

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

DISSERTAÇÃO

AÇÃO DE *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* SOBRE POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE DIFERENTES LOCALIDADES.

Wendell Marcelo de Souza Perinotto

2010



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

**AÇÃO DE *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* SOBRE
POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE
DIFERENTES LOCALIDADES.**

Wendell Marcelo de Souza Perinotto

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

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
Fevereiro de 2010

579.5

P445a

T

Perinotto, Wendell Marcelo de Souza, 1983-.

Ação de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes localidades / Wendell Marcelo de Souza Perinotto - 2010.

61 f.: 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. 40-47.

1. Fungos entomopatogênicos - Teses. 2. *Rhipicephalus* - Teses. 3. Carrapato - Controle - 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**

Wendell Marcelo de Souza Perinotto

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 05/02/2010



Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt PhD UFRRJ



Márcia Cristina de Azevedo Prata Dra. EMBRAPA-MG (Gado de Leite)



Gisela Lara da Costa Dra. FIOCRUZ

Dedicatória:

Aos meus pais, Helena e Luiz, meus irmãos Éder e Cintia, todos meus familiares, especialmente minha querida avó Célia (in memoriam) e minha noiva Marcela.

AGRADECIMENTOS

Sei que tudo o que sou e o que sei devo a Deus e é a ele que agradeço em primeiro lugar por mais essa vitória em minha vida.

Aos meus queridos pais, cujas palavras me faltam para expressar o quanto sou grato por tudo o que sempre fizeram por mim, mesmo com tantas dificuldades me possibilitaram chegar até aqui.

Aos meus tios Edinho e Maria Helena que me acolheram e me deram todo apoio para que eu pudesse realizar este sonho e a todos meus familiares por compartilharem comigo os desafios desta caminhada.

A professora Vânia que sempre me ajudou nesta minha vida acadêmica desde a bolsa de alimentação até aqui. Foram muitos anos de orientação, ensinamento, paciência e amizade, que juntos possibilitaram o meu crescimento acadêmico e pessoal.

A Marcela por todo carinho, companheirismo, incentivo e compreensão por todos estes anos me estimulando a concretizar meus objetivos.

Aos amigos de laboratório Isabele da Costa Ângelo, Patrícia da S. Golo, Mariana G. Camargo, Simone B. Quinelato, Ana Paula Moraes, Fillipe Sá, Josie Albuquerque, Caio Junior Balduino e George Eduardo Gabriel Kluck por todo companheirismo e auxílio na minha aprendizagem e por todos momentos vividos no laboratório.

Aos amigos que passaram pelo LCM e me ensinaram muitas coisas que sei hoje: Éverton K. K. Fernandes, Thiago C. Bahiense, Andréia Terra, Rosana Colatino, Denise Melo e Sandra Borges.

A Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata pelas sugestões, dedicação, simpatia e principalmente o bom humor que nos enche de ânimo.

Ao Dr. John Furlong, Dra. Gisela Lara Costa e ao Dr. Fábio Scott pelas sugestões para o engrandecimento na dissertação.

Aos funcionários Mauricio, Ivan, Arthur, Léo, Rodrigo, Zé pela disponibilidade nas horas que precisei.

A todos professores do curso de Ciências Veterinárias da UFRRJ e aos colegas de turma pelos conhecimentos trocados nas salas de aulas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

BIOGRAFIA

Wendell Marcelo de Souza Perinotto, filho de Luiz Antônio Valentin Perinotto e Helena Maria de Souza Perinotto, nasceu na cidade de Casa Branca-SP, no dia 29 de março de 1983.

Cursou o ensino fundamental na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Grau Professora Rita de Macedo Barreto, na cidade de Itobi-SP. Concluiu o ensino Médio e técnico na E.T.A.E. “Dr. Carolino da Mota e Silva”, formando em Técnico em Agropecuária no ano de 2000.

Ingressou na faculdade no curso de Zootecnia em outubro de 2002. Porém no ano de 2004, através de um processo seletivo interno, transferiu-se para o curso de Medicina Veterinária e concluiu o curso em dezembro de 2007, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.

Durante todo o período da graduação foi bolsista no Laboratório de Controle Microbiano, participando de artigos científicos, congressos e eventos locais.

Em março de 2008 iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

PERINOTTO, Wendell Marcelo de Souza. **Ação de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes localidades.** 2010. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Estudos recentes indicaram a possibilidade de diferença na susceptibilidade entre populações distintas de carrapatos, quando submetidos ao tratamento com fungos entomopatogênicos. Para avaliar se ocorre realmente essa diferença, foi avaliada a ação *in vitro* dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre duas populações distintas de *R. (B.) microplus*, oriundas de diferentes propriedades. Foram realizados bioensaios sobre fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas. Para avaliar o efeito dos fungos sobre as fêmeas observaram-se os parâmetros reprodutivos. Para ovos analisou-se o percentual de eclosão das larvas e sobre larvas analisaram-se o percentual de mortalidade e tempo médio letal. Foram formados cinco grupos por propriedade (10^8 , 10^7 conídios/ml de *M. anisopliae*; 10^8 , 10^7 conídios/ml de *B. bassiana* e controle) com 10 repetições cada. No tratamento, as espécimes foram imersas em um ml da suspensão testada durante três minutos e o grupo controle foi exposto apenas ao diluente. Os resultados obtidos demonstraram que os fungos influenciaram na maioria dos parâmetros reprodutivos das fêmeas de ambas as propriedades. Para verificar a susceptibilidade das populações distintas, foram realizadas análises estatísticas comparando os tratamentos sobre as fêmeas de diferentes origens. Pode-se observar que houve diferença significativa nos seguintes parâmetros: períodos de pré-postura, período de eclosão das larvas e índice de produção de ovos. Além disso, pode-se observar que o isolado Bb 986 de *B. bassiana* foi mais patogênico do que o isolado Ma 959 de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas, promovendo um percentual de controle de 49%. No bioensaio com ovos, a redução do percentual de eclosão das larvas variou entre 3,1 a 49,5% em uma propriedade e 3,4 a 42,7% em outra, porém não houve diferença significativa entre as duas populações nesta fase do *R. (B.) microplus*. No bioensaio com larvas o percentual de mortalidade das larvas variou de 91,8 a 98,7% em uma e 71,0 a 94,0% em outra propriedade. Além disso, o tempo médio letal (LT 90) foi de 19,52 a 27,51 dias em uma das propriedades e de 22, 89 a 37,31 dias na outra. Através destes resultados, pode-se concluir que os fungos entomopatogênicos utilizados neste estudo são capazes de agir sobre esta espécie de carrapato. No entanto, populações distintas apresentam variação na sua susceptibilidade à *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (B.) microplus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, susceptibilidade e controle biológico.

ABSTRACT

PERINOTTO, Wendell Marcelo de Souza. **Action of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations of different locations.** 47p. Dissertation (Master Science in Veterinary Parasitology, Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Recent studies have indicated the possibility of difference in susceptibility between different populations of ticks, while undergoing treatment with entomopathogenic fungi. To assess whether this difference actually occurs, this study intends to verify the in vitro effect of fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on two distinct populations of *Rhipicephalus (B.) microplus* collected from different properties. Experiments were conducted on engorged females, eggs and larvae. To evaluate the effect of fungi female reproductive parameters were observed. In eggs, the hatch percentage was evaluated, and in larvae, the mortality rate was analyzed. Five groups were formed (10^8 , 10^7 conidia/ml of *M. anisopliae*; 10^8 , 10^7 conidia/ml of *B. bassiana* and control group) with 10 repetitions each. The specimens were immersed in one ml of the suspension for three minutes and the control group was exposed only to diluent. The results showed that the fungi were efficient, influencing all females's reproductive parameters of both properties. To verify the susceptibility of different populations statistical analysis were carried out comparing the treatments on females of different origins. The following parameters presented significant difference: periods of the pre oviposition, larvae hatch and egg production index. Furthermore, *B. bassiana* was more effective than *M. anisopliae* on engorged female. In the bioassay with eggs the hatch percentage ranged between 3.1 and 49.5% in one property and from 3.4 to 42.7% in another, but there was no significant difference between the two populations at this stage of *R. (B.) microplus*. At the bioassay with larvae the mortality percentage of larvae ranged from 91.8 to 98.7% in one and 71.0 to 94,0% in another property. Moreover, the average lethal time (LT 90) ranged from 19.52 to 27.51 days in one of the properties and 22.89 to 37.31 days in the other. Through these results, it can be concluded the entomopathogenic fungi used in this study are effective in controlling this tick species. However, different populations have variation in their susceptibility to *B. bassiana* and *M. anisopliae*.

Key-words: *Rhipicephalus (B.) microplus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, susceptibility and biological control.

Lista de figuras:

- Figura 1.** Média e desvio padrão do período de pré-postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundos da PESAGRO-RJ e Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 19
- Figura 2.** Média e desvio padrão do peso da postura, em gramas, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundos da PESAGRO-RJ e Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb986 de *Beauveria bassiana*..... 20
- Figura 3.** Média e desvio padrão do período de postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 23
- Figura 4.** Média e desvio padrão do período de incubação, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 24
- Figura 5.** Média e desvio padrão do período de eclosão das larvas, em número de dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 25
- Figura 6.** Média e desvio padrão do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 26
- Figura 7.** Média e desvio padrão do peso residual de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 27
- Figura 8.** Média e desvio padrão do índice nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria*..... 28

Lista de figuras (continuação):

- Figura 9.** Média e desvio padrão do índice de produção de ovos (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 29
- Figura 10.** Média do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de ambas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 30
- Figura 11.** Média do percentual de mortalidade no 10º dia pós tratamento das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de ambas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 31
- Figura 12.** Média do percentual de mortalidade no 20º dia pós tratamento das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de ambas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 32
- Figura 13.** Média do percentual de mortalidade no 30º dia pós tratamento das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de ambas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*..... 32

Lista de tabelas:

Tabela 1. Concentrações de conídios dos isolados 959 de <i>Metarhizium anisopliae</i> e 986 de <i>Beauveria bassiana</i> , utilizados nas diferentes fases de desenvolvimento de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	14
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do Peso da fêmea (P.F.); Período de Pré-Postura (P.P.P.); Peso da Postura (Pes. P); Período de Postura (Per. P.); Período de Incubação (P. I.); Período de Eclosão (P. Ec.); Percentual de Eclosão (% Ec.); Índice Nutricional (I. N.) e Índice de Produção de Ovos (I.P.O.) de fêmeas alimentadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> provenientes da Pesagro-RJ, tratadas com diferentes concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado (Ma 959) e <i>Beauveria bassiana</i> isolado (Bb 986).....	21
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão do Peso da fêmea (P.F.); Período de Pré-Postura (P.P.P.); Peso da Postura (Pes. P); Período de Postura (Per. P.); Período de Incubação (P. I.); Período de Eclosão (P. Ec.); Percentual de Eclosão (% Ec.); Índice Nutricional (I. N.) e Índice de Produção de Ovos (I.P.O.) de fêmeas alimentadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> provenientes da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado (Ma 959) e <i>Beauveria bassiana</i> isolado (Bb 986).....	22
Tabela 4. Percentual de Controle de fêmeas alimentadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> oriundas da PESAGRO-RJ (IZ) e Bovinocultura de Leite (IZ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de <i>Metarhizium anisopliae</i> e Bb 986 de <i>Beauveria bassiana</i>	28
Tabela 5. Média do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> provenientes da PESAGRO-RJ (P) e da Bovinocultura de leite (IZ), tratados com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de <i>Metarhizium anisopliae</i> e Bb 986 de <i>Beauveria bassiana</i>	29
Tabela 6. Tempo Médio Letal (LT 90) em número de dias, das larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> oriundas da PESAGRO-RJ (P) e da Bovinocultura de Leite da UFRRJ (IZ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de <i>Metarhizium anisopliae</i> e Bb 986 de <i>Beauveria bassiana</i>	32
Tabela 7. Percentual de eficiência de produtos comerciais a carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> provenientes da Bovinocultura de Leite da UFRRJ (FAIZ) e da PESAGRO-RJ.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2 Controle microbiano utilizando fungos entomopatogênicos.....	5
2.3 <i>Metarhizium anisopliae</i>	6
2.4 <i>Beauveria bassiana</i>	8
2.5 Mecanismos de resistência e sensibilidade nos carrapatos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Localização do Experimento	12
3.2 Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos	12
3.3 Elaboração das Suspensões e Quantificação dos Inóculos	12
3.4 Viabilidade das Suspensões de Conídios	13
3.5 Obtenção de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	13
3.6 Delineamento Experimental.....	14
3.7 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas	14
3.8 Bioensaio com Ovos.....	16
3.9 Bioensaio com Larvas.....	16
3.10 Reisolamento dos isolados fúngicos após o bioensaio.....	16
3.11 Análise Estatística.....	17
4 RESULTADOS	
4.1 Viabilidade das Suspensões de Conídios	18
4.2 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i>	18
4.2.1 Peso médio das fêmeas ingurgitadas.....	18
4.2.2 Período de pré-postura	18
4.2.3 Peso da postura.....	19
4.2.4 Período de postura	23
4.2.5 Período de incubação	23
4.2.6 Período de eclosão das larvas	24
4.2.7 Percentual de eclosão	25
4.2.8 Peso residual das fêmeas.....	26
4.2.9 Índice nutricional	27
4.3 Índice de produção de ovos	28
4.3.1 Percentual de controle.....	29
4.4 Bioensaio com Ovos de <i>R. (B.) microplus</i>	30
4.5 Bioensaio com Larvas não Alimentadas de <i>R. (B.) microplus</i>	30
4.5.1 Percentual de mortalidade.....	31
4.5.2 Tempo Médio Letal.....	32
4.6 Reisolamento fúngico.....	33
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	39

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são parasitas de diversas espécies de mamíferos, inclusive o homem, e podem ser causadores de consideráveis perdas econômicas, sobretudo sobre a pecuária brasileira. As perdas econômicas causadas pelos principais ectoparasitos apenas em bovinos no Brasil são estimadas em 2,650 bilhões de dólares anuais, destacando-se as causadas pelo carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, com 2 bilhões (GRISI et al., 2002).

O parasitismo por esse carrapato causa o desenvolvimento lento dos animais, a diminuição da produção de leite e carne, perdas na produção do couro e gastos com produtos carrapaticidas, além de predispor ao surgimento de miíases e transmitirem agentes de doenças como Anaplasmose e Babesiose que resultam no atraso do desenvolvimento dos animais, inclusive podem levar seu hospedeiro à morte.

Para o controle de *Rhipicephalus (B.) microplus* vários métodos são aplicados, e estão relacionados com as fases não parasitária e parasitária. As técnicas empregadas no controle da fase não parasitária estão correlacionadas com o manejo das pastagens, já as medidas para o controle da fase parasitária incluem pesquisas sobre a resistência do hospedeiro, desenvolvimento de vacinas e uso de produtos carrapaticidas.

A utilização de produtos carrapaticidas é uma prática bastante comum entre os pecuaristas, porém a utilização indiscriminada desses produtos pode acarretar sérios problemas. As principais desvantagens da utilização dos acaricidas químicos no gado bovino são o elevado custo dos produtos, o desenvolvimento de resistência em carrapatos e a contaminação ambiental e de alimentos pelos acaricidas e seus resíduos. Portanto, a utilização exclusiva de carrapaticidas é cada dia menos viável em termos práticos e econômicos, tornando-se necessária a adição de métodos alternativos de controle. Dessa forma, o controle microbiano vem se destacando, principalmente, na área da entomologia agrícola.

Inúmeros são os microorganismos que têm sido isolados de artrópodes, mas somente um pequeno número deles tem mostrado algum potencial real para o controle de vetores, sendo que os agentes mais efetivos têm sido descobertos em países de clima temperado e tropical.

Os fungos vêm sendo avaliados como agentes promissores para uso em controle de insetos e outros artrópodes transmissores de agentes de doenças para o homem e animais. Os

fungos mais utilizados para o controle de vetores pertencem aos gêneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Isaria*, *Paecilomyces*, entre outros.

A evolução da resistência tem sido um mecanismo de defesa dos insetos contra as táticas de controle. Este problema vem ocorrendo mais frequentemente com o controle químico, pois esta tática tem sido a mais difundida no manejo de pragas. Porém, já se sabe que o problema da resistência de artrópodes não está restrito aos produtos químicos, pois a mesma já foi identificada para os métodos biológicos de controle.

Trabalhos recentes realizados no Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ têm apresentado resultados que nos levam a crer que existe uma diferente resposta pelos carrapatos de diferentes localidades aos fungos entomopatogênicos.

Para verificar esta hipótese, este trabalho avaliou a ação *in vitro* do isolado 959 de *M. anisopliae* e o isolado 986 de *B. bassiana* em diferentes concentrações para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (B.) microplus* provenientes de duas propriedades distintas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *R. (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) é originário da Ásia e foi introduzido no Brasil junto com os primeiros bovinos trazidos pelos colonizadores, onde se adaptou perfeitamente ao nosso clima (BARCI, 1997).

Está presente em praticamente todos os países compreendidos entre os paralelos 32° de latitude norte e 35° de latitude sul, sendo ectoparasita de maior relevância na pecuária desses países (NUÑEZ, et al., 1982). A distribuição deste carrapato na América do Sul ocorre no norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela, além do Brasil, com especial atenção às regiões Sudeste e Centro-oeste e toda a costa brasileira, obviamente pelas boas condições de umidade e temperatura e pela exploração pecuária mais intensa (ESTRADA-PEÑA, 1999).

O hospedeiro preferencial do *R. (B.) microplus* é o bovino, sendo que as maiores infestações ocorrem em *Bos taurus* e as menores em *Bos indicus*. Porém, ovelha, cavalo, veado, cão, cabra, homem (GONZALES, 1974), búfalos, gatos, coelhos, cangurus, porcos e onças (PEREIRA, 1980), também podem ser hospedeiros, mas apenas em épocas de grande infestação nas pastagens.

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, cuja produtividade é determinante na economia do país. No entanto, devido às condições climáticas e deficiência no manejo, o gado brasileiro é altamente acometido pelo carrapato dos bovinos, produzindo perdas diretas e indiretas pela transmissão de agentes de doenças e pelo custo de seu controle. Grisi et al., (2002) estimaram que os prejuízos econômicos ocasionados pelo carrapato *R. (B.) microplus* no Brasil gira em torno de 2 bilhões de dólares por ano. Estes gastos estão relacionados com a compra de carrapaticidas, mão de obra para sua administração e pela perda na produtividade do rebanho (PENNA, 1990).

Uma fêmea de *R. (B.) microplus* ingere de 0,5 a 3,0 ml de sangue em toda a sua vida. Durante o repasto sanguíneo provoca intenso desconforto aos bovinos não permitindo que estes pastem normalmente, diminuindo assim a taxa diária de conversão do alimento em carne e/ou leite (FURLONG, 1993). Além disso, no momento de sua alimentação, o carrapato inocula saliva no seu hospedeiro, podendo transmitir os agentes do complexo da tristeza

parasitária, que causam doença com elevado grau de morbidez, podendo levar o animal a morte (PETER et. al, 2005).

Os pontos de parasitismo causados pelos carrapatos se tornam em lesões da pele, que além de serem prejudiciais às indústrias de couro, promovendo a desvalorização no preço final do produto, predisõem o desenvolvimento de bactérias e larvas de moscas (HORN; ARTECHE, 1985).

Através de um estudo realizado na Austrália foi estimado que cada fêmea de *R. (B.) microplus*, seria responsável pela queda de produção diária de aproximadamente 8,9 ml de leite e de 1,0g de peso corporal (JONSSON et al., 1998).

O ciclo de vida do carrapato *R. (B.) microplus* divide-se em fase de vida livre e fase de vida parasitária. Na fase de vida livre, são necessários em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura; de vinte e dois a trinta dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, transformando-as em larvas infestantes. A cada postura uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e se acasalam com outras fêmeas (FURLONG, 1993).

Vários autores já demonstraram a influência dos fatores sazonais no ciclo de vida dos carrapatos e a conseqüente diferença de infestações nos animais, de acordo com o clima da região em que vivem e com a época do ano. A fase de vida livre é bastante influenciada, principalmente pela baixa temperatura e umidade (ROCHA et al, 2006).

O controle dos carrapatos é extremamente complexo, devido vários fatores, entre eles: a grande quantidade de ovos que uma fêmea produz que posteriormente se transformam em larvas de primeiro instar (KETTLE, 1995), a falta de conhecimentos dos pecuaristas e peões que lidam com o rebanho e entre outros o desenvolvimento de resistência a diversas bases químicas (ROCHA et al., 2006).

Na prática, o controle dos carrapatos é feito basicamente através da utilização de acaricidas químicos. Entretanto, devido às conseqüências provocadas pelo mau uso destes acaricidas, o controle biológico está sendo cada vez mais atrativo, pois causa menos danos ao meio ambiente e à saúde humana, além disso, a população humana segue uma tendência crescente no consumo de produtos orgânicos (SAMISH et al., 2004).

2.2 Controle microbiano utilizando fungos entomopatogênicos

O controle microbiano pode ser definido sucintamente como a intervenção humana no comportamento natural de microrganismos, para controlar e/ou combater as chamadas pragas parasitárias, observadas tanto na agricultura quanto em medicina veterinária.

A primeira classificação de um entomopatógeno foi feita por Réaumur em 1726, identificando um fungo do gênero *Cordyceps* atacando um lepidóptero. Em 1835, Agostino Bassi, comprovou que o fungo *Beauveria bassiana*, era o causador de uma doença chamada “Muscardine Branca”, muito importante para o bicho da seda, demonstrando a natureza infecciosa de um agente microbiano para um animal (ALVES, 1998).

O controle microbiano possui atributos favoráveis que o possibilita ser usado como medida estratégica para controle de pragas. Esses fatores são a alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, a capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, o caráter enzoótico e a não toxicidade de mamíferos. Neste tipo de controle há uma harmonia com o ambiente, e espera-se que haja a redução de populações de insetos indesejáveis (pragas) para níveis que não provoquem prejuízos. Outra grande vantagem, é que o controle biológico possibilita a associação de microrganismos com formulações medicamentosas, diminuindo os resíduos ou toxicidade para animais e o ambiente. Além disso, há diminuição da possibilidade de aparecimento de resistência, pois os microrganismos utilizam diversos mecanismos para parasitar seus hospedeiros (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são os agentes microbianos mais promissores como método alternativo ao controle químico dos carrapatos, isso se deve a capacidade destes organismos em penetrar diretamente pela cutícula do artrópode, além disso, não precisa ser ingerido pelo hospedeiro para iniciar a infecção. Na maioria dos casos os fungos são capazes de infectar todos os estágios de desenvolvimento do carrapato. A grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos através de técnicas apropriadas possibilita a seleção de isolados fúngicos altamente virulentos, mais específicos e tolerantes as condições climáticas para serem utilizados como inseticidas microbianos (ALVES, 1998).

O controle biológico de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos tem apresentado resultados potencialmente satisfatórios. Dentre os fungos estudados, *B. bassiana* e *M. anisopliae* são os que têm apresentando resultados mais satisfatórios em condições laboratoriais, demonstrando-se patogênicos para várias espécies de carrapatos, como *Amblyomma cooperi*, (REIS et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004), *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005), *Rhipicephalus sanguineus* (GARCIA et

al., 2004; GARCIA et al., 2005; PRETTE et al., 2005) e *Rhipicephalus (B.) microplus* (BITTENCOURT et al., 1992; MONTEIRO et al., 1998).

No entanto, sua aplicabilidade está restrita a testes *in vitro* e diretamente no hospedeiro (BITTENCOURT et al., 1994 a). A maioria dos testes que foram realizados em nível de campo com fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos na América do Sul demonstrou baixa eficácia (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008), com exceção de uma formulação de gel de celulose polimerizada e conídios de *Beauveria bassiana* aplicada diretamente nas orelhas dos eqüinos para reduzir a infestação de *Anocentor nitens* (SOUZA et al., 2009).

Provavelmente, a baixa eficiência dos fungos em testes de campo está relacionada a fatores bióticos e abióticos que podem influenciar na sua sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000).

Os fatores abióticos são essenciais para a sobrevivência dos fungos, dentre estes a radiação solar UV é considerada a de maior importância (CAGAN; SVERCEL, 2001), pois pode inativar o conídio, ocasionar danos letais ao DNA e mutações gênicas (NICHOLSON et al., 2000). Outros fatores de extrema importância para os fungos são a temperatura e umidade. Rath et al. (1992) observou que em altas temperaturas a sobrevivência do fungo foi prejudicada, enquanto que em baixas temperaturas ocorreu maior persistência, característica essa desejável. Sobre a influência de fatores bióticos no desenvolvimento fúngico, Groden; Lockwood (1991), relataram que microrganismos presentes na microbiota do solo exercem ação fungistática inibindo a atividade ou sobrevivência dos fungos entomopatogênicos.

A busca de novos fungos e utilização dos mesmos no controle biológico de carrapatos se deve aos resultados promissores encontrados em testes *in vitro*. Por isso, a pesquisa nesta área vem sendo bastante explorada e o número de trabalhos é cada vez maior. O que tem se buscado é estabelecer estratégias racionais e eficazes para possibilitar uma forma de manejo integrada para controle de artrópodes (CHANDLER et al., 2000).

2.3 *Metarhizium anisopliae*

Entre os fungos utilizados no controle biológico de pragas de importância agrícola e veterinária, o fungo *M. anisopliae* se destaca como um agente microbiano de extrema importância. Sua ação é amplamente conhecida, ocorrendo em diversas regiões, desde ambientes de clima temperado até clima tropical. Pertencente à classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae, foi descrito por Metschnikoff em 1879 pela primeira vez

como *Entomophthora anisopliae*. Este pesquisador realizou o primeiro trabalho de controle microbiano utilizando este fungo para o controle de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*, e foi finalmente classificado por Sorokin em 1883 como *Metarhizium anisopliae*. A partir de então, a utilização deste patógeno vêm sendo estudada sobre muitas espécies de insetos, com grandes potencialidades para o controle biológico, tendo como hospedeiros mais de 300 espécies de insetos (ALVES, 1998).

Recentemente, através de estudos baseados em técnicas moleculares, novas variedades da espécie *M. anisopliae* foram sugeridas: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *majus* e *M. anisopliae* var. *dcjhyium* (DRIVER et al., 2000; DONG et al., 2007).

M. anisopliae é um fungo de cultivo simples, necessitando basicamente de uma fonte de amido, desenvolve-se em diversos meios de cultura (AZEVEDO, 1998), é cosmopolita e apresenta grande potencial como entomopatógeno, por isso, é um dos fungos que mais tem sido estudado em programas de manejo biológico de pragas (ONOFRE et al., 2002).

No Brasil os principais projetos de controle de pragas envolvendo *M. anisopliae* são: cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*, *M. fimriolata*), cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*), cupim da cana-de-açúcar (gênero *Heterotermes*), broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), broca-dos-citros (*Diploschema rotundicolle*), percevejo-do-colmo do arroz (*Tibraca limbativentris*) e a broca-do-café (*Hipotheremus hampei*) (ALVES, 1998).

Além desses projetos, o fungo *M. anisopliae* vem sendo amplamente estudado em ensaios laboratoriais no controle de carrapato e tem demonstrado eficiência sobre várias espécies como *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma Cajennense*, *Rhipicephalus (B.) microplus* (KAAYA et al., 1996; MONTEIRO et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999; BITTENCOURT, 2000; PAIÃO et al., 2001; GARCIA et al., 2004; LOPES et al., 2007).

A etapa inicial do processo de infecção do *Metarhizium anisopliae*, se dá pela adesão e germinação de conídios do fungo na superfície do inseto, seguida de penetração da hifa através da cutícula. O processo de adesão depende da presença de enzimas (esterases e proteases) que ocorrem na superfície dos conídios não germinados e que alteram a superfície do tegumento do inseto, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (St. LEGER et al., 1991). Na extremidade do tubo germinativo é formada uma estrutura denominada apressório, que corresponde a uma dilatação da hifa, onde ocorre elevada atividade metabólica devido à

produção de enzimas (proteases, lipases e quitinases). Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químico, resultante da liberação destas enzimas que facilitam a penetração mecânica. Após a penetração, inicia-se o processo de colonização do hospedeiro, no qual ocorre proliferação das hifas na cavidade do corpo, com liberação de toxinas (dextruxinas e citocalasinas) que provavelmente causam sua paralização ou morte. Após a morte do hospedeiro, as hifas crescem invadindo os diversos órgãos internos. O micélio emerge do corpo do inseto produzindo esporos que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos (ALVES, 1998).

Entre as enzimas estudadas em *M. anisopliae*, amilase, lipase, protease e quitinase, a protease (Pr1) parece ser a mais ativa na penetração do hospedeiro (St. LEGER et al., 1992).

Boldo et al. (2009) estudando o efeito de endoquitinases do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, observaram a atividade enzimática de uma quitinase específica para saber se esta era importante na patogenicidade. Os pesquisadores confirmaram que a endoquitinase CH12 realmente é uma das enzimas responsáveis pela patogenicidade do *M. anisopliae*.

2.4 *Beauveria bassiana*

A primeira descrição de *Beuveria bassiana* (Bals.) Vuillemin foi em 1835 por Balsamo com o nome de *Botrytis bassiana*, porém o gênero *Bassiana* foi reorganizado em 1912 (LIMA, 1989). As espécies de *Beuveria* ssp. são classificadas como fungos Deuteromicetos, classe Hifomicetos assexuados, por se reproduzirem através da produção de conídios. Porém, com o advento da biologia molecular, essas espécies foram agrupadas como fungos sexuados (REHNER, 2005).

O gênero *Beuveria* inclui espécies de fungos com grande potencial como agente de controle microbiano. A espécie *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin é de ocorrência cosmopolita, sendo frequentemente encontrada sobre insetos e amostra de solos (ALVES, 1998).

A germinação dos conídios de *B. bassiana* ocorre, geralmente, em um período de 12 horas após a inoculação. A fase de penetração do fungo, geralmente pelo tegumento, ocorre em função de uma ação mecânica e efeitos enzimáticos, com duração de aproximadamente 12 horas. Após 72 horas da inoculação, o inseto apresenta-se colonizado com uma grande quantidade de conidióforos e conídios. Entretanto, para aumentar a capacidade de

disseminação dos propágulos, são necessárias algumas condições favoráveis, destacando-se a temperatura, umidade relativa e radiação (ALVES, 1998).

Para que ocorra germinação dos conídios, crescimento vegetativo e esporulação de *B. bassiana* é ideal que a temperatura esteja na faixa entre 23 a 28°C, porém este fungo pode suportar temperaturas de até 45°C (ALVES; LECUONA, 1998). No entanto, melhor desenvolvimento e maior virulência dos fungos são atingidos em temperatura ótima (25° C). As temperaturas abaixo do ótimo são menos prejudiciais à patogenicidade dos fungos, pois segundo Roberts e Campbell (1977), em alguns casos, aumentam os tempos letais, mas sem afetar a mortalidade total, já as temperaturas acima do ótimo podem reduzir a patogenicidade dos fungos entomopatogênicos.

Tanto o calor quanto o frio podem influenciar no uso dos fungos como agentes para o biocontrole, porém, o fator abiótico mais importante é a radiação solar, particularmente a UV-B, que possui a maior capacidade de impossibilitar a ação do fungo. Fernandes (2007), em seu estudo de caracterização e seleção de 60 isolados de *Beauveria* ssp. para o controle microbiano do carrapato *R. (B.) microplus*, observou que alguns isolados, cujos conídios foram expostos a duas horas de radiação UV apresentaram diminuições significativas dos percentuais de germinação, influenciando diretamente na virulência destes microrganismos.

O fungo *B. bassiana*, apresenta variação na viabilidade dos conídios de acordo com a conservação, segundo Alves e Lecuona (1998), na forma de conídios puros, a viabilidade dura em torno de 60 dias, e se forem mantidos em formulações podem atingir até oito meses com alguma viabilidade. Quando se pretende preservar os conídios por longos períodos, a conservação deve ser em baixas temperaturas, na faixa de -20 a +8°C.

O primeiro relato de *B. bassiana* em carrapatos foi sobre a espécie *Ixodes ricinus*, quando fêmeas ingurgitadas foram coletadas a campo e mantidas em laboratório sob observação, sendo verificada a presença de hifas na abertura oral do carrapato após a morte, porém não houve alterações na postura (SAMSINAKOVA, 1957).

Desde então, a patogenicidade deste fungo vem sendo amplamente estudada e tem apresentado resultados satisfatórios sobre várias espécies de carrapatos, entre elas *R. (B.) microplus*, *R. sanguineus*, *Anocentor nitens*, *Amblyomma cajennesne* (BITTENCOURT et al., 1995; MONTEIRO, 1997; SOUZA, 1999; BITTENCOURT et al., 2002; MONTEIRO et al., 2003; REIS et al., 2004).

2.5 Mecanismos de Resistência e Sensibilidade nos Carrapatos

A busca de produtos eficazes para o controle do carrapato dos bovinos *R. (B.) microplus* ocorre desde o final do século XIX. Em 1896, um fazendeiro australiano formulou um produto a base de arsênico para banhar os animais, porém em 1937 foi registrado o aparecimento de resistência em populações de carrapatos na Austrália e África do Sul (FURLONG et al., 2007).

Até meados do século XX, os acaricidas mais utilizados no controle de carrapatos eram os derivados arsenicais, os quais tinham baixa eficácia e, além disso, deixavam resíduos altamente tóxicos para os bovinos (GRAF et al., 2004).

Com o passar dos anos, várias classes de acaricidas foram produzidas, entre elas: organofosforados, carbamatos, amidinas, piretróides, entre outros. Entretanto, o uso errôneo destes acaricidas, tem resultado no acúmulo de resíduos tóxicos na carne e no leite, poluição do meio ambiente, intoxicação dos seres humanos, altos custos para produção, além do desenvolvimento de mecanismos de resistência (BEUGNET; CHARDONNET, 1995; JONSSON, 1997; LATIF; LONGEJAN, 2002).

Resistência é a habilidade dos indivíduos sobreviverem a doses de drogas que poderiam normalmente matar outros da mesma espécie e estágio. Isto é herdado e selecionado devido aos sobreviventes aos tratamentos que passam genes da resistência para seus descendentes. Os genes da resistência são inicialmente raros em uma população ou aparece como raras mutações nos genes, assim como por seleções contínuas. A proporção dos genes resistentes aumenta de acordo com a proporção dos parasitas resistentes (SANGSTER, 2001).

Devido à seleção de populações resistentes a determinados princípios ativos, há uma necessidade de utilizar acaricidas com diferentes composições, e o uso destes acaricidas muitas vezes em um curto período de tempo acaba por selecionar novas populações resistentes a mais de um princípio ativo, caracterizando um ciclo vicioso (FREITAS et al., 2005).

Pelo fato da utilização excessiva de acaricidas de diferentes princípios químicos nas últimas décadas (arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, nitroguanidinas, fenilpirazoles, formamidinas, piretróides, avermectinas, lactonas macrocíclicas e feniluréias) diversos mecanismos de resistência foram sendo desenvolvidos como estratégia de sobrevivência pelo carrapato (HÄUSERMAN et al., 1992).

A base molecular da resistência tem sido estudada em diferentes espécies de artrópodes, principalmente em insetos, mas algo já é conhecido em carrapatos. O carrapato *R.*

(*B. microplus*) pode apresentar resistência mais rapidamente do que outras espécies, provavelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995).

Artrópodes em geral possuem um curto período de tempo entre uma geração e outra. Isto favorece o surgimento de populações com diferentes características genéticas, de acordo com a pressão seletiva que estão sofrendo. Estas características variam desde a redução do poder de penetração do pesticida, aumento do poder sequestrante de moléculas tóxicas ou mesmo insensibilidade a compostos tóxicos e aumento da detoxificação celular (CASIDA; QUISTAD, 1998; OAKESHOTT, 2003; RANSON et al., 2002), o que torna os pesticidas utilizados defasados em um curto espaço de tempo e torna necessário o aumento da concentração de uso, mudança de princípio ativo ou a utilização de outros princípios ativos combinados (SUTHERST et al., 1983).

As bases moleculares da resistência podem ser resumidas em três tipos: aumento de expressão de genes ou aumento da atividade de enzimas envolvidas em metabolismo de xenobióticos/detoxificadoras; mutações em neurorreceptores e mutações em canais de sódio (MARTIN et al., 2003; OAKESHOTT et al., 2003; RUFINGIER et al., 1999).

A evolução da resistência tem sido um mecanismo de defesa dos insetos contra as táticas de controle. Este problema vem ocorrendo mais freqüentemente com o controle químico, pois esta tática tem sido a mais difundida no manejo de pragas. No final de década de 80, havia uma documentação de 504 espécies de insetos e ácaros resistentes à pelo menos uma classe de pesticida (GEORGHU; TEJEDA, 1991). No início, acreditava-se que os insetos não seriam capazes de vencer os agentes do controle biológico, porém sabe-se atualmente que esse problema não está restrito aos produtos químicos, pois a resistência de artrópodes já foi identificada para outras táticas de controle, incluindo os entomopatógenos (ALVES, 1998).

Inicialmente, as diferenças na susceptibilidade de populações de insetos e entomopatógenos eram observadas apenas a partir de estudos de pressão e seleção em condições laboratoriais (BURGUES, 1971). No entanto, McGaughey (1985), demonstrou pela primeira vez, que a resistência a patógenos pode ser observadas em condições de campo, através da comparação de diferenças em susceptibilidade de populações de *Plodia interpunctella* a *Bacillus thuringiensis*. Posteriormente, outras evidências de resistência de pragas de importância econômica foram detectadas para vírus e bactérias. Nas condições brasileiras, pode-se citar o programa de controle da lagarta *Anticarsia gemmatalis* com *Baculovirus anticarsi* na cultura de soja (MOSCARDINI, 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e Período de Realização do Experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano, localizado na Estação 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. Os bioensaios foram realizados em janeiro e fevereiro do ano de 2009.

3.2 Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma 959) foi obtido através do isolamento em *Deois flavopicta* e *Beauveria bassiana* (Bb 986) foi isolado do carrapato *R. (B.) microplus*. Para serem utilizados no experimento foram cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP).

Estes isolados foram reproduzidos e são mantidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária da UFRRJ.

Para o presente bioensaio, os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e mantidos em câmara climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$.

3.3 Elaboração das Suspensões e Quantificação dos Inóculos

As suspensões conidiais foram preparadas a partir do crescimento dos isolados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA.

Para o preparo da suspensão na concentração 10^8 conídios/ml, 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 com auxílio da Câmara de Neubauer sob microscópio óptico, segundo Alves (1998).

A concentração 10^7 conídios/ml foi preparada através de diluição seriada a partir da concentração 10^8 conídios/ml, onde foram utilizados 2 ml dessa suspensão acrescida de 18 ml de água destilada estéril e Tween 80 0,1%.

3.4 Viabilidade das Suspensões de Conídios

Uma amostra de 10 μ l da concentração 10⁷ conídios/ml foi colocada em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e antibiótico (500mg de cloranfenicol :1 litro de meio de cultura) para avaliação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. As placas foram mantidas em câmara climatizada sob temperatura de 25 \pm 1°C e umidade relativa \geq 80% e avaliadas 24 horas após. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

3.5 Obtenção de *R. (B.) microplus*

Para realização dos bioensaios, foram coletadas fêmeas ingurgitadas diretamente do corpo de vacas leiteiras naturalmente infestadas em duas propriedades distintas (PESAGRO-RJ e Bovinocultura de Leite da Universidade Federal rural do Rio de Janeiro, situadas 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. Essas fêmeas ficaram acondicionadas em placas de Petri mantidas em câmaras climatizadas, tipo (B.O.D.) sob temperatura e umidade relativa controladas, para realizarem postura. No décimo dia de postura, alíquotas de 500 mg foram pesadas e colocadas em seringas vedadas com algodão hidrofílico. Quando as larvas completaram 15 dias, foram utilizadas para infestação artificial de dois bezerros distintos, onde um recebeu larvas provenientes da PESAGRO-RJ e outro larvas da Bovinocultura, os bezerros permaneceram em baias individuais. No 21º dias após a infestação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso da baia dos bezerros e 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, parte das fêmeas foram submetidas ao tratamento e a outra parte mantida em placas de Petri em câmara climatizada sob temperatura de 27 \pm 1 °C e umidade relativa \geq 90% para obtenção de ovos e larvas.

3.6 Delineamento Experimental

Para realização do experimento foram preparadas duas suspensões conidiais nas concentrações 10⁷ e 10⁸ conídios/ml de cada fungo e um grupo controle. No grupo controle foi utilizada somente uma solução de água destilada e Tween 80 a 0,1%. Cada tratamento foi formado por dez repetições. Os mesmos tratamentos foram utilizados nas duas populações distintas de *R. (B.) microplus* testadas.

As concentrações utilizadas nos bioensaios de cada fase de desenvolvimento de *R. (B.) microplus* estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de conídios dos isolados (Ma 959) de *Metarhizium anisopliae* e (Bb 986) de *Beauveria bassiana*, utilizados nas diferentes fases de desenvolvimento de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

	Fêmeas ingurgitadas	Ovos	Larvas
Ma 959	$1,2 \times 10^8$ conídios/ml	$1,3 \times 10^8$ conídios/ml	$1,2 \times 10^8$ conídios/ml
Bb 986	$1,2 \times 10^8$ conídios/ml	$1,3 \times 10^8$ conídios/ml	$1,2 \times 10^8$ conídios/ml

3.7 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).

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 banhadas em tubos de ensaio com um ml de suspensão fúngica e submersas por um período de três minutos. As fêmeas do grupo controle receberam um ml da solução contendo água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%. Após o tratamento, o excesso da suspensão foi retirado com ajuda de um papel toalha e, as fêmeas, devidamente identificadas, foram fixadas com fita adesiva dupla face, no interior das placas de Petri, e mantidas em câmara climatizada sob condições ideais já descritas no item 3.6.

Para a avaliação do percentual de eclosão das larvas oriundas da postura de fêmeas tratadas, a massa de ovos 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 *B. bassiana* e *M. anisopliae* 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 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 compreendido entre

o início da postura e a eclosão das primeiras larvas), período de eclosão (tempo 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 residual da fêmea (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):

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

$$\text{IN} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{[\text{peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)} - \text{peso residual das fêmeas (g)}]} \times 100$$

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

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

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

$$\% \text{ de Redução da Eclosão} = \left[\frac{\% \text{ Eclosão (controle)} - \% \text{ Eclosão (tratado)}}{\% \text{ Eclosão (controle)}} \right] \times 100$$

3.8 Bioensaio com Ovos

No 10º dia de postura das fêmeas destinadas à obtenção dos ovos, os mesmos foram separados, pesados em alíquotas de 50 mg e acondicionados em tubos de ensaio devidamente vedados com algodão hidrófilo. Para realizar o tratamento dos ovos com as diferentes concentrações conidiais foi utilizada a mesma metodologia descrita para o tratamento das

fêmeas. Após o tratamento, os tubos de ensaio foram mantidos em câmara climatizada sob condições de umidade e temperatura descritas no item 3.6.

Como parâmetro de avaliação, foi observado diariamente o percentual de eclosão das larvas.

3.9 Bioensaio com Larvas

Parte da postura do 10º dia das fêmeas foi pesada em alíquotas de 50 mg e acondicionada 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 dez dias, até o 30º dia após a realização do tratamento das mesmas.

3.10 Reisolamento dos Isolados Fúngicos após o Bioensaio

Três dias após o término da postura, amostras de fêmeas ingurgitadas tanto do grupo controle como do grupo tratado com as suspensões conidiais, foram colocadas em câmara úmida e incubadas em câmara climatizada sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ para facilitar o crescimento dos fungos e posterior confirmação de suas características (SAMSON; EVANS, 1982).

3.11 Análise Estatística

Primeiramente, foram comparados dentro de cada propriedade todos os tratamentos, inclusive o controle, posteriormente as propriedades foram comparadas entre si para cada concentração fúngica de ambos isolados.

Para análise dos dados paramétricos foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os dados não paramétricos foram submetidos à análise de Kruskal Wallis, seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as ordenações médias, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (SAMPAIO, 2002).

O cálculo dos tempos médios letais TL_{90} , foi realizado pelo software Polo ($p \leq 0,1$) (LeORA SOFTWARE, 1987).

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade das Suspensões de Conídios

Os conídios dos isolados Ma 959 e Bb 986 de *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram 100% de germinação, sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$, após o período de 24 horas, demonstrando que os fungos estavam aptos a serem utilizados.

4.2 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de *R. (B.) microplus*

Através dos resultados obtidos nos grupos controles de ambas as propriedades pode-se observar que as fêmeas utilizadas no presente experimento estavam com a capacidade reprodutiva normal, de acordo com o índice de produção de ovos e percentual de eclosão de larvas, segundo Glória et al. (1993). Com os resultados encontrados pode-se observar que ambos isolados testados foram capazes de influenciar na maioria dos parâmetros biológicos de fêmeas alimentadas de *R. (B.) microplus*, como demonstram as tabelas 2 e 3.

4.2.1 Peso médio das fêmeas ingurgitadas

O peso médio das fêmeas utilizadas no grupo controle e nos grupos tratados com as diferentes concentrações dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana* se encontram nas tabelas 2 e 3. Pode-se observar que conforme a metodologia, foram obtidas fêmeas ingurgitadas com pesos homogêneos. Desta forma, as diferenças encontradas nos parâmetros biológicos podem ser atribuídas à ação dos tratamentos utilizados.

4.2.2 Período de pré-postura

O período de pré-postura não demonstrou diferença significativa quando as diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana* foram comparadas com o grupo controle de cada propriedade pesquisada separadamente, como pode se observar nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do Peso da fêmea (P.F.); Período de Pré-Postura (P.P.P.); Peso da Postura (Pes. P); Período de Postura (Per. P.); Período de Incubação (P. I.); Período de Eclosão (P. Ec.); Percentual de Eclosão (% Ec.); Peso Residual da Fêmea (P.R.); Índice Nutricional (I. N.) e Índice de Produção de Ovos (I.P.O.) de fêmeas alimentadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da Pesagro-RJ, tratadas com diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* isolado (Ma 959) e *Beauveria bassiana* isolado (Bb 986) (*)

	Controle	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸
P.F. (gr)	0,243 ± 0,02 a	0,247 ± 0,02 a	0,240 ± 0,02 a	0,242 ± 0,02 a	0,240 ± 0,02 a
P.P.P. (dias)	3,8 ± 0,42 a	3,5 ± 0,52 a	3,9 ± 0,31 a	3,6 ± 0,42 a	3,5 ± 0,42 a
Pes.P. (gr)	0,162 ± 0,05 a	0,169 ± 0,07 a	0,134 ± 0,02 b	0,114 ± 0,04 b	0,104 ± 0,02 bc
Per.P. (dias)	17,1 ± 1,52 a	17,2 ± 1,68 a	13,0 ± 1,56 b	12,6 ± 5,79 b	9,8 ± 2,48 bc
P.I. (dias)	23,8 ± 0,42 a	23,5 ± 0,52 a	23,9 ± 0,31 a	23,8 ± 0,42 a	23,8 ± 0,42 a
P. Ec. (dias)	8,0 ± 1,05 a	7,8 ± 1,03 a	8,4 ± 0,96 a	8,2 ± 1,03 a	9,0 ± 0,00 a
Ec. (%)	97,8 ± 1,61 a	82,9 ± 18,44 b	81,8 ± 27,47 b	79,8 ± 16,24 b	89,8 ± 7,17 b
P. R. (gr)	0,051 ± 0,01 a	0,044 ± 0,01 a	0,052 ± 0,01 a	0,059 ± 0,01 a	0,054 ± 0,02 a
I.N. (%)	83,4 ± 18,84 a	82,5 ± 32,35 a	71,2 ± 6,92 b	61,1 ± 20,25 b	56,2 ± 12,69 bc
I.P.O. (%)	65,9 ± 15,57 a	67,5 ± 26,87 a	55,5 ± 4,21 b	46,4 ± 16,61 b	43,8 ± 10,43 b

(*) Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão do Peso da fêmea (P.F.); Período de Pré-Postura (P.P.P.); Peso da Postura (Pes. P); Período de Postura (Per. P.); Período de Incubação (P. I.); Período de Eclosão (P. Ec.); Percentual de Eclosão (% Ec.); Peso Residual da Fêmea (P.R.); Índice Nutricional (I. N.) e Índice de Produção de Ovos (I.P.O.) de fêmeas alimentadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* isolado (Ma 959) e *Beauveria bassiana* isolado (Bb 986) (*)

	Controle	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸
P.F. (gr)	0,217 ± 0,02 a	0,239 ± 0,02 a	0,239 ± 0,02 a	0,239 ± 0,02 a	0,240 ± 0,02 a
P.P.P. (dias)	3,3 ± 0,48 a	3,5 ± 0,52 a	3,2 ± 0,42 a	3,6 ± 0,51 a	3,3 ± 0,48 a
Pes.P. (gr)	0,141 ± 0,02 a	0,132 ± 0,02 a	0,128 ± 0,03 a	0,115 ± 0,05 ab	0,088 ± 0,04 b
Per.P. (dias)	19,7 ± 0,48 a	15,4 ± 3,10 b	14,8 ± 3,39 b	12,7 ± 5,16 b	9,5 ± 2,68 bc
P.I. (dias)	23,3 ± 0,48 a	23,5 ± 0,53 a	23,2 ± 0,42 a	23,6 ± 0,52 a	23,3 ± 0,48 a
P. Ec. (dias)	8,0 ± 1,05 a	8,4 ± 0,97 a	8,6 ± 0,84 a	7,6 ± 0,97 a	7,2 ± 0,63 a
Ec. (%)	95,3 ± 3,97 a	94,1 ± 4,33 a	82,5 ± 23,12 ab	84,7 ± 20,76 a	72,0 ± 25,95 bc
P. R. (gr)	0,054 ± 0,02 a	0,040 ± 0,01 a	0,047 ± 0,01 a	0,059 ± 0,01 a	0,059 ± 0,02 a
I.N. (%)	78,3 ± 7,61a	66,9 ± 7,89 b	66,4 ± 11,04 b	64,4 ± 28,04 b	47,0 ± 17,62 bc
I.P.O. (%)	60,0 ± 4,69 a	55,3 ± 4,52 a	53,2 ± 9,17 a	48,5 ± 21,32 b	36,8 ± 15,79 b

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

Quando as propriedades foram comparadas entre si para cada concentração fúngica de ambos os isolados, observou-se diferença significativa no período de pré-postura no grupo tratado com o fungo *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/ml (Figura 1).

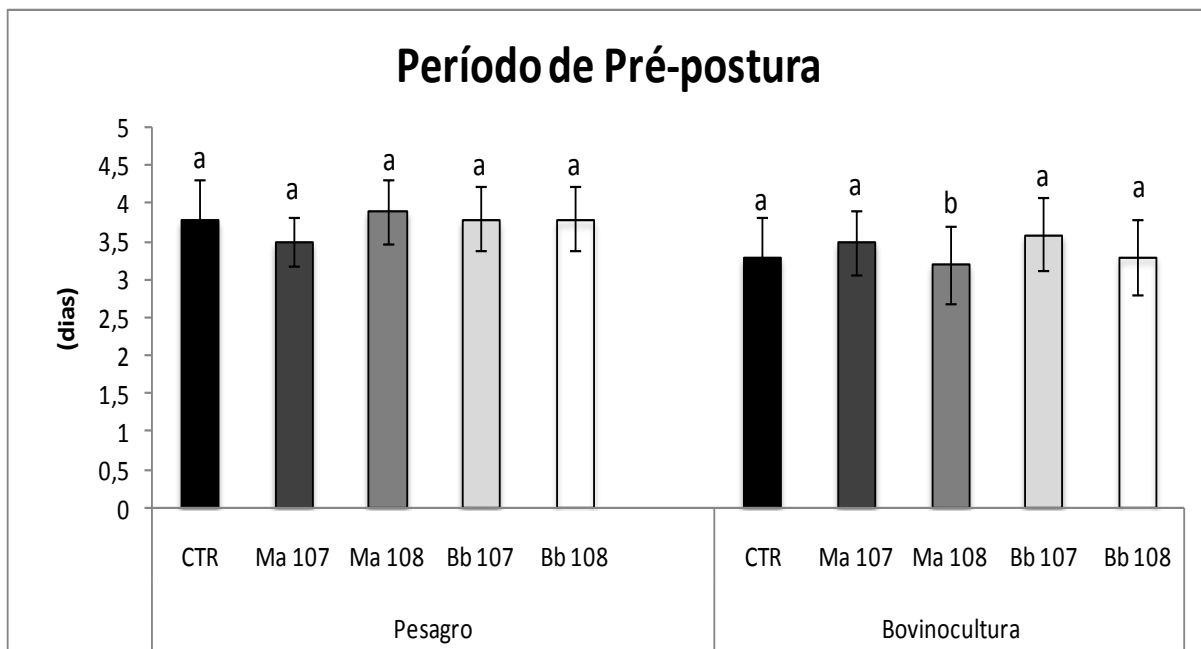


Figura 1. Média e desvio padrão do período de pré-postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundos da PESAGRO-RJ e Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.2.3 Peso da postura

Os isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 *B. bassiana* foram capazes de promover diminuições significativas no peso final da postura das fêmeas ingurgitadas tratadas. Na população de fêmeas ingurgitadas oriundas da Pesagro-RJ houve diminuição do peso da postura em quase todos tratamentos, exceto no grupo tratado com *M. anisopliae* na concentração de 10^7 conídios/ml, e na população de carrapatos da Bovinocultura de leite houve diminuição no grupo tratado com o isolado Bb 986 de *B. bassiana* na concentração de 10^8 conídios/ml, como demonstram as tabelas 2 e 3. Apesar de não ter sido observadas diferenças significativas entre as populações estudadas ao se comparar cada tratamento (Figura 2), ficou evidenciada uma maior influência do isolado Bb 986 de *B. bassiana* sobre ambas populações de *R. (B.) microplus*, demonstrando assim uma maior patogenicidade a esta espécie de carrapato.

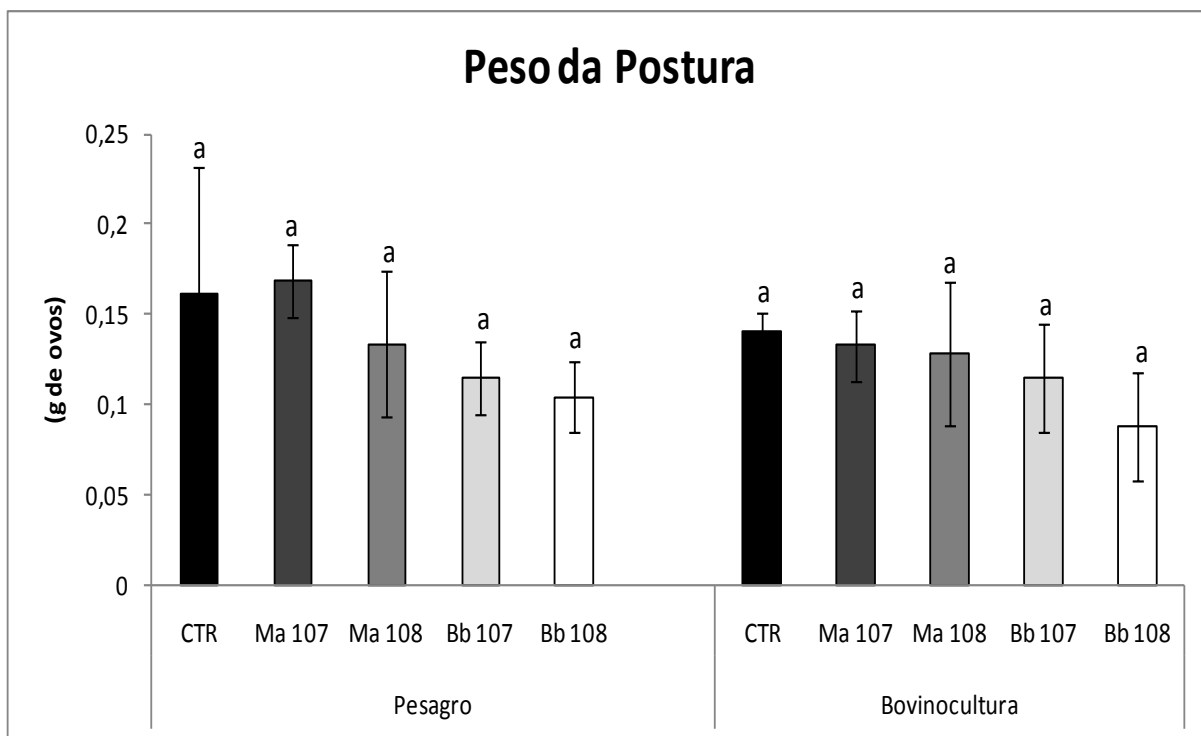


Figura 2. Média e desvio padrão do peso da postura, em gramas, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundos da PESAGRO-RJ e Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb986 de *Beauveria bassiana*.

4.2.4 Período de postura

As diferentes concentrações dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana* apresentaram alterações significativas no período de postura das fêmeas alimentadas de *R. (B.) microplus* de ambas propriedades (Tabelas 2 e 3). No entanto, em uma avaliação combinada deste parâmetro com o peso das posturas, evidencia-se que a redução de período em determinado tratamento pode estar mais ligada à redução na quantidade de ovos postos do que uma possível aceleração no processo.

Quando se comparou o período de postura entre as populações estudadas, não foram observadas diferenças significativas (Figura 3).

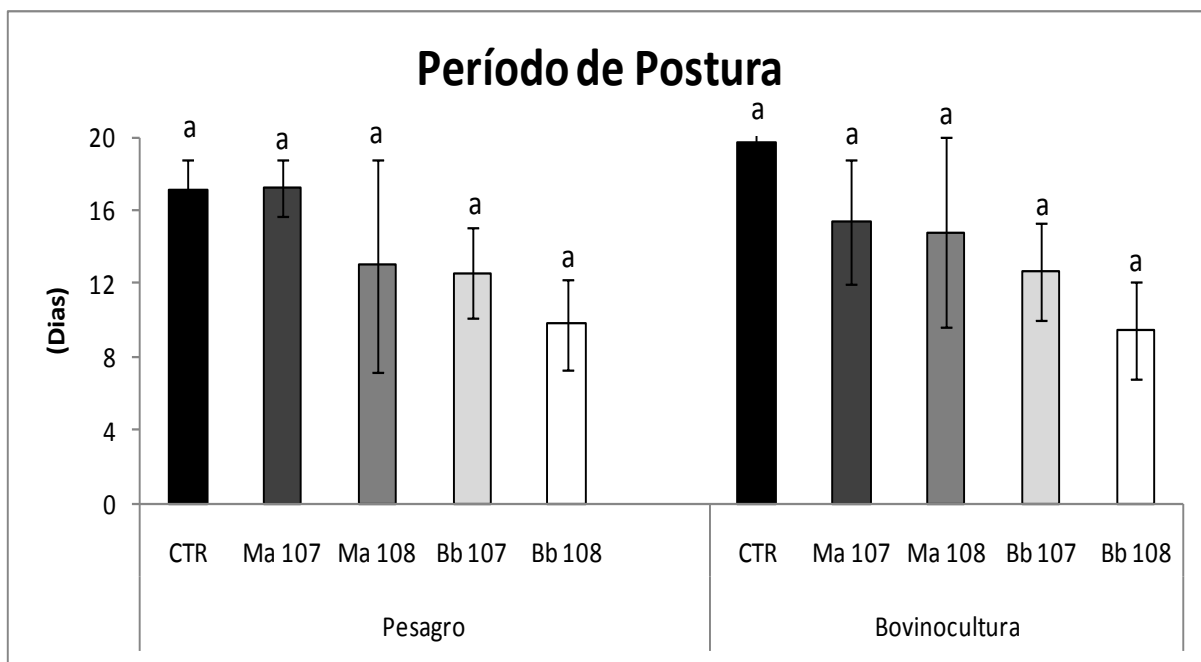


Figura 3. Média e desvio padrão do período de postura, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.2.5 Período de incubação

O período de incubação dos ovos oriundos das fêmeas tratadas com os isolados entomopatogênicos Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana*, não demonstraram redução significativa nos grupos tratados, independente da concentração de conídios utilizada (Tabelas 2 e 3). Além disso, não foi observada diferença entre as duas populações estudadas através deste parâmetro, como demonstra a figura 4, indicando que não há influência dos fungos na velocidade do desenvolvimento embrionário dos carrapatos.

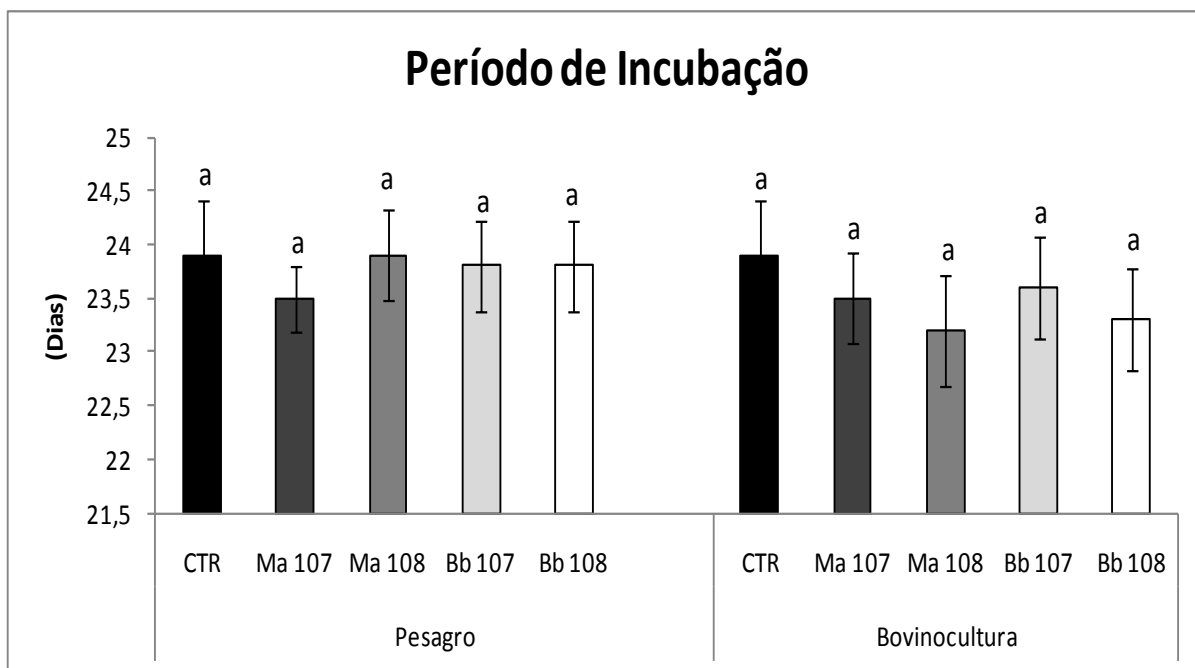


Figura 4. Média e desvio padrão do período de incubação, em dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.2.6 Período de eclosão das larvas

Os isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana* não promoveram redução significativa neste parâmetro das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, conforme mostrados nas tabelas 2 e 3. No entanto, quando foi comparado o período de eclosão de larvas entre as duas populações distintas, houve diferença significativa no grupo tratado com o isolado Bb 986 de *B. bassiana* na concentração de 10^8 conídios /ml (Figura 5).

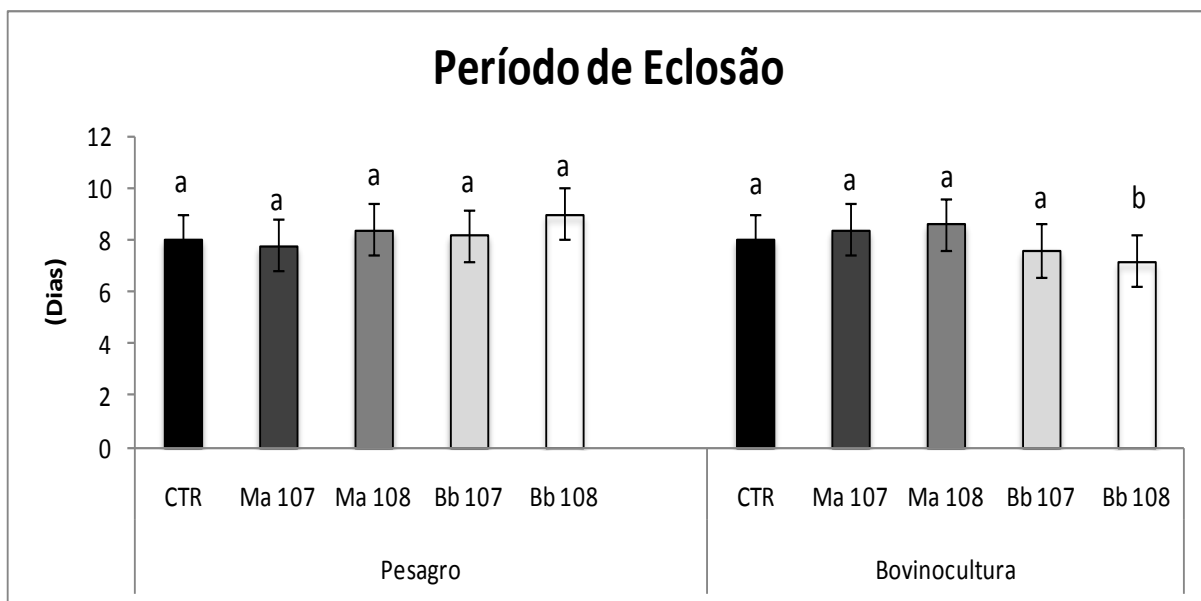


Figura 5. Média e desvio padrão do período de eclosão das larvas, em número de dias, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.2.7 Percentual de eclosão

Ao se avaliar cada população separadamente para este parâmetro, observou-se que na propriedade PESAGRO-RJ, ambos isolados estudados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 896 de *B. bassiana*, nas duas concentrações promoveram diminuição significativa. No entanto, nos grupos formados com fêmeas provenientes da Bovinocultura de leite (UFRRJ), apenas na maior concentração (10^8 conídios/ml) do isolado Bb 986 de *B. bassiana* é que houve diminuição significativa no percentual de eclosão das larvas (Tabelas 2 e 3). Quando as propriedades foram comparadas entre si para cada concentração fúngica de ambos isolados através deste parâmetro não foi observada diferença significativa (Figura 6). Mesmo não apresentando diferença significativa entre os tratamentos nas duas populações, ficou evidenciada que a população de carrapatos da PESAGRO-RJ foi mais sensível aos isolados fúngicos estudados.

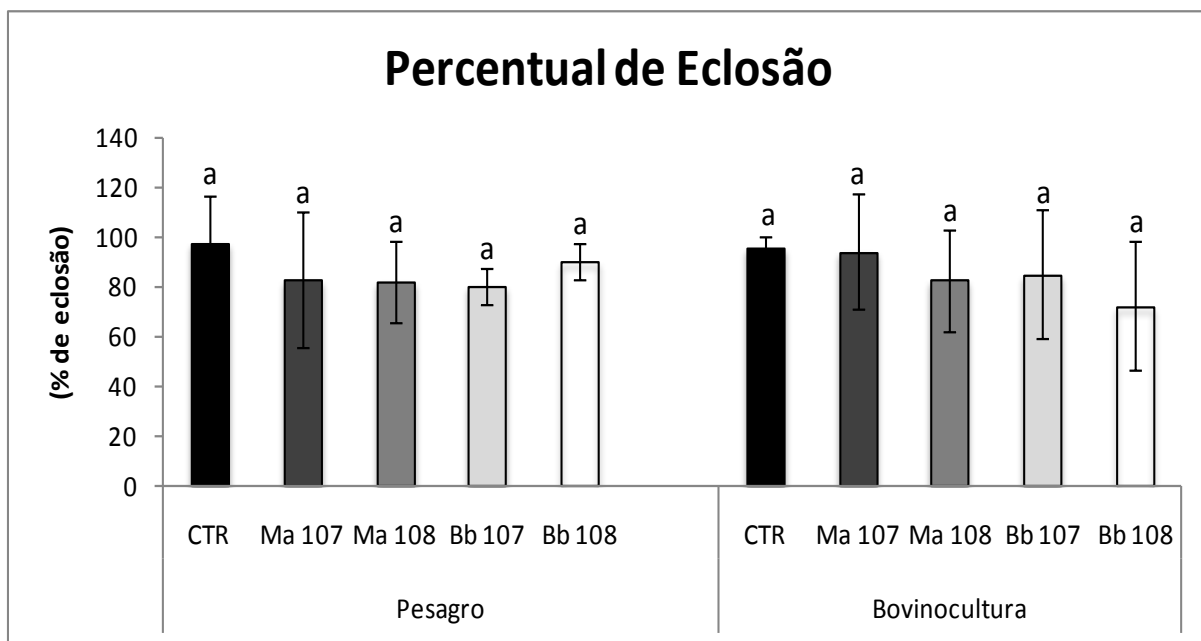


Figura 6. Média e desvio padrão do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.2.8 Peso Residual das Fêmeas

Este parâmetro não demonstrou diferença significativa quando as diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana* foram comparadas com o grupo controle de cada propriedade pesquisada separadamente, como pode se observar nas tabelas 2 e 3. Quando as propriedades foram comparadas entre si para cada concentração fúngica de ambos isolados, também não observou se diferença significativa no peso residual das fêmeas (Figura 7).

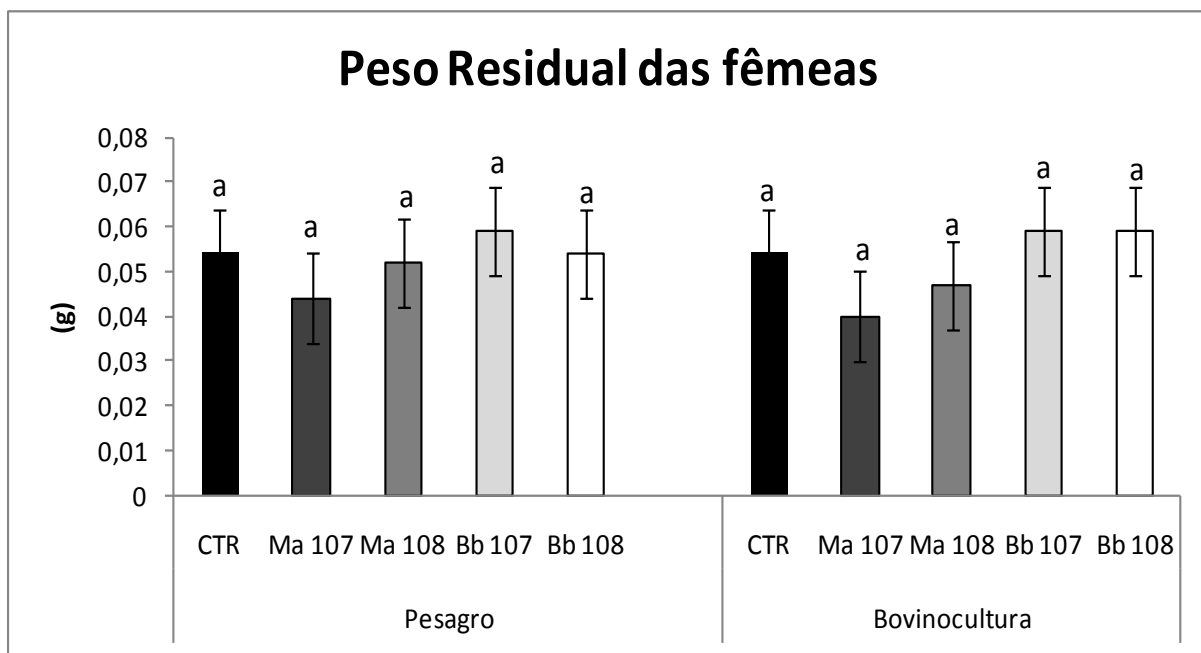


Figura 7. Média e desvio padrão do peso residual de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.2.9 Índice Nutricional

Os isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana* ocasionaram diminuição significativa no Índice Nutricional de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* das duas propriedades. De um modo geral, a ação dos fungos determinou sobre ambas as populações um desvio nutricional para outros processos metabólicos não relacionados à produção de ovos.

Ao se avaliar separadamente este parâmetro, observou-se que na propriedade Bovinocultura de Leite (UFRRJ), ambos isolados estudados, nas duas concentrações promoveram redução significativa. No entanto, as fêmeas provenientes da PESAGRO, que foram tratadas com Ma 959 de *M. anisopliae* na concentração 10^7 conídios/ml, não apresentaram redução significativa, todos os demais tratamentos foram significativos. (Tabelas 2 e 3). Através deste parâmetro, não foi observada diferença significativa entre as populações testadas (Figura 8).

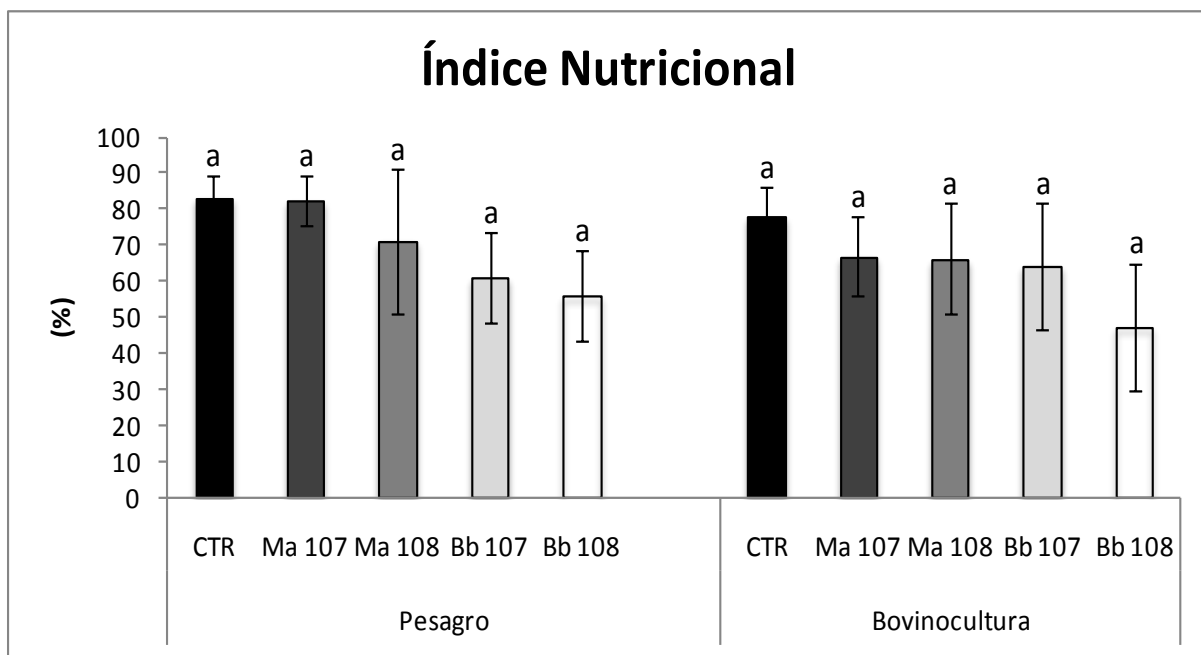


Figura 8. Média e desvio padrão do índice nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.3 Índice de Produção de Ovos

Através deste parâmetro pode-se observar diferença na ação dos dois isolados fúngicos testados sobre as fêmeas de *R. (B.) microplus* de origem diferentes. Nas fêmeas oriundas da PESAGRO, o Índice de Produção de Ovos foi reduzido significativamente nos grupos tratados com Ma 959 10^8 , Bb 986 10^7 e 10^8 conídios/ml. Nas fêmeas provenientes da Bovinocultura de leite, houve diferença significativa neste parâmetro com o isolado Bb 986 nas duas concentrações 10^7 e 10^8 conídios/ml (Tabela 2 e 3).

Através destes resultados pode-se observar que o isolado fúngico Ma 959 de *M. anisopliae*, não foi capaz de reduzir significativamente a conversão do sangue ingerido em ovos pelas fêmeas de *R. (B.) microplus* oriundas da Bovinocultura de Leite (UFRRJ). Enquanto que o isolado Bb 986 de *B. bassiana*, foi capaz de reduzir significativamente a conversão do sangue ingerido em ovos pelas fêmeas de ambas populações estudadas, independente da concentração.

Quando as propriedades foram comparadas entre si para cada concentração fúngica de ambos isolados sobre o Índice de Produção de Ovos foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com o isolado Ma 959 na concentração de 10^7 conídios/ml (Figura 9).

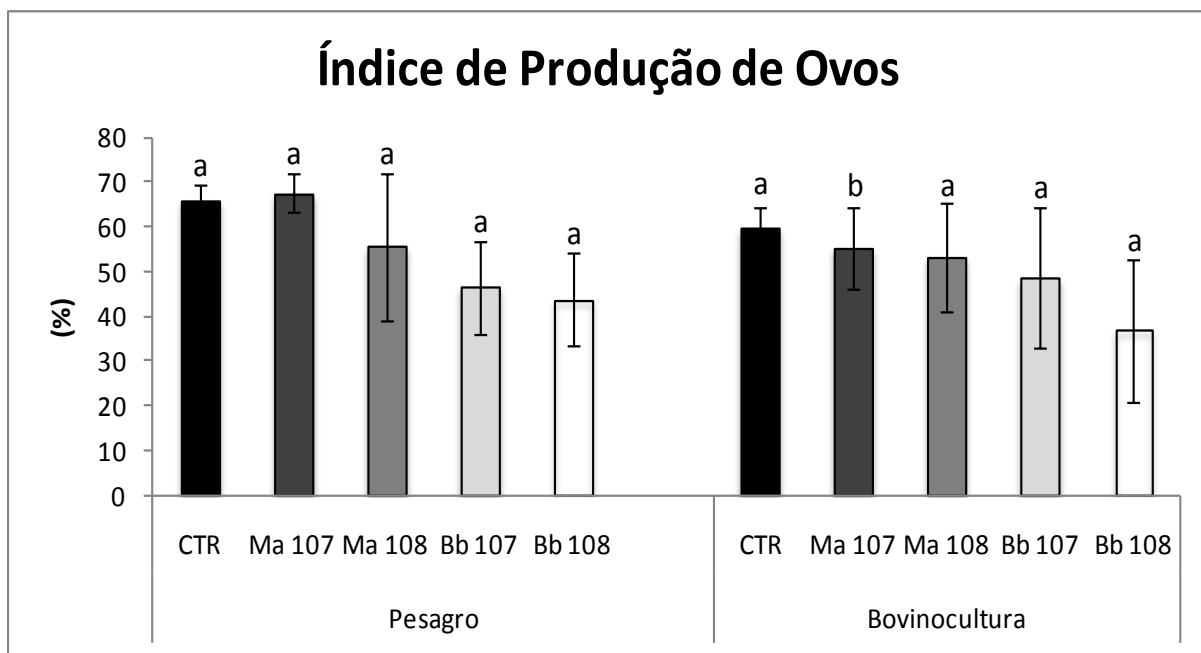


Figura 9. Média e desvio padrão do índice de produção de ovos (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ e da Bovinocultura de Leite (UFRRJ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.3.1 Percentual de Controle

Os percentuais de controle obtidos ao se tratar as fêmeas de *R. (B.) microplus* oriundas de ambas as propriedades, com os isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana*, podem ser observados na tabela 4. Através destes resultados pode-se observar que houve uma melhor atuação do isolado Bb 986 de *B. bassiana*, principalmente na maior concentração. Além disso, com esses dados pode-se dizer que a população de carrapatos da PESAGRO-RJ foi mais sensível à *B. bassiana*, sendo mais fácil de ser controlada utilizando este fungo. Os percentuais de controle encontrados utilizando *B. bassiana* são relativamente satisfatórios para controle biológico, visto que a utilização de fungos entomopatogênicos é uma proposta para somar-se a um método integrado de controle de carrapatos e não substituir o método químico.

Tabela 4. Percentual de Controle de fêmeas alimentadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ (IZ) e Bovinocultura de Leite (IZ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

	M.a		B.b.	
	P	IZ	P	IZ
10^7	11,5	10,0	42,3	38,0
10^8	28,7	20,0	39,9	49,0

4.4 Bioensaio com Ovos de *R. (B.) microplus*

Os dois isolados fúngicos nas maiores concentrações conidiais foram capazes de promover redução no percentual de eclosão das larvas de ambas as propriedades quando os ovos de *R. (B.) microplus* foram submetidos aos tratamentos. No entanto, na concentração de 10^7 conídios/ml, somente houve redução no percentual de eclosão de larvas na população da PESAGRO-RJ, que foi tratada com o isolado Ma 959 de *M. anisopliae* (Tabela 5). Porém, quando as propriedades foram comparadas entre si para cada concentração fúngica de ambos isolados, os resultados obtidos não ocasionaram diferença significativa entre os tratamentos (Figura 10). Através dos resultados obtidos neste bioensaio utilizando ovos foi demonstrada novamente a maior eficácia do fungo *B. bassiana* sobre este carrapato.

Tabela 5. Média do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da PESAGRO-RJ (P) e da Bovinocultura de leite (IZ), tratados com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana* (*).

	M.a		B.b.	
	P	IZ	P	IZ
Controle	99,4 ± 0,7 a	98,2 ± 1,8 a	99,4 ± 0,7 a	98,2 ± 1,8 a
10^7	94,4 ± 3,3 b	96,9 ± 2,8 a	96,6 ± 2,8 a	93,2 ± 5,8 a
10^8	70,0 ± 16,3 bc	64,0 ± 21,7 b	57,3 ± 33,3 b	50,5 ± 30,2 b

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

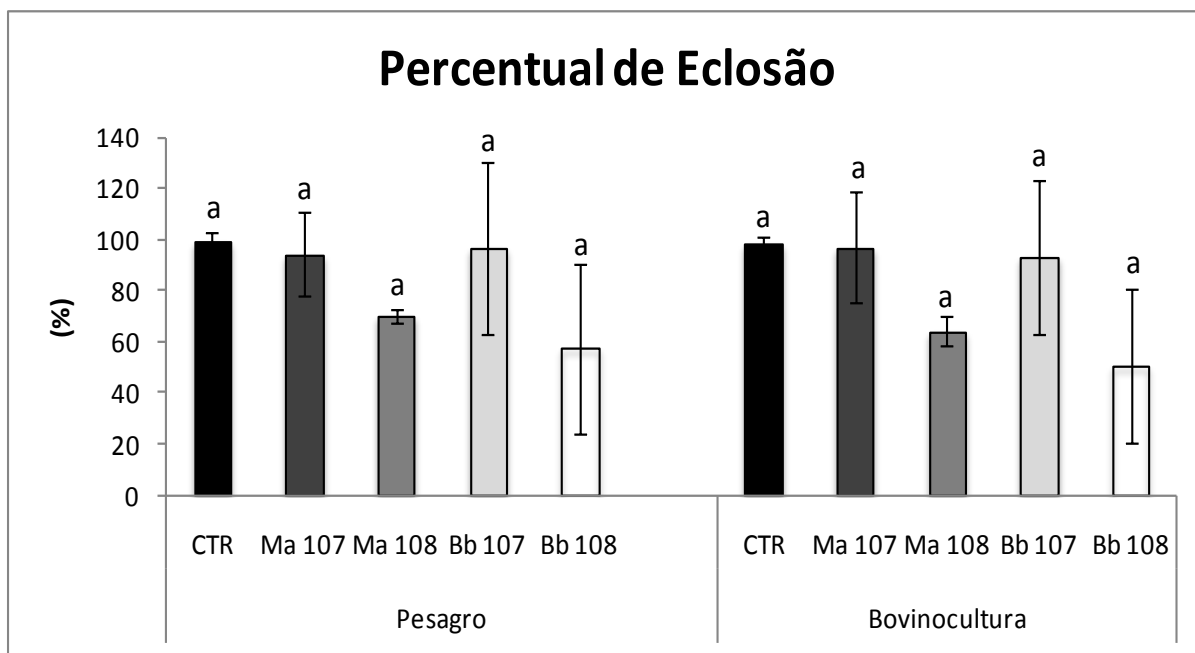


Figura 10. Média do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de ambas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.5 Bioensaio com Larvas não Alimentadas de *Rhipicephalus (B.) microplus*

4.5.1 Percentual de mortalidade

Os resultados obtidos sobre as larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus* foram os mais interessantes, pois neste estágio ambos os isolados fúngicos testados apresentaram alta patogenicidade. Isto demonstra que o estágio larval do carrapato seria o alvo mais fácil para ação dos fungos entomopatogênicos. Além disso, em aplicações destes fungos em nível de campo, a chance dos fungos agirem sobre larvas é maior do que sobre ovos, visto que as larvas estão mais expostas nas pastagens.

Sobre este estágio do carrapato houve uma inversão dos valores nos resultados encontrados, onde ficou evidenciada uma melhor eficácia do isolado Ma 959 de *M. anisopliae* quando comparado com o isolado Bb 986 de *B. bassiana*.

Quando as duas populações foram analisadas separadamente, ambas foram sensíveis aos isolados fúngicos, entretanto, a população oriunda da Bovinocultura de Leite (UFRRJ) apresentou percentual de mortalidade das larvas bem mais alto, evidenciando uma expressiva diferença entre as duas populações estudadas. Ao se comparar o percentual de mortalidade obtido entre as duas propriedades, observou-se diferença significativa em todos os grupos (no

30° dia pós tratamento), exceto com o isolado Bb 986 10^7 conídios/ml comprovando maior sensibilidade da população da Bovinocultura de Leite (UFRRJ) (Figuras 11, 12 e 13).

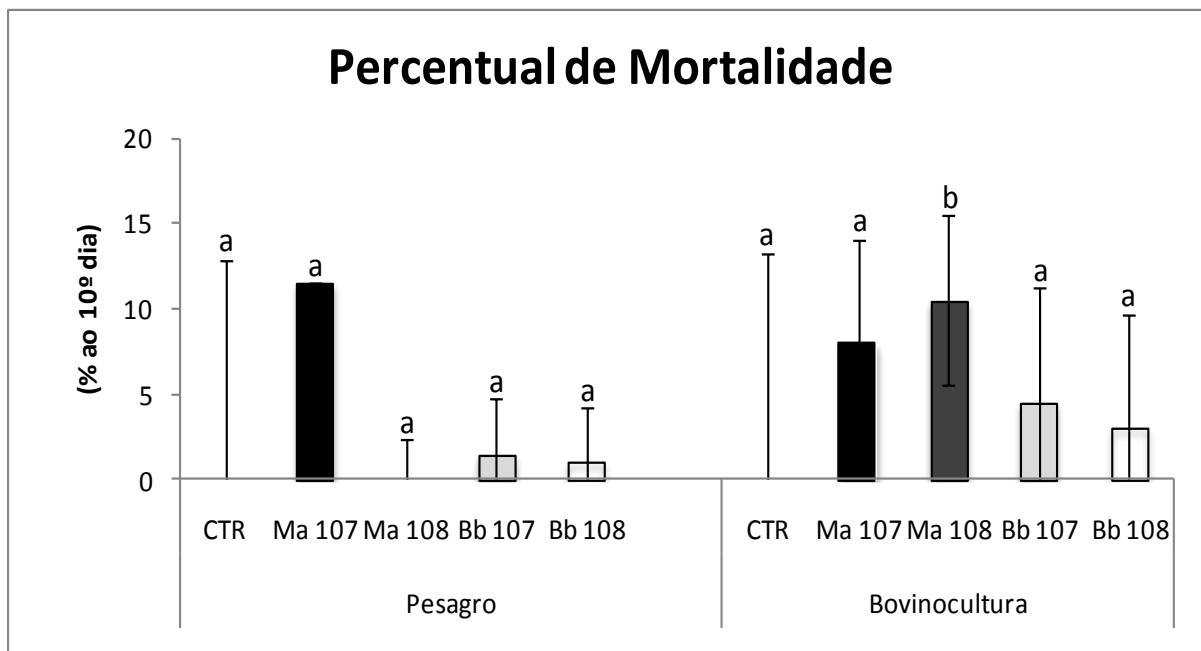


Figura 11. Média do percentual de mortalidade no 10º dia pós tratamento das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de duas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

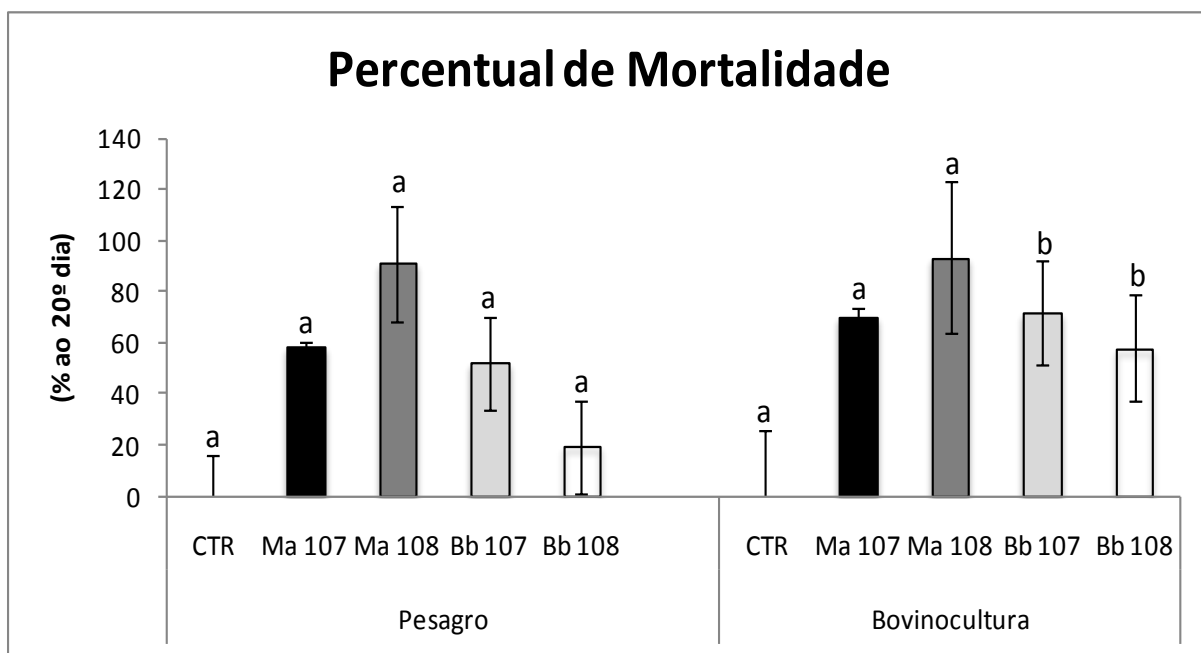


Figura 12. Média do percentual de mortalidade no 20º dia pós tratamento das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de duas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

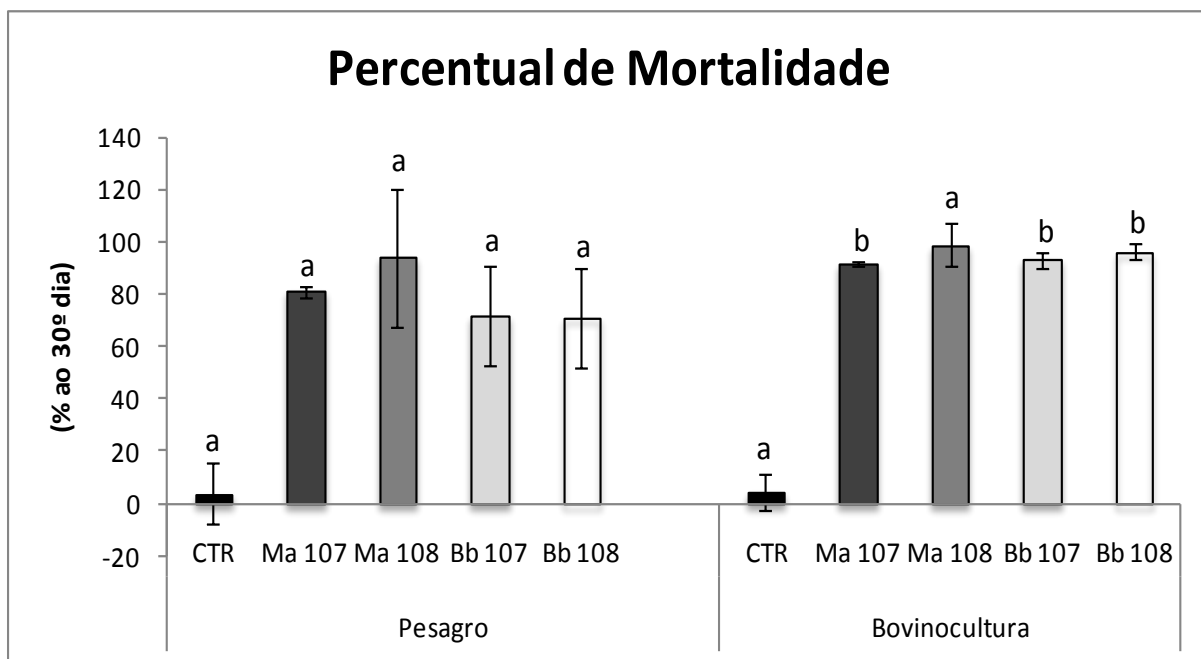


Figura 13. Média do percentual de mortalidade no 30º dia pós tratamento das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de duas propriedades, tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana*.

4.5.2 Tempo Médio Letal

Ao se comparar as duas populações de acordo com o tempo médio letal (LT 90), ou seja, tempo necessário para que o fungo conseguisse matar 90% das larvas da população estudada, foi observada diferença significativa entre as duas propriedades nas menores concentrações (10^7 conídios/ml), de ambos os isolados fúngicos (Tabela 6). Além disso, ficou bem evidenciada a maior eficácia do isolado Ma 959 de *M. anisopliae* sobre este estágio do carrapato *R. (B.) microplus*, pois levou menos dias para alcançar a LT 90.

Tabela 6. Tempo Médio Letal (LT 90) em número de dias, das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* oriundas da PESAGRO-RJ (P) e da Bovinocultura de Leite da UFRRJ (IZ), tratadas com diferentes concentrações conidiais dos isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* e Bb 986 de *Beauveria bassiana* (*).

	M.a.		B.b.	
	P	IZ	P	IZ
10^7	37,3 a	27,2 b	35,7 a	27,5 b
10^8	22,9 a	19,5 a	35,8 a	26,7 a

(*) Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha de cada coluna, não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,1$).

4.6 Reisolamento Fúngico

As amostras de fêmeas pós-postura (residuais), ovos e larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus* submetidas ao tratamento com as diversas concentrações dos isolados fúngicos Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana*, apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas após 10 dias de incubação em câmara úmida, confirmando que o fungo penetrou e se desenvolveu nos diferentes estágios do carrapato. E como esperado, as amostras utilizadas no grupo controle não demonstraram desenvolvimento de colônias.

5 DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos neste trabalho pode se observar que ambos os isolados testados foram capazes de influenciar nas diferentes fases de *R. (B.) microplus*, demonstrando potencial patogênico para esta espécie de carrapato.

O tratamento sobre fêmeas alimentadas apresentou bons resultados, obtendo percentuais de controle variando de 10 a 49%, esses valores são satisfatórios para controle biológico. No entanto, Bittencourt et al. (1992) utilizando o mesmo isolado Ma 959 de *M. anisopliae*, conseguiu um percentual de controle de 96,6%. Uma possível explicação para esta diferença seria as características intrínsecas tanto das populações de carrapatos, como dos isolados fúngicos utilizados nos diferentes experimentos.

No bioensaio com ovos, a redução do percentual de eclosão das larvas variou entre 3,1 a 49,5 %. Em um estudo realizado por Bittencourt et al. (1996), utilizando o mesmo isolado Bb 986 de *B. bassiana* sobre carrapatos da mesma espécie, foi encontrada uma redução no percentual de eclosão das larvas entre 20 a 86,6 %, e Bittencourt et al. (1994 b) utilizando o mesmo isolado Ma 959 de *M. anisopliae*, obteve percentuais de eclosão de larvas variando de 3,3 a 66,0 % nas concentrações de 10^5 a 10^9 , respectivamente. Em relação ao tratamento de larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus*, os valores encontrados foram similares aos presentes na literatura, no entanto neste trabalho, o tempo necessário para obter altos percentuais de mortalidade foi maior. Os percentuais de mortalidade do presente estudo variaram de 71,0 a 98,7%, porém esses valores só foram alcançados no 30º dia após o tratamento. 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 o mesmo estágio 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/ml, respectivamente.

Como se pode observar, os percentuais de mortalidade foram similares, no entanto, tanto Bittencourt et al. (1996) como Bahiense et al. (2003), conseguiram esses valores no 10º dia após o tratamento, ou seja, 20 dias a menos do que o do presente estudo.

A variação de resultados utilizando os mesmos isolados fúngicos sobre o mesmo gênero de carrapato pode estar relacionada tanto a mecanismos de defesa dos carrapatos num processo de adaptação ou a uma diminuição da virulência destes entomopatógenos. Além disso, pode ainda haver uma combinação de ambos os fatores. Devido estas possibilidades seria interessante a realização de mais estudos nesta área para esclarecer estas hipóteses.

Anteriormente, a hipótese de resistência ou diferença na susceptibilidade de populações de carrapatos estava restrita a produtos químicos. No entanto, Fernandes (2007) estudando a ação de 60 isolados fúngicos de *B. bassiana* observou que no primeiro bioensaio todos os isolados de *B. bassiana* promoveram tardiamente a mortalidade às larvas de *R. (B.) microplus*, porém, em um segundo bioensaio utilizando larvas de carrapato de outra procedência a mortalidade das larvas foi significativa no décimo dia pós-tratamento. Estes resultados levantaram a hipótese de diferença na susceptibilidade entre populações distintas de carrapatos. No presente estudo, esta diferença foi observada em vários tratamentos para os diferentes estágios evolutivos do carrapato *R. (B.) microplus*. Entretanto, foi no bioensaio com larvas não alimentadas que ficou mais evidente a diferença entre as populações de carrapatos aos fungos testados, pois para atingir a mortalidade de 90% da população de carrapatos em uma das propriedades necessitou de 10 dias a mais do que a outra, sendo que as suspensões fúngicas utilizadas foram as mesmas para ambas populações.

As possíveis diferenças observadas por populações de carrapatos oriundos de locais diferentes podem estar relacionadas às características genéticas e fisiológicas de determinadas cepas, por isso podem apresentar diferentes respostas quando são desafiadas com os fungos entomopatogênicos. Segundo Polar et al. (2005) é possível que os carrapatos sejam fisiológica ou estruturalmente tolerantes a infecção por fungos entomopatogênicos, visto que elevadas concentrações de conídios estabelecidas nos ensaios em laboratório são necessárias para estabelecer a rápida mortalidade dos carrapatos. Essa afirmativa é sustentada pelo fato de que não foram encontrados relatos de epizootias ocorrendo naturalmente em carrapatos. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de um contato prévio destas cepas de carrapatos aos fungos entomopatogênicos, visto que estes podem estar presentes no solo.

Coincidentemente, no mesmo período deste experimento, um teste de sensibilidade a produtos carrapaticidas químicos foi realizado nas mesmas propriedades de onde os carrapatos deste estudo foram coletados, e os resultados obtidos demonstraram diferença na susceptibilidade entre as duas populações a diferentes produtos químicos, como pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7. Percentual de eficiência de produtos comerciais sobre carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da Bovinocultura de Leite da UFRRJ (FAIZ) e da PESAGRO-RJ.

Produto Comercial	Eficiência do Produto (%)	
	FAIZ	PESAGRO
CYPERCLOR PLUS	100	100
FLYTION SP	100	100
TOPLINE POUR-	100	44,9
AMIPHÓS	95,6	86,7
COLOSSO PULVERIZAÇÃO	80,3	78,7
CARRAPATICIDA E SARNICIDA U.C.B.	50,8	91,8

Fonte: EMBRAPA, Gado de Leite (2009).

Na propriedade da FAIZ, a população de carrapato foi mais sensível aos produtos comerciais “Cyperclor Plus, Flytion Sp, TopLine pour on” e menos à “Colosso e Carrapaticida e Sarnicida U.C.B.” A população oriunda da PESAGRO, se comportou de maneira oposta, sendo mais sensível ao Carrapaticida e Sarnicida U.C.B e menos a TopLine pour on. Através destes dados pode-se observar que realmente, a resposta é diferente nas populações distintas, independentemente do controle ser químico ou biológico. Essa diferença de sensibilidade entre as populações provavelmente é devido a contatos prévios com produtos com estas mesmas bases químicas, acarretando na seleção de cepas resistentes, por isso um histórico do controle de carrapatos nestas propriedades é de extrema importância.

Quando se sabe que uma população de carrapatos é resistente a produtos químicos, não se pode descartar a possibilidade de interferência dos mecanismos desta resistência na atuação dos fungos entomopatogênicos, principalmente pelo fato de que tanto os produtos químicos como os fungos entomopatogênicos agem nos carrapatos através de contato com a cutícula. Em um estudo com *R. (B.) microplus* resistentes a acaricidas, Baffi et al. (2007) observaram diferentes pontos de mutações genéticas nestas populações resistentes a produtos químicos a base de piretróides e organofosforados. E quando Bahiense (2007) estudou a ação *in vivo* dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana* associados ou não a Deltametrina no controle de uma cepa do carrapato *R. (B.) microplus* resistente a piretróides, o autor observou que esta cepa sofreu ação pelos fungos, porém com valores abaixo dos encontrados na literatura. Nos grupos tratados apenas com suspensões fúngicas, os percentuais médio de controle foram de 6,43% e 8,18% nas concentrações de 10^8 conídios/ml de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente. Em testes *in vitro*, Bittencourt et al. (1992),

utilizando a mesma concentração deste isolado fúngico de *M. anisopliae*, verificou um percentual de 96,6%, evidenciando que experimentos realizados em laboratório, a eficácia observada é mais elevada do que nos experimentos *in vivo*. Isto se deve aos experimentos laboratoriais serem executados em ambiente de umidade e temperatura favorável ao patógeno e controlada, ao contrário das condições a campo, onde as variações climáticas são bruscas e nem sempre favorável ao patógeno. Além destes fatores climáticos influenciando na eficácia dos isolados fúngicos, outras hipóteses não devem ser descartadas, como por exemplo, diferenças intrínsecas entre os isolados utilizados em momentos diferentes e uma possível correlação entre cepas resistentes a produtos químicos e controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos, visto que o presente estudo foi realizado sobre condições laboratoriais assim como por Bittencourt et al. (1992) e os resultados aqui encontrados foram menores.

Outro fator bastante importante que pode favorecer o entendimento sobre diferença entre populações distintas de carrapatos é conhecimento genotípico destes artrópodes. Passos et al. (1999) estudando a variabilidade genética entre populações do carrapato bovino *R. (B.) microplus* no sudeste do Brasil, sugeriu através dos resultados encontrados em seu trabalho, que há uma diversidade genotípica complexa em regiões endêmicas de populações de *R. (B.) microplus*. O mesmo foi evidenciado por Labruna et al. (2009) que estudaram populações oriunda de três continentes: Africano, Americano e Asiático, e evidenciaram divergências genéticas e reprodutivas entre as populações distintas de *R. (B.) microplus*. Apesar de não ter sido realizado nenhum estudo genotípico sobre as populações no presente experimento, as informações obtidas por Passos et al. (1999) e Labruna et al. (2009) ajudam a explicar a diferença na susceptibilidade entre as populações estudadas.

A partir deste estudo, pode se observar que diferentes populações desta espécie de carrapato podem manifestar diferentes níveis de susceptibilidade à infecção por *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Neste caso, não só as condições genéticas e fisiológicas dos isolados fúngicos, mas também a susceptibilidade dos indivíduos de uma população podem interferir na eficácia do biocontrole de determinada população do carrapato *R. (B.) microplus*. Neste sentido, tendo em vista que é possível a seleção dos isolados de maior potencial virulento sobre diferentes populações de carrapato, a pesquisa de uma formulação destes isolados pode favorecer uma maior eficácia nos programas de controle biológico de carrapatos.

Pelo fato deste estudo ter sido pioneiro acerca da sensibilidade entre populações de *R. (B.) microplus* utilizando os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* (isolado Ma 959) e *B. bassiana* (isolado Bb 986), os resultados encontrados demonstram grande importância e são

motivadores para dar continuidade a esta linha de pesquisa, isto devido a complexidade do assunto.

6 CONCLUSÕES

- Existe diferença na susceptibilidade ao controle biológico entre diferentes populações de *R. (B.) microplus*, quando desafiadas com os isolados fúngicos Ma 959 de *M. anisopliae* e Bb 986 de *B. bassiana*, não apenas com relação a concentração necessária para seu controle, como também no tempo necessário para seu controle;
- Em aplicações futuras dos fungos entomopatogênicos em nível de campo, pode se aplicar a metodologia de teste de sensibilidade dos carrapatos aos fungos antes do tratamento, para saber qual espécie fúngica é mais patogênica a determinada população de carrapatos, proporcionando assim melhores resultados;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.
- ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. **Epizootiologia aplicada ao controle microbiano** In: Controle microbiano de insetos. 2ª ed. Piracicaba, SP: FEALQ, p. 97-170. 1998.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: UFG, 1998. 490p.
- BAFFI, M. A.; SOUZA, G. R. L.; VIEIRA, C. U.; SOUSA, C. S.; GOURLART, L. R.; BONETTI, A. M. Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 148, p. 301-309, 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.
- 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.
- BENNETT, G.F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, n.1, 1974.
- BEUGNET, F. CHARDONNET. L. Tick resistance to pyrethroids in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**. v.56, p. 325-338, 1995.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A. F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n.2, 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 da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 32–38, 1994 a.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v.16, p.49-55, 1994 b.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 17, p. 83-88, 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.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S.; REIS, R. C. S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1883) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.20, n.2, p.78-82, 1999.

BITTENCOURT, V. R. E. P. Controle Biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico de carrapatos**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2000, cap. 4, p.145-175.

BITTENCOURT, V. R. E. P., SOUZA, E. J, COSTA, G. L. Evaluation of a formulation of *Beauveria bassiana* for control of *Anocentor nitens*. **Abstracts of the IV international conference on ticks and tick-born pathogens**. Banff, Canada, p. 88, 2002.

BOLDO, J.T.; JUNGES, A.; AMARAL, K.B.; STAATS, C.C. ; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**, p. -, 2009.

BURGES, H. D. Possibilities of pest resistance to microbial control agents. In: BURGES, H. D., HUSSEY, N. W. **Microbial control of insects and mites**. New York, Academic Press, 1971, p. 445-457.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet Light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konossu Saitama, v.2, n.4, 2001.

CASIDA, J. E., QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide: Past, Present, or Future? **Annual Review of Entomology**. V.43, P.1-16, 1998.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science and Technology**, London, v.10, n.4, p.357-384, 2000.

DONG, C.; ZHANG, J.; CHEN, W.; HUANG, H.; HU, Y. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. **Microbiol Res**. v.162, p.53-61, 2007.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H.; A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**. v. 2, p. 134-150, 2000.

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.

ESTRADA-PEÑA, A. Geostatistics and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology** v. 81, p.73-82, 1999.

FERNANDES, E. K. K. **Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus***. 2007.150p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

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

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

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

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**. Ano 27, nº 159, p.1-7, 2007.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1513-1518, 2004.

GARCIA, M. V. MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; PRETTE, N.; BECHARA, G. H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.368- 372, 2005.

GEORGHIOU, G. P., TEJEDA, L. A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991, 318 p.

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.

GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D.; WRAIGHT, S. P. Fungi. In: **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 2000, cap.4, p.255-282, 2000.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.

GRAF, J. F. GOGOLEWSKI, R. LEACH, BING N. SABATINI, S. A. MOLENTO, M. B. BORDIN, E. L. et. Al. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**. v. 129, p. 427-442, 2004.

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.

GRODEN, E.; LOCKWOOD, J.L. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.57, n.1, p.7-16, 1991.

HÄUSERMAN, W.; FRIEDEL, T.; HESS, E. A.; STRONG, M. B. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks In: **Proceedings of XIX International Congress of Entomology** (Beijing, China). p.138, 1992.

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

JONSSON, N. N. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. **Aust Vet J**. v.75, p. 802-807, 1997.

JONSSON, N. N.; MAYER, D. G.; MATSCHOS, A. L.; GREEN, P. E.; ANSELL, J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Vet. Parasitol.**, v. 78, p. 65-77, 1998.

KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* using the entomopathogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.67, n.1, p.15-20, 1996.

KETTLE, D. S. Ixodida - Ixodidae (Hard ticks). In: Kettle D. S. **Medical and Veterinary entomology**, 2nd ed. CAB international, Wellingford, UK, 1995.

KOCAN, K. M. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 57, p.121- 151, 1995.

LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; JONGEJAN, F.; FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**. v. 9, p. 46-58, 2009.

LATIF, A. JONGEJAN, F. The wide use of acaricides for the control of livestock diseases in Africa needs a reappraisal. Newsletter on Integrated Control Pathogenics Trypanosomes and their vectors, vol. 6, pp 10-12. 2002.

LeORA SOFTWARE. POLO-PC: User's guide to Probit or Logit analysis. LeORA Software, Berkeley, CA, 1987.

LIMA, E. A. L. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v. 84, supl.3, p.17-20, 1989.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; P'REZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.16, n.1, p.27-31, 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.

MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.159, n.4, p.527-532, 2005.

MARTIN, T.; OCHOU, O. G.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 9, p. 883-887, 2003.

McGAUGHEY, W. H. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for controlling Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae) in farm gran bins and elevator silos. **Journal Econ. Entomol.** 78: p. 1089-1094, 1985.

MONTEIRO, S. G. Ação dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, sobre o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em diferentes temperaturas. 1997. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997.

MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.2, p.109-112, 1998.

MONTEIRO, S. G.; BAHIANSE, T. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nittens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v.33, p. 559-563, 2003.

MOSCARDINI, F. Soybean integrated pest management in Brazil. **FAO Plant Prot. Bull.**41: p. 91-100, 1993.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.548- 572, 2000.

NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus: La Garrapata Común del Ganado Vacuno***. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1982. 184p.

OAKESHOTT, J. G.; HOME, I.; SUTHERLAND, T. D.; RUSSELL, R. J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**. v.4, p.202, 2003.

ONOFRE, S. B.; MINIUIK, C. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.62, n.9, p.1478-1480, 2002.

PAIÃO, J. C. V.; MONTEIRO, A. C.; KRONKA, S. N. Susceptibility of the cattle tick of the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n.2, p.245-251, 2001.

PASSOS, D. T., FERREIRA, C. A. S., SILVA, S. S., RICHTER, M. F., OZAKI, L. S. Detection of genomic variability in different populations of the cattle tick *Boophilus microplus* in southern Brazil. **Veterinary parasitology**. v. 87, p. 83-92, 1999.

PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle. Belo Horizonte: **Cadernos técnicos de Escola de Veterinária da UFMG**. v. 4, p. 65, 1990.

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

PETER, R. J.; BOSSCHE, P. V. D.; PENZHORN, B. L.; SHARP, B.: Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. **Veterinary Parasitology**. v.132, p. 205-215, 2005.

POLAR, P.; DE MURO, M. A.; KAIRO, M. T. K. PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, v.5, p.276-284, 2005.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C.; GARCIA, M. V.; SOARES, V. E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.855-861, 2005.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**. v.298, p. 179-181, 2002.

RATH, A. C.; KOEN, T. B.; YIP, H. Y. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n.5, p.378-384, 1992.

REHNER, S. A. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: Vega, F.E.; BLACKWELL, M. **Insect-fungal Association Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2005.

REIS, R. C. S.; CHACON, S. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, (1883) na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908)(Acari-Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.2, p.68-70, 2003.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.6, p.788-791, 2004.

ROBERTS, D. W.; CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. In: Ignoffo, C.M.; Hostetter, D.L. **Environmental stability of microbial insecticides**. New York: Entomological Society of America. 3 ed. p.10, 1977.

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.

RUFINGIER, C.; PASTEUR, N.; LAGNEL, J.; MARTIN, C.; NAVAJAS, M. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 4, p. 385-391, 1999.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**. v. 129, p.389-413, 2004.

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

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg) Pic. Iako Parasit Klistete *Ixodes ricinus* L. **Zool. Listv.**, v. 6, p. 229-230, 1957.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. Two new *Beauveria* spp. From South America. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.39, p. 93-97, 1982.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**. v. 98, n. 1-3, p. 89-109, 2001.

SOUZA, E.J. **Avaliação da eficácia in vitro dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 sobre ovos e larvas do carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)**. 1999. 72 p. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

SOUZA, E. J.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FAGUNDES, A. S. Ação do fungo *Beauveria bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens* em teste de campo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 163-169, 2009.

St. LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C.; Penetrations events during infection of host cuticle by *M. anisopliae*. **Journal of invertebrate Pathology**. v. 58, p.168-179, 1991.

St. LEGER, R. J.; MAY,B.; ALLEE, L.L; FRANK, D. C.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W.; Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.89-101, 1992.

SUTHERST, R. W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN, D. A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.34, p. 317-327, 1983.