was calculated. All the treatments led to a significant reduction ($p < 0.05$) in the egg mass weight. The hatching percentage decreased ($p < 0.05$) in the groups treated with *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 and *H. bacteriophora* HP88 associated with the oil, but in the group treated only with the oil the hatching percentage was similar ($p > 0.05$) to that of the control group. In the treatment with *H. indica* LPP1 associated with the oil, no larvae hatched. The control percentage in the group treated with the oil alone was 50.7%. In the other treatments, the control percentages were greater than 95% and reached 100% in the group treated with *H. indica* LPP1 together with the *L. sidoides* oil. The compatibility of the association of *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 with the essential oil of *L. sidoides* at the concentrations tested indicates the feasibility of using these agents together to control *R. microplus*.

Key word: Cattle tick, biological control, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica*, pepper alecrim.

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago de bovinos encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, e representa um dos principais problemas para pecuária bovina. Os prejuízos econômicos vão desde perdas na produção de leite e carne, danos causados no couro dos animais, transmissão de patógenos e gastos relacionados à mão de obra e compra de carrapaticidas (FURLONG et al., 2004; FURLONG et al., 2007). No Brasil, estima-se que as perdas ocasionadas pelo parasitismo desse ixodídeo resultam em prejuízos de dois bilhões de dólares anualmente (GRISI et al., 2002).

A aplicação de carrapaticidas sintéticos é o principal meio de controle de *R. microplus*, entretanto, a má utilização desses produtos (AMARAL et al., 2011a,b) resultou em seleção de carrapatos resistentes, sendo que atualmente, a maior parte dos carrapaticidas disponíveis no mercado apresentam baixa eficácia (FURLONG et al., 2007). Somados aos problemas de resistência, existe crescente demanda do mercado consumidor pela redução na utilização de produtos químicos, minimizando as chances de contaminação do ambiente e alimentos e intoxicação de animais e do homem. Assim, nas duas últimas décadas tem se intensificado os esforços por busca de novas alternativas de controle utilizando produtos de origem vegetal (MONTEIRO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010a; MONTEIRO et al., 2012a; GOMES et al., 2012; LAGE et al., 2013) ou entomopatógenos (VASCONCELOS et al., 2004; SAMISH et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010b; MONTEIRO et al., 2010c; MONTEIRO et al., 2012b; SILVA et al., 2012; FERNANDES et al., 2012).

Lippia sidoides Cham (Verbenaceae) é um arbusto conhecido popularmente como alecrim-pimenta, sendo encontrada no nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Essa espécie tem uso comprovado na medicina popular, principalmente como antisséptico e antimicrobiano (MATOS et al., 2004). Seu óleo essencial possui atividades antibacteriana, antifúngica (LEMONS et al., 1992; LACOSTE et al., 1996), inseticida (MACIEL et al., 2009; LIMA et al., 2011, LIMA et al., 2013), anti-helmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007) e acaricida (CAVALCANTI et al., 2010). Gomes et al. (2012) demonstraram que as concentrações de 20,0 e 60,0 µL/mL apresentaram eficiência de 100% contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, respectivamente.

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são importantes agentes utilizados no controle biológico de diferentes insetos pragas (GREWAL et al., 2001; DOLINSKI, 2006). Em condições de laboratório foi demonstrado que fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* são susceptíveis a infecções por esses nematoides, sendo *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado HP88 e *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP1, apontadas como as espécies mais virulentas para esse ixodídeo (MONTEIRO et al., 2010b; SILVA et al., 2012).

Os juvenis infectantes (JIs) destes nematoides são tolerantes à exposição a inseticidas e acaricidas, sendo relatado que a utilização em conjunto em muitos casos apresenta efeito aditivo ou sinérgico (GREWAL et al., 2001; KOPPENHÖFER & GREWAL 2005; REIS-MENINI et al., 2008). Entretanto, pouco se sabe a respeito da associação de NEPs com óleos essenciais e outros produtos de origem vegetal. Krishnayya & Grewal (2002) relatam a compatibilidade de *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae) com o óleo de neem. Anastasiadis et al. (2011) mostraram que o uso combinado de *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Rhabditida: Steinernematidae) e dialil dissulfeto (componente volátil de óleo de alho) reduziu significativamente a população de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) (Tylenchida: Heteroderidae). Dolinski et al. (2012) verificaram que a aplicação de *Heterorhabditis baujardi* Phan et al. 2003 (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolado LPP7

associado com tortas de neem resultou em efeito aditivo no controle de *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae), em plantações de goiaba.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação entre o óleo essencial de *L. sidoides* com os nematoides *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, nematoides entomopatogênicos e óleo essencial de *Lippia sidoides*

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite (CNPGL), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foi utilizada uma estirpe de *R. microplus* mantida através de infestações artificiais em bezerros (registro 23083.009241/2011-16.) na estação experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brasil (Anexo E).

Os nematoides *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram cedidos pelo laboratório de Nematologia da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e mantidos no banco de NEPs do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite. A manutenção dos isolados foi feita através de multiplicação *in vivo* em lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) (LINDEGREN et al., 1993; KAYA & STOCK, 1997) (Anexo A e C).

O óleo essencial de folhas de *L. sidoides* foi adquirido da empresa PRONAT (Produtos Naturais LTDA, Horizonte CE, Brasil) que cultiva a planta e obtém o óleo pelo método de arraste a vapor.

2.2 Análise dos constituintes do óleo essencial de *Lippia sidoides*

A amostra do óleo essencial de *L. sidoides* foi previamente caracterizada em estudo publicado por Gomes et al. (2014) através de análise em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM - Shimadzu QP-2010 Plus) (qualitativo) e cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização por chama (D_IC) (quantitativo) (Anexo I).

2.3 Preparação das suspensões com nematoides

Para preparação da suspensão com NEPs, foi feita contagem de 10 alíquotas de 10 µL obtidas a partir de 20 mL de suspensão aquosa de nematoides estocadas em garrafa de cultivo celular de 40 mL, mantidas em câmara climatizada (18±1°C) por período inferior a 15 dias. Em seguida foi calculada a média de juvenis infectante (JIs) por amostra e a partir desta média, as suspensões foram ajustadas para concentração de 300 JIs/mL.

2.4 Preparação da solução com o óleo essencial

Para preparação da solução contendo o óleo essencial de *L. sidoides*, 200 µL do óleo foi pipetado em tubo Falcon contendo 4,8 mL de tween 80 a 3% (tween 80 e água destilada v/v). Na sequência o conteúdo foi agitado em vortex até a homogeneização da solução

2.5 Experimento – Associação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP1 com o óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Fêmeas ingurgitadas com pesos previamente homogêneos ($p > 0,05$) foram divididas em seis grupos contendo 10 carrapatos (cada fêmea = unidade experimental) (Figura 1A). No grupo tratado apenas com nematoides, cada fêmea foi pesada (Figura 1B) e colocada em uma placa de Petri (6x6 cm) previamente forrada com duas folhas de papel de filtro. Na sequência foi feita a aplicação de 1,0 mL de solução com a concentração de 300 JIs por fêmea (Figura 1C). No grupo tratado com o óleo, as fêmeas foram imersas por cinco minutos (Figura 1D) em solução do óleo com a concentração de 4% (v/v), sendo em seguida colocadas sobre duas folhas de papel toalha para absorção do excesso do líquido (Figura 1E). Em seguida, cada fêmea foi pesada (Figura 1B) e acondicionada em uma placa de Petri (6x6 cm) forrada com duas folhas de papel de filtro molhado com 1,0 mL de água destilada. Nos grupos tratados com a associação NEPs + *L. sidoides*, as fêmeas foram imersas em solução de óleo (40,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e na sequência, transferidas para as placas de Petri para adição dos NEPs (300 JIs/fêmea). No grupo controle, as fêmeas foram imersas por cinco minutos em Tween 80[®] (30 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e em seguida, colocados individualmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro. Foram formados seis grupos, a saber: grupo com fêmeas tratadas com *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1, óleo de *L. sidoides*, associação óleo + *H. bacteriophora* HP88, associação óleo + *H. indica* LPP1 e grupo controle.

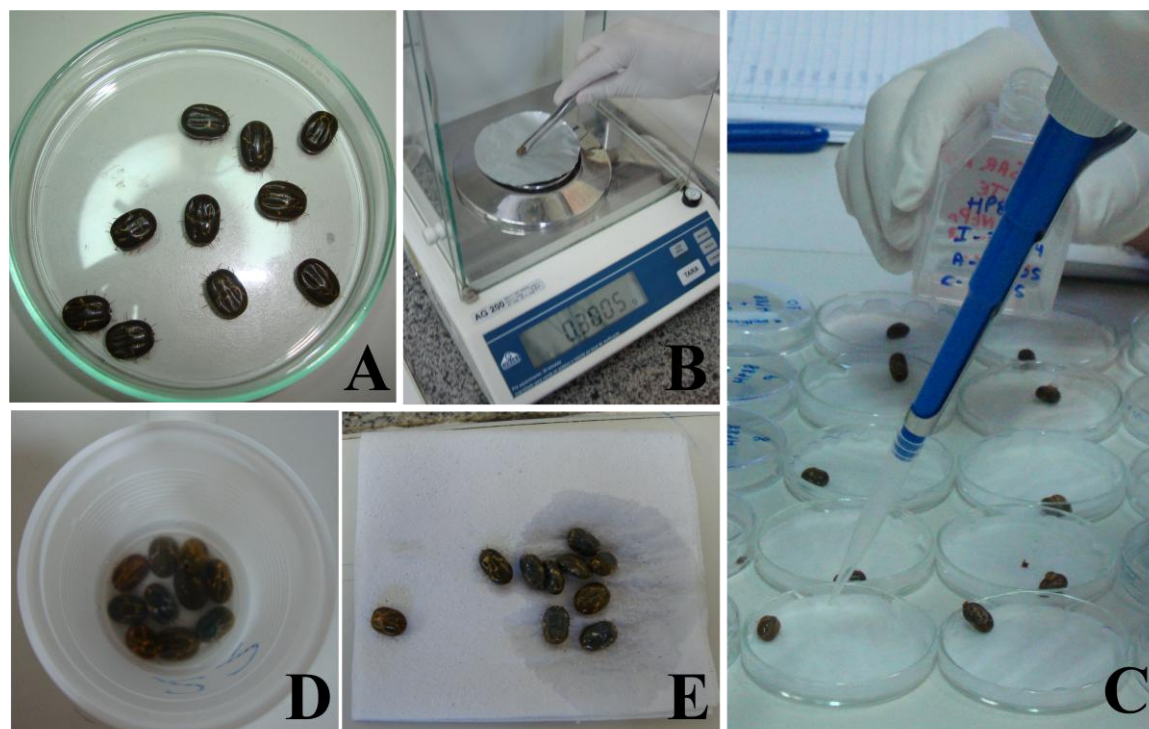


Figura 1. A: Grupo com dez fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*; B: Fêmeas ingurgitadas sendo pesadas individualmente; C: Adição de 1 mL de NEPs na concentração de 300 JIs em placas de Petri com as fêmeas ingurgitadas; D: Fêmeas imersas no óleo de *Lippia sidoides* na concentração de 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$; E: Fêmeas ingurgitadas sobre folhas de papel para retirada do excesso do óleo.

As placas de Petri de todos os grupos foram vedadas com parafilme durante três dias para manter o papel de filtro úmido, mantendo condições adequadas para os NEPs. Passado esse tempo, o parafilme junto com as folhas de papel filtro foram retirados. Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\pm 10\%$ UR) e a coleta de postura foi feita diariamente até a morte do último carrapato. As massas de ovos de cada fêmea foram acondicionadas em tubo de ensaio de 10 mL devidamente identificadas, vedados com algodão hidrófilo e mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão de larvas. A partir desses valores foi feito o cálculo do percentual de controle (DRUMMOND et al., 1973) (Anexo H).

2.6 Análise estatística

Para realização da análise estatística dos experimentos, foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. As médias dos diferentes parâmetros foram comparadas por teste não paramétrico de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão listados os constituintes químicos e seus respectivos percentuais e índices de retenção do óleo essencial de *L. sidoides*. Foi possível determinar 98,47% da composição química do óleo. O óleo de *L. sidoides* apresentou nove hidrocarbonetos monoterpênicos (21,01%), oito monoterpênicos oxigenados (72,21%), quatro hidrocarbonetos sesquiterpênicos (4,70%) e um sesquiterpeno oxigenado (0,55%), sendo o timol o constituinte majoritário (69,91%) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química, índice de retenção (IR_c) e percentual de compostos identificados do óleo essencial de *Lippia sidoides**.

Compounds	IR _c	%
<u>Hidrocarbonetos monoterpênicos</u>		21,01
α-Tujeno	930	0,16
α-Pineno	938	0,74
β-Pineno	986	0,12
Mirceno	994	3,57
δ-(3)-Careno	1012	0,17
α-Terpineno	1022	0,78
<i>o</i> -Cimeno	1035	14,84
<i>E</i> -β-Ocimeno	1052	0,04
γ-Terpineno	1065	0,59
<u>Monoterpenos oxigenados</u>		72,21
6,7-Epoximirceno	1095	0,20
Linalol	1102	0,23
Ipsdienol	1164	0,12
4-Terpineol	1188	0,16
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1198	0,26
α-Terpineol	1202	0,49
Timol metil éter	1236	0,84
Timol	1315	69,91
<u>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</u>		4,70
α-Ylangeno	1385	0,11
<i>E</i> -Cariofileno	1433	4,04
α-Humuleno	1467	0,21
Viridifloreno	1487	0,34
<u>Sesquiterpenos oxigenados</u>		0,55
Óxido de cariofileno	1597	0,55
Total		98,47

*Essa amostra do óleo essencial foi previamente caracterizada em estudo publicado por Gomes et al. (2014).

Os valores referentes ao peso médio das fêmeas antes da postura variaram entre 234,5 e 238,0 mg, sendo estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). O peso da massa de ovos dos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 e óleo essencial de *L. sidoides* foram de 4,4; 9,3 e 69,7 mg, respectivamente, sendo estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) entre si e diferindo ($p < 0,05$) do valor observado no grupo controle (127,9 mg). Nos tratamentos utilizando *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 associados ao óleo essencial de *L. sidoides*, os valores observados foram de 1,8 e 1,0 mg, respectivamente, sendo constatada diferenças significativas ($p < 0,05$) para o grupo tratado apenas com o óleo essencial e também para o controle (Tabela 2).

O percentual de eclosão obtido no grupo tratado com o óleo essencial de *L. sidoides* foi de 81%, sendo estatisticamente semelhante ao valor observado para o controle (91,7%). Os valores verificados para os tratamentos com *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 e *H. bacteriophora* HP88 + *L. sidoides*, resultaram em redução significativa ($p < 0,05$) no percentual de eclosão, sendo observados valores entre 59,0 a 18,7%. No grupo tratado com *H. indica* LPP1 + *L. sidoides* não foi verificado a eclosão de nenhuma larva (Tabela 2). A utilização do óleo de *L. sidoides* na concentração de 40,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ resultou em percentual de controle de 50,8%. Nos demais tratamentos, o percentual de controle foi de 95 e 98% nos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1, chegando a 99% e 100% nos tratamentos com *H. bacteriophora* HP88 + *L. sidoides* e *H. indica* LPP1 + *L. sidoides*, respectivamente (Figura 1).

Tabela 2. Peso da fêmea antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão larval de *Rhipicephalus microplus* tratados com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis indica* LPP1 na concentração de 300 NEPs/carrapato, associados ou não ao óleo essencial de *Lippia sidoides* na concentração de 40,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e Umidade Relativa de $80 \pm 10\%$) (Valores da média \pm desvio padrão).

	Peso da fêmea antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Percentual de eclosão (%)	⁺ Percentual de controle (%)
Controle	238,0 ^a \pm 37,8 (10)	127,9 ^a \pm 29,1 (10)	91,7 ^a \pm 12,1 (10)	
HP88	235,6 ^a \pm 40,2 (10)	4,4 ^{bc} \pm 3,2 (10)	41,7 ^{bc} \pm 38,8 (3)	98,3
LPP1	235,0 ^a \pm 40,2 (10)	9,3 ^{bc} \pm 8,0 (10)	59,0 ^{bc} \pm 35,1 (5)	95,1
<i>L. sidoides</i>	234,5 ^a \pm 34,4 (10)	69,7 ^b \pm 51,4 (10)	81,0 ^{ab} \pm 17,0 (7)	50,7
HP88 + <i>L. sidoides</i>	235,5 ^a \pm 26,7 (10)	1,8 ^c \pm 2,9 (10)	18,7 ^c \pm 34,3 (4)	99,7
LPP1 + <i>L. sidoides</i>	234,9 ^a \pm 43,3 (10)	1,0 ^c \pm 2,5 (10)	0,0 [*] \pm 0,0 (2)	100

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

() – Tamanho da amostra

*- Análise estatística não realizada devido ao tamanho reduzido da amostra.

⁺ - Calculado segundo Drummond et al. (1973).

HP88 = *Heterorhabditis bacteriophora*

LPP1 = *Heterorhabditis indica*.

4 DISCUSSÃO

Sabe-se que alguns produtos químicos interferem na viabilidade dos NEPs, podendo comprometer a eficiência desses organismos como agentes de controle biológico. Dessa forma, torna-se importante avaliar a compatibilidade entre NEPs e diferentes agentes químicos, permitindo selecionar substâncias adequadas para o uso em conjunto no manejo integrado de pragas (ALVES et al., 1998). Além disso, muitas vezes os agentes de controle

biológico e substâncias de origem vegetal apresentam elevada eficácia em laboratório, entretanto, os mesmos resultados não são observados em testes *in vivo*; assim, a associação desses dois métodos de controle a campo pode apresentar efeito aditivo ou sinérgico, aumentando a chance de sucesso no estabelecimento de métodos alternativos de controle de pragas. Tal fato foi observado por Dolinski et al. (2012) através da utilização em conjunto de NEPs com torta de neem para o controle de *C. psidii* em plantações de goiaba.

O óleo essencial de *L. sidoides* na concentração 40,0 µL/mL apresentou atividade sobre *R. microplus*, causando redução na postura produzida pelas fêmeas ingurgitadas, resultando em percentual de controle de 50%. Entretanto, a viabilidade dos ovos não foi significativamente afetada. O óleo essencial de plantas do gênero *Lippia* tem demonstrado atividade sobre diferentes espécies de microorganismos e invertebrados (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010; TELES et al., 2010; SHUKLA et al., 2011; KHANI et al., 2012; SARRAZIN et al., 2012). Em carrapatos, já foi evidenciado atividade do óleo essencial de *Lippia graveolens* Kunth (Verbenaceae) (MARTINEZ-VELAZQUEZ et al., 2011), *L. sidoides* (GOMES et al., 2012), *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) (LAGE et al., 2013) e *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) (CRUZ et al., 2013) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Essa atividade é atribuída principalmente a presença de timol e carvacrol, que são monoterpenos isoméricos presentes em conjunto ou isoladamente na composição química do óleo essencial de plantas desse gênero.

No presente estudo, a atividade carrapaticida pode ser atribuída ao alto teor de timol encontrado na composição química do óleo essencial de *L. sidoides*, uma vez que esse monoterpeno puro já teve sua atividade demonstrada para diferentes estágios de *R. microplus* (NOVELINO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2010a; CRUZ et al., 2013), *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) (DAEMON et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009) *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) (MENDES et al., 2011; SENRA et al., 2013b) e *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) (DAEMON et al., 2012). Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho para eficácia do óleo essencial de *L. sidoides* são inferiores aos obtidos por Gomes et al. (2012) que utilizando a mesma concentração do óleo, observaram redução da quantidade e viabilidade dos ovos, resultando em percentual de controle de 72%. A diferença encontrada pode estar relacionada com a presença do carvacrol na composição do óleo utilizado por Gomes et al. (2012) e ausência na amostra utilizada no presente estudo. Esse monoterpeno, isômero do timol, já teve sua atividade carrapaticida evidenciada para *R. microplus*, *D. nitens*, *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, 1940 (Acari: Ixodidae), *Ixodes scapularis* Say, 1821 (Acari: Ixodidae), *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758) (Acari: Ixodidae), e *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) (COSKUN et al., 2008; CETIN et al., 2009; DOLAN et al., 2009; CETIN et al., 2010; SENRA et al., 2013a; SENRA et al., 2013b) e a presença do carvacrol juntamente com timol na amostra de Gomes et al. (2012) pode ter potencializado a sua atividade acaricida. Também foi observado que a associação desses monoterpenos apresentou efeito sinérgico sobre o nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) (Tylenchida: Heteroderidae) (NTALLI et al., 2011).

A diferença na eficácia do óleo *L. sidoides* também pode ter sido influenciada pela diferença na susceptibilidade das cepas de carrapatos utilizadas, uma vez que populações diferentes podem apresentar respostas variadas a um agente de controle, como demonstrado a respeito da susceptibilidade de diferentes populações de *R. microplus* para fungos entomopatogênicos em estudos desenvolvidos por Fernandes et al. (2011) e Perinotto et al. (2012). No presente estudo foram utilizados carrapatos da colônia do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, enquanto Gomes et al. (2012)

utilizaram carrapatos da colônia da Embrapa Gado de Leite (cepa sensível Porto Alegre - POA).

A utilização dos nematoides causou redução na prole de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, diminuindo a quantidade e viabilidade dos ovos produzidos, resultando em percentual de controle superior a 95% para as duas espécies de NEPs. A alta eficiência dos NEPs testados já era esperada uma vez que *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram apontadas até o momento como as espécies mais virulentas para *R. microplus* (MONTEIRO et al., 2010b; SILVA et al., 2012). Em testes *in vitro* com essas espécies foram obtidos percentuais de controle superior a 90% a partir da concentração de 75 JIs/fêmea (MONTEIRO et al., 2010b; SILVA et al., 2012), superando os resultados obtidos para outros NEPs como *S. carpocasiae* isolados All e Santa Rosa, *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929), isolado Santa Rosa e CCA, *Steinernema diaprepesi* Nguyen & Duncan, 2002, *H. bacteriophora* CCA e *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. 2006, isolado RSC-5 (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; MOLINA-OCHOA et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010c).

Na associação do óleo de *L. sidoides* com as duas espécies de nematoides foram observados valores de percentual de controle semelhantes aos obtidos para a utilização apenas dos NEPs e superiores ao obtido com a utilização apenas do óleo. Cabe destacar que no grupo tratado com *L. sidoides* + *H. indica* LPP1 a eficácia foi de 100%, uma vez que os poucos ovos produzidos foram inférteis, não sendo observada a eclosão de nenhuma larva. Sabe-se que o óleo de *L. sidoides* assim como seu componente majoritário (timol) apresenta atividade contra diferentes espécies de nematoides (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; NTALLI, 2009; CARVALHO et al., 2012). Entretanto, o óleo impregnado na cutícula das fêmeas não repeliu os JIs e aparentemente não causou nenhum efeito negativo sobre a associação nematoide e bactéria, uma vez que as fêmeas mortas nos tratamento com o óleo associado aos NEPs apresentavam sinais de infecção. Tal fato pode estar relacionado ao pouco tempo de contato que os JIs tiveram com óleo enquanto se locomovem sobre a fêmea ingurgitada até penetrarem pelos orifícios naturais e por rompimento da cutícula.

A ordem em que os carrapatos foram expostos aos agentes de controle reflete uma das possibilidades de aplicação em conjunto do óleo e dos nematoides em “*vivo*”, uma vez que as fêmeas de *R. microplus* teriam primeiramente contato com o óleo através da aspersão de concentrados emulsionáveis do óleo sobre bovinos infestados, e após desprenderem do bovino, entrariam em contato com os JIs presentes no solo. O fato das fêmeas impregnadas com o óleo terem sido infectadas pelos nematoides demonstra que os métodos foram compatíveis e permite vislumbrar que o mesmo poderia ser reproduzido a campo, com a realização de banhos dos bovinos com produtos a base do óleo de *L. sidoides* ou de timol e aplicação dos nematoides nas pastagens simultaneamente. A aplicação em conjunto do óleo essencial de *L. sidoides* com os NEPs na pastagem ou sobre o animal também pode ser uma alternativa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.

ALVES, S.B.; MOINO-JR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos In: ALVES, S.B. (eds). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FAPESP & FEALQ. 1998. p. 217-239.

AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p. 148-154, 2011a.

AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.H.; 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, 2011b.

ANASTASIADIS, I.; KIMBARIS, A.C.; KORMPI, M.; POLISSIOU, M.G. The effect of a garlic essential oil component and entomopathogenic nematodes on the suppression of *Meloidogyne javanica* on tomato. **Hellenic Plant Protection Journal**. v. 4, p.21-24, 2011.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**. v. 148, p. 288–294, 2007.

CARVALHO, C.O.; CHAGAS, A.C.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L.G.; CHAVES, F.C.; STEPHAN, M.P.; BIZZO, H.R.; AMARANTE, A.F. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**. v. 183, p. 260-268, 2012.

CAVALCANTI, S.C.H.; NICULAU EDOSS, BLANK, A.F.; CÂMARA, C.A.G.; ARAÚJO I.N.; ALVES, P.B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**. v. 101, p. 829-832, 2010.

CETIN, H.; CILEK, J.E.; AYDIN, L.; YANIKOGLU, A. Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* against *Rhipicephalus turanicus*. **Veterinary Parasitology**. v. 160, p. 359–361, 2009.

CETIN, H.; CILEK, J.E.; OZ, E.; AYDIN, L.; DEVECI, O.; YANIKOGLU, A. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 287–290, 2010.

COSKUN, S.; GIRISGIN, O.; KÜRKCÜOĞLU, M.; MALYER, H.; GIRISGIN, A.O.; KIRIMER, N.; BASER, K.H. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 103, p. 259–261, 2008.

CRUZ, E.M.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.; SANTOS, D.A.; ARAÚJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 105, p. 495–497, 2013.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; ROSA, L.S.; CLEMENTE, M.A.; ARCOVERDE, A. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 105, p. 495–497, 2009.

DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C.M.O.; SCORALIK, M.; MASSONI, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**. v. 186, p. 542–545, 2012.

DOLAN, M.; JORDAN, R.A.; SCHULZE, T.L.; SCHULZE, C.J.; CORNELL, M.; RUFFOLO, D.; SCHMIDT, J.P.; PIESMAN, J.; KARCHESY, J. Ability of two natural products, nootkatone and carvacrol, to suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme disease endemic area of New Jersey. **Journal of Economy Entomology**. v. 102, p. 2316–2324, 2009.

DOLINSKI, C. Uso de entomopatogénicos nematodos para o controle de pragas. In: VENZON, M.; PAULA JR, T.J.; PALLINI, A. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças**, Viçosa, UFV. 2006. p. 261–289.

DOLINSKI, C.; CHOO, H.Y.; DUCAN, L.W. Grower acceptance of entomopathogenic nematodes: Case studies on three continents. **Journal of Nematology**. v. 44, p. 226–235, 2012.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, p. 30–133, 1973.

ESCOBAR, P.; LEAL, .SM.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, p. 184–190, 2010.

FERNANDES, É.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, Á.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 182, p. 307–318, 2011.

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

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O.; DOLINSKI, C.; RIBEIRO, A.L. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL Strains (*Steinernema*: Rhabditidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 911–919, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 23, p. 53–56, 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 27, p. 53–56, 2007.

GREWAL, P.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**. v. 19, p. 245-253, 1994.

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

GOMES, G.A.; MONTEIRO, C.M.O.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R.S.; GOIS, R.W.S.; DAEMON, E.; SANTIAGO, G.M.P.; CARVALHO, M.G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 111, p. 2423-2330, 2012.

KAYA, H.K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic, CA. 1997. p. 281–324.

KHANI, A.; BASAVAND, F.; RAKHSHANI, E. Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil. **Journal of Crop Protection**. v. 1, p. 313-320, 2012.

KOPPENHOFER, A.M.; GREWAL, P.S. Compatibility and Interaction with agrochemicals and biocontrol agents. In: GREWAL, P.S.; EHILERS, R.U.; SHAPIRO, D.I. Nematodes as biocontrol agents. Cambridge: CABI: Publishing Cambridge. 2005. p.364-381.

KRISHNAYYA, P.V.; GREWAL, P.S. Effect of Neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Biocontrol and Science Technology**. v. 12, p. 259-266, 2002.

LACOSTE, E.; CHAUMONT, J.P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M.M.; MATOS, F.J. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v. 54, p. 228-230, 1996.

LAGE, T.C.A.; MONTANARI, R.M.; FERNANDES, S.A.; MONTEIRO, C.M.O.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R.S.M.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. p. 112, p. 863–869, 2013.

LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; BARBOSA, R.C.S.B.; LIMA, E.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia** v. 63 ,p. 266–268, 1992.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; CARVALHO, S.M.; RODRIGUES, V.G.; GUIMARAES, L.G.L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**. v. 35, p. 664-671, 2011.

LIMA, G.P.G.; SOUZA, T.M.; PAULA FREIRE, G.; FARIAS, D.F.; CUNHA, A.P.; RICARDO, N.M.P.S.; MORAIS, S.M.; CARVALHO, A.F.U. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**. v. 112, p. 1953-1958, 2013.

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

MACIEL, M.D.O.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ALBUQUERQUE, E.; SILVA, R.; BARROS, R.S.; SOUSA, R.N.; SOUSA, L.C.D.E.; BRITO, E.S.; SOUZA NETO, M.A. Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* sobre *Lutzomyia longipalpis*. **Ciência Animal**. v. 19, p. 77-87, 2009.

MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A.; SOUZA, M.P.; MATOS, M.E.O., MACHADO, M.I.L. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Editora UFC. 2004.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; CASTILLO-HERRERA, G.; FLORES-FERNANDEZ, J.M.; ALVAREZ, A.H.; LUGO-CERVANTES, E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 48, p. 822-7, 2011.

MENDES, A.S.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; BRITO, F.C.; MASSONI, T. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 183, p. 136–139, 2011.

MOLINA-OCHOA, J.; NGUYEN, K.B.; GONZÁLEZ-RAMIREZ, M.; QUINTANA-MORENO, M.G.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; FOSTER, E.F. *Steinernema diaprepesi* (Nematoda: Steinernematidae): Its occurrence in Western México and Susceptibility of engorged cattle ticks *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Florida Entomologist**. v. 92, p. 660-663, 2009.

MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; CLEMENTE, M.A.; ROSA, L.S.; MATURANO, R. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 105, p. 1093–1097, 2009.

MONTEIRO, C.M.O.; DAEMON, E.; SILVA, A.M.R.; MATURANO, R.; AMARAL, C.D. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 106, p. 615-619, 2010a.

MONTEIRO, C.M.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; SOARES, A.E.; BATISTITA, E.S.P.; DOLINSKI, C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 355–358, 2010b.

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; FAZZA, A.P.; SILVA, A.M.R.; ANDALÓ, V.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 106, p. 821–826, 2010c.

MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JR, F.E.A.; CALMON, F.; SENRA, T.O.S.; FAZZA, A.P.; CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**. v. 111, p. 1295-1300, 2012a.

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

NOVELINO, A.M.S.; DAEMON, E.; SOARES, G.L.G. Evaluation of acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**. v. 101, p. 809–811, 2007.

NTALLI, N.G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management of Science**. v. 67, p. 341–351, 2011.

PERINOTTO, W.M.S.; ÂNGELO, I.C.; GOLO, P.S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M.G.; SÁ, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**. v. 130, p. 257–260, 2012.

REIS-MENINI, C.M.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; SILVA, E.R. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 103, p. 1391-1396, 2008.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: BOWMAN, A.S., NUTTALL, P.A. (Eds). **Ticks: Biology, Disease and Control**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. p. 447–469.

SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal

activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 112, p. 1461-1466, 2013a.

SENRA, T.O.S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.O.M.; MATURANO, R.; MATOS, R.S.; MELO, D.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. DOI 10.1007/s00436-013-3527-8, 2013b.

SARRAZIN, S.L.F.; OLIVEIRA, R.B.; BARATA, L.E.S.; MOURÃO, R.H.V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**. p. 134, v. 147-1478, 2012.

SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. Efficacy of essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown and *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet and their major constituents on mortality, oviposition and feeding behaviour of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, p. 2277-83, 2011.

SILVA, E.R.; MONTEIRO, C.M.O.; REIS-MENINE, C.; PRATA, M.C.A.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biological Control**. v. 62, p. 140-143, 2012.

TELES, T.V.; BONFIM, R.R.; JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ARAÚJO, A.A.S. Composition and evaluation of the lethality of *Lippia gracilis* essential oil to adults of *Biomphalaria glabrata* and larvae of *Artemia salina*. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 8800-8804, 2010.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatograph**. v. 11, p. 463-471, 1963.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; PRATA, M.C.A. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 94, p. 201–206, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

CAPÍTULO I

1. *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis indica* LPP1, *Steinernema feltiae* SN e *Steinernema carpocapsae* ALL em formulação inseto cadáver, sob condições controladas, apresentam patogenicidade para fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.
2. A ação dos JIs desses isolados reduziram a quantidade e viabilidade de ovos produzidos pelas fêmeas ingurgitadas.
3. Entre os isolados testados, os nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* em formulação inseto cadáver apresentam melhor eficácia para contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
4. *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 apresentaram melhor eficácia sobre *R. microplus* quando formulados em lagartas de *Galleria mellonella*.
5. *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 formulados em larvas de *Tenebrio molitor* apresentam eficácia sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo uma alternativa para formulação desses isolados.

CAPÍTULO II

6. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 apresenta alta virulência para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e ninfas de *Mahanarva spectabilis*, apresentando potencial para ser utilizado no controle em conjunto desses dois artrópodes.
7. O aumento da densidade de hospedeiros com a presença de *M. spectabilis* e *G. mellonella* resulta em efeito positivo sobre a eficácia de *H. baujardi* LPP7 sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
8. A eficácia de *H. baujardi* LPP7 para *M. spectabilis* não se altera na presença de *G. mellonella* ou *R. microplus*.
9. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 multiplicados em *M. spectabilis* e *G. mellonella* apresentaram virulência similar para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
10. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 nas concentrações de 400 e 800 JIs/carrapato apresentou eficácia similar sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

CAPÍTULO III

11. Juvenis infectantes de *H. bacteriophora* LPP30 multiplicados em larvas de *T. molitor* foram altamente virulentos para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em testes *in vitro*.
12. A ação dos juvenis infectantes de todos os isolados testados em condições semi-naturais causaram redução na quantidade de ovos produzidos por fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
13. Em condições semi-naturais, *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7 foram os isolados que apresentaram melhor eficácia sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.
14. A eficácia de *H. bacteriophora* LPP30 apresentada nos testes em condições semi-naturais foi inferior ao verificado em testes *in vitro*.
15. *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7 permaneceram ativos por mais de 65 dias no solo, sendo capazes de infectar fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após esse período.

CAPÍTULO IV

16. A população de *R. microplus* proveniente do município de Edéia, Goiás apresentou baixa sensibilidade aos princípios ativos carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós, enquanto a população de Pato de Minas, Minas Gerais, apresentou baixa sensibilidade a deltametrina e amitraz.
17. Nas concentrações testadas, os princípios ativos deltametrina, amitraz e clorfenvinfós foram compatíveis com *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 em condições de laboratório.
18. Na população resistente a deltametrina, a associação de *H. bacteriophora* HP88 com esse princípio ativo reduziu a eficácia do nematoide.

CAPÍTULO V

19. Nas concentrações testadas, o desempenho de *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foi superior ao constatado para os fungos *Metharizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 em condições de laboratório.
20. *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1, *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 nas concentrações testadas são compatíveis em condições de laboratório.
21. Os fungos *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 conseguem se desenvolver e reproduzir mesmo em fêmeas ingurgitadas infectadas por *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1.

22. O contato das fêmeas com os fungos *M. anisopliae* IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 24 horas antes da exposição aos nematoides *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 não interferiu na associação entre os entomopatógenos.

CAPÍTULO VI

23. O óleo essencial de *Lippia sidoides* na concentração de 4% apresenta atividade para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, no entanto, a eficácia obtida com a utilização de *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 é superior.
24. O óleo de *L. sidoides* rico em timol e os nematoides *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1 nas concentrações testadas são compatíveis em condições de laboratório.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) é feito principalmente com a aplicação de carrapaticidas sobre bovinos infestados. O desenvolvimento de métodos de controle biológico com a aplicação de NEPs na pastagem permitirá atingir esse carrapato em outro momento do seu ciclo de desenvolvimento. Assim, a associação dos métodos biológicos e químicos no manejo integrado de carrapatos poderá reduzir a dependência atual que existe em relação aos carrapaticidas. Tal fato poderá permitir a redução no número e no intervalo dos banhos utilizados atualmente, reduzindo a pressão de seleção, e conseqüentemente, retardando o surgimento de populações resistentes aos carrapaticidas. Além disso, a menor dependência dos carrapaticidas reduz risco de intoxicação de animais e do homem e contaminação de alimentos e ambiente.

O método de aplicação dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) apresenta grande importância para obtenção de resultados satisfatórios no controle de uma determinada praga. No primeiro estudo foi demonstrado que os quatro isolados testados em formulação inseto cadáver foram patogênicos para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a utilização de NEPs do gênero *Heterorhabditis*. Ainda nesse estudo, a comparação entre a aplicação de NEP formulados em cadáveres de diferentes insetos, revelou que a formulação em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepdoptera: Pyralidae) apresentou resultado superior ao obtido com a utilização de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Os carrapatos são hospedeiros acidentais de NEPs, uma vez que os JIs morrem logo após penetrarem na fêmea ingurgitada, não dando continuidade no ciclo. Assim, a aplicação de NEPs na pastagem poderia ter sua eficácia comprometida devido a presença de outros insetos susceptíveis a infecção, fazendo com que os JIs fossem mais fortemente atraídos para infectar esses insetos. Os resultados do segundo capítulo demonstraram que a presença de outros hospedeiros, ao contrário do que se esperava, potencializou a eficácia de *Heterorhabditis baujardi* Phan et al. 2003 (Rhabditida: Heterorhabditidae), LPP7 sobre carrapatos. Também foi possível verificar que a utilização dos NEPs na pastagem pode ser uma alternativa para o controle simultâneo do carrapato dos bovinos e da cigarrinha das pastagens, *Mahanava spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae), duas das pragas que representam grandes entraves para bovinocultura. Também foi verificado que a multiplicação dos NEPs nas cigarrinhas pode propiciar manutenção dos JIs viáveis no ambiente.

Embora os estudos *in vitro* sejam de fundamental importância, permitindo selecionar as espécies com maior capacidade de infectar determinado artrópode, nem sempre os resultados em laboratório com base nessas seleções se repetem nos testes *in vivo*. No terceiro capítulo, os isolados *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1975) (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP88 e *H. baujardi* LPP7 aplicados em formulação inseto cadáver foram altamente eficazes em condições semi-naturais, causando inibição de postura superior a 90%, resultados similares aos observados anteriormente em laboratório. Já para os isolados *H. bacteriophora* LPP30 e *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 (Rhabditida: Heterorhabditidae), LPP1, foi observado o contrário, uma vez que ocorreu queda na eficácia desses isolados em condições semi-naturais. Ainda nesse capítulo, foi verificado que os JIs de *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7 permaneceram ativos por mais de 65 dias no ambiente, sendo capazes de infectar as fêmeas ingurgitadas após esse período.

A utilização em conjunto de carrapaticidas e NEPs pode criar um cenário no qual as fêmeas ingurgitadas irão primeiramente entrar em contato com os carrapaticidas por meio do banho dos animais, e o contato com os NEPs acontecerá posteriormente, após o momento em

que as fêmeas se desprendem do bovino e caem no solo. Assim, existia uma dúvida se o fato das fêmeas estarem impregnadas com carrapaticidas teria algum efeito negativo sobre os JIs e sobre processo de infecção das fêmeas. Os resultados do capítulo IV demonstraram que os isolados *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram compatíveis com os carrapaticidas deltametrina, amitraz e clorfenvinfós, sendo capazes de infectar as fêmeas ingurgitadas impregnadas por essas substâncias. Em alguns casos, essas associações apresentaram efeito aditivo.

Os métodos de controle de *R. microplus* com a utilização de substâncias de origem vegetal ou com fungos entomopatogênicos ainda se encontram na fase de pesquisa. A maior parte dos estudos *in vivo* direciona a aplicação de fungos e óleos essenciais sobre bovinos infestados, assim como é feito com os carrapaticidas tradicionais. Dessa forma, nos capítulos V e VI os experimentos foram conduzidos seguindo o mesmo raciocínio dos experimento desenvolvidos no capítulo IV. Os resultados demonstraram que os isolados *H. bacteriophora* HP88 e *H. indica* LPP1 foram compatíveis com os fungos *Metharizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986 e com o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae).

Embora os resultados obtidos sejam animadores com respeito à utilização de NEPs para o controle do carrapato dos bovinos, uma série de estudos ainda se fazem necessários para validação desse método de controle, como avaliação dos NEPs em teste a campo e avaliação de outros métodos de aplicação e formulação. Também é necessária a realização de estudos sobre as interações ecológicas e comportamentais de JIs inseridos nesses ecossistemas e avaliação do efeito da aplicação dos NEPS sobre organismos não alvo.

ANEXOS

Anexo A. Criação de <i>Galleria mellonella</i>	152
Anexo B. Criação de <i>Tenebrio molitor</i>	154
Anexo C. Manutenção e multiplicação dos isolados de nematoides entomopatogênicos...	156
Anexo D. Manutenção e multiplicação dos isolados de fungos entomopatogênicos.....	158
Anexo E. Manutenção das colônias de carrapatos.....	160
Anexo F. Protocolo de aprovação do comitê de ética permitindo manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i> por meio de infestações artificiais em bezerros.....	163
Anexo G. Obtenção de amostras de carrapatos enviadas para realização de testes de sensibilidade de fêmeas ingurgitadas aos carrapaticidas na Embrapa Gado de Leite.....	165
Anexo H. Coleta de cigarrinha das pastagens.....	167
Anexo I. Fórmulas utilizadas para cálculo de eficácia dos tratamentos.....	169
Anexo J. Identificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	171
Anexo K. Artigo referente ao Capítulo I recomendado para publicação na <i>Veterinary Parasitology</i> após serem feitas as correções sugeridas pelos revisores.....	173
Anexo L. Artigo referente ao Capítulo V publicado na <i>Parasitology Research</i>	174
Anexo M. Artigo referente ao Capítulo VI publicado na <i>Parasitology Research</i>	175

Anexo A. Criação de *Galleria mellonella*

A colônia de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepdoptera: Pyralidae) foi mantida a partir de adultos recém-eclodidos colocados em recipientes plásticos (24x25 cm) com tampas aeradas, sendo adicionados papéis dobrados em forma de sanfona. Após o acasalamento, as fêmeas fecundadas fizeram postura nas dobras desses papéis. Em seguida, pedaços dos papéis contendo ovos foram recortados e transferidos para fôrmas metálicas contendo dieta artificial para nutrir as larvas provenientes desses ovos. As fôrmas ficaram acondicionadas em câmara climatizada ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR = $40\pm 10\%$) e foram vistoriadas diariamente para verificação dos estágios de desenvolvimento, limpeza do substrato e acréscimo de dieta. As lagartas foram mantidas nessas condições até chegarem ao último ínstar de desenvolvimento do estágio larval (7°). Ao chegarem nesse estágio de desenvolvimento, parte das lagartas foram utilizadas para multiplicação dos nematoides, enquanto outra parcela permaneceu acondicionada nas fôrmas metálicas, para dar origem a pupas, que são transferidas para outras bandejas para obtenção dos adultos. Essas bandejas são vistoriadas diariamente para transferência dos adultos para recipiente de plástico para dar continuidade no ciclo, permitindo a manutenção da colônia.

A dieta utilizada para alimentação das lagartas é composta de:

1. 120 g de açúcar mascavo;
2. 80 g de glicerol;
3. 400g de leite em pó;
4. 120g de levedo de cerveja;
5. 200g de farinha de trigo;
6. 200g de farelo de trigo (fibra de trigo);
7. 200g de gérmen de trigo.

Esses itens são misturados adicionados em recipiente de plástico até que os ingredientes formem uma mistura única. Além da dieta, também foi adicionado nas formas, pedaços de favo de mel alveolado que também são utilizados na alimentação pelas larvas.



Figura 1. Manutenção de colônia de *Galleria mellonella* – A: Recipiente plástico para acondicionamento dos adultos; B e C: Adultos de *G. mellonella* acasalando e fêmeas fazendo postura em pedaços de papéis; D e E: Papéis contendo ovos de *G. mellonella*; F e G: Formas metálicas contendo dieta, favo e larvas de *G. mellonella*; H: Larva do último ínstar de *G. mellonella*; I: Forma metálica com pupas de *G. mellonella* separadas para obtenção de adultos; J: Pupa de *G. mellonella*.

Anexo B. Criação de *Tenebrio molitor*

A colônia de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) foi mantida a partir de larvas colocadas em fôrmas metálicas e preenchida com dieta, sendo que essa fôrma deve ficar em local protegido da luz. As larvas são mantidas nesse recipiente até atingirem o último ínstar de desenvolvimento (8°). A dieta deve compor um substrato com aproximadamente 10 cm de altura e sendo trocado a cada 60 dias. Uma parcela das larvas dos últimos instares foi utilizada para multiplicação dos nematoides, enquanto outra parcela permaneceu no substrato dando origem as pupas.

As pupas foram transferidas para outra caixa de madeira contendo substrato. É importante manter larvas e adultos em recipientes separados, uma vez larvas podem matar os adultos e comerem os ovos. Nesse novo recipiente as pupas darão origem a adultos que vão acasalar, permitindo que as fêmeas façam a postura. A partir desses ovos tem-se o início de uma nova geração.

A dieta utilizada para alimentação é composta de:

500 g de ração de codorna.

500 g de ração de curió.

2 kg de farelo de trigo.

500 g de farelo de soja.

1,5 kg de ração de coelho.

200 g de feijão quebrado.

Esses itens são misturados adicionados em recipiente de plástico até que os ingredientes formem uma mistura única. Pedacos de pão também foram adicionados a mistura.

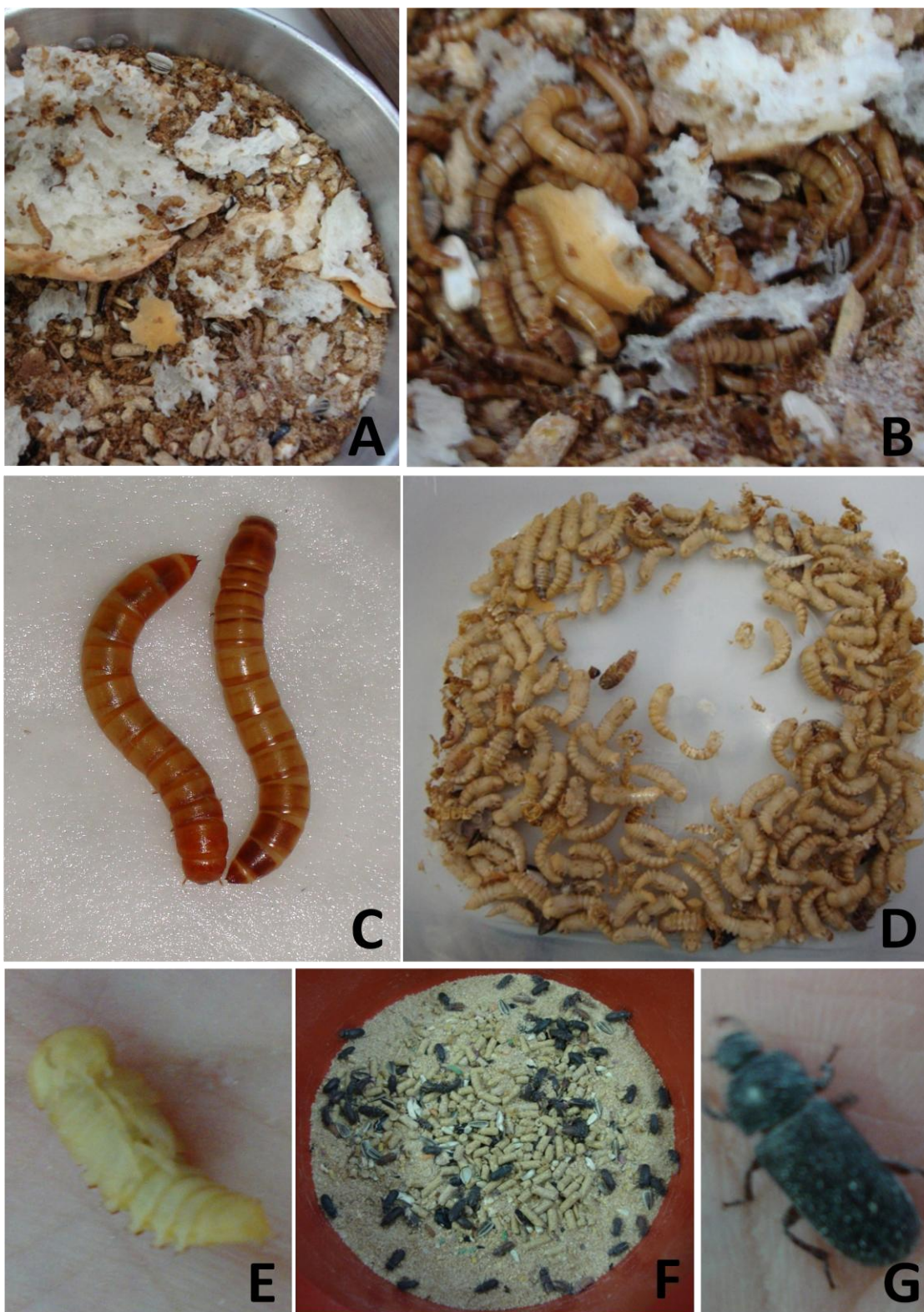


Figura 2. Criação de *Tenebrio molitor*. A e B: Forma metálica contendo dieta e larvas de *T. molitor*; C: Larvas de *T. molitor*; D: Pupas de *T. molitor* separadas em recipiente plástico; E: Pupa de *T. molitor*; F: Recipiente plástico contendo dieta e adultos de *T. molitor*. G: Adulto de *T. molitor*.

Anexo C: Manutenção e multiplicação dos isolados de nematoides entomopatogênicos

Para multiplicação dos isolados de nematoides foram utilizadas larvas dos últimos instares de *G. mellonella* ou *T. molitor*. Para isso, dois mL de suspensão aquosa contendo juvenis infectantes de cada isolado foi pipetada sobre placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo duas folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e 10 larvas de *G. mellonella* ou *T. molitor*. As placas foram vedadas com parafilme a fim de se evitar evaporação da água (câmara úmida) e entrada de outros microorganismos, permanecendo por 72h em câmara climatizada ($27\pm 1^\circ\text{C}$). Posteriormente, as larvas mortas e com sinais de infecção foram transferidas para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo uma folha de papel de filtro previamente esterilizada (câmara seca), permanecendo por mais 4 dias em câmara climatizada ($27\pm 1^\circ\text{C}$).

Após sete dias as larvas foram transferidas para armadilhas de “White” para coleta dos JIs. Essa armadilha é composta por uma placa de Petri (6 cm de diâmetro) coberta por uma folha de papel de filtro previamente esterilizado e disposto no centro de outra placa de Petri (12 cm de diâmetro) preenchida com uma pequena lâmina de água destilada. As larvas (*G. mellonella* ou *T. molitor*) são colocadas no topo da placa central coberta com papel de filtro. Os juvenis infectantes que deixam o cadáver dos insetos migram para lâmina de água da placa, e essa suspensão contendo nematoides é coletada e acondicionadas em garrafas de cultivo celular de 40 mL. Em cada garrafa foi colocado 20 mL de suspensão de nematoides com a concentração de aproximadamente 3000 JIs/mL.

As garrafas contendo nematoides foram mantidas em câmara climatizadas (18°C) sendo agitadas por 10 minutos em agitador mecânico, três vezes por semana, para fazer a oxigenação da água.

A renovação dos isolados foi feita mensalmente.

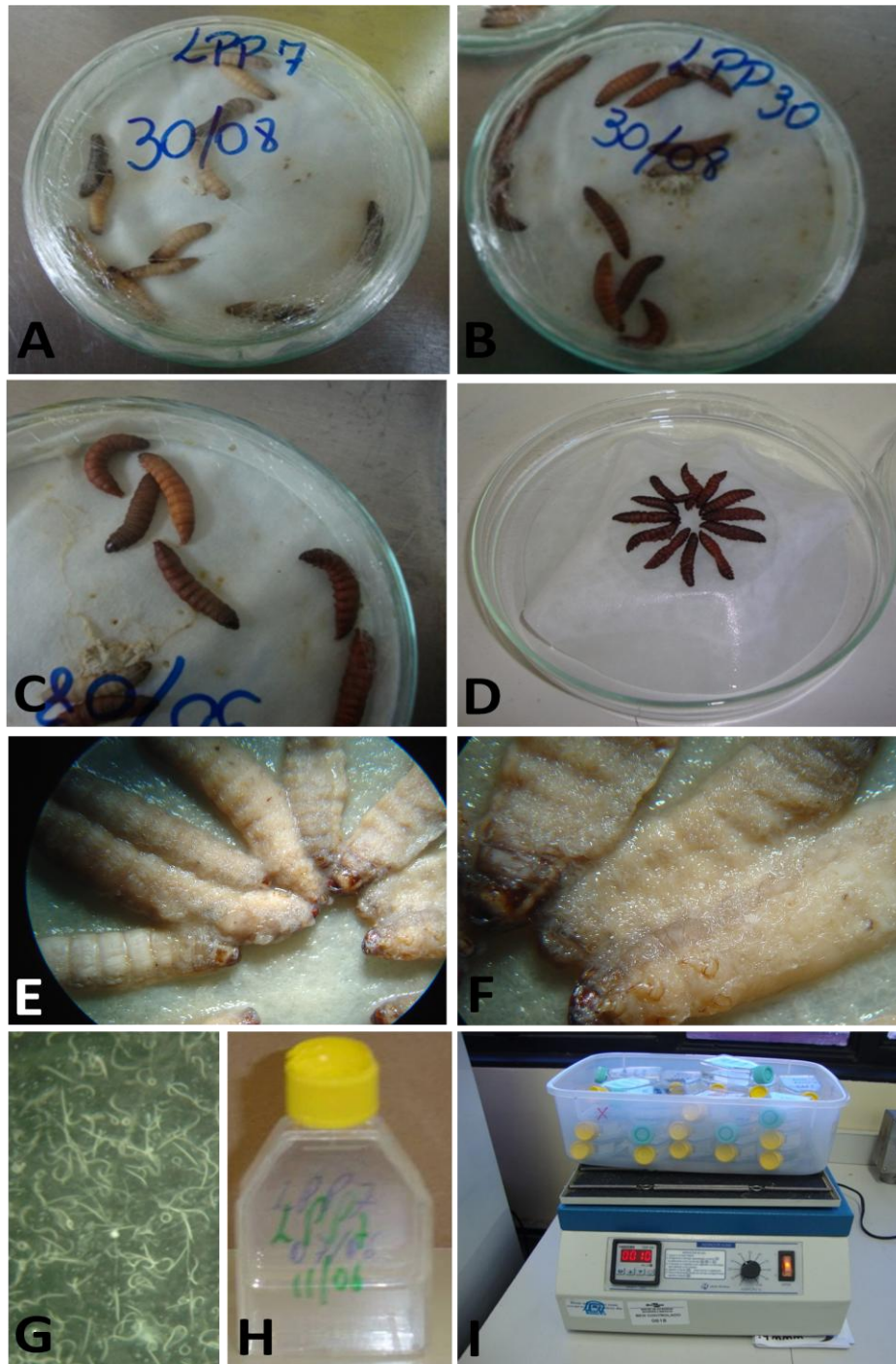


Figura 3. Manutenção e multiplicação dos isolados de NEPs – A: Larvas de *Galleria mellonella* em placas de Petri vedada com parafilme contendo duas folhas de papel de filtro esterilizado e juvenis infectantes de NEPs; B e C: Larvas mortas por NEPs do gênero *Heterorhabditis*; D: Armadilha de “White” para coleta de dos juvenis infectantes; E e F: Juvenis infectantes de NEPs do gênero *Steinernema* deixando o cadáver de larvas de *G. mellonella*; G: Juvenis infectantes na lâmina d’água da armadilha de White; H: Garrafa de cultivo celular contendo suspensão de NEPs; I: Garrafas de cultivo celular em agitado mecânico para oxigenação.

Anexo D. Manutenção dos isolados de fungos entomopatogênicos

Os isolados dos fungos entomopatogênicos utilizados são mantidos em câmara climatizada na micoteca do laboratório de Controle de Controle Microbiano, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. Esses isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR>80% durante 15 dias. Decorrido esse período, as placas foram armazenadas em câmara refrigerada sob temperatura de 5°C até a realização dos bioensaios.

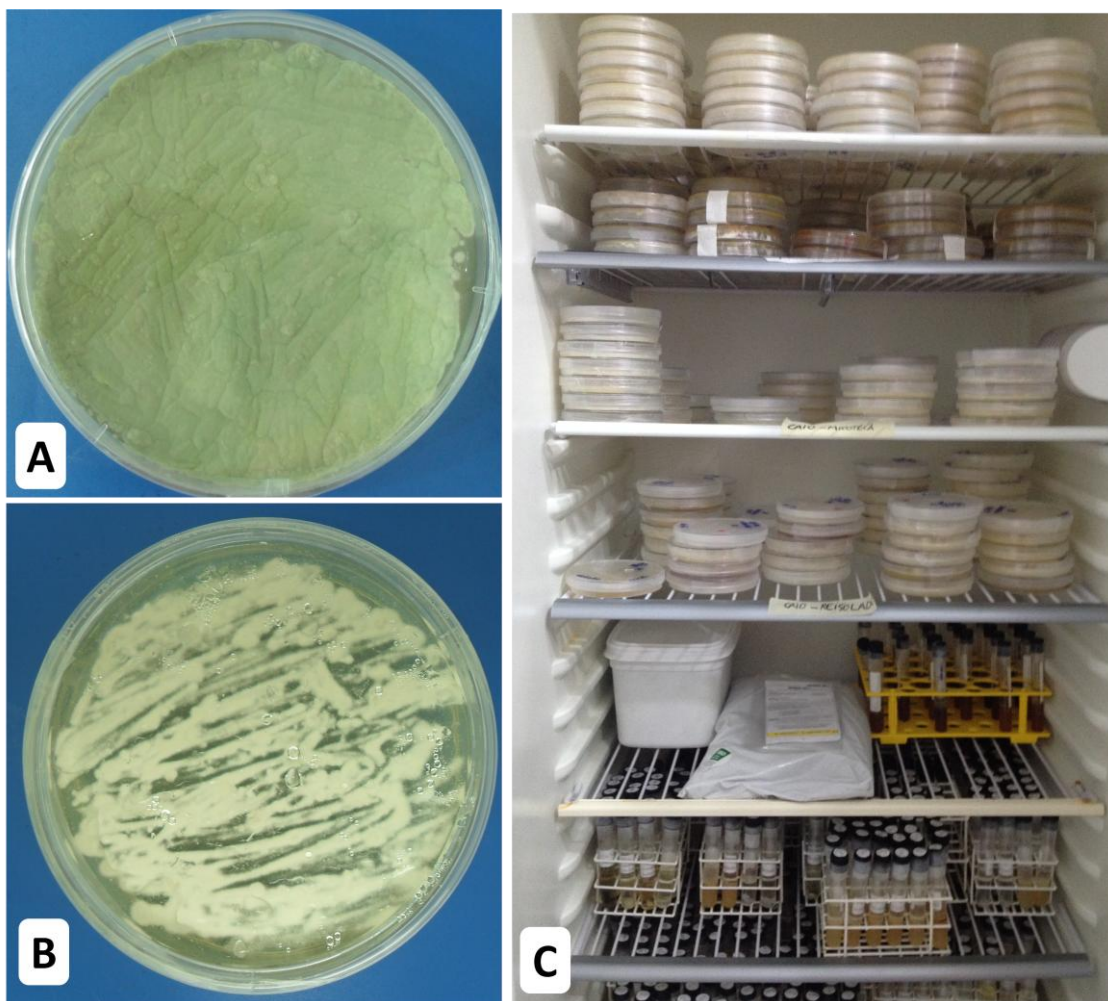


Figura 4. Manutenção dos isolados de fungos entomopatogênicos – A e B: Fungo *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA); C: Placas contendo fungos armazenadas em câmara refrigerada sob temperatura de 5°C.

Anexo E. Manutenção das colônias de *Rhipicephalus microplus*

Com exceção do capítulo IV, todos os outros experimentos foram feitos com a utilização de carrapatos de colônia mantidas através de infestações artificiais em bezerros mantidos na estação experimental de estudos para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (registro 23083.009241/2011-16) ou no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil (registro CEUA-EGL 11/2013).

Os bezerros mantidos em estábulos foram infestados com larvas provenientes de 300 mg de ovos acondicionados previamente em seringas de 20 mL com extremidade distal cortada e vedada com algodão hidrófilo. A partir do 21º dia após a infestação, fêmeas ingurgitadas que se desprenderam naturalmente dos bovinos foram recolhidas no chão das baias e levadas para o laboratório onde foram lavadas e acondicionadas em placas de Petri.

Uma parcela das fêmeas foi utilizada para a realização dos experimentos, enquanto outra parcela foi colocada em placas de Petri (12 cm de diâmetro) e mantidas em câmara climatizada ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\%$) para realização de postura utilizada para obtenção de larvas e manutenção da colônia. Para sincronização do ciclo dos carrapatos com a disponibilidade dos outros organismos utilizados para o desenvolvimento dos experimentos, quando foi necessário, fêmeas ingurgitadas foram mantidas por até 6 dias em câmara climatizada a 6°C . Esse procedimento mantém as fêmeas vivas, mas com baixa atividade metabólica, retardando o processo de postura, impedindo que façam a oviposição.



Figura 5. Manutenção da colônia de *Rhipicephalus microplus* – A: Baias da estação de Pesquisas Parasitológicas W.O Neitz da UFRRJ; B: Bezerro mantido na baia; C, D e E: Bezerro sendo infestado; F: Larvas sobre o dorso do bezerro; G e H: Carrapatos obtidos através da infestação.



Figura 6. Instalações das baias da fazenda Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite.

Anexo F. Protocolo de aprovação do comitê de ética permitindo manutenção da colônia de *Rhipicephalus microplus* por meio de infestações artificiais em bezerros



Gado de Leite

PARECER

PROTOCOLO CEUA-EGL Nº: 11/2013	Data de entrada: 09/05/2013 Data sessão: 14/05/2013
--------------------------------	--

TÍTULO: Infestações artificiais para manutenção de colônia de carrapato dos bovinos sensível a carrapaticidas

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Márcia Cristina de Azevedo Prata

CONSIDERAÇÕES APROVADAS PELO PLENÁRIO:

O detalhamento apresentado atende ao solicitado no formulário, estando o projeto adequado para aprovação final pelo CEUA.

RETORNAR AO PESQUISADOR	SIM ()	NÃO (X)
-------------------------	---------	-----------

CONCLUSÃO: APROVADO (X)	COM PENDÊNCIA ()	NÃO APROVADO ()
---------------------------	-------------------	------------------

Nome e Assinatura do Presidente/Secretário da CEUA-EGL:

Manuela Lampião Lana - Manuela Hanna

RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

Protocolo nº: 11/2013

A Comissão de Ética No Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, referente ao projeto/experimento: "*infestações artificiais para manutenção de colônia de carrapato dos bovinos sensível a carrapaticidas*".

Manuel Helena

Presidente/Secretário da CEUA-EGL

Anexo G. Obtenção de amostras de carrapatos enviadas para realização de testes de sensibilidade de fêmeas ingurgitadas aos carrapaticidas na Embrapa Gado de Leite

As populações de *R.microplus* utilizadas no capítulo IV foram obtidas a partir de amostras de carrapatos enviadas por sedex por produtores, onde parte da população foi utilizada para a realização do teste de eficácia de carrapaticidas e parte foi empregada no desenvolvimento dos experimentos.

Informações sobre o teste e procedimentos para envio de amostras:

Diante do quadro de resistência dos carrapatos aos químicos, em 1997 a Embrapa Gado de Leite implementou o teste de eficácia de carrapaticidas, serviço gratuito que permite determinar o produto adequado para ser aplicado em cada propriedade. Este teste é feito a partir de amostras de carrapatos enviadas por produtores de diferentes lugares do país.

Os produtores são recomendados com os seguintes procedimentos:

Separar dois ou três animais deixa-los sem tratamento por:

25 dias (produto de contato);

35 dias (produto sistêmico).

- Coletar ± 200 carrapatos;
- Acondicionar (pote, caixa);
- Identificar;
- Enviar para (sedex) para:

EMBRAPA GADO DE LEITE (carrapatos)

Rua Eugênio do Nascimento, 610 Dom Bosco - Juiz de Fora - MG
CEP 36038-330



Figura 7. Amostra de carrapatos enviada por produtor rural através do sedex, para realização do teste de sensibilidade aos carrapaticidas.

Anexo H. Coleta das cigarrinhas das pastagens, *Mahanarva spectabilis*

As ninfas de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) foram coletadas em pastagens presentes no Campo Experimental Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite, localizado no distrito de Barão de Juparanã, município de Valença, Rio de Janeiro.

As cigarrinhas foram coletadas através de busca ativa nas pastagens, utilizando a presença de espuma produzida por esse estágio como um indicativo de presença das ninfas. Após serem coletadas, as ninfas foram transferidas para bandejas contendo *Brachiaria decumbens* com raízes expostas para alimentação das ninfas. As bandejas foram cobertas com tecido *Voil* e levados para o laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite para triagem dos insetos e separação dos indivíduos utilizados no experimento do Capítulo 2. As ninfas foram transferidas para as unidades experimentais com utilização de pincel, devido à alta sensibilidade desse estágio, sendo facilmente lesado.

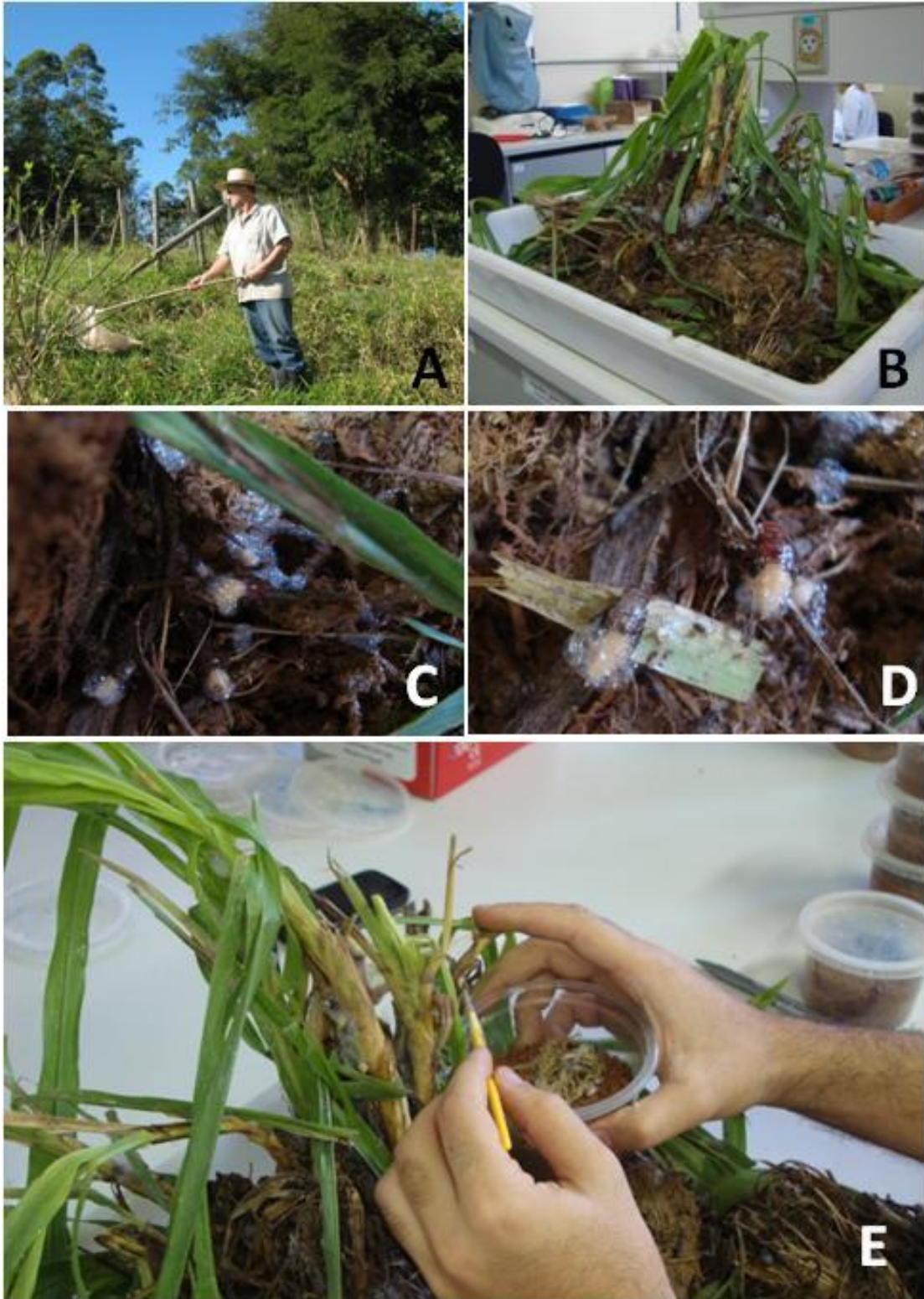


Figura 8. Obtenção de cigarrinhas das pastagens, *Mahanarva spectabilis* – A: Coleta de cigarrinhas na pastagem, *Mahanarva spectabilis* (Fonte: Tiago Teixeira de Resende); B: Bandeja contendo *Brachiaria decumbens* para acondicionamento das cigarrinhas para serem levadas para o laboratório; C e D: Ninfas de cigarrinhas produzindo espuma; E: Cigarrinhas sendo transferidas para pote para realização do experimento.

Anexo I. Fórmulas utilizadas para cálculo de eficácia dos tratamentos

A FAO (*Food and Agriculture Organization*) recomenda que a eficácia de agentes carrapaticidas sobre fêmeas ingurgitadas seja feita com a utilização de fórmulas que avaliem a redução de prole. Isso porque, ao se desprenderem do hospedeiro, fêmeas ingurgitadas não irão mais parasitar nenhum outro animal, e sim buscar no solo um ambiente que propiciem condições favoráveis para realizarem postura. Então a eficácia do tratamento deve ser quantificada a partir da redução de prole, reduzindo o número de carrapatos das próximas gerações.

Para os desenvolvimento do presente estudo a eficácia dos tratamentos foram calculadas com a utilização das fórmulas de percentual de controle e inibição de postura, propostas por Drumonnd et al. (1973) e Gonçalves et al. (2007), respectivamente.

DRUMONND et al. (1973) - Nessa fórmula é feita a avaliação sobre a redução na quantidade e viabilidade de ovos.

- DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GRADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economy Entomology**. v. 66, p. 30–133, 1973.

- **Reprodução estimada (RE)** = $\left(\frac{PM}{PI}\right) \times PE \times 20.000$

- **Percentual de controle (%C)** = $\frac{(RE \text{ do grupo controle} - RE \text{ do grupo tratado})}{RE \text{ do controle}} \times 100$

1. **PM** = Peso médio da massa de ovos – média do peso da massa de ovos produzidos por cada fêmea.
2. **PI** = Peso médio inicial – peso médio das fêmeas ingurgitadas antes de iniciarem a oviposição.
3. **PE** = Percentual médio de eclosão – média da estimativa visual de larvas eclodidas em relação a massa de ovos de cada fêmea.

GONÇALVES et al. (2007) – Nessa fórmula é feita a avaliação apenas sobre a redução na quantidade de ovos

- GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; ASCOLI, B.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**. v. 100, p. 1267–1270, 2007.

$$\text{Índice de produção de ovos (IPO)} = \frac{PM}{PI}$$

$$\text{Índice de inibição de postura (IP)} = \frac{IPOc - IPOt}{IPOt} \times 100$$

1. **PM** = Peso médio da massa de ovos – média do peso da massa de ovos produzidos por cada fêmea.
2. **PI** = Peso médio inicial – peso médio das fêmeas ingurgitadas antes de iniciarem a oviposição.
3. **IPOc** – IPO do grupo controle.
4. **IPOt** – IPO do grupo tratado.

Anexo J - Identificação dos constituintes do óleo


O óleo essencial de folhas de *L. sidoides* foi adquirido da empresa PRONAT (Produtos Naturais LTDA, Horizonte-CE, Brasil) que cultiva a planta e obtém o óleo pelo método de arraste a vapor e foi previamente caracterizada em estudo publicado por Gomes et al. (2014).


Artigo

GOMES, G.A.; MONTEIRO, C.M.O.; JULIÃO, L.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R.S.; DAEMON, E.; CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**. doi: 10.1016/j.exppara.2013.12.003

ScienceDirect Register

Home | Publications | Search | My settings | My alerts | Shopping cart

 Purchase  Export citation More options...

 **Experimental Parasitology** 

Available online 11 December 2013
In Press, Uncorrected Proof — Note to users

Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)

Geovany Amorim Gomes^a, Caio Márcio de Oliveira Monteiro^b, Lisieux de Santana Julião^a, Ralph Maturano^b, , Tatiane de Oliveira Souza Senra^c, Viviane Zeringóta^b, Fernanda Calmon^c, Renata da Silva Matos^c, Erik Daemon^c, Mario Geraldo de Carvalho^a

^a Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora-MG, Brazil

Metodologia de identificação dos constituintes do óleo essencial de *Lippia sidoides*:

A composição química do óleo essencial de *L. sidoides* foi analisada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM - Shimadzu QP-2010 Plus) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida *Factor Four/VF-5ms* (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm de espessura de filme), usando fluxo de gás hélio a 1 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 35 °C, sendo mantida constante durante 2 min, seguido de um incremento de 4 °C min⁻¹ até 180 °C, em seguida, 10 °C min⁻¹ até 250 °C, finalizando com uma isoterma (250 °C) por 20 min. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL (modo *split* 1:50). A temperatura do injetor e detector foi de 250°C. Os espectros de massas foram obtidos numa faixa de *m/z* 10 – 300, fornecidos através da técnica de impacto eletrônico (EMIE) a 70 eV.

A análise quantitativa da composição química do óleo foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização por chama (D_IC) em equipamento HP 5890 – Series II, utilizando o mesmo tipo de coluna da análise com CG/EM, as temperaturas do injetor e detector foram de 240 e 300 °C, respectivamente. A percentagem dos constituintes foi calculada através da área de integral de seus respectivos picos, relacionadas com a área total de todos os constituintes da amostra.

Os diversos constituintes químicos do óleo essencial foram identificados através da comparação visual de seus espectros de massas com aqueles existentes na literatura (ADAMS, 2007) e espectros fornecidos pelo banco de dados (NIST08) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles existentes na literatura (ADAMS, 2007). Uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20) foi injetada nas mesmas condições cromatográficas da amostra, e utilizada para obter os índices de retenção conforme descrito por Van Den Dool & Kratz (1963). A *identificação do constituinte majoritário foi realizada a partir das informações* fornecidas pelos métodos de análise mencionados, juntamente com dados gerados pela comparação dos espectros de *ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)* do óleo, do timol e da mistura óleo mais timol.

K. Artigo referente ao capítulo I recomendado para publicação na Veterinary Parasitology após serem feitas as correções sugeridas pelos revisores

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Parasitology
Manuscript Draft

Manuscript Number: VETPAR-D-13-7536

Title: Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Article Type: Research Paper

Keywords: Cattle tick, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*

Corresponding Author: Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro, M

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

First Author: Caio Márcio de Oliveira Monteiro, M

Order of Authors: Caio Márcio de Oliveira Monteiro, M; Renata S Matos; Laryssa X Araújo; Roberson Campos; Vânia Rita Elias P Bittencourt; Claudia Dolisnki; John Furlong; Márcia Cristina A Prata

Abstract: This study evaluated the efficacy of four entomopathogenic nematode (EPN) strains in insect cadaver formulations against *Rhipicephalus microplus* and to compare the efficacy of the most virulent EPNs in cadavers of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. In the first experiment, infected *G. mellonella* larvae were used as a source of EPNs. Engorged females of *R. microplus* were placed in pots filled with soil and different amounts of *G. mellonella* larvae infected with one of four species of nematodes. All treatments, except for the group exposed to *S. carpocapsae*. All whose source nematodes included six larvae of *G. mellonella*, led to a significant reduction ($p < 0.05$) in the egg mass weight produced per engorged females. *S. feltiae* SN applied to two, four, and six cadavers and *S. carpocapsae* All with two cadavers caused a reduction in hatching percentage of larvae of *R. microplus* ($p < 0.05$). The percentage of control was above 95% in all groups treated with *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 and in the treatment with four larvae infected with *S. feltiae* SN. The second experiment followed the same methodology, using *G. mellonella* and *T. molitor* larvae infected by the two most virulent EPNs. *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 in different formulations, caused reduction ($p < 0.05$) in the egg mass weight. The percentage of control was 82.4 and 84.9% for *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1, respectively, formulated in *T. molitor* and reaching 99.9% in groups formulated with *G. mellonella*. The EPNs tested in insect cadaver formulation showed pathogenicity to engorged females of *R. microplus* and EPNs the genus *Heterorhabditis* formulated in *G. mellonella* larvae were more effective.

Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Caio Márcio Oliveira Monteiro · Laryssa Xavier Araújo · Renata Silva Matos ·
Patrícia da Silva Golo · Isabele Costa Angelo · Wendell Marcelo de Souza Perinotto ·
Camila Aparecida Coelho Rodrigues · John Furlong · Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt ·
Márcia Cristina Azevedo Prata

Received: 4 June 2013 / Accepted: 22 July 2013 / Published online: 15 August 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The aim of the study was to assess the effect of the association of entomopathogenic nematodes and fungi on *Rhipicephalus microplus*. The nematodes used were *Heterorhabdits bacteriophora* HP88 and *Heterorhabdits indica* LPP1 and the fungi were *Metarhizium anisopliae* IBCB 116 and *Beauveria bassiana* ESALQ 986. In the groups treated with the fungi, the females were immersed for 3 min in a conidial suspension, while in the groups treated with the nematodes, the ticks were exposed to infective juveniles. To evaluate the interaction between entomopathogens, the females were first immersed in a conidial suspension and then exposed to the nematodes. The egg mass weight and hatching percentage values of the groups treated with *M. anisopliae* IBCB 116 and *B. bassiana* ESALQ 986 in the two experiments were statistically similar ($p > 0.05$) to the values of the control group. In the groups treated only with nematodes,

there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the egg mass weight, a fact also observed for the hatching percentage of the group treated with *H. indica* LPP1. In all the groups treated with nematodes in association with fungi, there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the egg mass weight and hatching percentage. The percentage of control of the groups treated with fungi alone varied from 31 to 55 %. In the groups treated with nematodes associated or not with fungi, the control percentage was always greater than 90 % and reached 100 % in the group treated with *H. bacteriophora* HP88 associated with the fungus *M. anisopliae* IBCB 116.

Introduction

Rhipicephalus microplus (Canestrini 1888), commonly known as the cattle tick, is a hematophagous ectoparasite with wide geographic distribution (Leal et al. 2003) and is considered one of the main sanitary problems of cattle breeding in tropical and subtropical areas (Pereira 2008; Martins et al. 2006). Although hard to quantify, it is believed that the economic losses caused by this tick in Brazil reach two billion dollars a year (Grisi et al. 2002) considering reduced meat and milk production and treatment costs.

At present, infestations are mainly controlled through the use of organosynthetic acaricides, but the indiscriminate use and without the proper technical criteria have resulted in the selection of tick strains resistant to nearly all the chemical bases available (Furlong et al. 2007; Klafke 2008). Besides the problems related to resistance, there is growing concern regarding environmental safety, human health, and death of nontarget organisms. These factors together make the use of biological control techniques, an attractive alternative (Alonso-Diaz et al. 2007; Fernandes and Bittencourt 2008).

Among the various methods studied for biological control of ticks, the use of entomopathogenic fungi is a promising option due to their capacity to disperse and penetrate the tick's cuticle

C. M. O. Monteiro (✉) · P. da Silva Golo · I. C. Angelo ·
W. M. de Souza Perinotto · V. R. E. P. Bittencourt
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465,
23890-000 Seropédica, RJ, Brazil
e-mail: caiosat@gmail.com

L. X. Araújo · R. S. Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer,
s/n—Campus Universitário Bairro Martelos, 36036-330 Juiz de
Fora, MG, Brazil

J. Furlong · M. C. A. Prata
Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610 Bairro
Dom Bosco, 36038-330 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

C. A. Coelho Rodrigues
Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Avenida Luz Interior, 100
Bairro Estrela Sul, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

I. C. Angelo
Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas
Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte -,
MG, Brazil

Entomopathogenic nematodes associated with essential oil of *Lippia sidoides* for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Caio Márcio Oliveira Monteiro · Laryssa Xavier Araújo · Geovany Amorim Gomes · Tatiane Oliveira Souza Senra · Fernanda Calmon · Erik Dacmon · Mario Geraldo de Carvalho · Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt · John Furlong · Márcia Cristina de Azevedo Prata

Received: 28 September 2013 / Accepted: 9 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract In vitro effect of the association of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and *Heterorhabditis indica* LPP1 with the essential oil of *Lippia sidoides* on engorged females of *Rhipicephalus microplus* was assessed. Engorged females with homogeneous weights ($p > 0.05$) were divided into six groups of ten ticks each (each female = an experimental unit). In the treated groups, the ticks were exposed to the oil (40 $\mu\text{l/ml}$ = 4 %) and nematodes (300 entomopathogenic nematodes (EPNs/tick) separately and also to the nematodes together with the oil, while in the control group, the females were immersed in Tween 80 (3 %). All the

treatments caused a significant reduction in the egg mass weight ($p < 0.05$). The hatching percentage of larvae was reduced ($p < 0.05$) in the groups treated with *H. bacteriophora* HP88, *H. indica* LPP1, and *H. bacteriophora* HP88 associated with the oil, but in the group treated only with the oil, the hatching of percentage of larvae rate was similar to that of the control group ($p > 0.05$). The percentage of control in the group exposed only to the oil was 50.7 %, while in the other treated groups, the percentage of control was greater than 95 %, reaching 100 % in the group treated with *H. indica* LPP1 associated with the oil. The results of the *L. sidoides* essential oil in the concentrations tested in association with both *H. bacteriophora* HP88 and *H. indica* LPP1 indicate that these combinations can be used to control *R. microplus*.

C. M. O. Monteiro (✉) · V. R. E. P. Bittencourt
Departamento de Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: caiosat@gmail.com

G. A. Gomes · M. G. de Carvalho
Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

L. X. Araújo
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Minas Gerais, Brazil

T. O. S. Senra · F. Calmon · E. Dacmon
Departamento de Zoologia, Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

J. Furlong
Embrapa Gado de Leite, 610 Bairro Dom Bosco, 36038-330 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

M. C. d. A. Prata
Embrapa Gado de Leite, Rua Euzébio do Nascimento, 610 Bairro Dom Bosco, 36038-330 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Introduction

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) is a hematophagous ectoparasite of cattle found widely in tropical and subtropical regions in the world. It causes significant losses to beef and dairy cattle breeders. Besides the direct losses caused by blood spoliation and its consequences, this tick also is responsible for indirect harm from the transmission of pathogenic agents and the cost of drugs and specialized labor to treat animals (Furlong et al. 2004, 2007). The losses caused by this tick in Brazil are estimated at over two billion dollars a year (Grisi et al. 2002).

The application of synthetic acaricides is the main method of controlling of *R. microplus*. However, the misuse of these products has resulted in the selection of resistant ticks, so that most of the acaricides available have low efficiency for *R. microplus* (Furlong et al. 2007). In addition to the problems of resistance, there is a growing demand from consumers to reducing the use of chemicals, minimizing the chances of environmental