

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

**DISSERTAÇÃO**

***Avaliação in vitro dos efeitos do agente etiológico***  
***Nomuraea rileyi* no controle biológico do carrapato**  
***Rhipicephalus (Boophilus) microplus.***

**Andréia Loureiro Musso Terra**

**2008**



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

***Avaliação in vitro dos efeitos do agente etiológico *Nomuraea rileyi* no controle biológico do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.***

**ANDRÉIA LOUREIRO MUSSO TERRA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

*e Co-orientação da Pesquisadora*  
**Áurea Maria Lage de Moraes**

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

Seropédica, RJ  
Agosto de 2008

595.42

T323a

T

Terra, Andréia Loureiro Musso, 1971-  
Avaliação in vitro dos efeitos do  
agente etiológico *Nomuraea rileyi* no  
controle biológico do carrapato  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* /  
Andréia Loureiro Musso Terra - 2008.  
33f. : il.

Orientador: Vânia Rita Elias  
Pinheiro Bittencourt.

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

Bibliografia: f. 27-33.

1. Carrapato - Controle biológico  
- Teses. 2. *Rhipicephalus* - Controle  
biológico - Teses. 3. *Boophilus  
microplus* - Controle biológico -  
Teses. 4. Fungos entomopatogênicos -  
Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita  
Elias Pinheiro, 1959- II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título.

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

**ANDRÉIA LOUREIRO MUSSO TERRA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 / 08 / 2008.



---

**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt PhD UFRRJ**



---

**Áurea Maria Lage de Moraes Dra. FIOCRUZ**



---

**Gisela Lara da Costa Dra. FIOCRUZ**



---

**Éverton Kort Kamp Fernandes Dr. UTAH**

*Dedicatória:*

*Ao meu marido, Rômulo Reis Terra, grande incentivador na minha vida profissional. Às minhas filhas, Ana Beatriz e Maria Clara, a quem tento demonstrar com exemplos, o grande valor do estudo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho. A Deus por guiar meus passos na minha longa caminhada. A professora *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* que além da orientação dinâmica dispensada se tornou uma grande amiga, obrigada pela confiança em mim depositada. A *Isabele da Costa Angelo* pela sua dedicação integral na execução de todas as etapas desse trabalho, sem sua presença constante teria sido difícil chegar até aqui, obrigado por tudo!!! A *Ana Paula Rodrigues de Moraes*, responsável pelos momentos de descontração no laboratório e pela sua ajuda constante. Ao meu marido *Rômulo Reis Terra*, por propiciar meu crescimento pessoal e profissional nesses vinte anos de convivência. A minha filha *Ana Beatriz Musso Terra*, que por muitas vezes não só me compreendeu, como ajudou e incentivou nos momentos difíceis dessa jornada. Seu prazer pelos estudos me deixa maravilhada!!! A minha pequenina filha *Maria Clara Musso Terra*, que apesar de muito pequena, é sempre motivo de grande alegria na nossa casa. Amo vocês!!! A *Andreza Gomes da Fonseca Carneiro* e *Josiane Gomes* pelo afeto dispensado as minhas filhas, transmitindo tranquilidade para que eu me ausentasse de casa. A minha mãe *Janair Loureiro Musso*, minhas irmãs, *Adriana Musso Rabelo* e *Mariana Loureiro Musso Caldas*, que mesmo de longe torcem pelo meu sucesso. As minhas lindas e queridas sobrinhas *Jade* e *Luna Musso Rabelo*. Ao meu cunhado e amigo *Edson Alves Rabelo Júnior*, grande esteio da nossa família. Ao meu cunhado *Marcos Paulo Koller Caldas*, recentemente na família. A minha sogra *Nadir Pedrosa Reis Terra*, grande incentivadora dos que se enveredam pelo caminho dos estudos. A amiga e comadre *Denise Souza* e a amiga *Denise Maria Dias Andretti* que sempre me motivaram, não permitindo que eu fraquejasse diante dos obstáculos encontrados. Ao amigo *Éverton Kort Kamp Fernandes*, pela ajuda constante ao longo desse trabalho, mesmo a quilômetros de distância. A *Alessandra Nunes Tovar Elias* e *Liliane da Costa Figoreli*, pelos anos de amizade sincera compartilhada. Ao amigo de laboratório *Wendell Marcelo de Souza Perinotto*, sempre pronto a ajudar. A Dra. *Áurea Maria Lage de Moraes*, pela sua competência e atenção dispensada, somando de forma positiva na execução desse trabalho. Aos *funcionários da estação Experimental W. O. Neitz* pela ajuda dispensada com os animais durante o experimento. Ao *CNPq* pela ajuda financeira desse projeto. A *Embrapa Soja* por fornecer os isolados fúngicos utilizados no presente estudo. Aos *professores e amigos do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias*, por todo o tempo de convivência. A todos vocês meu muito obrigado!!!

## BIOGRAFIA

Andréia Loureiro Musso Terra, filha de Murillo Costa Musso (*In memoriam*) e Janair Loureiro Musso, nasceu na cidade de Vitória - ES, no dia 30 de abril de 1971.

Cursou o ensino fundamental na Escola de Aplicação Dom Pedro II e de 5ª a 8ª série no colégio Estadual Maria Ortiz. Concluiu o ensino Médio na Escola de 2º grau Instituto de Educação Professor Fernando Duarte Rabelo, formando em magistério no ano de 1988.

Prestou concurso público nas Prefeituras Municipais das cidades de Viana e Vitória, localizadas no estado do Espírito Santo e trabalhou como professora estatutária no período de 1990 a 1994.

Em junho de 1994 mudou-se para Volta redonda –RJ após ter se casado com Rômulo Reis Terra, funcionário da Companhia Siderúrgica Nacional, situada nesta cidade.

Ingressou na faculdade de Medicina Veterinária em agosto de 1996 e concluiu o curso em dezembro de 2000, na fundação Educacional Dom André Arco Verde, situada na cidade de Valença, estado do Rio de Janeiro.

Foi proprietária do consultório Veterinário “Quatro Patas”, em Volta Redonda - RJ, atuando na clínica de pequenos animais de agosto de 2002 a fevereiro de 2005.

Em março de 2006 iniciou o mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## RESUMO

TERRA, Andréia Loureiro Musso. **Avaliação *in vitro* dos efeitos do agente etiológico *Nomuraea rileyi* no controle biológico do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2008. 33p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae) é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária brasileira e atualmente seu controle consiste basicamente no uso de acaricidas químicos. A sua utilização inadequada tem favorecido o desenvolvimento de cepas resistentes e a contaminação do meio ambiente. Diversos fungos entomopatogênicos têm sido estudados no intuito de minimizar os problemas ocasionados por esse artrópode. O objetivo desse estudo foi testar *in vitro* os isolados Nr 151 e Nr 177 de *Nomuraea rileyi* sobre as diferentes fases de desenvolvimento do carrapato *R. (B.) microplus*. O fungo foi repicado em Sabouraud Maltose Ágar com extrato de levedura (SMAY) - modificado e mantido a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  por 30 dias. Para o preparo das suspensões, os conídios da superfície da placa foram raspados, suspensos em solução de água destilada estéril e Tween 0,1% e quantificados em câmara de Neubauer. Após preparo da suspensão  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , as concentrações  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foram obtidas por diluição seriada. Cada tratamento foi constituído pela imersão dos espécimes em 1 ml de suspensão durante três minutos enquanto o grupo controle foi exposto apenas ao diluente sem adição de conídios. Cada grupo foi formado por 10 repetições. Para avaliação do efeito dos isolados fúngicos sobre as fêmeas ingurgitadas, os seguintes parâmetros biológicos foram observados: peso de postura, períodos de pré-postura, postura, incubação e eclosão, além do peso da quenógina, necessários para a realização dos cálculos do índice nutricional e de produção de ovos. Os parâmetros utilizados para avaliação dos isolados sobre ovos e larvas foram: percentual diário de eclosão das larvas e percentual de mortalidade (observado a cada cinco dias até o 20º dia), respectivamente. Os isolados de *N. rileyi* não foram capazes de ocasionar alterações significativas nos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas, exceto no percentual de eclosão das larvas, quando a maior concentração de  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foi utilizada, e no percentual de controle onde se obteve 17,15% e de 27,62% nas concentrações  $10^5$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. Os ovos tratados com as diferentes concentrações dos isolados de *N. rileyi* não apresentou diferença significativa no percentual das larvas eclodidas. O melhor resultado obtido com o isolado Nr 177 foi sobre larvas não alimentadas, onde todas as concentrações utilizadas demonstraram um percentual de mortalidade significativo. A concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  do isolado Nr 177 de *Nomuraea rileyi* foi capaz de promover um percentual de mortalidade das larvas de 14,5 e 69,5% somente no 15º e 20º dia após o tratamento, respectivamente. As demais concentrações apresentaram um percentual de mortalidade significativo, no entanto esses resultados não foram tão satisfatórios quanto aos obtidos com a maior concentração utilizada. O isolado Nr 151 de *Nomuraea rileyi* ocasionou baixo percentual de mortalidade das larvas não alimentadas, entre 10 e 15% quando as concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foram utilizadas. Dessa forma, esses resultados demonstram que os isolados de *N. rileyi* não apresentaram efeitos deletérios significativos ao carrapato *R. (B.) microplus*.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Nomuraea rileyi*, Controle biológico.



## ABSTRACT

TERRA, Andréia Loureiro Musso. **Evaluation *in vitro* of *Nomuraea rileyi* to control *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick**. 2008. 33p. Dissertation (Master of Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causes severe economic losses to the Brazilian cattle raising industry. In nowadays, the control of the cattle tick is especially based on the use of chemical acaricides. The inadequate use of these acaricides allows the development of tick's resistant strains and environmental contamination. Several entomopathogenic fungal species have been investigated to control arthropod populations and, therefore, minimize the damages caused by them. The current study investigates *Nomuraea rileyi* isolates (Nr 151 and Nr 177) to control the three developmental stages of *R. (B.) microplus* tick. The fungal isolates were cultivated on modified Sabouraud Maltose Agar with yeast extract (SMAY) at  $25 \pm 1$  °C and relative humidity (RH) higher or equal to 80% for 30 days. Conidia were harvested from the SMAY medium surface and suspended in sterile Tween 80 0.1% aqueous solution. The suspensions were adjusted to  $10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  using the hemacytometer, other conidial suspensions ( $10^7$ ,  $10^6$  and  $10^5$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ ) were obtained by serial dilution (1:10). The specimens were immersed in 1 ml of conidial suspension for three minutes, while control groups were immersed in Tween 80 0.1% aqueous solution (no conidia). Each treatment or control groups were composed of 10 repetitions. The effects of fungal isolates on engorged female ticks were investigated through the evaluation of the following parameters: pre-oviposition period, oviposition period, egg production, egg incubation and hatching period, and dead tick weight. These data were used to calculate the Nutrient Index and Egg Production Index. The effect of fungal isolates on egg and larva was evaluated by recording the hatchability daily, and mortality (at every 5-day intervals), respectively. In general, *N. rileyi* isolates did not cause significant alteration of engorged females' parameters; however, the isolate Nr 177 at  $10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  significantly reduced larvae hatchability. The percentage of control of engorged females exposed to *N. rileyi* was 17.15 or 27.62% at  $10^5$  or  $10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ , respectively. The percent hatchability of eggs exposed to *N. rileyi* isolates did not differ from control group. The best result with the isolate Nr 177 was observed on non-fed larvae, all conidial suspensions caused significant mortality rates. The isolate Nr 177 at  $10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  caused 14.5% and 69.5% larva mortality only at day 15 and day 20 after treatment, respectively. Other fungal suspensions caused significant larva mortality, but the results were not reasonable as the results observed with the fungal suspension with the highest conidia concentration. The isolate Nr 151 caused low non-fed larva mortality rates, 10% or 15%, at  $10^7$  or  $10^8$  conidial  $\text{ml}^{-1}$ , respectively. These results demonstrate that the *N. rileyi* isolates investigated did not cause significant harmful effect to control *R. (B.) microplus* tick.

Key-words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Nomuraea rileyi*, Biological control.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Suspensões de conídios dos isolados de *Nomuraea rileyi* utilizados nas diferentes fases de desenvolvimento de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*..... 10
- Tabela 2.** Peso médio, em gramas, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 14
- Tabela 3.** Média do período de pré-postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 14
- Tabela 4.** Peso médio da postura, em gramas, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 15
- Tabela 5.** Média do período de postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 16
- Tabela 6.** Média do período de incubação, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 17
- Tabela 7.** Média do período de eclosão das larvas, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 17
- Tabela 8.** Média do índice nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 18
- Tabela 9.** Média do índice de produção de ovos (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*..... 19
- Tabela 10.** Percentual médio de eclosão das larvas oriundas dos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea*

<i>rileyi</i> .....	20
<b>Tabela 11.</b> Percentual médio de controle de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de <i>Nomuraea rileyi</i> .....	21
<b>Tabela 12.</b> Percentual médio de eclosão das larvas oriundas dos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de <i>Nomuraea rileyi</i> .....	22
<b>Tabela 13.</b> Percentual médio de mortalidade das larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> tratadas com diferentes suspensões conidiais do isolado Nr 177 de <i>Nomuraea rileyi</i> .....	23
<b>Tabela 14.</b> Percentual médio de mortalidade das larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> tratadas com diferentes concentrações conidiais de do isolado Nr 151 de <i>Nomuraea rileyi</i> .....	23
<b>Tabela 15.</b> Concentrações letais, CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> dos isolados Nr 177 e Nr 151 de <i>Nomuraea rileyi</i> obtidas através da avaliação do percentual de mortalidade de larvas não alimentadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	24

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 Carrapato dos bovinos.....	3
2.2 Controle Biológico – Fungos Entomopatogênicos.....	4
2.3 <i>Nomuraea rileyi</i> .....	6
2.4 Mecanismos de Penetração dos Fungos Entomopatogênicos .....	8
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	9
3.1 Localização do Experimento .....	9
3.2 Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos .....	9
3.3 Avaliação Morfológica dos Isolados .....	9
3.4 Elaboração das Suspensões e Quantificação dos Inóculos .....	9
3.5 Viabilidade das Suspensões de Conídios .....	10
3.6 Delineamento Experimental .....	10
3.7 Obtenção de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	10
3.8 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas .....	10
3.9 Bioensaio com Ovos.....	12
3.10 Bioensaio com Larvas.....	12
3.11 Reisolamento dos Isolados Fúngicos após o Bioensaio.....	12
3.12 Análise Estatística.....	12
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	13
4.1 Avaliação Morfológica dos Isolados .....	13
4.2 Viabilidade das Suspensões de Conídios .....	13
4.3 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	14
4.3.1 Peso médio das fêmeas ingurgitadas.....	14
4.3.2 Período de pré-postura .....	14
4.3.3 Peso da postura.....	15
4.3.4 Período de postura .....	16
4.3.5 Período de incubação .....	16
4.3.6 Período de eclosão das larvas .....	17
4.3.7 Índice nutricional .....	18
4.3.8 Índice de produção de ovos .....	19
4.3.9 Percentual de eclosão.....	20
4.3.10 Percentual de controle .....	21
4.4 Bioensaio com Ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	22
4.5 Bioensaio com Larvas não Alimentadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ..	23
4.6 Reisolamento Fúngico.....	25
4.7 Considerações Finais.....	25
<b>5 CONCLUSÕES</b>	26
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	27

## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina apresentou nas últimas décadas um aumento considerável na produtividade, decorrente principalmente da melhoria genética dos rebanhos, da conversão alimentar e das técnicas reprodutivas. Junto aos benefícios surgiram também inúmeros problemas sanitários.

A melhoria das pastagens com maior número de animais por área, o desmame precoce e a criação de animais confinados, favoreceu largamente os parasitas nas raças bovinas mais produtivas, a ponto de hoje em dia, não ser mais possível a criação econômica de bovinos sem um combate sistemático aos seus principais endo e ectoparasitas.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* também conhecido no Brasil como carrapato dos bovinos, originou-se provavelmente na Ásia e se adaptou perfeitamente aos países tropicais, onde o calor e a umidade propiciam condições favoráveis à sobrevivência e à manutenção dessa espécie.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado um dos mais importantes ectoparasitas da pecuária brasileira, pois são responsáveis por perdas econômicas severas devido à transmissão de patógenos, à desvalorização do couro e à baixa conversão alimentar e geram gastos no seu controle que giram em torno de dois bilhões de dólares por ano.

O homem desenvolveu vários métodos para o controle do carrapato *R. (B.) microplus*, no entanto, nem todos foram capazes de resolver o problema, e a solução imediatista sempre fora o uso de substâncias químicas acaricidas. Essas drogas determinam o aparecimento de populações de carrapatos resistentes e a permanência de resíduos em produtos de origem animal e no meio ambiente, tornando a busca por alternativas para o controle do carrapato uma questão fundamental em respeito à integridade do ecossistema.

Apesar do progresso alcançado nas décadas anteriores nos programas de controle de artrópodes utilizando os agentes químicos, esse carrapato ainda representa um risco constante para a população de bovinos, sendo de fundamental importância o conhecimento da relação “artrópode - agente patogênico - hospedeiro”, para que dessa forma, haja o desenvolvimento de um método de controle efetivo.

O controle biológico pode representar uma alternativa mais econômica e viável quando comparado à utilização de inseticidas químicos, pois a maioria desses acaricidas apresentam amplo espectro de atuação e acabam por dizimar outros artrópodes ecologicamente importantes.

Os métodos de controle microbiano utilizando fungos entomopatogênicos apresentam satisfação do ponto de vista econômico e ecológico, sendo recomendado para controle de pragas. A maioria desses entomopatógenos são altamente especializados na penetração via tegumento, o que é uma grande vantagem no caso específico dos carrapatos, já que a infecção oral é inviável para esses artrópodes hematófagos obrigatórios.

Os principais fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, são descritos como agentes patogênicos no controle biológico de insetos e a eficácia de ambos foi comprovada experimentalmente para os diferentes estágios evolutivos de carrapatos em diversos estudos. A avaliação de outras espécies de fungos entomopatogênicos, no entanto, é necessário para selecionar aquela com maior potencial de controle de carrapatos.

O fungo *Nomuraea rileyi* apresenta grande contribuição em surtos epizoóticos anuais sobre populações da lagarta *Anticarsia gemmatilis*, importante praga na cultura da soja, ampliando sua atuação como possível agente promissor no controle microbiano de outros

artrópodes. Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito *in vitro* de *N. rileyi* sobre as diferentes fases evolutivas do carrapato *R. (B.) microplus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Carrapato dos Bovinos

Os principais carrapatos de importância econômica que ocorrem no Brasil pertencem à família Ixodidae. Dentre eles está o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887, que é uma das espécies mais relevantes para pecuária do nosso país (BITTENCOURT, 2000).

O carrapato *R. (B.) microplus* é originário da Ásia e foi introduzido no Brasil junto com os primeiros bovinos trazidos pelos colonizadores, onde se adaptou perfeitamente ao nosso clima, distribuindo-se por todo o território nacional, com algumas poucas exceções das regiões que possuem baixa precipitação pluviométrica (BARCI, 1997). É conhecido como carrapato dos bovinos, mas em altas infestações na pastagem pode parasitar outros mamíferos como equinos, caprinos, ovinos, caninos, o homem (GONZALES, 1975), além de búfalos, gatos, coelhos, cangurus, porcos e onças (PEREIRA, 1980).

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem distribuição entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul, delimitando ao Norte, o Sul dos Estados Unidos, meio do México e Norte da África, ao Sul, o extremo Sul do Brasil, meio do Uruguai e da Argentina e Sul da Austrália (GONZALES, 1995). De acordo com Furlong e Evans (1991), no Brasil, *R. (B.) microplus* encontra condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, do extremo Sul em direção ao Norte ou Nordeste, possibilitando-lhe completar de dois, três, quatro e potencialmente até cinco gerações por ano, em locais com temperaturas médias anuais acima de 17° C.

O ciclo de vida de *R. (B.) microplus* divide-se em uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária. A fase de vida livre inicia-se com a queda da fêmea ingurgitada que se desprende do hospedeiro, caindo ao solo para realizar a postura. O período de pré-postura dura de dois a três dias passando posteriormente à fase de ovopostura, que dura em torno de 17 dias podendo se estender a mais de 90 e, em seguida, à fase de eclosão que dura em média de 22 a 30 dias e, após um período de quatro a 20 dias, em condições de umidade e temperatura favoráveis, as larvas não alimentadas então se tornam infestantes (GONZALES, 1974).

A fase de vida parasitária inicia-se quando a larva infestante instala-se no hospedeiro, iniciam a alimentação passando por várias ecdises até chegar ao estágio adulto, em que as fêmeas fecundadas e ingurgitadas se desprendem do hospedeiro e caem ao chão (GONZALES, 1974). Esse período pode variar em média de 18 a 26 dias na região do Brasil-Central (FURLONG, 1993).

A temperatura é um importante fator regulador no desenvolvimento do carrapato *R. (B.) microplus*. Toda sua biologia é influenciada por esse fator, sendo que os diferentes tempos de evolução desta espécie são encurtados em temperaturas elevadas, e prolongadas em temperaturas mais amenas (GLÓRIA et al., 1993). Estações secas severas podem limitar a sobrevivência do carrapato, podendo ir até a completa paralisação na incubação, postura, e até mesmo o fracasso desses estágios.

O carrapato dos bovinos é um parasita de alta importância, produzindo perdas diretas e indiretas pela transmissão de patógenos e pelo custo de seu controle. Ainda hoje, apresenta alta incidência e prevalência no Brasil e em países desenvolvidos de clima tropical, devido à complexidade dos fatores envolvidos e ao desconhecimento dos produtores sobre informações específicas necessárias à adoção de práticas efetivas no controle desse ectoparasito em suas propriedades (ROCHA et al., 2006).

O carrapato *R. (B.) microplus* é também vetor de diversos agentes infecciosos, tais como: bactérias, protozoários, rickettsias e vírus, sendo o principal vetor do *Anaplasma*

*marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* responsáveis por mortes de bezerros ou de animais adultos que não tenham sido previamente expostos ao carrapato. Essas doenças formam um complexo conhecido como tristeza parasitária dos bovinos (FERNANDES et al., 2002).

Os animais parasitados apresentam perda de peso, baixa produtividade e desvalorização de seu couro (BITTENCOURT, 2000). De acordo com Furlong (1993), os prejuízos causados pelo carrapato aos bovinos se processam de várias maneiras e quanto a espoliação sanguínea é geralmente causada pelas teleóginas, já que larvas, ninfas e machos são pequenos e tem como predominância na sua alimentação a linfa e substratos teciduais. |O volume ingerido por cada fêmea de *R. (B.) microplus* varia entre 0,5 e 3 ml de sangue (SEIFER, 1971; GONZALES, 1975).

Estima-se que os prejuízos econômicos ocasionados pelo carrapato *R. (B.) microplus* no Brasil seja em torno de 2 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2002) devido a gastos com carrapaticidas, mão de obra para sua administração e pela perda na produtividade do rebanho (HORN; ARTECHE, 1985).

A principal forma de controle até o presente momento consiste no emprego de acaricidas químicos. No entanto, o uso continuado desses produtos e a utilização de forma inadequada dos mesmos têm ocasionado problemas quanto à resistência e a contaminação do meio ambiente (CASTRO et al., 1997). Desde a década de 40, com o surgimento de indivíduos resistentes aos produtos arsenicais, uma sucessão de produtos de outras bases químicas foi lançada no mercado mundial para evitar os problemas de resistência que são emergentes a intervalos cada vez mais curtos (WHARTON E ROULSTON, 1970).

Rocha e Leite (2006) em entrevista a produtores de leite da região de Divinópolis, MG, demonstraram a falta de conhecimento necessário para a realização de um combate racional dos carrapatos, assim como os prejuízos que podem ser causados por esses parasitos no sistema produtivo. Santos Jr et al. (2000) relataram que não existe uma preocupação dos proprietários com a eficiência dos tratamentos acaricidas, acarretando assim fracassos no controle e aumento de gastos representado pelo elevado número de tratamentos.

O aumento da resistência de *R. (B.) microplus* aos pesticidas, seu alto preço, associado ao crescimento da demanda pública pela segurança em alimentos e à preocupação com um meio ambiente menos poluído, estão gerando um aumento na procura de meios alternativos para o controle desse carrapato (SAMISH, 2000), encorajando os pesquisadores a buscarem continuamente novos métodos de controle e aplicá-los de forma integrada no combate a este parasita (BARROS; EVANS, 1989).

## **2.2. Controle Biológico – Fungos Entomopatogênicos**

O controle biológico pode ser definido como quaisquer atividades envolvendo a manipulação de inimigos naturais tais como predadores, parasitas ou patógenos com o objetivo de reduzir ou suprimir uma população animal ou vegetal que represente uma praga. Um programa completo de controle biológico cobre uma gama de atividades, desde a simples conservação de inimigos naturais, através de criteriosa seleção de um pesticida que lhes seja menos tóxico, até a liberação ou introdução de inimigos naturais numa área onde se encontram os hospedeiros alvos (MORETTI, 2007).

O uso do controle microbiano apresenta diversas vantagens, incluindo a segurança para humanos e organismos não alvos, redução de resíduos químicos no meio ambiente e nos alimentos, preservação de endemias naturais e aumento da biodiversidade em ecossistemas controlados (LACEY et al., 2001). Além disso, após os patógenos se estabelecerem numa determinada área de cultivo, a doença pode assumir caráter enzoótico, dificultando o desenvolvimento dos insetos e impedindo que os mesmos ocasionem danos econômicos à lavoura. Esse fato pode estar relacionado aos efeitos secundários ocasionados a geração futura



da população desses insetos, diminuindo a oviposição, a viabilidade dos ovos e o aumento da sensibilidade a outros produtos biológicos e químicos (ALVES, 1998).

A conservação e utilização de agentes de controle biológico dentro de agroecossistemas é uma das principais estratégias adotadas no manejo integrado de pragas e para que isso ocorra, é necessário conhecer a ação dos produtos fitossanitários de origem química, sua seletividade e/ou compatibilidade sobre o inimigo natural em questão (FILHO et al., 2003). Os entomopatógenos ocorrem naturalmente e são considerados como importante fator regulador nas populações de artrópodes. Muitas espécies são empregadas como agentes de controle biológico de insetos praga em pomares, gramados, produtos armazenados e para redução de insetos pestes e vetores de importância médica e veterinária (LACEY et al., 2001).

A história da pesquisa de fungos patogênicos para invertebrados foi relatada há milhares de anos, onde a observação de microrganismos em alguns insetos era possível a olho nu, iniciando assim um amplo campo de estudos na patologia dos invertebrados (CASTRILHO et al., 2005).

O primeiro pesquisador a comprovar a natureza infecciosa de um fungo como agente microbiano sobre um inseto foi Agostino Bassi, em 1835, relatando o fungo *Beauveria bassiana* como causador da doença “muscardine branca” no bicho-da-seda (ALVES, 1998).

Atualmente cerca de 750 espécies de fungos são conhecidas como patógenos de artrópodes que habitam o meio aquático, solos e plantas (FUXA, 1987; MCCOY, 1990; HAJEK; St LEGER, 1994, LACEY et al., 2001). Alguns fungos são conhecidos e utilizados no controle microbiano de insetos no qual podemos citar: *B. bassiana* controlando larvas de mosquitos e moscas; *B. brongniartii* controlando baratas; *M. anisopliae* controlando cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), cigarrinha das pastagens (*Deois zulia*), a broca da cana (*Diatraea saccharalis*), o percevejo da soja (*Nezara* sp e *Piezodorus* sp) e insetos da família Reduviidae; *Nomuraea rileyi* controlando membros das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Orthoptera e *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) controlando larvas de mosquitos e moscas (MORETTI, 2007).

Esses entomopatógenos vêm sendo estudados no Brasil há mais de sessenta anos. Todavia, foi somente depois de 1964, com a ocorrência epizootica de *M. anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, que os fungos receberam mais atenção dos pesquisadores. Mais de 50% dos trabalhos publicados no Brasil sobre patologia de insetos e controle microbiano são sobre fungos entomopatogênicos, sendo que 90% deles foram desenvolvidos somente nas duas últimas décadas (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são patógenos de largo espectro e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento (ALVES, 1998), o que é uma grande vantagem quando comparado com outros patógenos, pois a infecção oral é praticamente nula para os artrópodes hematófagos. Além disso, podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, pupas e adultos, sendo esta característica desejável e muito peculiar desse grupo (KAAYA et al., 1991). Muitos dos esporos produzidos pelo fungo no hospedeiro são carregados através do vento ou da chuva e em contato com outros artrópodes alvos podem propagar um outro quadro de infecção a longa distância (ALVES, 1998).

Vários inimigos naturais do carrapato *R. (B.) microplus* são descritos na literatura: alguns invertebrados como formigas, aranhas e dípteros, e vertebrados como roedores, aves e anfíbios. Fungos, bactérias e nematóides também são considerados agentes patogênicos que podem controlar populações desse artrópode (BITTENCOURT, 2000; VERÍSSIMO, 1995).

Atualmente é crescente o número de trabalhos publicados por pesquisadores na área de controle microbiano (SAMISH; REHACED, 1999). Samish e Rehaced (1999) revisaram mais de 100 espécies de patógenos e aproximadamente 150 predadores associados com carrapatos, o que representa um amplo arsenal de espécies com uso potencial como agentes de biocontrole.

A ação de fungos sobre o carrapato *R. (B.) microplus* foi avaliada pela primeira vez por Connole (1969), que testou 156 extratos de diferentes fungos mantidos em coleção e obtidos através de centrifugação. O material obtido foi inoculado na hemocele dos carrapatos e os resultados mais promissores foram com *Arpergillus niger* que promoveu a inibição da postura em 50% dos espécimes testados.

A pesquisa relativa ao uso de microorganismos ainda é incipiente, contudo várias pesquisas têm sido realizadas através de infecções experimentais utilizando fungos entomopatogênicos (ATHAYDE et al., 2001). Diversos trabalhos em condições controladas avaliaram os efeitos das suspensões de vários isolados de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* sobre as diferentes fases de desenvolvimento do carrapato *R. (B.) microplus* (BITTENCOURT et al., 1992, 1994a, 1994b, 1995).

Alves et al. (1993) compararam um isolado do fungo *B. bassiana* e um isolado de *M. anisopliae* sobre ovos de *R. (B.) microplus*, e relataram que apesar de *B. bassiana* ser patogênica, a eficiência de *M. anisopliae* havia sido superior.

Bittencourt et al. (1992, 1994a, 1994b) avaliaram a ação de dois isolados de *M. anisopliae* sobre o carrapato *R. (B.) microplus* e observaram as seguintes alterações: aumento no período de pré-postura e eclosão das larvas, e diminuição do período de postura, índice de produção de ovos e percentual de eclosão das larvas, demonstrando seu efeito patogênico sobre *R. (B.) microplus*. Em outro estudo, Bittencourt et al. (1995) testaram *in vitro* suspensões dos isolados 747 e 986 (ESALQ/ USP) do fungo *B. bassiana* sobre ovos e larvas da mesma espécie de carrapato e obtiveram redução do percentual de eclosão e aumento na mortalidade das larvas.

Alguns estudos demonstraram que conídios de *Metarhizium* sp. formulados em solução oleosa causaram altas taxas de mortalidade quando comparados com as suspensões aquosas (CASTENEIRAS et al., 1987; KAYA et al., 1996; MONTEIRO et al., 1998; LEEMON; JONSSON, 2007.). A vantagem da utilização da formulação oleosa é sua excelente adesão à cutícula hidrofóbica de artrópodes (PRIOR et al., 1988), além dos conídios lipofílicos, como os de *Metarhizium* sp., serem mais facilmente suspensos em óleo e manterem sua viabilidade por maior período de tempo (DAOUST et al., 1983). Portanto, é uma excelente área de estudo para o desenvolvimento de futuros trabalhos ao nível de campo, buscando a descoberta de um bioacaricida eficaz.

Bahiense (2007) relatou a eficácia dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* associados a deltametrina sobre uma cepa resistente do carrapato *R. (B.) microplus* em teste de estábulo. Essa associação do acaricida com os fungos resultou no controle da cepa do carrapato, demonstrando que a utilização simultânea dos acaricidas em bovinos infestados pode ser possível e, além disso, pode atuar como ferramenta para o manejo integrado no controle desse carrapato. Portanto, a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos com agroquímicos pode melhorar o potencial de controle, já que as substâncias sintéticas podem atuar como estressantes, facilitando a infecção fúngica (SOSA-GOMEZ, 2005).

A perspectiva da utilização de fungos entomopatogênicos contra carrapatos e o desenvolvimento de novas tecnologias para a aplicação desses produtos biológicos irão contribuir para melhorias na produção animal e para minimizar os danos ecológicos (ATHAYDE, et al., 2001).

### **2.3. *Nomuraea rileyi***

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano, e a maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já relatados ocorre no Brasil, sendo que destes, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica para a agricultura.

*Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson é um fungo anamórfico pertencente a Classe Ascomycetes. Segundo Ignoffo (1981), a utilização dessa espécie é segura para humanos e outros organismos não alvo, facilitando o seu uso no controle de pragas específicas, incluindo insetos parasitas e predadores. É uma espécie cosmopolita e apresenta potencial para controle de diversas pragas de insetos de importância econômica.

Esse fungo ocorre naturalmente em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleoptera, Ortoptera e Lepidoptera em várias regiões do mundo, e cerca de 90% dos hospedeiros susceptíveis pertencem a essa última ordem, tais como: *Helicoverpa armigera* (Hubner), *Spodora litura* (Fabricius), *Plusia* sp que atacam plantios de feijão, girassol, algodão e tomate (VIMALA DEVI et al., 1996). Outras espécies de insetos de importância agrícola são susceptíveis a *N. rileyi*, dentre elas estão: *Alabama argillacea* e *Trichoplusia ni* que atacam plantios de algodão, *Anticarsia gemmatalis* e *Plusia* sp. no plantio da soja, e *Cirphis latiuscula* e *Diatraea saccharalis* que ocasionam prejuízos no plantio da cana-de-açúcar (ALVES, 1998).

No Brasil, dentre os hospedeiros susceptíveis destaca-se a lagarta da soja, que pode ser acometida pela doença branca causada por esse fungo entomopatogênico, considerado o mais importante agente de controle natural deste inseto. As lagartas são infectadas pelos conídios do fungo presentes sobre as folhas ou no solo, ficando endurecidas e recobertas por uma camada branca devido ao desenvolvimento externo do micélio, tornando-se verdes com a produção dos conídios (GAZZONI; YORINIORI, 1995; SUJII et al., 2001).

Os altos índices obtidos no controle natural da lagarta da soja sugerem *N. rileyi* (como um importante agente a ser usado em programas integrados de pragas. Esse fungo promove epizootias sob certas condições ambientais, principalmente em períodos chuvosos e sob temperaturas amenas, sendo capaz de reduzir drasticamente as populações deste inseto (CORREA & SMITH, 1975; CARNER, 1980; IGNOFFO, 1981; LECUONA, 1990). No centro-sul do Brasil, a presença do fungo impede que o inseto atinja um nível de dano econômico, evitando assim a aplicação de defensivos agrícolas contra essa praga (FARIA et al., 1993).

Testes realizados a campo por Ignoffo (1981) com *N. rileyi* sobre *Trichoplusia ni* mostraram mortalidade de 67% das lagartas e uma redução na capacidade reprodutiva da população do inseto. A morte do hospedeiro ocorre por volta do sexto dia e o ciclo se completa com a formação dos conídios, sob temperatura de 25°C, entre oito a doze dias após o início do quadro de infecção. Estes dados sugerem que *N. rileyi* pode facilitar o controle químico, e também ser utilizado como agente profilático antes da ocorrência da praga.

Esse mesmo autor relata experimentos com concentrações de  $10^{10}$  a  $10^{13}$  conídios/0,4 ha, utilizados na aplicação dos diferentes estádios de desenvolvimento da lagarta *Helicoverpa zea*, onde o melhor desempenho ocorreu na redução da população de primeiro e segundo ínstaes expostos às concentrações mais elevadas.

A origem geográfica e as condições de cultivo, envolvendo meios, temperaturas, umidade etc, podem interferir na patogenicidade dos isolados de *N. rileyi* e outros fungos entomopatogênicos. A virulência e o espectro de hospedeiros dos isolados podem ser previstos com maior exatidão através de bioensaios (IGNOFFO; BOUCIAS, 1992). Estudo realizado com isolados de *B. bassiana* de diferentes regiões geográficas do território brasileiro e norte-americano demonstraram variações genéticas significativa, evidenciando que a distância geográfica é um fator importante na variabilidade genética (FERNANDES, 2007).

O solo representa um dos maiores reservatórios de inóculos de *N. rileyi*, cujos clamidósporos podem permanecer viáveis por até 12 semanas, sendo a temperatura favorável para o crescimento do fungo em torno de 26°C e a umidade relativa entre 60 a 100% (PENDLAND, 1982). O fungo pode permanecer viável por períodos maiores, sobre os

cadáveres do inseto no solo, na forma de clamidósporos ou hifas, fornecendo o inóculo para formação dos focos primários da doença no ano seguinte (IGNOFFO, 1981).

#### **2.4. Mecanismos de Penetração dos Fungos Entomopatogênicos**

Os fungos entomopatogênicos desenvolvem distintas estratégias para infectar seus hospedeiros, variando consideravelmente o modo de ação, virulência e especificidade. A adesão dos conídios na superfície do hospedeiro e a penetração são os eventos iniciais do processo patogênico e parecem estar envolvidos com mecanismos de adesão não específicos, mediados pela característica hidrofóbica dos conídios (ARRUDA et al., 2005).

Vinte e quatro horas após o início da infecção ocorrem a adesão e germinação dos conídios sobre a superfície do hospedeiro. Neste período, o tubo germinativo se diferencia para formar o apressório, exercendo pressão mecânica e secreção de enzimas hidrolíticas. Essa combinação de mecanismos físicos e enzimáticos é utilizada pelos fungos entomopatogênicos para transpor a cutícula do hospedeiro. A produção de quitinases e proteases é peça chave para penetração que é observada 72 horas após contato com a superfície do artrópode (ARRUDA et al., 2005). Em seguida, ocorre a colonização do hospedeiro, onde as hifas que penetraram sofrem um engrossamento e se ramificam na hemocele (ALVES, 1998).

A colonização do fungo no interior do hospedeiro se dá nos diversos órgãos e apresenta, provavelmente, a seguinte seqüência: corpos gordurosos, sistema digestivo e tubos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso, músculos e traquéias, culminando na morte do hospedeiro. Após 96 horas, a hifa começa a emergir para a superfície da cutícula, iniciando o processo de conidiogênese. Após a formação dos propágulos infectivos (conídios), estes se dispersam pelo ambiente, auxiliados por fatores bióticos e abióticos, tais como: vento, chuva, homem, animais, etc. (ALVES, 1998).

Os fungos também produzem micotoxinas que contribuem para a mortalidade do hospedeiro, provocando a diminuição do ingurgitamento, da fecundidade e do percentual de eclosão das larvas. A mortalidade dos carrapatos está relacionada à concentração de conídios, ou seja, ocorre uma relação entre o percentual de mortalidade e o número de conídios que o recobre: quanto maior o número de conídios, maior será a taxa de mortalidade (KAAYA et al., 1996; BITTENCOURT, 2000).

Todas as fases do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, principalmente germinação, penetração e reprodução, são muito dependentes das condições ambientais, como temperatura, umidade e radiação ultravioleta.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Localização do Experimento

A avaliação do efeito do fungo *N. rileyi* sobre as diferentes fases do carrapato *R. (B.) microplus* foi realizada no período entre junho e novembro de 2007, no Laboratório de Controle Microbiano, localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON), do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, situado em Seropédica - RJ, entre os paralelos 22°49' e 22°45' de latitude sul, e os meridianos 43°38' e 43°42' de longitude oeste de Greenwich, com altitude de 33 metros e clima do tipo subtropical.

#### 3.2. Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos

Os isolados Nr 151 e Nr 177 do entomopatógeno *N. rileyi* foram cedidos pela EMBRAPA/Soja ao Laboratório de Controle Microbiano e repicados em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Maltose Agar com Extrato de Levedura (SMAY modificado) acrescido de 10g de Extrato de Levedura e mantidos em câmara climatizada tipo BOD sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  por 30 dias.

O isolado Nr 151 oriundo de Brasília - Distrito Federal, foi originalmente isolado do hospedeiro *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) em 1996 e o isolado Nr 177, oriundo de Warta, Londrina – Paraná, foi isolado do mesmo hospedeiro, em 1999.

#### 3.3. Avaliação Morfológica dos Isolados

Os aspectos morfológicos de *N. rileyi* foram observados 30 dias após o cultivo dos isolados em placas de Petri, como descrito no item 3.2. A descrição das características macromorfológicas foi realizada através dos seguintes parâmetros: taxa de crescimento através da mensuração do diâmetro da colônia, aspecto e coloração das colônias e seus reversos. As características micromorfológicas foram avaliadas através da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIVALIER; SEYDEL, 1932), mantidas sob condições de temperatura e umidade descritas no item 3.2, durante 30 dias. As lâminas foram coradas com Lactofenol de Amman com azul de algodão segundo Hawksworth (1977).

#### 3.4. Elaboração das Suspensões e Quantificação dos Inóculos

As soluções conidiais foram preparadas a partir do cultivo dos isolados de *N. rileyi* em placas de Petri, contendo meio de cultura SMAY modificado. Para o preparo de suspensão com concentração de  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , 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% (LUZ et al., 1998). A suspensão foi quantificada em Câmara de Neubauer sob microscópio óptico, segundo Alves (1998).

As suspensões  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foram preparadas através de diluição seriada a partir da suspensão  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . Desse modo, 2 ml da suspensão  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  acrescida de 18 ml de água destilada estéril e Tween 80 0,1%, resultam na concentração de  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . A mesma metodologia foi utilizada para o preparo das demais concentrações.

### 3.5. Viabilidade das Suspensões de Conídios

Uma amostra de 0,1 ml da suspensão de  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de cada isolado foi colocada em placas de Petri contendo meio de cultura SMAY modificado e antibiótico (500mg de cloranfenicol : 1 litro de meio de cultura)., para avaliação da viabilidade dos conídios de *N. rileyi*. Uma outra amostra também foi feita utilizando o mesmo meio de cultura e a mesma concentração de conídios  $\text{ml}^{-1}$ , porém sem a adição do cloranfenicol, para se avaliar a influência do antibiótico sobre a germinação fúngica. As placas foram mantidas em câmara climatizada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  e realizada a contagem de conídios germinados e não germinados diariamente até o 4º dia. A germinação dos conídios foi observada utilizando microscópio óptico com magnitude de 400X e um número mínimo de 300 conídios por placa foi avaliado. O percentual de conídios viáveis foi calculado através da divisão do número de conídios germinados pelo número total de conídios contados (Alves, 1998).

### 3.6. Delineamento Experimental

Para realização do experimento foram preparadas quatro suspensões conidiais nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e uma solução controle sem adição de conídios. No grupo controle foi utilizado somente uma solução de água destilada e Tween 80 a 0,1%. Cada grupo foi formado por dez repetições. As concentrações utilizadas nos bioensaios de cada fase de desenvolvimento de *R. (B.) microplus* estão demonstradas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Suspensões de conídios dos isolados de *Nomuraea rileyi* utilizados nas diferentes fases de desenvolvimento de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

	Fêmeas ingurgitadas	Ovos	Larvas
Nr 177	$1,5 \times 10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$	$4,3 \times 10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$	$2,9 \times 10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
Nr 151	$1,0 \times 10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$	$4,8 \times 10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$	$5,6 \times 10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$

### 3.7. Obtenção de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dois bezerros foram infestados artificialmente na Estação Experimental com larvas oriundas de 300mg de ovos, durante três dias consecutivos. As fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso da baia e após a coleta, as fêmeas foram levadas ao Laboratório de Controle Microbiano, lavadas em água corrente e posteriormente imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos para assepsia da cutícula. Após serem secas em papel toalha estéril, parte das fêmeas foi submetida ao tratamento e outra parte mantida em placas de Petri em câmara climatizada a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 90\%$  para obtenção de ovos e larvas.

### 3.8. Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas

Para a homogeneização do peso das fêmeas ingurgitadas destinadas ao tratamento, o número de classes foi calculado através da fórmula de Yule (SAMPAIO, 2002) em função do número de observações (n). O intervalo de classe utilizado foi de 8 mg sendo o valor mínimo para o peso das fêmeas 200 mg e o valor máximo para a mesma variável 280 mg.

Para a formação dos grupos, uma fêmea de cada classe foi escolhida aleatoriamente, formando grupos com dez repetições. Após formação desses grupos, procedeu-se a pesagem individual das fêmeas, seguida pela sua identificação e seu respectivo tratamento.

As fêmeas ingurgitadas foram imersas em 1 ml de suspensão conidial, em tubos de ensaio por um período de três minutos. As fêmeas do grupo controle foram imersas em 1 ml de solução de água destilada estéril e Tween 80 0,1%. Após o tratamento, o excesso da suspensão foi retirado com ajuda de um papel toalha e, as fêmeas, devidamente identificadas, foram fixadas em fita dupla face adesiva, em placas de Petri, e mantidas em câmara climatizada sob condições ideais já descritas no item 3.7.

A massa de ovos oriunda de cada fêmea foi coletada e pesada diariamente, armazenada em pequenos frascos de vidro vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada sob condições já descritas. O percentual de eclosão das larvas foi acompanhado diariamente.

Os parâmetros biológicos utilizados para avaliar o efeito dos isolados de *N. rileyi* sobre fêmeas ingurgitadas foram: peso inicial das fêmeas (relativo ao peso de cada fêmea antes de submetê-la ao tratamento), período de pré-postura (período de dias compreendido entre o desprendimento da fêmea ingurgitada e o início da postura), peso de postura (somatório dos pesos diários das posturas), período de postura (período compreendido entre o primeiro e último dia da postura), período de incubação (período de dias compreendido entre o início da postura e a eclosão das primeiras larvas), período de eclosão (dias compreendido entre o início e o término da eclosão), percentual de eclosão das larvas (estimativa visual do percentual de larvas eclodidas em relação à massa de ovos), peso da quenógina (peso de cada fêmea três dias após o término de sua postura).

Esses parâmetros foram observados para permitir o cálculo dos Índices de Produção de Ovos (IPO) e Nutricional (IN), que foram obtidos através das equações a seguir, segundo Bennett (1974):

$$\text{IPO} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times 100$$

$$\text{IN} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso da teleógina (g) - peso da quenógina (g)}} \times 100$$

Para a obtenção do Percentual de controle de *R. (B.) microplus* exercido pelo fungo *N. rileyi*, foi calculada a Reprodução Estimada (RE). Ambos os cálculos foram realizados de acordo com Drummond et al., (1971) e obtidos através das seguintes equações:

$$\text{RE} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso da teleógina (g)}} \times \% \text{ eclosão larvas} \times 20000$$

$$\text{Percentual de controle} = \frac{\text{média RE (controle)} - \text{média RE (tratado)}}{\text{média RE (controle)}} \times 100$$

### **3.9. Bioensaio com Ovos**

No décimo dia de postura das fêmeas não tratadas (mantidas incubadas para postura), os ovos foram pesados, separados em alíquotas de 50 mg e acondicionados em tubos de ensaio devidamente vedados com algodão hidrófilo. Para realizar o tratamento, os ovos foram imersos em 1 ml de suspensão conidial por 3 minutos, e cada grupo era formado por 10 repetições. Após o tratamento, os tubos de ensaio foram mantidos em câmara climatizada sob condições de umidade e temperatura descritas no item 3.7, e o percentual de eclosão das larvas foi avaliado diariamente.

### **3.10. Bioensaio com Larvas**

Parte da postura das fêmeas foi pesada e separada em alíquotas de 50 mg no décimo dia de postura. Os ovos foram acondicionados em tubos de ensaio, mantidos em câmara climatizada até a completa eclosão das larvas. Os tubos de ensaio que não apresentaram eclosão superior a 95% não foram utilizados no bioensaio. O tratamento ocorreu no 15º dia após o início da eclosão das larvas e a metodologia utilizada para o bioensaio com as larvas de *R. (B.) microplus* foi a mesma descrita para fêmeas ingurgitadas e ovos. A estimativa do percentual de mortalidade das larvas foi observada a cada cinco dias, até o 20º dia após a realização do tratamento das mesmas.

### **3.11. Reisolamento dos Isolados Fúngicos após o Bioensaio**

As quenóginas do grupo controle e dos grupos tratados com as suspensões conidiais foram colocadas em câmara úmida e incubadas em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 90\%$  para facilitar o desenvolvimento de *N. rileyi*. Após 30 dias, as quenóginas foram transferidas para meio de cultura SMAY modificado em placas de Petri com para posterior confirmação das características macro e micromorfológicas.

### **3.12. Análise Estatística**

Para análise dos dados referentes ao peso inicial das fêmeas, período de pré-postura, peso de postura, período de postura, período de incubação, período de eclosão e peso da quenóquina foi realizada a análise de variância, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

Para análise dos dados referentes ao percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de fêmeas tratadas, da eclosão das larvas oriundas dos ovos submetidos ao tratamento e do percentual de mortalidade das larvas, foi realizada a análise de Kruskal Wallis, seguida pelo teste t de Student para comparação entre as ordenações médias, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) (SAMPALHO, 2002).

O cálculo das concentrações letais,  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , foi realizado pelo método de análise de próbites segundo Finney (1971), e os cálculos foram realizados com o auxílio do programa "Probit or Logit Analysis".



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação Morfológica dos Isolados

Em meio de cultura SMAY modificado, *Nomuraea rileyi* apresentou colônias verdes, e fiálides com aspecto de “garrafa”, engrossadas na base e com um pequeno pescoço, onde se originou conídios unicelulares. Na placa de Petri foram visualizados inúmeros conídios com formato elipsóide ou cilíndrico, bastantes hifas e pouquíssimos conidióforos. Essas características estão de acordo com as descritas por ALVES (1998).

Os aspectos macromorfológicos da colônia foram avaliados no 30º dia de incubação apresentando tamanho de 1,5 cm de diâmetro, margens irregulares, aspecto convexo, pulverulenta e de coloração esverdeada. O reverso da colônia apresentou coloração amarelada. Essas características estão de acordo com Samson (1974).

### 4.2 Viabilidade das Suspensões de Conídios

Os conídios dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* apresentaram 100% de germinação, sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ , porém somente após um período de 96 horas, quando acrescido ou não de cloranfenicol.

Os resultados demonstraram que a germinação dessa espécie de fungo ocorre mais tardiamente quando comparado a outras espécies de fungo entomopatogênicos. Como descritos por diversos autores. Bahiense et al. (2007), testaram os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre cepa de *R. (B.) microplus* resistente a deltametrina em teste de estábulo; Angelo (2007) avaliou o efeito dos fungos *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *Lecanicillium lecanii* sobre as diferentes fases de desenvolvimento do mesmo carrapato, e Fernandes (2007) testou 53 isolados de *B. bassiana* sobre larvas de *R. (B.) microplus*. Em todos esses estudos, os isolados apresentaram germinação próxima a 100% em um período de 24 horas.

A velocidade do processo de germinação dos fungos depende do isolado, das condições ambientais e do passado térmico dos conídios. Pekrul e Grula (1979), Jackson et al., (1985) apud ALVES (1998) relataram que os conídios dos isolados mais virulentos de *B. bassiana*, *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) e *Verticillium lecanii* apresentaram maior velocidade de germinação quando comparado aos isolados menos virulentos da mesma espécie. No entanto, outros estudos demonstraram que o isolado mais virulento de *N. rileyi* foi o que germinou mais lentamente (BOUCIAS; PENDLAND, 1984). apud ALVES (1998).

Experimentos realizados por Sujii et al. (2002), em nível de campo, demonstraram que a viabilidade dos conídios de *N. rileyi* pode permanecer elevada (acima de 75%) sobre a superfície de cadáveres da lagarta *A. gemmatilis* por um período de até 10 dias. Isso comprova que os conídios do isolado CG 859 de *N. rileyi* foram capazes de resistir às condições ambientais, além de atuarem como fonte de inóculo durante este período. Embora esses conídios tenham apresentado elevado percentual de germinação em condições não controladas, esta ocorreu de forma lenta, confirmando o atraso na germinação de conídios de *N. rileyi* quando comparado a germinação de conídios de outros fungos entomopatogênicos.

### 4.3 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

#### 4.3.1 Peso médio das fêmeas ingurgitadas

O peso médio das fêmeas utilizadas no grupo controle e nos grupos tratados com as diferentes concentrações dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* se encontram na tabela 2 e são similares aos descritos por Bennett (1974).

**Tabela 2.** Peso médio, em gramas, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	10 <sup>5</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>
Nr 177	0,2403 a	0,2400 a	0,2390 a	0,2389 a	0,2397 a
Nr 151	0,2403 a	0,2388 a	0,2394 a	0,2411 a	0,2400 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ).

Bennett (1974) descreveu que fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* com pequeno tamanho são menos eficientes na produção de ovos quando comparadas a fêmeas com peso entre 160 e 300 mg. No presente estudo, o peso médio das fêmeas dos grupos controle ou tratado com as diferentes concentrações conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 do fungo *N. rileyi* se enquadram nessa faixa ideal de peso, dando confiabilidade as amostras de *R. (B.) microplus* selecionadas, e indicando que houve homogeneização das amostras em todos os grupos avaliados.

#### 4.3.2 Período de pré-postura

O período de pré-postura não demonstrou diferença significativa dos grupos tratados com as diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 do fungo *N. rileyi* quando comparados com o grupo controle (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média do período de pré-postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com suspensões conidiais de diferentes suspensões dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	10 <sup>5</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>
Nr 177	2,2 ab	2,2 ab	2 b	2,1ab	2,5 a
Nr 151	2,2 a	2,2 a	2 a	2,1 a	2,1 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ).

Davey et al (1984) relataram que o período de pré-postura em *R. (B.) microplus* se mantém dentro de uma faixa de variação de um a seis dias sob temperaturas de 22 a 27°C corroborando os dados encontrados no grupo controle do presente bioensaio. As fêmeas tratadas foram mantidas em câmara climatizada sob temperatura de 27°C de acordo com o

Dipeolu (1984), pois essa temperatura se encontra dentro da faixa considerada ideal para espécies do gênero *Boophilus*.

*Nomuraea rileyi* não foi capaz de ocasionar alteração no período de pré-postura, fato esse que pode ser atribuído a ausência de conídios sobre a superfície das quenóginas, quando as mesmas foram colocadas em placa de Petri em meio SMAY modificado para ser realizado o isolamento fúngico.

Angelo (2007) utilizou diferentes concentrações conidiais dos fungos entomopatogênicos *P. lilacinus*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *Lecanicillium lecanii* e avaliou seus efeitos *in vitro* sobre diferentes parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus*. O autor não observou redução significativa do período de pré-postura dos grupos tratados com as suspensões conidiais, independente da espécie do fungo e da concentração de conídios utilizadas.

Bittencourt et al. (1994) avaliaram a ação do fungo *M. anisopliae* (isolados mãe e Bm) sobre fêmeas de *R. (B.) microplus* e observaram aumento no período de pré-postura quando utilizaram ambos isolados nas concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . Esses dados demonstram o potencial desse entomopatógeno no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

#### 4.3.3 Peso da postura

No presente trabalho, os isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* não demonstraram alterações no peso da postura de fêmeas ingurgitadas tratadas com as diferentes suspensões conidiais, quando estas foram comparadas entre si ou com o grupo controle. (Tabela 4).

**Tabela 4.** Peso médio da postura, em gramas, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
Nr 177	0,1297 a	0,1222 a	0,1380 a	0,1323 a	0,1177 a
Nr 151	0,1297 a	0,1250 a	0,1422 a	0,1226 a	0,1233 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ).

Fernandes et al., (2002) ao avaliarem esse parâmetro biológico de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* submetidas ao tratamento com três isolados de *M. anisopliae* (Ma01, Ma02 e Ma04) e um isolado de *B. bassiana* (Bb30) também observaram que esses fungos não provocaram alteração significativa no peso total da postura.

Os trabalhos supracitados diferem dos resultados encontrados por Bittencourt et al., (1992) que, ao utilizarem suspensões nas concentrações  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  sobre fêmeas da mesma espécie de carrapato observaram uma quantidade de massa de ovos inferior ao do grupo controle, independente da concentração conidial utilizada nos diferentes tratamentos. Esses resultados evidenciaram a patogenicidade de *M. anisopliae* sobre essa fase não parasitária de *R. (B.) microplus*.

#### 4.3.4 Período de postura

As diferentes suspensões de *N. rileyi* utilizando os isolados Nr 177 e Nr 151 não apresentaram alterações significativas do período de postura de fêmeas de *R. (B.) microplus* (tabela 5).

Glória et al. (1993) descreveram que as fêmeas de *R. (B.) microplus* mantidas na temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  apresentaram períodos de postura com duração de 3 a 16 dias. Esse período foi compatível com o observado no grupo controle do presente trabalho, em média 11 dias, garantindo assim a validade da amostra de *R. (B.) microplus* utilizada no bioensaio.

Esses resultados foram similares aos obtidos por Angelo (2007), que utilizou os isolados CG 202 e CG 36 dos fungos *I. fumosorosea* e *P. lilacinus*, respectivamente, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e não observou redução significativa desse parâmetro. Porém, os isolados CG 420 de *L. lecanii* e CG 198 de *I. farinosa* causaram diminuição significativa do período de postura das fêmeas quando foram utilizadas as concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de *L. lecanii* e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de *I. farinosa*.

**Tabela 5.** Média do período de postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
Nr 177	11,9 a	11,5 a	11 a	10,7 a	11,8 a
Nr 151	11,9 a	11,1 a	12,3 a	11,1 a	10,3 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ).

Outro trabalho também demonstrou redução significativa no período de postura das fêmeas de *R. (B.) microplus* quando diferentes suspensões conidiais de *M. anisopliae* ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ) foram testadas (BITTENCOURT et al., 1994). Esta redução foi inversamente proporcional à concentração do fungo utilizada, demonstrando sua eficácia quando utilizado no controle biológico dessa espécie de carrapato.

#### 4.3.5 Período de incubação

O período de incubação foi um dos parâmetros avaliados para identificar o efeito dos isolados entomopatogênicos Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* sobre a fase não parasitária de *R. (B.) microplus*, não demonstrando redução significativa desse parâmetro nos grupos tratados, independente da concentração de conídios utilizada (Tabela 6).

**Tabela 6.** Média do período de incubação, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	10 <sup>5</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>
Nr 177	23,0 a	23,2 a	23,1 a	23,1 a	23,4 a
Nr 151	23,0 a	23,2 a	23,3 a	23 a	23,2 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ).

Segundo Glória et al. (1993), o período de incubação de ovos de *R. (B.) microplus* variou de 24 a 27 dias quando as fêmeas foram colocadas na temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $80 \pm 10\%$ . No entanto, no presente estudo, sob as mesmas condições de temperatura e umidade, esse parâmetro variou entre 23 e 23,4 dias, apresentando maior proximidade com os dados encontrados por Bittencourt et al. (1994), em que o grupo controle apresentou 22,47 dias.

Bittencourt et al. (1994) descreveram um aumento no período de incubação dos ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas dessa mesma espécie de carrapato tratadas com as concentrações  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  de *M. anisopliae*. Esse aumento foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de conídios utilizada.

Fernandes et al., (2002) relataram não haver qualquer diferença nesse parâmetro quando os isolados Ma01, Ma02 e Ma04 de *M. anisopliae* e o isolado Bb30 de *B. bassiana* foram testados sobre fêmeas de *R. (B.) microplus*, diferindo dos trabalhos realizados anteriormente por Bittencourt et al. (1994, 1997).

Perinotto et al.,(2006), ao avaliarem os efeitos do isolado Nr 138 do fungo *N. rileyi* sobre fêmeas de *R. (B.) microplus*, observaram diferenças significativas nesse parâmetro quando compararam os grupos tratados com o grupo controle. Porém, o resultado foi inferior aos obtidos com outros fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* (BITTENCOURT et al.,1994) e *B. bassiana* (BITTENCOURT et al.,1997).

#### 4.3.6 Período de eclosão das larvas

As diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* não causaram diminuição significativa do período de eclosão das larvas, conforme mostrados na tabela 7.

**Tabela 7.** Média do período de eclosão das larvas, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	10 <sup>5</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup> con. ml <sup>-1</sup>	10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>
Nr 177	6,1 a	4,8 a	5,5 a	5,5 a	5,3 a
Nr 151	6,1 a	5,7 a	7,9 a	6,5 a	6,7 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ).

Perinotto et al.,(2006) ao avaliarem o mesmo parâmetro em fêmeas de *R. (B.) microplus* utilizando o isolado Nr 138 de *N. rileyi*, observaram que a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foi capaz de reduzir o período de eclosão das larvas oriundas da postura das fêmeas que foram submetidas ao tratamento. Esse período foi de 4,7 dias enquanto que no grupo controle foi de 8,8 dias. Esses dados demonstram que diversos isolados podem apresentar resultados diferentes para uma mesma espécie de carrapato e que novos estudos devem ser realizados com o objetivo de testar a ação de outros isolados de *N. rileyi*.

No trabalho realizado por Angelo (2007), o período de eclosão das larvas foi reduzido significativamente somente com a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  do isolado CG 36 de *P. lilacinus*. Os isolados CG 198 de *I. farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 420 de *L. lecanii* não foram capazes de causar redução significativa desse parâmetro.

#### 4.3.7 Índice nutricional

Os isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* não causaram diminuição significativa do índice nutricional das fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, independentemente da concentração de conídios utilizada (tabela 8).

Esses resultados diferem dos encontrados por Perinotto et al.,(2006) que ao utilizarem o isolado Nr 138 de *N. rileyi* observaram redução significativa nesse parâmetro, porém somente com a maior concentração testada ( $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ), no qual o índice nutricional foi de 52%. O autor relata que apesar de ter apresentado um bom resultado, outras espécies de fungos entomopatogênicos, como *B. Bassiana* e *M. anisopliae*, apresentam resultados mais promissores para o controle biológico de carrapatos.

**Tabela 8.** Média do índice nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
Nr 177	73,10 a	66,25 a	75,23 a	74,91 a	67,81 a
Nr 151	73,10 a	74,43 a	78,16 a	67,37 a	68,27 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de t de Student ( $p \leq 0,05$ ).

Bahiense et al. (2007) relataram que o fungo *M. anisopliae* na concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  reduziu o índice nutricional de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* tratadas sobre bovinos em teste de estábulo. Essa redução foi considerada significativa quando comparado ao grupo controle nos dias +2 e +25 pós-tratamento.

Em estudos realizados com outras espécies de fungos, Angelo (2007) observou que *I. fumosorosea* demonstrou redução significativa do índice nutricional de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Esses valores foram 59,02% no grupo tratado com a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  enquanto que no grupo controle, esse valor foi de 69,65%. O isolado de *L. lecanii* também demonstrou redução nesse parâmetro quando as duas maiores concentrações conidiais ( $10^8$  e  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ) foram utilizadas, enquanto que somente a concentração de  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  do isolado de *I. farinosa* foi capaz de causar diminuição significativa do índice nutricional das fêmeas. O isolado CG 36 de *P. lilacinus* não causou redução desse parâmetro, similarmente aos resultados encontrados no presente estudo.

#### 4.3.8 Índice de produção de ovos

*Nomuraea rileyi* (isolados Nr 177 e Nr 151) não demonstrou potencial patogênico para as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, pois não ocasionou diminuição significativa no índice de produção de ovos, independente da concentração de conídios utilizada (Tabela 9).

O grupo controle apresentou índice de produção de ovos semelhantes aos demonstrados em estudos prévios realizados em condições similares de temperatura ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ) (Glória et al., 1993). Portanto, a cepa de *R. (B.) microplus* testada no presente estudo apresentou resultados condizentes com os descritos na literatura.

**Tabela 9.** Média do índice de produção de ovos (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
Nr 177	54,49 a	50,33 a	58,14 a	55,72 a	49,22 a
Nr 151	54,49 a	53,20 a	59,19 a	50,50 a	51,81 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de t de Student ( $p \leq 0,05$ ).

Diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, outros estudos têm demonstrado resultados mais promissores ao testarem outras espécies de fungos entomopatogênicos. Angelo (2007) relatou que o fungo *L. lecanii* reduziu significativamente esse índice quando as quatro diferentes concentrações de conídios foram testadas sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Gindin et al. (2001) obtiveram resultados similares aos encontrados por Angelo (2007), pois ao utilizarem a concentração  $1 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de *L. lecanii* sobre *B. annulatus*, *R. sanguineus* e *Hyalomma excavatum*, obtiveram redução da massa de ovos das fêmeas ingurgitadas. Dessa forma, pode-se sugerir que as gerações futuras do carrapato estarão comprometidas, uma vez que *L. lecanii* foi capaz de interferir na postura das fêmeas ingurgitadas.

Bahiense (2007) ao testar o potencial de *M. anisopliae* sobre *R. (B.) microplus* em teste de estábulo descreveram que houve redução no índice de produção de ovos no segundo dia após as fêmeas terem sido submetidas ao tratamento com suspensão aquosa do fungo na concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ .

O índice de produção de ovos de *R. (B.) microplus* tratados com dois isolados de *M. anisopliae* (isolado mãe ou isolado Bm) foi de 5% a 38% e 4,7% a 34,5% respectivamente, enquanto que o grupo controle apresentou índices maiores, variando de 54,9% e 55,4%. Em ambos os isolados testados, a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  apresentou melhores resultados quando comparada com as demais concentrações utilizadas (Bittencourt et al., 1994).

Pirali-Kheirabadi et al. (2007), ao avaliarem a patogenicidade dos isolados de *M. anisopliae* (IRAN 437 ou DEMI 001), *B. bassiana* (IRAN 403 C), *L. psalliotae* (IRAN 468 C e IRAN 518 C) sobre as diferentes fases de desenvolvimento de *R.(B.) annulatus* observaram que todos os isolados testados provocaram diminuição significativa na eficiência reprodutiva das fêmeas tratadas. Os isolados IRAN 437 de *M. anisopliae* e IRAN 468 C de *L. psalliotae* quando testados na maior concentração,  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , ocasionaram uma diminuição de 88,69% e 78,15% neste parâmetro, respectivamente. A eficiência reprodutiva desses dois isolados mostrou ser inversamente proporcional à concentração conidial utilizada.

#### 4.3.9 Percentual de eclosão

O isolado Nr 177 de *N. rileyi* ocasionou diminuição significativa do percentual de eclosão das larvas oriundas da postura de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* tratadas com a suspensão  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . As demais concentrações desse isolado, assim como todas as suspensões do isolado Nr 151, não foram capazes de ocasionar tal redução quando comparados com o grupo controle (tabela 10).

**Tabela 10.** Percentual médio de eclosão das larvas oriundas dos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
Nr 177	91,0 ac	75 bc	94,2 a	86,1 ab	68,5 b
Nr 151	91,0 a	73,7 a	90,1 a	74,3 a	82,8 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de t de Student ( $p \leq 0,05$ ).

Resultados mais promissores foram obtidos por Perinotto et al., (2006) ao utilizarem o isolado Nr 138 do fungo *N. rileyi*, ocasionando uma redução significativa de 36% nesse parâmetro, quando a maior concentração conidial ( $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ) foi utilizada.

*Isaria fumosorosea* foi capaz de reduzir o percentual de eclosão de larvas, porém somente quando se utilizou as concentrações  $10^6$  e  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  no tratamento de fêmeas ingurgitadas. No entanto, com os isolados de *I. farinosa*, *P. lilacinus* e *L. lecanii* tal redução não foi demonstrada nas diferentes concentrações conidiais utilizadas (Ângelo, 2007).

Bittencourt et al. (1994) obtiveram melhores resultados com as concentrações  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de dois isolados de *M. anisopliae* (isolado mãe e isolado Bm) sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, porém as demais concentrações ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ) também apresentaram redução significativa desse parâmetro.

Bittencourt et al., (1992) relataram que o percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de fêmeas de *R. (B.) microplus* tratadas com os mesmos isolados de *M. anisopliae* descritos no parágrafo acima, foi bem inferior ao do grupo controle. Esses índices ficaram entre 0 e 60% de acordo com as suspensões conidiais utilizadas, enquanto que o índice obtido com o grupo controle foi superior a 90% de eclosão, demonstrando o potencial de *M. anisopliae* no controle desse artrópode.

Bittencourt et al. (1997) ao verificarem a patogenicidade *in vitro* dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* observaram que os valores desse percentual decresceram progressivamente de acordo com o aumento das concentrações de conídios utilizadas em cada tratamento. Esses dados foram similares aos encontrados por Bittencourt et al. (1995) e Peralva et al., (1996), que testaram os mesmos isolados de *B. bassiana* sobre as diferentes fases do desenvolvimento de *R. (B.) microplus*.

Fernandes et al., (2002) avaliaram três isolados de *M. anisopliae* (Ma01, Ma02 e Ma03) e um isolado de *B. bassiana* (Bb30) quanto a sua patogenicidade para fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Esses autores observaram redução significativa do percentual de eclosão das larvas em pelo menos um dos grupos tratados com os diferentes isolados.

O fungo *B. bassiana* foi utilizado em infecção experimental de fêmeas de *Ixodes ricinus* por Boyce e Rizvanov, (1960), mantidas a temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e umidade relativa de



90%. Esses autores observaram um percentual de eclosão das larvas de apenas 6,5%, demonstrando que esse entomopatógeno exerce controle sobre a população de carrapatos da espécie *I. ricinus*.

Kaaya et al. (1996) evidenciaram em testes *in vitro* com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, que a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  inibiu a eclosão das larvas de *Amblyomma variegatum*. As larvas provenientes dos ovos das fêmeas tratadas com *M. anisopliae* apresentaram um índice de eclosão de 3,9%; não sendo evidenciada eclosão quando as fêmeas foram tratadas com *B. bassiana*, demonstrando assim, uma grande redução desse parâmetro, já que no grupo controle o percentual de eclosão foi de 68,3%.

Os resultados do presente estudo não foram tão promissores quanto os obtidos pelos autores supracitados. Essas diferenças podem ser atribuídas tanto às espécies de carrapatos quanto aos diferentes fungos entomopatogênicos estudados.

#### 4.3.10 Percentual de controle

Ao tratar as fêmeas de *R. (B.) microplus* com o isolado Nr 177 de *N. rileyi*, foi obtido um percentual de controle de 17,15 e 27,62% nas concentrações  $10^5$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  respectivamente. O isolado Nr 151 foi capaz de ocasionar um pequeno percentual de controle nas diferentes concentrações testadas, exceto na concentração  $10^6$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , como demonstrado na tabela 11.

**Tabela 11.** Percentual médio de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	$10^5$ conídios $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ conídios $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ conídios $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ conídios $\text{ml}^{-1}$
Nr 177	17,15	-16,66	-3,06	27,62
Nr 151	15,90	-13,92	15,39	3,25

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de t de Student ( $p \leq 0,05$ ).

As diferentes concentrações de ambos os isolados de *N. rileyi* testados no presente experimento apresentaram resultados menos satisfatórios que os observados em outros estudos, nos quais foram utilizadas outras espécies de fungos entomopatogênicos sobre o carrapato *R. (B.) microplus*.

Perinotto et al.,(2006) ao avaliarem a ação do isolado Nr 138 de *N. rileyi* sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. (B.) microplus*, obtiveram um percentual de controle de 67,36%. Esses resultados foram mais satisfatórios que os obtidos neste estudo.

Estudos realizados por Angelo (2007) calculou o percentual de controle de diversos isolados a  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e relatou os seguintes resultados: *L. lecanii* ocasionou 41,02%, *I. farinosa* 25,15%, *I. fumosorosea* 59,19%. Esses resultados foram bem melhores do que os obtidos no presente estudo, exceto o isolado CG 36 de *P. lilacinus* que apresentou resultados similares ao presente estudo, mostrando percentuais variando entre 4,28% e 13,5%.

O percentual de controle obtido com o isolado Ma 959 de *M. anisopliae* sobre o carrapato *R. (B.) microplus* foi de 96,60%, resultado esse bem superior aos isolados testados de *N. rileyi* (Bittencourt et al., 1992). Vale ressaltar que a ação patogênica do fungo *M. anisopliae* vem sendo amplamente estudada nos últimos anos sobre vários gêneros de carrapatos, e até mesmo sobre outros gêneros de artrópodes.

Bittencourt et al. (1992) observaram que o percentual de controle nos grupos tratados com a suspensão Mãe variou de 38,5 a 97,4% e com a suspensão Bm variou de 40,1 a 96,6% em função da concentração conidial utilizada. Esse percentual de controle elevado demonstrou o potencial desse entomopatógeno no controle do carrapato dos bovinos.

*Nomuraea rileyi* é considerado um fungo entomopatogênico com potencial para controle biológico da lagarta *Anticarsia gemmatalis*. Seja em condições naturais ou quando testado em condições laboratoriais, o percentual de controle obtido é bastante satisfatório.

#### 4.4 Bioensaio com Ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

As diferentes suspensões conidiais testadas nos bioensaios com os isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* não foram capazes de reduzir o percentual de eclosão de larvas quando os ovos de *R. (B.) microplus* foram submetidos ao tratamento (Tabela 12).

**Tabela 12.** Percentual médio de eclosão das larvas oriundas dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes suspensões conidiais dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

Isolado Fúngico	Controle	10 <sup>5</sup> conídios ml <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> conídios ml <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup> conídios ml <sup>-1</sup>	10 <sup>8</sup> conídios ml <sup>-1</sup>
Nr 177	98,2 a	98,6 a	98,4 a	97,4 a	98,1 a
Nr 151	98,2 a	98,5 a	98,2 a	98,5 a	98,3 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de t de Student ( $p \leq 0,05$ ).

O trabalho de Perinotto et al.,(2006) apresentou diferentes resultados com o isolado Nr 138 de *N. rileyi*, pois obtiveram uma redução de 50% no percentual de eclosão das larvas de *R. (B.) microplus* quando utilizaram a concentração 10<sup>8</sup> conídios ml<sup>-1</sup>. Esses dados não foram tão relevantes quanto os demonstrados por Bittencourt et al. (1996), que ao testarem dois isolados de *B. bassiana* (Bb 986 e Bb 747) sobre os ovos desse mesmo carrapato, obtiveram uma variação no percentual de eclosão entre 20 e 86,6% nos grupos tratados e de 93,3% no grupo controle.

*Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana* também demonstraram resultados satisfatórios nos tratamentos com ovos de *R. (B.) microplus*, ao reduzirem o percentual de eclosão quando foram utilizadas as concentrações de 10<sup>8</sup> conídios ml<sup>-1</sup> (PAIÃO et al., 2001).

Angelo (2007) ao utilizar os fungos entomopatogênicos *L. lecanii* e *I. farinosa* obteve resultados significativos reduzindo o percentual de eclosão das larvas pelo menos em uma das concentrações utilizadas, porém o isolado CG 36 de *P. lilacinus* não foi capaz de causar redução desse parâmetro. Os melhores resultados foram obtidos com *I. fumosorosea*, que reduziu significativamente a eclosão das larvas em praticamente todas as concentrações, com exceção da concentração 10<sup>6</sup> conídios ml<sup>-1</sup>. Esse resultado também foi demonstrado em outra etapa do mesmo estudo, quando se observou que *I. fumosorosea* foi capaz de reduzir a eclosão das larvas provenientes dos ovos das fêmeas ingurgitadas tratadas.

Monteiro et al., (1998a, b) testaram a patogenicidade dos isolados 747 e 986 de *B. bassiana* e os isolados 959, E9 e 319 de *M. anisopliae* sobre o carrapato *R. sanguineus* e obtiveram excelentes resultados. Vinte dias após o tratamento, e utilizando a concentração de 10<sup>8</sup> conídios ml<sup>-1</sup> não havia ocorrido eclosão das larvas em 95% dos ovos que foram submetidos ao tratamento. Além disso, Bittencourt et al. (2000) ao testarem três isolados de *M. anisopliae* e um isolado de *B. bassiana* sobre ovos do carrapato *Anocentor nitens*

observaram uma redução do percentual de eclosão das larvas variando de 30 a 90%. Esses dados demonstram a patogenicidade desses fungos sobre outras espécies de carrapatos.

#### 4.5 Bioensaio com Larvas não Alimentadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

No presente estudo, os melhores resultados obtidos com *N. rileyi* foram sobre as larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus*. A concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  do isolado Nr 177 de *N. rileyi* foi capaz de promover um percentual de mortalidade das larvas de 14,5 e 69,5% no 15° e 20° dia após o tratamento, respectivamente. As demais concentrações apresentaram um percentual de mortalidade significativo, no entanto esses resultados não foram tão satisfatórios quanto aos obtidos com a maior concentração testada. Esses dados são relevantes, pois não houve mortalidade das larvas no grupo controle, evidenciando que a mortalidade nos diferentes tratamentos, mesmo que tardiamente, se deve a patogenicidade do isolado fúngico (Tabela 13).

**Tabela 13.** Percentual médio de mortalidade das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes suspensões conidiais do isolado Nr 177 de *Nomuraea rileyi*\*.

<i>Nomuraea rileyi</i> (Nr 177)	Controle	$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
15° dia	0 (a)	4,6 cd	3,5 bd	5,5 bc	14,5 b
20° dia	0 (a)	33,5 b	5,8 b	7,5 b	69,5 c

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de t de Student ( $p \leq 0,05$ ).

O isolado Nr 151 de *N. rileyi* não apresentou um percentual de mortalidade esperado sobre as larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus*, quando estas foram submetidas ao tratamento com as diferentes suspensões conidiais. Ao utilizar a maior concentração ( $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ), o percentual de mortalidade ficou entre 10 e 15%, somente no 15° e 20° dia após o tratamento.

**Tabela 14.** Percentual médio de mortalidade das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes suspensões conidiais do isolado Nr 151 de *Nomuraea rileyi*\*.

<i>Nomuraea rileyi</i> (Nr 151)	Controle	$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$
15° dia	0 a	0 a	0 a	5 a	10 a
20° dia	0 a	0 a	0 a	10 a	15 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de t de Student ( $p \leq 0,05$ ).

Perinotto et al., (2006), ao avaliarem o isolado Nr 138 de *N. rileyi*, não obtiveram resultados satisfatórios quanto à mortalidade das larvas de *R. (B.) microplus* no 10° dia após o tratamento com as diferentes suspensões conidiais ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ). Isso pode ser atribuído ao fato da germinação completa dos conídios dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *N.*

*rileyi* ocorrer lentamente, por volta de 96 horas, retardando assim o processo de infecção. No presente estudo, o isolado Nr 177 somente provocou mortalidade das larvas a partir do 15º dia.

Bittencourt et al. (1996) ao verificarem a patogenicidade dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* sobre larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus* observaram um maior percentual de mortalidade das larvas dos grupos tratados com as suspensões fúngicas de diferentes concentrações, variando entre 18,8 e 88%; enquanto que no grupo controle esse percentual variou entre 13 e 16,5%.

Bahiense et al. (2003) também obtiveram bons resultados ao testarem o isolado Bb LCM 01 de *B. bassiana* sobre larvas de *R. (B.) microplus*. O percentual de mortalidade foi de 6, 14, 27, 55 e 93% nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente, dez dias após tratamento. Esses resultados demonstram o elevado potencial carrapaticida de *B. bassiana* sobre larvas não alimentadas do carrapato *R. (B.) microplus*.

Castro et al. (1997) ao utilizarem o isolado 959 de *M. anisopliae* sobre adultos, ninfas e larvas de *R. (B.) microplus* em teste de estábulo, obtiveram os seguintes resultados: a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  ocasionou um percentual de mortalidade de 41, 69,4 e 47,7%, respectivamente. Em relação à mortalidade das larvas, os melhores resultados foram observados logo após a infecção fúngica, demonstrando haver uma maior atividade do fungo sobre as fases evolutivas do carrapato imediatamente após as mudas, pois o quadro de infecção inicial nesses artrópodes ocorre através da colonização e penetração de seu tegumento.

Ao testarem a patogenicidade dos isolados 747 e 986 de *B. bassiana* sobre ovos e larvas de *R. sanguineus*, Monteiro et al., (1998a, b) observaram redução do percentual de eclosão e na sobrevivência das larvas conforme foram utilizadas as maiores concentrações conidiais. Monteiro et al., (2000), ao avaliarem a ação do isolado 986 de *B. bassiana* sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *A. nitens*, obtiveram os melhores resultados com larvas não alimentadas. Esses dados, foram similares aos encontrados no presente estudo com o isolado Nr 177 de *N. rileyi*, embora as espécies de fungo e carrapatos testados por Monteiro et al., (1998 a, b; 2000) tenham sido distintas.

As concentrações letais,  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$ , obtidas com os isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* sobre larvas não alimentadas estão demonstradas na tabela 15. Esses valores indicam a concentração de conídios necessária para causar mortalidade de 50% ( $\text{CL}_{50}$ ) e 90% ( $\text{CL}_{90}$ ) da população de larvas de carrapatos submetida ao tratamento.

**Tabela 15.** Concentrações letais,  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{90}$  dos isolados Nr 177 e Nr 151 de *Nomuraea rileyi* obtidas através da avaliação do percentual de mortalidade de larvas não alimentadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Fungos	Dias após o tratamento		
		15º dia	20º dia
<i>Nomuraea rileyi</i> (Nr 177)	$\text{CL}_{50}$	$2,43 \times 10^{13}$ con. $\text{ml}^{-1}$	$2,54 \times 10^9$ con. $\text{ml}^{-1}$
	$\text{CL}_{90}$	$1,12 \times 10^{18}$ con. $\text{ml}^{-1}$	$2,95 \times 10^{13}$ con. $\text{ml}^{-1}$
<i>Nomuraea rileyi</i> (Nr 151)	$\text{CL}_{50}$	$1,78 \times 10^{12}$ con. $\text{ml}^{-1}$	$1,29 \times 10^{13}$ con. $\text{ml}^{-1}$
	$\text{CL}_{90}$	$2,36 \times 10^{15}$ con. $\text{ml}^{-1}$	$1,06 \times 10^{18}$ con. $\text{ml}^{-1}$

Bittencourt et al. (1997) ao testarem o isolado 747 de *B. bassiana* obtiveram os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> de 3,21 x 10<sup>6</sup> conídios ml<sup>-1</sup> e 8,74 x 10<sup>8</sup> conídios ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Concentrações letais menores foram obtidas quando os autores utilizaram o isolado 986 de *B. bassiana*: CL<sub>50</sub> de 2,23 x 10<sup>6</sup> conídios ml<sup>-1</sup> e CL<sub>90</sub> de 1,41 x 10<sup>8</sup> conídios ml<sup>-1</sup>. Com base nesses baixos valores obtidos nas concentrações letais, os isolados de *B. bassiana* foram considerados patogênicos para larvas de *R. (B.) microplus*. Valores próximos dessas concentrações letais foram obtidos no presente estudo, com exceção do isolado Nr 177 de *N. rileyi* no 15º dia após o tratamento, portanto os isolados utilizados no presente estudo apresentam patogenicidade sobre a mesma fase de desenvolvimento desse carrapato.

#### 4.6 Reisolamento Fúngico

As amostras de quenóginas, ovos e larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus* submetidas ao tratamento com as diversas concentrações dos isolados fúngicos de *N. rileyi*, assim como as amostras utilizadas no grupo controle não apresentaram desenvolvimento de colônias após 20 dias de incubação em câmara úmida.

Gindin et al. (2001) utilizaram suspensões de nove fungos sobre as diferentes fases de desenvolvimento de *B. annulatus*, nos quais somente cinco fungos foram patogênicos: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *I. fumosoroseus* e *V. lecanii*. Os autores relataram que os carrapatos submetidos ao tratamento com *M. anisopliae* e *M. flavoviride* apresentaram as superfícies dorsais e ventrais colonizadas pelo fungo e os que foram submetidos ao tratamento com *B. bassiana* e *I. fumosoroseus*, a colonização fúngica ocorreu de forma diferente, através das aberturas naturais. *Verticillium lecanii* mesmo mostrando sua patogenicidade sobre este artrópode, não colonizou a superfície dos espécimes tratados, pois não apresentou sinais típicos da infecção fúngica. O mesmo ocorreu com os isolados de *N. rileyi* testados no presente estudo.

#### 4.7 Considerações Finais

Mais de 90% dos hospedeiros susceptíveis a *N. rileyi* são pertencentes a Ordem Lepidoptera, e as variações quanto ao tempo da germinação dos conídios sobre suas cutículas, variam de acordo com cada espécie hospedeira implicada. A germinação de conídios no tegumento de *S. litura* ocorre entre 46 e 48h e é bem similar aos relatados para *Heliothis zea* e *Spodoptera frugiperda*. No entanto, esse processo ocorre em até 8 horas em *Pseudoplusia includens* e entre 6 e 18 horas na *Anticarsia gemmatalis*. Essas diferenças no tempo de germinação podem ser atribuídas as variações na composição do tegumento das diferentes larvas. É possível que isso ocorra devido a similaridade entre os componentes de superfície de *N. rileyi* e células de insetos susceptíveis, permitindo assim, o desencadeamento no quadro de infecção (SRISUKCHAYAKUL et al., 2005). Certamente essa mesma relação parasita – hospedeiro não ocorreu entre *N. rileyi* e *R. (B.) microplus*, demonstrando que essa espécie de carrapato não é susceptível aos isolados fungicos testados no presente estudo.

## 5 CONCLUSÃO

- Os isolados Nr 177 e Nr 151 de *N. rileyi* não apresentam patogenicidade para fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ANGELO, I. C. **Avaliação dos efeitos *in vitro* de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *Lecanicillium lecani* sobre *Boophilus microplus***. 2007. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v.37, p. 231-244, 2005.
- ATHAYDE, A.C.R.; FERREIRA, U.L.; LIMA, E.A.L.A. Fungos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.21, p.12-15, 2001.
- BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolamento de uma cepa de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) e patogenicidade sobre larvas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: VIII SINCOBIOL – SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2003, São Pedro. **Anais...** São Paulo, 2003. p.67.
- BAHIENSE, T.C. **Avaliação *in vitro* dos fungos Entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* Associados ou não com Deltametrina no controle de uma cepa do carrapato *Boophilus microplus* Resistente a Piretróides**. 2007. 54f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- BARCI, L.A.G. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) no Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.64, n.1, p.95-101,1997.
- BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infectantes do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, p.17-21, 1989.
- BENNETT, G.F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, n.1, 1974.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L. Uso do *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v.15, p.197-202, 1992.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural**, Série Ciência da Vida, v.16, n.1/2, p.42-47, 1994a.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico do *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural**, Série Ciência da Vida, v.16, n.1/2, p.49-55, 1994b.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S.L.F.S.; VIEGAS, E.C. Eficácia “in vitro” dos isolados 747e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.2, supl.1, p.86, 1995.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F.S.; VIEGAS, E.C.; ALVES, S.B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F.S.; SOUZA, E.J.; MASCARENHAS, A.G.; ALVES, S.B. Ação de dois isolados do fungo entomogênico *Beauveria bassiana* sobre algumas características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em laboratório. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da vida, v.19, n.1-2, p.65-71, 1997.

BITTENCOURT, V. R. E. P. Controle Biológico de carrapatos. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Vol 2. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 388p.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. Nutritional requirements for conidial germination of several host rang pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rilleyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 43, p. 288-292, 1984 apud ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

BOYCEV, D.; RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, v.39, p.460, 1960.

CARNER, G. R. Sampling pathogens of soybean insect pests. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. C. (Ed.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer, p. 559-574, 1980.

CASTENEIRAS, A.; JIMMENO, G.; SOSA, M.L. Effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Fungi .Imperfecti) and *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: Formicida) on eggs of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). **Revista Salude Animala**, v.9, p.288-293, 1987.

CASTRILHO, L.A.; ROBERTS, D. W.; VANDENBERG, J.D. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.46-56, 2005.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, v.19, n.2-2, p.73-82, 1997.

CONNOLE, M. D. Effect of fungal extracts on the cattle tick *Boophilus microplus*. Australian Veterinary Journal, v. 45, p. 207, 1969 apud BITTENCOURT, V. R. E. P. Controle Biológico de carrapatos. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Vol 2. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 388p.



CORREA, B. S.; SMITH, J. G. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Huebner, in Paraná. **Florida Entomologist**, Homestead, v. 58, p. 280, 1975.

DAOUST, R.A.; WARD, H.G.; ROBERTS, D.H. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.41, p.151-160, 1983.

DAVEY, R.B.; OSBURN, R.L.; MILLER, J.A. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographic areas. **Annals of the Entomological Society of America**, v.77, p. 1-5, 1984.

DIPEOLU, O. O. Etudies on ticks of veterinary importance in Nigeria. The oviposition pattern of engorged *Boophilus* and *Hyalomma* species when subjected in the laboratory to artificially created factors. **Acarologia**, v. 25, n.3, p. 231-240, 1984.

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

FARIA, M. R.; TIGANO-MILANI, M. S.; LECUONA, R. E. Incidência natural de *Nomuraea rileyi* Farlow em população de *Anticarsia gemmatalis* Huebner no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Porto Alegre, v. 22, p. 385-388, 1993.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Potencial entomopatogênico de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* isolados e testados em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. In: XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2002. CD. Rom.

FERNANDES, E.K.K. **Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus***. 2007. 130f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

FILHO, A.B.; RAMIRO, Z.A.; ALMEIDA, J.E.M.; LEITE, L.G.; CINTRA, E.R.R.; LAMAS, C. Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.61-67, 2003.

FINNEY, D.S. **Probit analysis**. 3ed. Cambridge: University Press, 1971. 333p.

FURLONG, J.; EVANS, D. Epidemiologia do carrapato *Boophilus microplus* no Brasil: Necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, VLL. SIMPÓSIO SOBRE MOSCAS DO CHIFRE *Haematobia irritans*, II. 1991, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1991. p.48-50.

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

FUXA, J.R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 225-241, 1987.

GAZZONI, D. L.; YORINIORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995. 128p. (Manual de identificação de pragas e doenças,1).

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. The Susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) Ticks to Entomopathogenic Fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.111-118, 2001.

GLÓRIA, M.A.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H.;GRISI, L. Influencia de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitaria de *Boophilus microplus* (Canestrini,1887) (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, n.2, p.85-91, 1993.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974.101p.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 103p.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. Porto Alegre, 1995, 79p.

GRISI, L.; MASSARD,C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.23-28, 2002.

HAJEK, A.E., ST. LEGER, R.J, Interaction between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.293-322, 1994.

HAWKSWORTH, D.L. **Micologist's handbook**. 2ªed. England, Kew Surrey: CAB Press, 1977. 231p.

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

IGNOFFO, C.M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, p. 413-538. In: BURGESS, H.D. (ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. 861p.

IGNOFFO, C.M.; BOUCIAS, D.B. Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against the cabbage looper and veverbean caterpillar. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.59, n. 2, p. 215-217, 1992.

JACKSON, C. W.; HEALE, J.B., HALL, R.A. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella samborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. **Annals Applied Biology**, v. 106, p. 39-48, 1985 apud ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

KAAYA, G.P.; KOKWARO, E.D.; MURITHI, J. K. Mortalities in adult *Glossina morsitans* experimentally infected with the entomogenous fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Discovery innovation**, v.3, p.55-60, 1991.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.15-20, 1996.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAILS, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. **Biological Control**, v.21, p.230-248, 2001.

LECUONA, R. E. **El control microbiano como regulador poblacional de insectos plagas**. Castelar: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 1990. 24 p. (Serie Agricultura Sostenible, 4).

LEEMON, D.M.; JONSSON, N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97, p.40-49, 2007.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.6, p.839-846, 1998.

MCCOY, C.W. Entomogenous fungi as microbial pesticides. In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. (Ed.). **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York: Alan R. Liss, 1990. p. 139-159.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Effect of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on eggs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae). **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.461-466, 1998a.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p. 113-116, 1998b.

MONTEIRO, S.G. **Ação do isolado 986 do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, sobre o carrapato *Anocentor nitens* (Schulze), 1937**. 2000. 75 f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

MORETTI, P.E. Controle biológico de pragas agrícolas. **Microbiologia: Fundamentos & Aplicações** - Microbiologia Ambiental, 2007. Disponível em: [http://www.fam.br/microrganismos/map\\_cbpa.htm](http://www.fam.br/microrganismos/map_cbpa.htm). Acesso em: 15 maio 2008.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biochemistry**, v.17, p.245-251, 2001.

PEKRUL, S.; GRULA, E. A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 34, p. 238-247, 1979 apud ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

PENDLAND, J.C. Resistant structures in the entomogenous hyphomycete *Nomuraea rileyi*: an ultrastructural study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, n. 7, p. 1569-1576, 1982.

PERALVA, S.L.F.S.; SOUZA, E.J.; MASCARENHAS, A. G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação de *Beauveria bassiana* na fase não parasitária do ciclo biológico de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5.,1996, Foz do Iguaçu. **Anais...** Paraná, 1996. p.412.

PEREIRA, M.C. ***Boophilus microplus*: Revisão taxionômica e morfo-biológica**. 1980. 126f. Tese (Mestrado)- Universidade de São Paulo, São Paulo. 1980.

PERINOTTO, W.M. S.; ANGELO, I. C.; BAHIANSE, T.C.; FERNDDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Nomuraea rileyi* (isolado 138) sobre *Boophilus microplus*. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E 2º SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** São Paulo, 2006. p. 202.

PIRALI – KHEIRABADI, K.; HADDADZADEH, H.; RAZZAGHI – ABYANEH, M.; BOKAIE, S.; ZARE, R.; GHAZAVI, M.; SHAMS – GHAFAROKHI, M. Biological control of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. **Parasitology Research**, v.100, n. 6, p. 1297-1302, 2007.

RIVALIER, E. & SEYDEL, S. Nouveau procede de culture sur lames gélosés appliqué a l'étude microscopique de champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v.10, n.5, p.444-452, 1932.

ROCHA, C.M.B.M.; OLIVEIRA, P.R.; LEITE, R.C.; CARDOSO, D.L.; CALIC, S.B.; FURLONG, J. Percepção dos produtores de leite de Divinópolis/MG sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1235-1242, 2006.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, v.44, p.159-182, 1999.

SAMISH, M. Biocontrol of Ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916, n.1, p.172-178, 2000.

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

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, n.6, 120pp, 1974.

SANTOS Jr, J.C.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (ACARI:IXODIDAE) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica Fluminense do grande Rio-Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.2, p.305-311, 2000.

SEIFER, G. W. Ecto and endoparasitic effects on the growth rates of Zebu crossbred and British cattle in the field. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.22, p.839-850, 1971.

SOSA-GOMEZ, D. R. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos.2005. Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/download/artigos/seletiv\\_fung.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf). Acesso em: 15 maio 2008.

SRISUKCHAYAKUL, P.; WIWAT, C.; PANTUWATANA, S. Studies on the Pathogenesis of the Local Isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera Litura*. **ScienceAsia**, v.31, p.273-276, 2005.

SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; SCHMIDT, F. G. V.; ARMANDO, M. S.; PAIS, J. S. de O.; SANTOS, H. M. dos; BORGES, M. M.; CARNEIRO, R. G.; VALLE, J. V. V. **Recomendações para o Controle Biológico de Insetos – Pragas na Soja Orgânica no Distrito Federal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 53).

SUJII, E. R.; TIGANO, M. S.; SOSA-GOMES, D. Simulação do impacto do fungo *Nomuraea rileyi* em populações da lagarta da soja, *Anticarsia Gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n. 11, p. 1551-1558, 2002.

VIMALA DEVI, P.S.; PRASAD, Y.G.; RAJESWARI, B.; VIJAY BHASKAR, L. Epizootic of the entomo-fungal pathogen *Nomuraea rileyi*, on lepidopterous pests of oilseeds. **Journal of Oilseeds Research**, v. 13, n. 1, p. 144-148, 1996.

VERÍSSIMO, C.J. Inimigos naturais do carrapato parasita dos bovinos. **Agropecuária Catarinense**, v.8, n.1, p.35-37, 1995.

WHARTON, R.H.; ROULSTON, W.J. Resistance of tick to chemicals. **Annual Review of Entomology**, v.15, p.381-404, 1970.