

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

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

**TESE**

**Uso do Fungo *Metarhizium anisopliae* no Controle do Carrapato  
*Rhipicephalus microplus*: testes em condições laboratoriais e a campo**

**Mariana Guedes Camargo**

**2014**



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

**USO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DO  
CARRAPATO *Rhipicephalus microplus*: TESTES EM CONDIÇÕES  
LABORATORIAIS E A CAMPO**

**MARIANA GUEDES CAMARGO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**  
*Sob a Co-orientação da Professora*  
**Isabele da Costa Angelo**  
*Sob a Co-orientação da Doutora*  
**Márcia Cristina de Azevedo Prata**

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

Seropédica, RJ

Dezembro de 2014

595.42

Camargo, Mariana Guedes, 1985-

C172u

T

Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: testes em condições laboratoriais e a campo / Mariana Guedes Camargo. - 2014.

60 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

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

Bibliografia: f. 51-58.

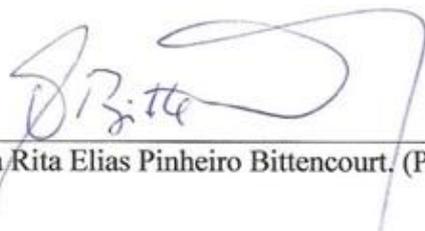
1. Carrapato - Teses. 2. Carrapato - Controle biológico - Teses. 3. Fungos entomopatogênicos - Teses. 4. *Metarhizium anisopliae* - Teses. 5. Óleos minerais - Teses. I. Bittencourt, Vânia Elias Pinheiro, 1959- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.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

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

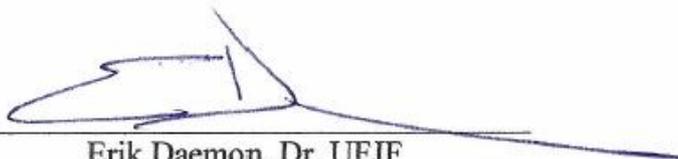
**MARIANA GUEDES CAMARGO**

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

TESE APROVADA EM 09/12/2014



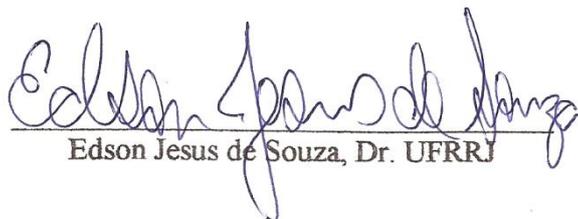
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. (Ph.D.) UFRRJ



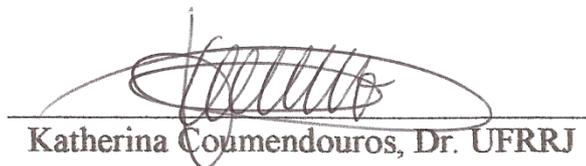
Erik Daemon, Dr. UFJF



Romário Cerqueira Leite, Dr. UFMG



Edson Jesus de Souza, Dr. UFRRJ



Katherina Coumendouros, Dr. UFRRJ

*Dedico este trabalho:  
aos meus pais Agostinho e Vera Lúcia,  
a minha irmã Anna Carolina,  
ao meu fofuxo Rodrigo,  
e a todos os meus familiares e amigos que fizeram parte dele.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* por ter guiado meus passos e iluminado meu caminho, sempre me amparando e protegendo em todos os momentos. Agradeço a professora *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por ter compartilhado comigo seu conhecimento, e pelos momentos nos quais, com sua sabedoria, me mostrou o caminho certo. Agradeço as minhas co-orientadoras *Márcia Cristina de Azevedo Prata* e *Isabele da Costa Angelo* pelo aprendizado, atenção e conhecimento transmitido. Professoras *Vânia*, *Márcia* e *Isabele*, vocês foram mais que orientadoras! Obrigada por acreditarem no meu potencial e por todos os conselhos dados em cada ligação desesperada que eu fazia nos momentos nos quais eu não sabia o que fazer, e vocês, com toda paciência me orientavam, acalmavam e mostravam o caminho a seguir. Agradeço ao Dr. *Paulino José Mello Andrade*, a *Priscila Nascimento* e a todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite, Campo Experimental Santa Mônica pela infraestrutura e total apoio na realização dos testes de estábulo. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho. Agradeço ao *José Luiz Roque da Silva* e ao *Inacio Vieira dos Santos (Tatu)* que foram fundamentais na realização dos testes de estábulo. Obrigada Roque e Tatu pela dedicação e carinho no trato dos animais, vocês me ensinaram a respeitar e amar os bezerros com os quais convivemos e trabalhamos durante meses de experimento. Agradeço ao Dr. Fábio Barbour Scott, a toda equipe de Grandes Animais do LQEPV, em especial a *Gabriela Oliveira*, *João Antônio Emídio Bicalho*, *Barbara Rauta de Avelar*, *Monique Medeiros*, *Bruno de Toledo Gomes (Sequela)* e *Gabriel Miranda Monteiro Diogo (Rato)*, e aos funcionários do curral de apreensão *Sidnei*, *Maninho* e *Edmar* pela ajuda fundamental para a realização do teste a campo. Sem vocês este trabalho não seria possível. Agradeço a *Simone Quinelato Bezerra* e *Patrícia Silva Gôlo* não só pela convivência no laboratório e em casa ou pela ajuda essencial nos experimentos, mas principalmente pela amizade e carinho dedicados a mim. Meninas, a amizade e convivência com vocês no dia a dia facilitaram muito as coisas, deixou tudo mais fácil e prazeroso. Obrigada por me ouvirem e apoiarem nos momentos bons e ruins durante todos esses anos! Não poderia esquecer dos meus sobrinhos de quatro patas *Tobias* e *Bianca* que me receberam com todo carinho e alegria no final do dia quando eu chegava em casa cansada. Aos amigos do Laboratório de Controle Microbiano *Wendell Marcelo de Souza Perinotto*, *Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues*, *Maria Clemente*, *Aleana Souza*, *Isabelle Campos*, *Sabrina Rita da Fonseca Rezende*, *Caio Márcio de Oliveira Monteiro* pelas discussões científicas e por estarem sempre dispostos a ajudar nos experimentos, além da preciosa amizade. E em especial ao *Allan Felipe Marciano*, *Michel Ruan dos Santos Nogueira* e *Fillipe Araujo de Sá* que foram meus braços direito e esquerdo nos testes *in vivo*, me ajudando diariamente (isso inclui sábados, domingos e feriados) nas coletas e contagem de carrapatos, além do apoio nos momentos inusitados, como a busca de bezerros fujões ou a sabotagem do experimento por gaviões, entre tantos outros acontecimentos. Família LCM, obrigada pelo apoio incondicional nos experimentos e pela paciência que tiveram comigo durante todos esses anos, eu sei que não sou a pessoa mais amável e fácil de conviver. Obrigada também pelos churrascos, festas juninas, amigos ocultos e tantos outros momentos felizes que tivemos juntos. Nossa convivência acrescentou além dos limites profissionais, obrigada por tudo! Aos colegas do *Laboratório de Hemoparasitos e Vetores* pelo apoio e cafezinhos no final da tarde. Aos colegas de turma da graduação, em especial *Vitor Sirena Sivoletta*, *Virginia Coimbra Zuvanov*, *Thiago Gonçalves*, *Raquel Sartori Gonçalves Dias*, *Ana Rita Pereira*, *Rafael Sonoda Côrtes*, *Vinicius Alves* e *Pedro Cupolillo de Faria* pela amizade e encontros que deixavam meus finais de semana mais divertidos.

Agradeço a minha mãe *Vera Lúcia Ferreira Guedes*, ao meu pai *Agostinho Jorge dos Reis Camargo* e a minha irmã *Anna Carolina Guedes Camargo* pela dedicação e amor incondicional. Obrigada pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Vocês foram meu estímulo para seguir em frente e nunca desistir, sem vocês nada disto seria possível. Amo muito vocês! Ao meu marido *Rodrigo Neumann Barros Ferreira* por estar sempre ao meu lado me apoiando, incentivando, e me mostrando que eu era capaz. Fofuxo, você é responsável por boa parte do meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela paciência nos momentos de nervosismo, pelo companheirismo e por todo amor dedicado a mim. Te amo! A minha sogra e amiga *Regina Célia Ferreira Barros* pelo carinho e momentos de descontração. Ao meu avô *Paulo Camargo* e a todos os meus tios e tias, primos e primas pelo apoio e carinho, vocês estão no meu coração! A minha grande amiga e madrinha *Tatiana Rodrigues* que, mesmo a distância, se fez presente com suas palavras de conforto e carinho. Agradeço a empresa *Koppert Biological Systems* por fornecer os produtos *Metarril* e *Metarril SP Organic* utilizados no presente trabalho. Aos funcionários da Estação Experimental W. O. Neitz e do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ que contribuíram para a realização deste trabalho. A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela dedicação e ensinamentos. Agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro. A todos, os meus sinceros agradecimentos, vocês fazem parte desta vitória!

## **BIOGRAFIA**

Mariana Guedes Camargo, filha de Agostinho Jorge dos Reis Camargo e Vera Lúcia Ferreira Guedes, nasceu em 10 de maio de 1985, na cidade de Rio Preto, MG.

Em maio de 2005 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído em dezembro de 2009. Foi estagiária do Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ, de janeiro a julho de 2007, o que permitiu que fosse bolsista de Iniciação Científica deste laboratório de agosto de 2007 a janeiro de 2010.

Em março de 2010 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na UFRRJ sob a orientação da Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Concluiu o mestrado em agosto de 2011, quando foi contemplada com uma bolsa de mudança de nível para o doutorado. Em setembro do mesmo ano, ingressou no doutorado em Ciências Veterinárias na mesma instituição, também sob a orientação da Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt.

Durante todo este período participou de projetos e eventos científicos, além de ter publicado artigos em revistas nacionais e internacionais.

## RESUMO

CAMARGO, Mariana Guedes. **Uso do Fungo *Metarhizium anisopliae* no Controle do Carrapato *Rhipicephalus microplus*: testes em condições laboratoriais e a campo.** 2014. 60p. Tese (Doutorado em Ciências, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito dos produtos Metarril SP Organic e Metarril acrescidos de 10% de óleo mineral, no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*, tendo como objetivos específicos: avaliar, *in vitro*, a ação da suspensão aquosa e formulação oleosa de Metarril sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, em diferentes umidades relativas; investigar o efeito de Metarril SP Organic acrescido de 10% de óleo mineral sobre o carrapato *R. microplus*, em testes de estábulo e a campo. Para o teste com variação de umidade foram formados quatro grupos (Controle aquoso, Controle oleoso, Metarril aquoso e Metarril oleoso) para cada umidade relativa utilizada (30, 50, 70 e 90%). As fêmeas de *R. microplus* foram submersas na suspensão ou formulação de seu respectivo tratamento. Em seguida, as fêmeas foram mantidas dentro dos dessecadores com a respectiva umidade relativa e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cada grupo possuía dez fêmeas. A postura de cada fêmea foi coletada, armazenada individualmente e mantida dentro dos dessecadores para posterior avaliação dos parâmetros biológicos. Para os testes de estábulo e a campo foram formados três grupos: Controle, Controle oleoso e Metarril oleoso. No teste de estábulo, cada grupo continha seis bovinos, sendo cada animal pulverizado com 3L de formulação. Foi realizado um tratamento no dia zero. Todos os carrapatos desprendidos do corpo dos animais foram contados diariamente e uma amostra de 20 fêmeas ingurgitadas por grupo foi incubada para avaliação dos parâmetros biológicos. No teste a campo, cada grupo continha dez bovinos, sendo cada animal pulverizado com 4L de formulação por tratamento. Foram realizados dois tratamentos, um no dia zero e outro no dia +3. Foram contadas todas as fêmeas entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento do lado esquerdo dos animais nos dias +7, +14 e +21 após cada tratamento e uma amostra de dez fêmeas ingurgitadas por grupo foi selecionada aleatoriamente para avaliação dos parâmetros biológicos. As suspensões e formulações fúngicas utilizadas em todos os experimentos possuíam  $10^8$  conídios/mL. No teste *in vitro*, a suspensão aquosa de Metarril se mostrou eficaz contra as fêmeas de *R. microplus* somente quando submetida a umidades relativas mais elevadas (70 e 90%). Já a formulação oleosa de Metarril foi eficaz em todas as umidades relativas utilizadas. Nos testes *in vivo*, a formulação oleosa de Metarril SP Organic apresentou eficácia variando de 8,23 a 67,39% e de 8,53 a 90,53% nos testes de estábulo e a campo, respectivamente. A eficácia média da formulação oleosa de Metarril SP Organic foi 47,74 e 75,09% nos testes de estábulo e a campo, respectivamente. Foram observadas alterações significativas nos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* nos três primeiros dias após o tratamento, no teste de estábulo, e no 14º dia após o segundo tratamento no teste a campo. A partir destes resultados sugere-se que as formulações Metarril SP Organic e Metarril, acrescidas de 10% de óleo mineral, são promissoras para o controle biológico de *R. microplus* em laboratório e em condições ambientais, podendo ser ferramentas importantes no controle deste carrapato.

**Palavras-chave:** Formulação oleosa, teste de estábulo, teste a campo.

## ABSTRACT

CAMARGO, Mariana Guedes. **Fungal formulations of *Metarhizium anisopliae* in the control of *Rhipicephalus microplus* ticks: in vitro and in vivo tests.** 2014. 60p. Thesis (Doctor in Sciences, Veterinarian Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The present work aimed to evaluate the effect of products Metarril SP Organic and Metarril plus 10% mineral oil in the control of *Rhipicephalus microplus* ticks, and having as specific goals: to evaluate *in vitro* the effect of Metarril aqueous suspension and oil-based formulation on engorged females of *R. microplus* ticks, in different relative humidity levels; to investigate the effect of Metarril SP Organic plus 10% mineral oil on *R. microplus* ticks in pen and field tests. For the test with humidity variation, four groups were formed (aqueous control, oil control, aqueous Metarril, oil Metarril) for each relative humidity level considered (30, 50, 70 and 90%). Females of *R. microplus* were submerged into the suspension or formulation of the corresponding treatment. Subsequently, the females were kept inside desiccators with the corresponding relative humidity and temperature of  $25 \pm 1$  °C. Each group had ten females. The eggs of each female were collected, stored individually and kept inside the desiccators for later evaluation of biological parameters. For the pen and field tests, three groups were formed: control, oil control and oil Metarril. In the pen test each group had six cattle, each of them being sprayed with 3L of formulation. A treatment was performed on day zero. All ticks fallen from the bodies of animals were counted daily and a sample of 20 engorged females per group was incubated for evaluation of biological parameters. In the field tests, each group had ten cattle, being each one sprayed with 4L of formulation per treatment. Two treatments were performed, one on day 0 and other on day +3. All females between 4,5 and 8,0 mm of length on the left side of the animals were counted on days +7, +14 and +21 after each treatment and a sample of ten engorged females per group was randomly selected for the evaluation of biological parameters. The fungal suspensions and formulations used in all experiments had  $10^8$  conidia/mL. In the *in vitro* test, the Metarril aqueous suspension was shown to be effective against *R. microplus* females only under higher relative humidity levels (70 and 90%). On the other hand, the oil-based formulation of Metarril was effective under all relative humidity levels considered. In the *in vivo* tests, the oil-based formulation of Metarril SP Organic presented effectiveness from 8,23 to 67,39% and from 8,53 to 90,53% for pen and field tests, respectively. The average effectiveness of the oil-based formulation of Metarril SP Organic was of 47,74 and 75,09% in pen and field tests, respectively. Significant changes in the biological parameters of *R. microplus* females were observed on the first three days following the treatment in the pen tests, and on the 14<sup>o</sup> day after the second treatment in the field tests. These results suggest that the formulations of Metarril and Metarril SP Organic, plus 10% mineral oil, are effective in the control of *R. microplus* both in laboratory and environmental conditions, being important tools for the control of this tick.

Keywords: Oil formulation, pen test, field test.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características dos animais utilizados no teste de estábulo. ....	18
<b>Tabela 2.</b> Características dos animais utilizados no teste a campo. ....	23
<b>Tabela 3.</b> Média e desvio padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> após tratamento com suspensão aquosa ou formulação oleosa de Metarril, mantidas em 25 °C e submetidas a diferentes umidades relativas do ar (30, 50, 70 ou 90%).....	27
<b>Tabela 4.</b> Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> após tratamento com suspensão aquosa ou formulação oleosa de Metarril, mantidas em 25 °C e submetidas a diferentes umidades relativas do ar (30, 50, 70 ou 90%). .....	28
<b>Tabela 5.</b> Eficácias (%) diária e média da formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral no controle do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> em teste de estábulo. .....	31
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletadas do piso das baias nos três primeiros dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.....	34
<b>Tabela 7.</b> Peso (mg) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo. ....	35
<b>Tabela 8.</b> Peso da massa de ovos (g) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo. .....	36
<b>Tabela 9.</b> Eclosão das larvas (%) provenientes de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo. .....	37
<b>Tabela 10.</b> Índice de produção de ovos (%) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo. .....	38
<b>Tabela 11.</b> Índice nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo. .....	39

**Tabela 12.** Número diário médio de carrapatos *Rhipicephalus microplus* obtido após tratamentos dos animais com formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste a campo. .... 40

**Tabela 13.** Eficácias (%) diária e média da formulação de Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*, em teste a campo. .... 41

**Tabela 14.** Média e desvio padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do corpo dos bovinos após os tratamentos com a formulação Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste a campo. .... 43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Placas de Petri com fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* após tratamento com a suspensão ou formulação de Metarril, no interior dos dessecadores, mantidos dentro das BODs. .... 16
- Figura 2.** Produto Metarril SP Organic utilizado nos testes de estábulo e a campo. .... 19
- Figura 3.** Etapas para realização do teste de estábulo. I e II: mistura dos componentes para a elaboração da formulação de Metarril SP Organic; III: formulação pronta. IV: pulverização dos animais com a formulação, utilizando bomba costal. V: bovino após o tratamento com a formulação. VI: coleta dos carrapatos do piso das baias. VII: acondicionamento em placa de Petri das 20 fêmeas ingurgitadas separadas para a avaliação dos parâmetros biológicos. .... 21
- Figura 4.** Teste a campo. I: pulverização dos animais com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, utilizando bomba costal. II: bovino após o tratamento com a formulação. .... 25
- Figura 5.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* em oviposição no 10º dia após tratamento com Metarril em diferentes umidades relativas do ar. I, II, III e IV: grupos mantidos a 30, 50, 70 e 90% de umidade relativa, respectivamente. A, B, C e D: grupos Controle aquoso, Controle oleoso, Metarril aquoso e Metarril oleoso, respectivamente. .... 29
- Figura 6.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* mantidas a 90% de umidade relativa e 25°C, 10 dias após o tratamento. I, II, III, IV: grupos Controle aquoso, Controle oleoso, Metarril aquoso e Metarril oleoso, respectivamente. .... 30
- Figura 7.** Eficácia diária (%) da formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral no controle de *Rhipicephalus microplus*, em teste de estábulo. .... 32
- Figura 8.** Número diário de carrapatos *Rhipicephalus microplus* obtido após tratamento dos animais com formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo. .... 33
- Figura 9.** Número diário médio de carrapatos *Rhipicephalus microplus* obtido após tratamentos dos bovinos com formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste a campo. .... 41
- Figura 10.** Eficácia diária (%) da formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*, em teste a campo. .... 42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2	Controle Microbiano Utilizando Fungos Artropodopatogênicos	4
2.3	Efeitos de Fatores Ambientais sobre Fungos Artropodopatogênicos	6
2.3.1	Temperatura	6
2.3.2	Umidade	8
2.3.3	Radiação	9
2.4	Formulação de Fungos Artropodopatogênicos	10
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1	Eficácia de Metarril em Diferentes Umidades Relativas do Ar	14
3.1.1	Localização do experimento	14
3.1.2	Obtenção do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
3.1.3	Preparo das suspensões e formulações fúngicas	14
3.1.4	Preparo dos dessecadores e ajuste das umidades relativas	15
3.1.5	Tratamento das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
3.1.6	Análise estatística	17
3.2	Teste de Estábulo	17
3.2.1	Localização e período de realização do experimento	17
3.2.2	Animais	17
3.2.3	Formulação fúngica	19
3.2.4	Delineamento experimental	19
3.2.5	Análise estatística	22
3.3	Teste a Campo	22
3.3.1	Localização e período de realização do experimento	22
3.3.2	Animais	22
3.3.3	Formulação fúngica	24
3.3.4	Delineamento experimental	24
3.3.5	Análise estatística	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
4.1	Eficácia de Metarril em Diferentes Umidades Relativas do Ar	26
4.2	Teste de Estábulo	30
4.3	Teste a Campo	40
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>

**ANEXOS**

**59**

Anexo A - Declaração de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

60

## INTRODUÇÃO

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 *Rhipicephalus microplus*, produzindo perdas diretas e indiretas pela transmissão de doenças, pela diminuição na produção de carne e leite e pelo custo de seu controle. Estima-se que, só no Brasil, estas perdas sejam de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2014).

O uso de carrapaticidas ainda é o método predominante no controle do carrapato *R. microplus*. Entretanto, a pouca preocupação no uso correto das bases químicas disponíveis no mercado tem feito com que esses produtos tenham sua eficácia reduzida devido à seleção e proliferação de carrapatos resistentes. Além disso, existe uma crescente preocupação com a diminuição de resíduos tóxicos no ambiente e com a presença desses resíduos na carne, leite e produtos derivados. Tais fatores aumentam o risco de intoxicação de animais e humanos, podendo também ser um fator limitador na exportação de leite e carne para outros países.

O interesse pelos programas de controle biológico de pragas da agricultura e parasitos na pecuária tem crescido consideravelmente no mundo em função do novo direcionamento da produção de favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos, além da preocupação com a qualidade dos alimentos e a ausência de resíduos de produtos químicos. Neste contexto, o controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos é um método promissor que deve ser considerado para o controle de carrapatos.

A virulência dos fungos artropodopatogênicos contra carrapatos já foi comprovada em diversos estudos laboratoriais. Entretanto, em condições naturais, esta virulência diminui, pois a ação destes patógenos é influenciada por diversos fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, exposição à radiação solar, saturação de água no solo e a presença de fatores fungistáticos no solo. Dentre estes fatores abióticos que interferem na ação dos fungos, a temperatura, a umidade relativa e a radiação solar são citados como os mais importantes. Temperaturas elevadas ou muito baixas, assim como as radiações ultravioleta UV-A e UV-B, podem inviabilizar a utilização de fungos artropodopatogênicos antes mesmo destes entrarem em contato com o hospedeiro. Já a umidade relativa interfere principalmente na germinação dos conídios, sendo que a maioria dos fungos necessita de valores elevados de umidade para germinar e conseguir penetrar no artrópode alvo. Sendo assim, se faz necessário avaliar a ação dos fungos em condições abióticas adversas visando elaborar formas de utilização destes patógenos sem que percam sua infectividade e virulência.

Os óleos minerais e vegetais têm sido utilizados como adjuvantes em formulações visando manter a virulência e até mesmo aumentar a eficácia dos fungos artropodopatogênicos contra carrapatos, pois quando adicionados a suspensões fúngicas, os óleos atuam protegendo os conídios das condições ambientais desfavoráveis, além de facilitar a adesão dos conídios à superfície do artrópode. Tais fatores contribuem para o uso efetivo destes patógenos contra carrapatos a campo. Entretanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos testando formulações de fungos artropodopatogênicos contra carrapatos em teste *in vivo*, sendo necessários mais estudos para o desenvolvimento de formulações efetivamente eficazes no controle destes artrópodes em condições ambientais.

Um grande número de micoinseticidas e micoacaricidas foi desenvolvido no mundo nas últimas décadas, entretanto a grande maioria é indicada exclusivamente para o controle de pragas da agricultura. Metarril SP Organic é um produto composto pelos isolados ESALQ 1037 e ESALQ E9 do fungo *Metarhizium anisopliae*, desenvolvido pela empresa Itaforte BioProdutos para o controle de pragas da agricultura. Este produto foi utilizado nos testes *in vivo* do presente trabalho. Entretanto, o Metarril SP Organic não é mais comercializado desde

2013, período no qual a empresa Itaforte BioProdutos foi adquirida pelo grupo Koppert Biological Systems, que passou a produzir e comercializar somente produtos a base do isolado ESALQ E9 de *M. anisopliae*. Sendo assim, os testes *in vitro* desenvolvidos no presente estudo foram realizados com conídios do isolado ESALQ E9 de *M. anisopliae*, sendo este produto chamado somente de Metarril. Desta forma, o presente trabalho se propôs a avaliar o efeito de Metarril SP Organic (isolados ESALQ 1037 e E9 de *M. anisopliae*) e Metarril (isolado ESALQ E9 de *M. anisopliae*), acrescidos de 10% de óleo mineral, no controle do carrapato *R. microplus*, tendo como objetivos específicos: 1) avaliar, *in vitro*, a ação da suspensão aquosa e formulação oleosa do produto Metarril sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, em diferentes umidades relativas; 2) Investigar o efeito do produto Metarril SP Organic acrescido de 10% de óleo mineral sobre o carrapato *R. microplus*, em teste de estábulo; 3) Investigar o efeito do produto Metarril SP Organic acrescido de 10% de óleo mineral sobre o carrapato *R. microplus*, em teste a campo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Rhipicephalus microplus*

*Rhipicephalus microplus*, conhecido como o carrapato dos bovinos, é um parasito obrigatório de origem asiática, e foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais pela importação do gado bovino (WHARTON, 1974). Encontra-se amplamente distribuído entre os paralelos 32° de latitude norte e 35° de latitude sul, ou seja, na América Central, América do Sul, Austrália, Oriente, Sul da África e da Flórida (NUÑEZ et al., 1982). No Brasil, fatores como as condições climáticas, com exceção do inverno no sul do país, e a disponibilidade de raças europeias de bovinos favoreceram a dispersão de *R. microplus* por todo o país (GRISI et al., 2002).

Murrel e Barker (2003) observaram, através de estudos moleculares e morfológicos, que algumas espécies pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* são mais estreitamente relacionadas às espécies do gênero *Boophilus* do que a outras espécies de *Rhipicephalus*. Sugeriram então, que *Boophilus* fosse um subgênero do gênero *Rhipicephalus*. Dessa forma, segundo a classificação taxonômica de Murrel e Barker (2003), as cinco espécies pertencentes ao gênero *Boophilus* foram transferidas para *Rhipicephalus* subgênero *Boophilus*.

O ciclo de vida do carrapato *R. microplus* é dividido em duas fases: uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária. A fase de vida livre se inicia com a queda da fêmea ingurgitada ao solo, começando então o período de pré-postura, que dura de dois a três dias. Em seguida, inicia-se o período de postura, que pode variar de três a seis semanas, seguido do período de eclosão das larvas, que varia de cinco a dez dias (FURLONG, 1993). Para que as larvas se tornem infectantes são necessários de dois a três dias após a eclosão, havendo então o fortalecimento da cutícula. A fase de vida parasitária se inicia com a fixação da larva no hospedeiro, ocorrendo em seguida a alimentação, a troca da cutícula, o desenvolvimento para os estágios de ninfa e adulto, o acasalamento, o ingurgitamento e a queda da fêmea ao solo para a postura. Este período dura, em média, de 18 a 26 dias. O macho permanece por mais tempo no hospedeiro e copula com outras fêmeas (FURLONG, 1993).

O carrapato *R. microplus* causa grande impacto econômico devido, principalmente, a sua interferência na pecuária. Grisi et al. (2014) estimaram que só no Brasil este prejuízo é de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares por ano. Estas perdas ocorrem devido à desvalorização do couro, à espoliação sanguínea, ao atraso no desenvolvimento dos animais, à queda na produção, ao aumento do custo da mão de obra, aos gastos com materiais utilizados para o controle desta parasitose e pela transmissão de patógenos causadores de doenças como a babesiose (HORN; ARTECHE, 1985). Segundo Furlong (1993), no momento da espoliação sanguínea, a fêmea de *R. microplus* causa intenso desconforto ao bovino, impedindo, assim, que este paste adequadamente, o que gera uma diminuição na conversão alimentar em carne ou leite.

Atualmente, o controle de carrapatos é feito basicamente através do uso de carrapaticidas que, em sua maioria, são organofosforados, amidinas, piretróides, avermectinas, reguladores do crescimento ou inibidores de muda. Estes produtos químicos são utilizados na maioria das vezes de forma equivocada: produto e dose inadequados, equipamento não apropriado à quantidade de animais banhados, contenção do animal incorreta, e sem respeitar a forma apropriada de se banhar o animal e a quantidade ideal de produto por animal. A utilização inadequada destes produtos tem gerado um aumento progressivo dos casos de resistência de carrapatos e, conseqüentemente, um aumento na frequência da aplicação de acaricidas, com a presença de resíduos desses produtos no leite e na carne (MENDES et al., 2007). Além disso, a utilização indiscriminada de produtos

químicos contribui para a poluição ambiental e para o desequilíbrio ecológico devido à redução de predadores naturais (NORVAL et al., 1992).

A necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos de controle de carrapatos é crescente, já que a utilização exclusiva de carrapaticidas está a cada dia menos viável em termos práticos e econômicos (BARROS; EVANS, 1989). Outros métodos de controle de carrapatos são propostos, como: 1) o uso de animais geneticamente resistentes, 2) o desenvolvimento de vacinas, 3) o gerenciamento de pastagem com alternância de espécies, 4) o controle biológico, 5) a rotação de pastagem e 6) a introdução de machos estéreis na população (PENNA, 1990; LEAL et al., 2003). Dentre estas alternativas, o controle microbiano vem se destacando, e os fungos artropodopatogênicos mostrando-se agentes promissores no controle microbiano (BITTENCOURT et al., 1992).

## 2.2 Controle Microbiano Utilizando Fungos Artropodopatogênicos

Na tentativa de diminuir a utilização de produtos químicos e os danos por eles causados, novas alternativas para controle de carrapatos vem sendo estudadas. O controle microbiano representa um ramo do controle biológico, que, por sua vez, trata da utilização racional de patógenos, visando a manutenção da população de pragas a níveis não significativos economicamente.

Em 1726, Réaumur fez a primeira classificação de um artropodopatógeno ao identificar um fungo do gênero *Cordyceps* atacando um lepdóptero. No Brasil, um dos primeiros relatos de um fungo atacando um artrópode foi feito por Pestana em 1923, quando referiu-se a *Penicillium anisopliae* como um agente promissor no controle de *Tomaspis* spp. Posteriormente, foram feitos novos relatos a patógenos em artrópodes, que contribuíram para o desenvolvimento do controle microbiano no Brasil. Dentre estas referências podem ser citadas: Bittencourt em 1934, que relatou a ocorrência de alguns fungos artropodopatogênicos sobre pragas de citros, Pereira em 1937, quando referiu-se ao nematóide *Rhabditis hambletoni* como semiparasito para a broca-do-algodoeiro, e a epizootia de *Metarhizium anisopliae* s.l. sobre *Mahanarva posticata* (a cigarrinha da cana-de-açúcar) em 1964, que chamou a atenção dos pesquisadores (ALVES, 1998).

O controle microbiano possui uma série de vantagens que favorecem a utilização de patógenos no controle de artrópodes, tais como: especificidade e seletividade do patógeno em relação ao artrópode-alvo; alta patogenicidade apresentada por alguns agentes de controle; capacidade de multiplicação e dispersão do mesmo no ambiente; facilidade de produção do agente patogênico em condições laboratoriais; associação do patógeno a inseticidas químicos; facilidade de aplicação; segurança em relação à poluição ambiental e à saúde de seres humanos e animais; efeitos secundários, ou seja, além de causar a mortalidade do artrópode, o patógeno tem ação sobre as gerações subsequentes, entre outras (ALVES, 1998).

Os fungos são importantes inimigos naturais de artrópodes. A capacidade destes microorganismos em agir sobre todos os estágios evolutivos do hospedeiro, bem como sua virulência relativamente específica os tornam agentes promissores no controle microbiano (SAMISH et al., 2004). Além disso, a grande variabilidade genética destes patógenos é uma de suas principais vantagens no controle microbiano (ALVES, 1998).

O mecanismo de penetração dos fungos artropodopatogênicos é uma característica que favorece a sua utilização como agentes no controle microbiano, já que estes são capazes de penetrar através da cutícula do artrópode e não necessitam ser ingeridos (MADELIN et al., 1967). Segundo Zimmermann (2007a), esta infecção pode ser dividida nas seguintes etapas: 1) fixação dos conídios na cutícula, 2) germinação, 3) penetração através da cutícula, 4) superação da defesa imunológica do hospedeiro, 5) proliferação no interior do hospedeiro, 6) crescimento sobre o hospedeiro morto e 7) produção de conídios. O modo de infecção destes

patógenos é alvo de muita pesquisa, visando principalmente caracterizar fatores de virulência que possam melhorar este processo de infecção (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Bittencourt et al. (1995) constataram que a principal forma de penetração de *M. anisopliae* s.l. em *R. microplus* é pelo tegumento, visto que não evidenciaram a infecção dos carrapatos pelas cavidades naturais através de técnicas histológicas. Esta constatação foi comprovada por Bittencourt et al. (1999), ao descreverem pela primeira vez o mecanismo de infecção do fungo *M. anisopliae* s.l. em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, através da microscopia eletrônica de varredura. Neste trabalho estes pesquisadores observaram a fixação dos conídios na cutícula das fêmeas, a germinação do conídio, a formação do tubo germinativo a partir de conídios germinados e o início da dilatação da extremidade deste tubo, formando uma estrutura denominada apressório.

Mais de 700 espécies de fungos artropodopatogênicos têm sido relatadas, porém apenas dez destas espécies foram ou estão sendo utilizadas no controle microbiano de artrópodes (SAMISH et al., 2004). Vários destes patógenos são naturalmente associados a carrapatos e alguns demonstram alta virulência em condições de laboratório (BITTENCOURT et al., 1994; REIS et al., 2001; FERNANDES et al., 2004, FERNANDES et al., 2006; ANGELO et al., 2010). De todos os gêneros e espécies de fungos testados, *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* foram os mais virulentos. Portanto, estes são os fungos artropodopatogênicos mais investigados quanto ao seu potencial para o controle de espécies de carrapatos do mundo inteiro (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

O fungo *B. bassiana* foi estudado pela primeira vez com detalhes em 1835 por Agostino Bassi, quando comprovou que este patógeno era o agente da muscardine branca, uma patologia que acomete o bicho-da-seda (*Bombyx mori*). Esta espécie fúngica é cosmopolita, sendo a mais freqüente sobre insetos e amostras do solo. Em condições laboratoriais, pode colonizar a maioria dos insetos (ALVES, 1998). A espécie *B. bassiana* é caracterizada por sua coloração branca, posteriormente amarelada ou ocasionalmente avermelhada, o reverso é incolor ou amarelo-rosado. Os conídios são hialinos, com morfologia variando de globosa a elipsoidal (ZIMMERMANN, 2007a).

O primeiro relato de *B. bassiana* em carrapatos foi feito por Samsinakova (1957), onde uma fêmea de *Ixodes ricinus* coletada na natureza estava naturalmente infectada. Atualmente muitos pesquisadores avaliam a eficácia desta espécie fúngica em diversas espécies de carrapatos.

Bittencourt et al. (1997) avaliaram a eficácia *in vitro* de dois isolados de *B. bassiana* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, onde evidenciaram um baixo percentual de eclosão das larvas nos grupos tratados com os isolados fúngicos, havendo um decréscimo progressivo neste parâmetro conforme aumentava a concentração das suspensões fúngicas e, conseqüentemente, o percentual de controle foi mais elevado nos grupos tratados com as maiores concentrações. Fernandes et al. (2006) confirmaram o potencial patogênico de *B. bassiana* para *R. microplus*, pois todos os 50 isolados testados apresentaram efeito letal sobre as larvas não alimentadas do carrapato.

Prette et al. (2005) ao avaliarem a patogenicidade de três isolados de *B. bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus*, observaram redução no percentual de eclosão de larvas oriundas de ovos tratados, e no percentual de ecdise de larvas e de ninfas. Reis et al. (2001) verificaram a mortalidade *in vitro* de ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* infectados por *B. bassiana*, onde os grupos tratados aumentaram consideravelmente a mortalidade proporcionalmente ao aumento da concentração de conídios nas suspensões, sugerindo o controle de *A. cajennense* por este fungo.

O gênero *Metarhizium* parasita uma grande variedade de espécies de artrópodes, sendo frequentemente isolado do solo e encontrado nos trópicos e regiões temperadas (ALVES,

1998). Geralmente são esverdeados quando esporulam sobre os cadáveres de seus hospedeiros ou em meio de cultura (BISCHOFF et al., 2009).

A espécie *M. anisopliae* foi originalmente descrita por Metschnikoff em 1879 como *Entomophthora anisopliae*, sendo posteriormente transferida para o gênero *Metarhizium* por Sorokin (1883) (ZIMMERMANN, 2007b). Recentemente, Bischoff et al. (2009) através de estudos filogenéticos, morfológicos e moleculares, concluíram que a espécie *M. anisopliae* é na verdade um complexo formado por sete espécies: *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. majus*, *M. lepidiotae* e *M. guizhouense*. Os isolados de *M. anisopliae* que ainda não foram re-classificados de acordo com Bischoff et al. (2009) devem ser considerados pertencentes a um complexo de espécies e identificados da seguinte forma: *M. anisopliae* sensu lato.

Atualmente, *M. anisopliae* é um dos fungos artropodopatogênicos mais utilizados como agente no biocontrole de insetos-praga (ZIMMERMANN, 2007b). Sua patogenicidade é amplamente testada para diversas espécies de carrapatos, como *R. microplus*, *R. sanguineus*, *R. appendiculatus*, *Dermacentor nittens*, *Ixodes scapularis*, *A. cajennense*, *A. variegatum*, *A. maculatum*, *A. americanum*, entre outros (BITTENCOURT et al., 1994; KAAYA et al., 1996; SOUZA et al., 1999; BENJAMIN et al., 2002; MONTEIRO et al., 2003; HORNBOSTEL et al., 2004; KIRKLAND et al., 2004; LOPES et al., 2007; LEEMON; JONSSON, 2008).

Embora a virulência dos fungos artropodopatogênicos já tenha sido comprovada em condições de laboratório, sua eficácia diminui consideravelmente quando são testados a campo. O desempenho dos fungos é afetado por uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, radiação solar, chuvas e ventos, além do microclima no habitat em que o patógeno vive (INGLIS et al., 2001).

## 2.3 Efeitos de Fatores Ambientais sobre Fungos Artropodopatogênicos

A propagação e sobrevivência de qualquer microorganismo no meio ambiente é fortemente afetada por vários fatores bióticos e abióticos. Os mais importantes condicionantes ambientais abióticos para os fungos são a temperatura, a umidade relativa e a radiação solar (ZIMMERMANN, 2007a). Segundo Alves (1998) o efeito dos fatores ambientais é mais evidente durante as fases de disseminação, germinação e penetração dos patógenos do que durante a fase de colonização, quando o patógeno está em desenvolvimento, no interior do inseto.

Dentre os microrganismos utilizados no controle biológico, os fungos artropodopatogênicos são os mais susceptíveis às condições climáticas adversas, já que o método de infecção ocorre via cutícula, necessitando da germinação na superfície externa do inseto hospedeiro, ficando assim mais expostos aos fatores ambientais, diferente dos patógenos que utilizam as aberturas naturais do artrópode para a infecção (ROBERTS; YENDOL, 1971).

### 2.3.1 Temperatura

A temperatura pode afetar o fungo de diferentes maneiras, já que influencia na germinação, no crescimento e na viabilidade do microorganismo sobre o hospedeiro e no ambiente. Este fator climático é de grande importância para fungos artropodopatogênicos, pois afeta seu metabolismo de forma geral, alterando os processos de produção de toxinas e enzimas, a germinação de conídios, o desenvolvimento do tubo germinativo, a penetração, colonização e reprodução (ALVES, 1998).

Altas temperaturas podem inativar o fungo antes do contato com o inseto hospedeiro, assim como pode reduzir ou acelerar o crescimento dentro do inseto, dependendo dos

requisitos de temperatura do patógeno e do inseto hospedeiro. Já as baixas temperaturas podem reduzir ou impedir a germinação e crescimento de um fungo e, desta forma, prejudicar uma infecção bem sucedida (ZIMMERMANN, 2007a).

A maioria dos fungos artropodopatogênicos é mesófila, com crescimento entre 10 °C e 40 °C e temperatura ótima entre 25 °C e 35 °C (COONEY; EMERSON, 1964; ROBERTS; CAMPBELL, 1977). A faixa de temperatura na qual o fungo *M. anisopliae* geralmente cresce é entre 15 °C e 35 °C, e a temperatura ótima para a germinação e crescimento é entre 25 °C e 30 °C (ROBERTS; CAMPBELL, 1977; ALVES et al., 1984). A temperatura máxima encontrada para o crescimento micelial de *M. anisopliae* s.l. varia entre 37 °C e 40°C (WALSTAD et al., 1970; FARGUES et al., 1992), entretanto, a temperatura de germinação e crescimento varia consideravelmente entre os isolados desta espécie fúngica. Yip et al. (1992) observaram que alguns isolados de *M. anisopliae* s.l. que crescem a 5 °C não crescem em temperaturas elevadas (37 °C), já os isolados que crescem a 37 °C não crescem em baixas temperaturas (5 °C); outros isolados desta espécie fúngica não crescem nem a 5 °C nem a 37 °C, mas crescem a 25 °C.

Para *B. bassiana*, a temperatura mínima para seu crescimento é de 5 °C e a máxima varia entre 30 °C e 38 °C. A temperatura ideal para a germinação e crescimento deste fungo varia entre 23 °C e 28 °C, dependendo do isolado (ROBERTS; CAMPBELL, 1977). Em condições ambientais (temperatura entre 15 °C e 38 °C), os conídios não formulados de *B. bassiana* podem perder a viabilidade em 60 dias, enquanto que os conídios já formulados podem atingir até 8 meses de viabilidade (ALVES et al., 1996).

Os fungos podem sofrer a ação de elevadas temperaturas por um curto período, enquanto os animais estão sob luz solar direta, ou por um longo período, como de 1 a 3 semanas, tempo durante o qual os artrópodes se alimentam em partes quentes do corpo do hospedeiro (MENT et al., 2010). Por isso, para o desenvolvimento de mico-acaricidas para o controle de ectoparasitas de vertebrados de sangue quente, se faz necessária a seleção de isolados de fungos que sejam eficazes em temperaturas relativamente elevadas (MENT et al., 2011). Outros motivos que destacam a importância da seleção de isolados fúngicos capazes de se desenvolverem em temperaturas mais elevadas são: a atuação sobre artrópodes em áreas tropicais e subtropicais, a manutenção da estabilidade dos conídios ou do produto formulado, e a infecção do artrópode e crescimento do patógeno na temperatura de superfície do corpo do mamífero (ZIMMERMANN, 2007b). Segundo Ment et al. (2011) isolados de fungos que cresceram melhor em 34 °C *in vitro* também foram mais patogênicos para *R. microplus in vivo* entre 31 °C e 35 °C.

Diversos trabalhos têm sido realizados visando selecionar isolados resistentes a diferentes temperaturas, avaliando a termotolerância dos mesmos. Fernandes et al. (2010) avaliaram a tolerância ao calor ( $45 \pm 0,2$  °C) e a atividade ao frio (5 °C) de diversas espécies e isolados do fungo *Metarhizium*, e após 8 horas de exposição a elevadas temperaturas observaram que todos os isolados até então classificados como *M. anisopliae* variedade *anisopliae* (Ma-an) e os isolados de *Metarhizium* do complexo *flavoviride* (Mf) apresentaram germinação conidial relativa (GR) igual a zero, enquanto os isolados de *M. acridum* demonstraram alta tolerância a temperaturas elevadas (70–100% GR); em relação a atividade ao frio, após quinze dias de exposição a baixa temperatura, as GRs para os isolados de Ma-an e *M. acridum* foram igual a zero, já os dois isolados de Mf testados apresentaram alta atividade ao frio.

O efeito da temperatura de superfície do corpo de animais de sangue quente na germinação, crescimento e virulência de quatro isolados de *M. anisopliae* s.l. foi avaliado sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) annulatus*. Os isolados de *M. anisopliae* s.l. avaliados foram divididos em dois grupos de acordo com suas características térmicas: um grupo composto por isolados que germinaram (90–100%), cresceram e infectaram os carrapatos a 25

°C, 30 °C e 35 °C, e o outro grupo composto por isolados que recuperaram sua habilidade de germinar relativamente rápido após incubação a temperatura favorável, depois de tê-la perdido durante choque térmico (37 ou 40 °C por 6-48 horas). Estes resultados demonstram a interferência da temperatura de superfície do corpo dos animais na eficiência de infecção dos isolados fúngicos e a importância em selecionar isolados que sejam mais termotolerantes (MENT et al., 2011).

Rangel et al., (2005) observaram uma grande variabilidade na termotolerância de 16 isolados do fungo *M. anisopliae* s.l. e de um isolado de *M. acridum*, após serem expostos as temperaturas 40 °C e 45 °C por 2, 4, 8 e 12 horas. Em geral, isolados provenientes de latitudes mais elevadas foram mais termotolerantes quando comparados a isolados provenientes de localidades mais próximas a Linha do Equador.

Fernandes et al. (2008) também observaram grande variabilidade na termotolerância e atividade ao frio de 59 isolados de *Beauveria* spp. e um isolado de *Engyodontium albus* (= *Beauveria alba*) e na atividade ao frio de oito isolados de *Metarhizium* spp.. Estes isolados fúngicos eram provenientes de diferentes regiões geográficas, diferentes artrópodes hospedeiros ou substratos. Em baixa temperatura (5 °C) a maioria dos isolados de *B. bassiana* germinaram bem, diferente dos isolados de *M. anisopliae* s.l., dos quais somente um apresentou atividade a frio; os isolados ARSEF 252 e GHA de *B. bassiana* se mostraram mais resistentes, apresentando alta termotolerância e atividade a frio, já o isolado de *E. albus* (UFPE 3138) foi o mais susceptível às situações de estresse. Isolados de *B. bassiana* oriundos de latitudes mais elevadas foram mais ativos ao frio quando comparados a isolados de regiões próximas a linha do Equador, porém não houve correlação semelhante para tolerância ao calor.

### 2.3.2 Umidade

A umidade é de extrema importância não só para a sobrevivência do artrópode como também para o patógeno, atuando nas fases de disseminação, germinação e penetração, sendo também um fator limitante para a reprodução de algumas espécies (ALVES, 1998).

A germinação dos conídios sobre a cutícula do carrapato e a esporulação após a morte do artrópode exigem alta umidade, porém alta ou baixa umidade associada a elevadas temperaturas pode causar a inviabilidade dos conídios (ZIMMERMANN, 2007a). O intervalo de umidade relativa para a germinação dos conídios dos isolados de *B. bassiana* é, geralmente de 92% a 100%, entretanto têm sido relatado fungos infectando insetos sob umidade relativamente baixa, como 60%-70% (ZIMMERMANN, 2007a). Geralmente, isolados do fungo *M. anisopliae* s.l. necessitam de alta umidade relativa para germinar, sendo que o melhor percentual de germinação dos conídios deste fungo foi observado a 100% de umidade relativa (WALSTAD et al., 1970).

Para Alves et al. (2002) a temperatura e umidade são os principais fatores que influenciam na longevidade dos conídios, sendo variável de acordo com a temperatura, o fotoperíodo, a formulação utilizada, o tipo de propágulo, a espécie e o isolado fúngico.

O impacto da umidade na germinação *in vitro* de 11 isolados de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* oriundos de substratos coletados no peridomicílio rural do Brasil Central foi testado, e os autores concluíram que a umidade influencia diretamente no início e no progresso da germinação dos conídios dos isolados testados, já que quando estes foram submetidos a atividade de água ideal ( $> 0,99 a_w$ ) começaram a germinação entre quatro e oito horas de incubação, e quando foram submetidos a uma atividade de água inferior a  $0,93 a_w$  houve um atraso no início da germinação da maioria dos isolados fúngicos investigados (LAZZARINI, et al., 2006).

Bateman et al. (1993) observaram uma infecção bem sucedida do fungo *M. acridum* (*M. flavoviride*) formulado em óleo sobre gafanhotos do deserto, com umidade relativa baixa (20%-30%). Hedgecock et al. (1995), ao avaliarem a influência do teor de umidade sobre a termotolerância e armazenamento de *M. acridum* em formulação oleosa, observaram que a viabilidade diminui sob alta temperatura e umidade relativa elevada.

A influência da temperatura e umidade relativa na formação de clamidósporos do fungo *M. anisopliae* em ovos de carrapato foi estudada pela primeira vez por Ment et al. (2010). Este estudo demonstrou que sob alta umidade (cerca de 100%) e temperatura moderada (25 °C) o fungo emergiu dos ovos e formou conidióforos e conídios, porém ao elevar a temperatura (30 °C) ou reduzir a umidade (55–75%) induziu-se a formação de clamidósporos dentro dos ovos, sem conidiogênese; quando os ovos com clamidósporos maduros foram devolvidos às condições adequadas (25 °C e 100% UR), a conidiogênese foi recuperada.

Segundo Lanza et al. (2009), a temperatura, a umidade e o tipo de solo podem afetar, não só agindo isoladamente, mas também combinados, a persistência do conídio, a mortalidade do hospedeiro e a esporulação do fungo sobre o cadáver do inseto. O efeito da temperatura e do teor de umidade do solo na sobrevivência do fungo *M. anisopliae* em três diferentes tipos de solo foi investigado, quando observou-se alta influência destes fatores na sobrevivência do fungo; os valores mais elevados de crescimento e sobrevivência do isolado fúngico foram observados nas temperaturas de 21,5 °C e 26,8 °C, enquanto que, no solo incubado a 31,5°C, o fungo cresceu pouco, e a população declinou rapidamente; houve rápido crescimento do isolado fúngico em 65% de umidade, porém foi observado um declínio na população no 112º dia; nos teores de 35% e 100% de umidade o crescimento foi menor, porém o fungo sobreviveu por mais tempo no solo (LANZA et al., 2009).

### 2.3.3 Radiação

Para Alves (1998), a radiação pode estimular, não influenciar ou prejudicar o desenvolvimento de patógenos no campo, dependendo do tipo de microorganismo, da fase de desenvolvimento e da natureza e quantidade de radiação à qual ele é exposto. Alguns fatores devem ser considerados ao avaliar a influência da radiação solar sobre os fungos, como a faixa de luz visível e diferentes comprimentos de onda que a compõem, o fotoperíodo e a faixa germicida do ultravioleta, que representa o principal agente de inibição dos patógenos (ALVES, 1998).

A radiação solar, principalmente as frações UV-A (330 - 400 nm) e UV-B (290 - 330 nm) é um dos fatores ambientais que mais afeta a viabilidade e persistência dos fungos a campo. Geralmente, poucas horas de exposição direta ao sol de meio dia no verão em regiões de clima tropical ou temperado são suficientes para inativar totalmente os conídios de praticamente todos os fungos já estudados, além de atrasar a germinação dos conídios (revisado por FERNANDES et al., 2007).

Alta variabilidade da tolerância a UV-B de 60 isolados de *Beauveria* spp. oriundos de diferentes localidades foi encontrada, tendo variado de 0% a 80%, aproximadamente. Além disso, foi observado um atraso na germinação dos conídios de isolados que resistiram à radiação. Entre os isolados de *B. bassiana* provenientes de 0º a 22º de latitudes, os oriundos de localidade com menor latitude foram estatisticamente mais tolerantes a radiação UV-B do que os isolados oriundos de latitudes mais elevadas (FERNANDES et al., 2007).

A tolerância de conídios à radiação solar é um fator importante para a utilização dos fungos como agentes no controle de insetos. Pesquisadores avaliaram a tolerância à UV-B de 20 isolados de *B. bassiana* oriundos de insetos de diversas localidades, e após exposição dos conídios a um gradiente de radiação UV-B observaram perdas de 50%, 75% e 95% na

viabilidade dos mesmos, e concluíram que, devido a grande variabilidade na tolerância a radiação, se faz necessário selecionar isolados tolerantes a UV-B para a utilização destes como agentes no controle microbiano de artrópodes (HUANG; FENG, 2009).

## 2.4 Formulação de Fungos Artropodopatogênicos

Devido à interferência negativa de fatores bióticos e abióticos sobre a virulência de fungos utilizados no controle microbiano de artrópodes, a formulação adquire grande importância. Segundo Alves (1998), formular um patógeno consiste em acrescentar a ele substâncias que irão melhorar seu desempenho no campo, facilitar seu manuseio e aplicação e, principalmente, permitir o armazenamento sob condições nas quais se minimize os custos, com perda mínima da qualidade do produto.

Os componentes presentes nas formulações devem contribuir para a manutenção da viabilidade, virulência e eficácia do microorganismo, levando em consideração as condições de armazenamento do composto. Os adjuvantes são ingredientes que podem ou não estar presentes em uma formulação, e quando presentes atuam otimizando a atividade do microorganismo e melhorando as características do produto formulado, tendo função fotoprotetora e antievaporante. Além do patógeno e do adjuvante, os ingredientes inertes, também chamados de veículos diluentes, absorventes e atrativos são componentes importantes de uma formulação. Estes veículos apresentam grande influência no armazenamento e conservação do patógeno formulado, podendo causar a inativação do microorganismo quando não selecionados adequadamente (ALVES, 1998).

Polar et al. (2005) avaliaram o efeito de suspensão aquosa, formulações a base de óleo de coco e de parafina líquida e óleos adjuvantes emulsionáveis a base de óleo de coco e de parafina líquida sobre a germinação de conídios do fungo *M. anisopliae* s.l.. Estes autores observaram que a maioria dos veículos testados não influenciaram negativamente na germinação dos conídios, já que esta variou de 86,0% a 95,4% 24 horas após o tratamento, com exceção do óleo adjuvante emulsionável de coco, que gerou um percentual de germinação de 10,9% 24 horas após o tratamento, sugerindo que este óleo atrasa o crescimento e desenvolvimento deste isolado fúngico.

Um diluente de micoinseticidas tem sido amplamente utilizado na China para diluir formulações oleosas (formando uma emulsão de água em óleo) de *M. anisopliae* s.l. (PENG E XIA, 2011). Este diluente desenvolvido por Xia et al. (2002), se mantém estável em até 12 meses de armazenamento e mistura-se facilmente com formulações oleosas, além de potencializar a virulência do isolado fúngico em condições de baixa umidade, possivelmente devido ao fornecimento de água necessária para a germinação do conídio. Peng e Xia (2011) confirmaram esta teoria ao investigarem o mecanismo de ação deste diluente através da avaliação da virulência, velocidade de invasão e viabilidade de conídios de *M. anisopliae* s.l. formulados em óleo e diluídos com este produto. Estes pesquisadores concluíram, através de bioensaios e técnicas moleculares, que o diluente potencializa a virulência do isolado fúngico formulado em óleo em condições de baixa umidade relativa, sem interferir na termotolerância e tolerância a UV-B dos mesmos.

A escolha do tipo de formulação é de extrema importância para o sucesso do biocontrole, e depende da tecnologia de aplicação, do patógeno e do artrópode envolvido. Existem diferentes tipos de formulações, dentre estes podem ser citados: pó-molhável, pó de contato, grânulos, grânulos solúveis em água, iscas, suspensão concentrada, suspensão emulsionável, suspensão de ultra-baixo volume, (FARIA; WRAIGHT, 2007) entre outros.

Diversos trabalhos têm avaliado o efeito de diferentes tipos de formulações na eficiência de fungos artropodopatogênicos. Souza et al. (2009) avaliaram a ação do fungo *B. bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens*

em teste de campo, e observaram que os grupos tratados com o fungo associado ao gel polimerizado obtiveram um percentual de controle superior a 50%, enquanto os grupos tratados com a suspensão aquosa obtiveram percentuais de controle inferiores a 20%, desta forma, sugeriram que a utilização do composto gel associado a *B. bassiana* potencializa a virulência do patógeno.

Alves et al. (2001), quantificaram e compararam o espalhamento e a eficiência de formulações do fungo *M. anisopliae* s.l. em óleo adjuvante emulsionável a uma suspensão aquosa com 0,05% de Tween 80, a uma formulação de óleo de amendoim e a uma formulação formada pela mistura de dois óleos minerais (50% Shellson T e 50% Ondina EL), e observaram que as formulações oleosas apresentaram um melhor espalhamento em relação as suspensões a base de água. Observaram também que as formulações de óleo adjuvante emulsionável aumentaram a infectividade do fungo em larvas de *Tenebrio molitor* e foram mais eficientes que o fungo em base aquosa e tão eficientes quanto às oleosas.

Os óleos minerais e vegetais têm sido amplamente testados como adjuvantes em formulações. Estes visam promover maior adesão dos conídios à superfície dos artrópodes e propiciar uma maior proteção à radiação ultravioleta (SOUZA, 2003). Outras vantagens da utilização de formulações de micoinseticidas em base oleosa são: menor dose letal requerida, menor efeito evaporativo sobre o produto aplicado, propriedades quitinofílicas incrementando a adesão e infectividade, e maior período de armazenamento do produto formulado quando comparado às suspensões aquosas (PRIOR et al., 1988).

Diversos pesquisadores avaliaram a eficiência de formulações a base de diferentes óleos no controle microbiano. Leite et al. (1993) ao compararem o efeito do óleo de soja e do óleo mineral na proteção do fungo *B. bassiana* contra a radiação ultravioleta, observaram que o óleo mineral foi mais eficiente.

Camargo et al. (2012) formularam os fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* em diferentes concentrações de óleo mineral e compararam o efeito das formulações oleosas com a suspensão aquosa destes fungos sobre ovos, larvas e adultos do carrapato dos bovinos, em laboratório. Estes pesquisadores concluíram que as formulações oleosas dos fungos avaliados foram mais eficientes do que as suspensões aquosas contra todos os estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

Angelo et al. (2010) avaliaram a eficiência do fungo *Lecanicillium lecanii* sobre fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas do carrapato *R. microplus* utilizando uma formulação a base de óleo mineral e suspensões aquosas do fungo. Estes pesquisadores obtiveram melhores resultados com a utilização da formulação oleosa, pois, em geral, as fêmeas tratadas com esta formulação morreram antes de iniciarem a postura, o que gerou um percentual de controle de 97,6%; os ovos tratados com a formulação oleosa ficaram inviáveis e as larvas tratadas com esta formulação apresentaram 100% de mortalidade. As suspensões aquosas também causaram alterações nos parâmetros analisados, porém significativamente menores às causadas pela formulação oleosa.

Polar et al. (2005) compararam o efeito de *M. anisopliae* s.l. em suspensão aquosa e formulação de óleo de coco, formulação de parafina líquida, óleo adjuvante emulsionável de coco e óleo adjuvante emulsionável de parafina líquida em fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Houve uma redução significativa no tempo médio de sobrevivência das fêmeas tratadas com as formulações fúngicas a base de óleo de coco ou óleo adjuvante emulsionável de parafina líquida quando comparado a suspensão aquosa. Não houve diferença significativa entre o tempo médio de sobrevivência das fêmeas tratadas com a formulação a base de parafina líquida e a suspensão aquosa, já a formulação a base de óleo adjuvante emulsionável aumentou o tempo médio de vida das fêmeas.

O uso de óleos minerais ou vegetais em formulações de fungos artropodopatogênicos representa uma vertente crescente entre os atuais produtos formulados. Isto se dá,

principalmente, pelo aumento na eficácia do controle de alguns artrópodes, já que o óleo mantém a viabilidade dos fungos sob condições de baixa umidade relativa do ar, assim como permite a aplicação de produtos em Ultrabaixo volume (UBV) (SOUZA, 2003). Para Prior et al. (1988) a tecnologia UVB se revelou eficaz, provavelmente devido a uma maior adesão de conídios na superfície hidrofóbica do artrópode.

Segundo Faria e Wraight (2007), um grande número de micoinseticidas e micoacaricidas foi desenvolvido no mundo nas últimas décadas. Foram registrados cerca de 171 produtos comerciais a base de fungos, principalmente das espécies *M. anisopliae* (33.9%), *B. bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (5.8%) e *B. brongniartii*. Vinte e oito produtos foram desenvolvidos para o controle de ácaros, entretanto, somente três destes foram desenvolvidos especificamente para o controle de carrapatos. Dentre eles, encontra-se o Tick-EX EC, produto comercializado nos Estados Unidos pela empresa Novozymes Biologicals; o segundo produto, chamado de Metazam, é comercializado em Honduras, El Salvador, Guatemala, Jamaica e Nicaragua e produzido pela Escuela Agrícola Panamericana em Honduras; e o terceiro foi desenvolvido no Brasil pela empresa Itafort Bioprodutos (atualmente Koppert Biological Systems), sendo chamado de Metarril SC 1037 (FARIA; WRAIGHT, 2007), entretanto, este último não é mais comercializado.

A elaboração de formulações que viabilizem a utilização dos patógenos em condições ambientais é muito importante. Alguns trabalhos foram realizados visando avaliar a eficiência dos fungos artropodopatogênicos no controle de carrapatos em testes *in vivo*. Leemon et al. (2008) avaliaram a patogenicidade de uma emulsão do fungo *M. anisopliae* em óleo de canola a 10% contra o carrapato *R. microplus* em testes de estábulo. Estes autores observaram pouco efeito da formulação fúngica na sobrevivência dos carrapatos sobre os bovinos, entretanto houve 100% de mortalidade das fêmeas coletadas dos bovinos nos três dias após o tratamento e uma redução significativa na produção de ovos.

A ação de uma suspensão do isolado 986 de *B. bassiana* foi avaliada no desenvolvimento da fase parasitária do carrapato *A. nitens* em teste de estábulo. Monteiro et al. (2003) acompanharam o desenvolvimento de larvas não alimentadas até a fase adulta colocadas nas orelhas de bovinos que haviam sido previamente banhadas com a suspensão fúngica. Estes pesquisadores não observaram alterações significativas nos parâmetros biológicos das fêmeas de *D. nitens*, entretanto, houve redução no número de fêmeas recuperadas dos bovinos tratados com a suspensão fúngica em relação ao grupo controle, tendo sido recuperadas 35, 70 e 117 fêmeas, do grupo tratado com a suspensão fúngica, do grupo tratado somente com água e Tween 80 e do grupo que não recebeu tratamento algum, respectivamente (MONTEIRO et al., 2003).

O efeito de uma suspensão do fungo *M. anisopliae* foi avaliado para o controle do carrapato *R. microplus*, em teste de estábulo (BAHIENSE et al., 2007). O índice médio de mortalidade observado em 28 dias de experimento foi de 33% no grupo tratado com a suspensão fúngica, além de ter sido observada redução significativa nos índices nutricional e de produção de ovos nos primeiros dias após o tratamento (BAHIENSE et al., 2007). Estes mesmos pesquisadores avaliaram a virulência do fungo *M. anisopliae* e sua associação com Deltametrina, em teste de estábulo, para o controle de uma cepa do carrapato *R. microplus* resistente a piretróides. Os bovinos foram banhados com uma suspensão conidial do fungo, ou com uma solução de Deltametrina ou com ambos. A taxa de mortalidade média encontrada pelos pesquisadores foi de 32,57% no grupo tratado com *M. anisopliae*, 38,58% no grupo tratado com Deltametrina e de 30,92% no grupo tratado com a associação do fungo e do produto químico (BAHIENSE et al., 2008).

Kaaya e Hassan (2000) avaliaram a ação dos fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* em suspensão aquosa e formulação a base de óleo de amendoim, sobre todos os estágios de desenvolvimento de *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum*, em condições

de campo. Estes autores observaram 100% de mortalidade em larvas, de 80% a 100% em ninfas e de 80% a 90% em adultos de ambas as espécies de carrapato tratadas com a formulação oleosa dos dois isolados fúngicos citados acima. A suspensão aquosa também provocou mortalidade, porém significativamente menor quando comparada à formulação oleosa.

Uma formulação de *M. anisopliae* a base de óleo de girassol foi avaliada, em teste a campo, em bovinos naturalmente infestados com os carrapatos *Rhipicephalus evertsi evertsi* e *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*. Os animais foram banhados com a formulação uma vez a cada três semanas durante um ano, tendo sido observada uma redução de 83% da população de carrapatos nos bovinos banhados com a formulação fúngica após três meses do início do experimento (KAAYA et al., 2011). Alonso-Díaz et al. (2007) avaliaram uma suspensão da mesma espécie fúngica contra o carrapato dos bovinos também em teste a campo. Os bovinos foram banhados com a suspensão de *M. anisopliae* a cada 15 dias durante dois meses, ou seja, foram realizados quatro tratamentos. Foi observada redução do número de carrapatos no grupo tratado com a suspensão fúngica a partir do segundo tratamento, gerando eficácia entre 40 e 91,2% da suspensão de *M. anisopliae* no controle do carrapato *R. microplus* a campo (ALONSO-DÍAZ et al., 2007).

A formulação em que os conídios são aplicados é de fundamental importância para o biocontrole de carrapatos, pois atua na manutenção da viabilidade, virulência e eficácia dos fungos a nível de campo, promovendo maior adesão dos conídios à superfície dos artrópodes e propiciando proteção contra as condições ambientais desfavoráveis. Diversas informações sobre formulações de fungos utilizados para o controle de carrapatos podem ser obtidas a partir de trabalhos com patógenos utilizados no controle de pragas da agricultura, porém, ainda são necessários muitos estudos para o desenvolvimento de formulações eficazes para o controle de carrapatos a campo (SAMISH et al., 2004).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Eficácia de Metarril em Diferentes Umidades Relativas do Ar

#### 3.1.1 Localização do experimento

Os testes desenvolvidos para avaliar a eficácia da suspensão aquosa e formulação oleosa do produto Metarril, em diferentes umidades relativas, sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus* foram desenvolvidos no Laboratório de Controle Microbiano (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EEPPWON), Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), situada em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

#### 3.1.2 Obtenção do carrapato *Rhipicephalus microplus*

As fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* utilizadas no experimento foram oriundas de infestação artificial de bezerros mantidos em baias localizadas na EEPPWON. Vinte e um dias após a infestação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e em seguida levadas ao Laboratório de Controle Microbiano para a assepsia da cutícula, sendo imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos e, posteriormente, secas com papel toalha. Uma parte destas fêmeas foi mantida em placas de Petri e acondicionada em câmara climatizada com temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  para a manutenção da colônia do carrapato, enquanto a outra parte foi pesada individualmente, dividida em grupos homogêneos quanto ao peso e submetida aos tratamentos com as suspensões e formulações fúngicas.

#### 3.1.3 Preparo das suspensões e formulações fúngicas

O produto utilizado neste teste, o Metarril, é um pó composto por conídios do isolado ESALQ E9 de *Metarhizium anisopliae*. Este produto é produzido e foi cedido pela empresa Koppert Biological Systems.

Foi preparada uma suspensão aquosa sem a presença dos conídios fúngicos, sendo composta somente de água destilada estéril e 1% de tween 80, utilizada no tratamento do grupo Controle aquoso. Para o tratamento do grupo Controle oleoso foi preparada uma formulação contendo água destilada estéril, 1% de tween 80 e 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As formulações utilizadas para o tratamento dos grupos Metarril aquoso e Metarril oleoso foram preparadas de forma semelhante aos respectivos controles, porém com a adição do produto Metarril. As suspensões e formulações foram quantificadas em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer, segundo Alves (1998), tendo as concentrações ajustadas à  $10^8$  conídios/mL.

A viabilidade dos conídios foi verificada através da inoculação de uma alíquota de 20  $\mu$ L da suspensão e formulação em meio de cultura Batata Dextrose Agar e incubação a 25°C por 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta pelo microscópio óptico e o cálculo da germinação dos mesmos foi realizado segundo Alves (1998).

### **3.1.4 Preparo dos dessecadores e ajuste das umidades relativas**

As umidades relativas utilizadas no presente experimento foram 30, 50, 70 e 90%. Para a obtenção e manutenção destas umidades, foram utilizados dessecadores de vidro, que continham no seu interior placas de Petri com uma solução saturada de hidróxido de potássio. Inicialmente, foram colocados 87,5, 62,5, 37 e 10g de hidróxido de potássio em 100 mL de água para a obtenção das umidades relativas de 30, 50, 70 e 90%, respectivamente (adaptado de Peterson, 1964). Os dessecadores contendo as placas de Petri com as soluções saturadas de hidróxido de potássio foram colocados dentro de BODs, com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, uma semana antes do tratamento das fêmeas com as suspensões ou formulações. No decorrer da semana, a umidade relativa no interior de cada dessecador foi avaliada diariamente com o auxílio de termohigrômetros mantidos dentro dos dessecadores. As umidades dos dessecadores foram ajustadas, quando necessário, com a adição de hidróxido de potássio ou água, até a obtenção das quatro umidades relativas utilizadas nos bioensaios.

### **3.1.5 Tratamento das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus***

Para cada uma das quatro umidades relativas utilizadas foram formados quatro grupos: Controle aquoso, Controle oleoso, Metarril aquoso e Metarril oleoso, totalizando dezesseis grupos.

As fêmeas ingurgitadas foram pesadas individualmente e divididas em doze classes homogêneas de peso, variando entre 0,200 e 0,280 g. Foi escolhida, aleatoriamente, uma fêmea de cada classe para a formação dos grupos, descartando as duas classes das extremidades. Em seguida, cada fêmea foi pesada, identificada e submersa por três minutos em um mL da suspensão ou formulação de seu respectivo tratamento. Após o tratamento, as fêmeas foram fixadas em placas de Petri com o auxílio de esparadrapo, em decúbito dorsal, e mantidas dentro dos dessecadores com a respectiva umidade relativa e temperatura de  $25 \pm 1$  °C (Figura 1). Cada grupo possuía dez fêmeas ingurgitadas. O experimento foi repetido duas vezes. A postura de cada fêmea foi coletada, armazenada individualmente em frascos de vidro identificados, e mantida dentro dos dessecadores para posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas.



**Figura 1.** Placas de Petri com fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* após tratamento com a suspensão ou formulação de Metarril, no interior dos dessecadores, mantidos dentro das BODs.

Para avaliar a eficácia da suspensão aquosa e formulação oleosa do produto Metarril em diferentes umidades relativas foram investigados alguns parâmetros biológicos, tais como:

**Peso inicial da fêmea**, que é o valor obtido pela pesagem individual de cada fêmea ingurgitada antes do tratamento.

**Peso da massa de ovos**, referente ao peso da postura total de cada fêmea tratada.

**Percentual de eclosão das larvas**, obtido através de observação visual e estimativa da quantidade de larvas eclodidas em relação ao total de ovos;

**Índice de produção de ovos** (BENNETT, 1974), calculado através da seguinte equação:

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

**Índice nutricional** (BENNETT, 1974), obtido através da seguinte equação:

$$IN = \frac{\text{peso da massa de ovos}}{\text{peso inicial da fêmea} - \text{peso residual da fêmea}} \times 100$$

**Percentual de controle** (DRUMMOND, 1971), calculado através da seguinte equação:

$$PC = \frac{\text{média ER (controle)} - \text{média ER (tratado)}}{\text{média ER (controle)}} \times 100$$

Onde: Eficiência Reprodutiva (DRUMMOND, 1971), é determinada através da seguinte equação:

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

### 3.1.6 Análise estatística

Para análise dos dados paramétricos, foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK), e para a avaliação dos dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruskal Wallis seguido do SNK. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) (SAMPAIO, 2002).

## 3.2 Teste de Estábulo

### 3.2.1 Localização e período de realização do experimento

O teste de estábulo foi realizado entre maio e julho de 2012, na Embrapa Gado de Leite, Campo Experimental Santa Mônica, Valença, Rio de Janeiro, situada a 22°21' de Latitude Sul e 43°42' de Longitude Oeste de Greenwich. Esta região apresenta clima tropical de altitude, com temperatura anual média de 21,3 °C, pluviosidade anual média de 1411 mm e altitude de 446 m. O acompanhamento e análise dos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* foram realizados entre junho e setembro de 2012, no LCM da UFRRJ.

### 3.2.2 Animais

Foram utilizados 18 bovinos mestiços das raças Holandesa e Gir, com idade entre 11 e 20 meses (idade média de 16,1 meses) e peso entre 149 e 230 Kg (peso médio de 188,2 Kg), todos do sexo feminino (Tabela 1). Estes animais foram mantidos em baias individuais, cobertas e com estrado de madeira no chão para impedir que os animais pisassem nos carrapatos. Os bezerros foram alimentados duas vezes ao dia com capim e ração comercial, e água à vontade. O projeto no qual está incluído o teste de estábulo referente ao presente trabalho foi submetido à Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFRRJ, tendo o seguinte número de protocolo 23083.011620/2011-68.

**Tabela 1.** Características dos animais utilizados no teste de estábulo.

<b>Brinco</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Raça</b>	<b>Grau de sangue</b>
714	202	20	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
715	207	20	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
718	202	19	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
721	230	19	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
735	174	19	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
738	177	18	Fêmea	Mestiça	$\frac{7}{8}$
751	217	18	Fêmea	Mestiça	$\frac{1}{2}$
779	213	17	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
786	194	17	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1604	159	16	Fêmea	Mestiça	Desconhecido
1605	195	16	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1611	200	16	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1624	174	14	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1628	149	14	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1633	167	13	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1650	173	11	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1652	175	11	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$
1657	179	11	Fêmea	Mestiça	$\frac{3}{4}$

### 3.2.3 Formulação fúngica

O produto testado, Metarril SP Organic é composto pelos isolados ESALQ 1037 e ESALQ E9 de *Metarhizium anisopliae* e era produzido pela empresa Koppert Biological Systems (Figura 2). Foi preparada uma formulação contendo apenas água, 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 1% de tween 80 para o tratamento do grupo controle oleoso. A formulação fúngica foi preparada com a utilização do Metarril SP Organic, água, 10% de óleo mineral e 1% de tween 80 (Figura 3.I, 2.II e 3.III). A formulação possuía  $1 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . A viabilidade dos conídios foi verificada através da inoculação de uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da formulação em meio de cultura Batata Dextrose Agar e incubação a 25°C por 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta pelo microscópio óptico e o cálculo da germinação dos mesmos foi realizado segundo Alves (1998).



**Figura 2.** Produto Metarril SP Organic utilizado nos testes de estábulo e a campo.

### 3.2.4 Delineamento experimental

Toda a metodologia utilizada no teste de estábulo, desde a infestação dos animais com as larvas do carrapato, o número de animais utilizados e a divisão dos mesmos entre os grupos, o tratamento dos bovinos com as formulações e a avaliação da eficácia do tratamento foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil para a produção, controle e emprego de antiparasitários de uso veterinário (Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997 do MAPA) (BRASIL, 2012).

Cada bezerro foi infestado com aproximadamente 3000 larvas, com idade entre 7 e 21 dias, do carrapato *Rhipicephalus microplus* nos dias -24, -21, -19, -17, -15, -11, -9, -7, -5, -3, -1. As larvas foram aplicadas por todo o corpo dos animais, que foram contidos com corda, tendo a cabeça e a cauda amarradas por no mínimo uma hora a fim de impedir a remoção das larvas. Esta metodologia de infestação permitiu que todos os estágios de desenvolvimento do

carrapato estivessem presentes nos bovinos no dia do tratamento. O tratamento dos animais foi realizado no dia zero.

Os grupos foram formados de acordo com o grau de infestação dos animais, determinado pela contagem do total de carrapatos desprendidos do corpo de cada bezerro nos três dias anteriores ao tratamento (-3, -2 e -1). Então, os três animais com a maior contagem média de carrapatos foram alocados aleatoriamente, um em cada grupo, e assim sucessivamente, até completar os três grupos com seis animais cada. Desta forma, os grupos começaram o teste com um número médio de carrapatos muito semelhante.

Os três grupos formados para a realização do teste de estábulo foram: o grupo controle, que não recebeu tratamento algum (Controle), o grupo tratado com a formulação oleosa de Metarril SP Organic e o grupo tratado somente com água, óleo mineral e Tween 80 (Controle oleoso). As formulações foram pulverizadas, com o auxílio de bomba costal, por todo o corpo dos animais, de baixo para cima e na direção oposta dos pêlos, dando maior atenção às áreas mais afetadas pelos carrapatos, como a parte interna das coxas, barbela, orelhas e períneo (Figura 3.IV). Cada animal foi pulverizado com 3 L de formulação, quantidade suficiente para banhar toda a superfície corporal de um animal com as características mencionadas acima (médias de 16 meses de idade e 188kg) (Figura 3.V). Os animais foram examinados antes e durante o experimento para avaliação da condição física e monitoramento de possíveis reações adversas ao tratamento.

Foram coletados do piso das baias todos os carrapatos desprendidos do corpo dos bovinos a partir do dia -3 até o dia +23 após o tratamento (Figura 3.VI). O número de carrapatos desprendidos por grupo foi registrado diariamente, e uma amostra de vinte fêmeas ingurgitadas por grupo por dia foi selecionada aleatoriamente para avaliação dos parâmetros biológicos. As fêmeas foram higienizadas com água, secas com papel toalha, pesadas individualmente, fixadas em placas de Petri com o auxílio de esparadrapo, em decúbito dorsal, e mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  para avaliação dos parâmetros biológicos (Figura 3.VII). A massa de ovos de cada fêmea foi pesada e armazenada individualmente em frascos de vidro identificados, nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa citadas acima para posterior avaliação da eclosão das larvas.



**Figura 3.** Etapas para realização do teste de estábulo. I e II: mistura dos componentes para a elaboração da formulação de Metarril SP Organic; III: formulação pronta. IV: pulverização dos animais com a formulação, utilizando bomba costal. V: bovino após o tratamento com a formulação. VI: coleta dos carrapatos do piso das baias. VII: acondicionamento em placa de Petri das 20 fêmeas ingurgitadas separadas para a avaliação dos parâmetros biológicos.

Os parâmetros biológicos avaliados foram os mesmos avaliados no teste com variação de umidade relativa, citados no item 3.1.5 Tratamento das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

O cálculo da eficácia da formulação de Metarril SP Organic foi feito utilizando a seguinte fórmula (HENDERSON; TILTON, 1955):

$$\text{Eficácia} = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a}\right) \times 100$$

onde:

$T_a$  = número médio de carrapatos recuperados dos animais tratados, após o dia do tratamento;  
 $T_b$  = número médio de carrapatos recuperados dos animais tratados nos 3 dias anteriores ao tratamento;

$C_a$  = número médio de carrapatos recuperados dos animais controle, após o dia do tratamento;  
 $C_b$  = número médio de carrapatos recuperados dos animais controle nos 3 dias anteriores ao tratamento.

### 3.2.5 Análise estatística

Os dados paramétricos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste Kruskal Wallis seguido do SNK. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) (SAMPAIO, 2002).

## 3.3 Teste a Campo

### 3.3.1 Localização e período de realização do experimento

O teste a campo foi desenvolvido nos meses de abril e maio de 2014, na Área Experimental de Campo da EPPWON (antigo Curral de Apreensão) na UFRRJ, no campus de Seropédica, Rio de Janeiro, situada a 22° 44' de latitude sul, 43° 42' de longitude oeste de Greenwich. Esta região apresenta clima tropical, altitude de 33 metros, temperatura anual média de 23,5°C e pluviosidade anual média de 1483 mm. A avaliação dos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* coletadas dos animais durante o teste foi realizada de maio a julho de 2014, no LCM da UFRRJ.

### 3.3.2 Animais

Foram utilizados 30 bovinos da raça Angus, variedade Red Angus, com idade aproximada entre 1 e 4 anos (idade média de 1,87 anos) e peso entre 155 e 461 Kg (peso médio de 313,1 Kg) (Tabela 2). Os grupos foram mantidos em três piquetes separados, com área de aproximadamente 2 hectares por piquete, com capim e água a vontade. O projeto no qual está incluído o teste a campo referente ao presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFRRJ, tendo o seguinte número de protocolo 017/2014 (ANEXO A).

**Tabela 2.** Características dos animais utilizados no teste a campo.

<b>Brinco</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Raça</b>
46	155	1	Fêmea	Angus
182	218	1	Fêmea	Angus
183	180	1	Fêmea	Angus
184	155	1	Macho	Angus
185	313	1	Macho	Angus
187	238	1	Fêmea	Angus
188	162	1	Macho	Angus
189	241	1	Fêmea	Angus
300	448	4	Macho	Angus
316	245	2,5	Fêmea	Angus
327	380	2	Macho	Angus
328	344	2	Macho	Angus
331	266	2	Macho	Angus
349	227	2	Fêmea	Angus
451	281	2	Fêmea	Angus
466	387	2	Macho	Angus
467	320	2	Macho	Angus
468	361	2	Macho	Angus
469	271	2	Fêmea	Angus
470	420	2	Macho	Angus
472	461	2,5	Fêmea	Angus
475	333	2	Macho	Angus
476	375	2	Macho	Angus
491	387	2,5	Macho	Angus
493	350	2,5	Macho	Angus
496	407	2,5	Macho	Angus
497	401	2,5	Macho	Angus
498	400	2,5	Macho	Angus
499	401	2,5	Macho	Angus
500	266	2	Macho	Angus

### 3.3.3 Formulação fúngica

O produto testado foi o Metarril SP Organic, o mesmo utilizado no teste de estábulo (Figura 2).

Foi elaborada uma formulação contendo somente água, 1% de Tween 80 e 10% de óleo mineral, além da formulação de Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral e 1% de Tween 80, como descrito detalhadamente no item “3.2.3 Formulação fúngica” da metodologia do teste de estábulo. A formulação oleosa de Metarril SP Organic possuía  $1 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . A viabilidade dos conídios foi verificada como descrito acima na metodologia do teste de estábulo.

### 3.3.4 Delineamento experimental

Toda a metodologia utilizada no teste a campo, desde o número de animais por grupo e a divisão dos mesmos entre os grupos, até a avaliação da eficácia do tratamento, foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção, controle e emprego de antiparasitários de uso veterinário (Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997 do MAPA) (BRASIL, 2012) e a metodologia descrita por Holdsworth et al. (2006).

Os animais utilizados no teste a campo estavam naturalmente infestados com o carrapato *R. microplus*. Foram feitas contagens semanais de carrapatos entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento até terem no mínimo 20 carrapatos em um dos lados de cada animal no dia -1.

Os 30 bovinos foram distribuídos entre os grupos de acordo com o grau de infestação, determinado pela contagem de carrapatos entre 4,5 e 8,0 mm presentes em um dos lados do corpo de cada animal nos três dias anteriores ao tratamento (-3, -2 e -1). Então, os três animais com a maior contagem média de carrapatos foram alocados aleatoriamente, um em cada grupo, e assim sucessivamente, até completar os três grupos com dez animais cada. Desta forma, os grupos começaram o teste com um número médio de carrapatos muito semelhante.

O teste a campo foi composto pelos mesmos três grupos do teste de estábulo: o grupo controle que não recebeu tratamento algum (Controle), o grupo tratado com a formulação oleosa de Metarril SP Organic (Metarril) e o grupo tratado somente com água, óleo mineral e Tween 80 (Controle oleoso). Cada grupo continha 10 animais. Foram realizados dois tratamentos dos bovinos com as formulações, sendo o primeiro tratamento no dia zero e o segundo no dia +3. A pulverização dos animais no teste a campo foi semelhante à metodologia utilizada para o tratamento dos animais no teste de estábulo, entretanto, cada animal foi pulverizado com 4L da formulação, quantidade que foi suficiente para banhar toda a superfície corporal dos animais com as características físicas listadas acima (médias de 1,87 anos de idade e 313 Kg) (Figura 4.I e 4.II). Os bovinos foram examinados para a verificação de reações adversas ao tratamento.

Foram contadas todas as fêmeas entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento presentes no lado esquerdo de cada animal nos dias +7, +14 e +21 após cada tratamento, totalizando seis contagens. Uma amostra de dez fêmeas ingurgitadas por grupo por dia de contagem foi selecionada aleatoriamente para avaliação dos parâmetros biológicos. As fêmeas foram levadas ao laboratório, pesadas individualmente, fixadas em placas de Petri e incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ . A massa de ovos das fêmeas foi pesada e incubada nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa citadas acima para posterior avaliação da eclosão das larvas.



**Figura 4.** Teste a campo. I: pulverização dos animais com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, utilizando bomba costal. II: bovino após o tratamento com a formulação.

Os parâmetros biológicos avaliados foram os mesmos avaliados nos testes com variação de umidade e de estábulo. A fórmula utilizada para calcular a eficácia da formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo contra o carrapato *R. microplus* em teste a campo foi a mesma descrita na metodologia do teste de estábulo (item “3.2.4 Delineamento experimental”).

### 3.3.5 Análise estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) para a análise dos dados paramétricos, e para a avaliação dos dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruskal Wallis seguido do SNK. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) (SAMPAIO, 2002).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Eficácia de Metarril em Diferentes Umidades Relativas do Ar

Os conídios de Metarril suspensos em água e Tween 80 apresentaram 100% de germinação em até 24 horas de incubação em BDA a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ , já os conídios de Metarril formulados em água, Tween 80 e óleo mineral apresentaram 100% de germinação em até 72 horas.

Não houve diferença significativa no peso das fêmeas entre os grupos em nenhuma das umidades relativas avaliadas (Tabela 3), logo todas as alterações nos parâmetros biológicos foram causadas pelo tratamento fúngico.

Somente a formulação oleosa de Metarril foi capaz de reduzir significativamente os parâmetros biológicos das fêmeas do carrapato quando submetidas as mais baixas umidades relativas (30 e 50%). A suspensão fúngica aquosa não causou alteração significativa em nenhum dos parâmetros biológicos avaliados nestas mesmas umidades, como demonstrado na Tabela 3.

Quando as fêmeas ingurgitadas foram mantidas em umidade relativa de 70% foi observado que a suspensão aquosa de Metarril reduziu significativamente os parâmetros biológicos quando comparada ao grupo controle aquoso; no entanto, não causou redução quando comparada aos grupos controle oleoso e Metarril oleoso. Já a formulação oleosa de Metarril reduziu significativamente todos os parâmetros biológicos quando comparada aos demais grupos, inclusive ao grupo tratado com a suspensão fúngica aquosa (Tabela 3).

Em relação à umidade relativa de 90%, tanto a suspensão aquosa quanto a formulação oleosa de Metarril foram capazes de reduzir significativamente todos os parâmetros biológicos das fêmeas quando comparadas aos grupos controle, havendo diferença estatística entre a suspensão aquosa e formulação oleosa de Metarril no peso da massa de ovos e percentual de eclosão das larvas, onde a formulação oleosa de Metarril foi mais eficiente (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média e desvio padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com suspensão aquosa ou formulação oleosa de Metarril, mantidas em 25 °C e submetidas a diferentes umidades relativas do ar (30, 50, 70 ou 90%).

UR	Grupos	Peso das Fêmeas (mg)	Peso da Massa de Ovos (mg)	Eclosão das Larvas (%)	IPO (%)	IN (%)
UR 30%	CTR Aquoso	312,6 a ± 0,03	114,5 a ± 0,02	16,10 a ± 18,73	36,68 a ± 4,07	47,89 a ± 4,78
	CTR Oleoso	311,9 a ± 0,02	103,7 a ± 0,04	17,60 a ± 17,57	33,05 a ± 10,65	42,89 a ± 11,99
	MTR Aquoso	311,3 a ± 0,02	89,6 a ± 0,05	15,10 a ± 19,06	28,26 a ± 14,23	36,32 a ± 17,12
	MTR Oleoso	311,8 a ± 0,02	32,6 b ± 0,04	2,60 b ± 5,36	10,24 b ± 12,80	13,93 b ± 16,46
UR 50%	CTR Aquoso	312,6 a ± 0,02	140,6 a ± 0,03	93,60 a ± 10,24	44,92 a ± 7,25	56,91 a ± 6,85
	CTR Oleoso	310,9 a ± 0,03	136,6 a ± 0,03	87,10 a ± 25,31	43,76 a ± 9,20	54,10 a ± 9,72
	MTR Aquoso	314,0 a ± 0,02	123,2 a ± 0,03	96,20 a ± 6,09	39,04 a ± 9,79	49,31 a ± 10,14
	MTR Oleoso	310,8 a ± 0,02	24,9 b ± 0,04	24,50 b ± 37,45	7,78 b ± 12,01	11,02 b ± 15,95
UR 70%	CTR Aquoso	312,4 a ± 0,02	170,3 a ± 0,01	100,00 a ± 0,00	54,63 a ± 4,53	65,51 a ± 3,81
	CTR Oleoso	311,2 a ± 0,02	139,9 ab ± 0,06	88,40 b ± 31,20	45,40 ab ± 18,65	56,68 ab ± 22,33
	MTR Aquoso	312,0 a ± 0,02	109,8 b ± 0,04	95,20 b ± 4,05	35,49 b ± 13,00	46,99 b ± 14,00
	MTR Oleoso	313,1 a ± 0,02	21,6 c ± 0,04	25,40 c ± 41,47	6,82 c ± 10,93	10,50 c ± 16,51
UR 90%	CTR Aquoso	312,5 a ± 0,03	163,8 a ± 0,02	93,90 a ± 9,60	52,44 a ± 4,39	69,24 a ± 5,71
	CTR Oleoso	312,7 a ± 0,02	177,1 a ± 0,02	96,30 a ± 6,58	56,48 a ± 3,81	75,76 a ± 5,66
	MTR Aquoso	313,6 a ± 0,02	86,9 b ± 0,05	62,50 b ± 33,52	27,77 b ± 15,41	46,65 b ± 20,79
	MTR Oleoso	311,3 a ± 0,02	31,4 c ± 0,03	7,60 c ± 18,70	10,22 b ± 8,84	25,43 b ± 18,60

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna e na mesma unidade relativa, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

IPO: Índice de Produção de Ovos (BENNETT, 1974); IN: Índice Nutricional (BENNETT, 1974).

O percentual de controle dos grupos Metarril aquoso e Metarril oleoso foi calculado em relação ao grupo controle aquoso. Também foi calculado o percentual de controle do Metarril oleoso em relação ao controle oleoso, eliminando assim o efeito isolado do óleo mineral (Tabela 4).

O percentual de controle obtido pela formulação oleosa de Metarril foi maior do que o percentual de controle da suspensão aquosa do produto em todos os níveis de umidade relativa avaliados. A suspensão aquosa de Metarril apresentou percentuais de controle variando entre 10,28 e 57,69%, sendo que os melhores valores foram obtidos nos dois maiores níveis de umidade relativa avaliados (70 e 90%). Já o percentual de controle da formulação oleosa fúngica variou pouco (entre 87,14 e 96,29% em relação ao grupo controle aquoso), sendo sempre superior a 87%, inclusive quando mantida nos níveis mais baixos de umidade relativa avaliados. O percentual de controle da formulação oleosa de Metarril não apresentou variação elevada quando calculado em relação aos grupos controle aquoso e controle oleoso (Tabela 4).

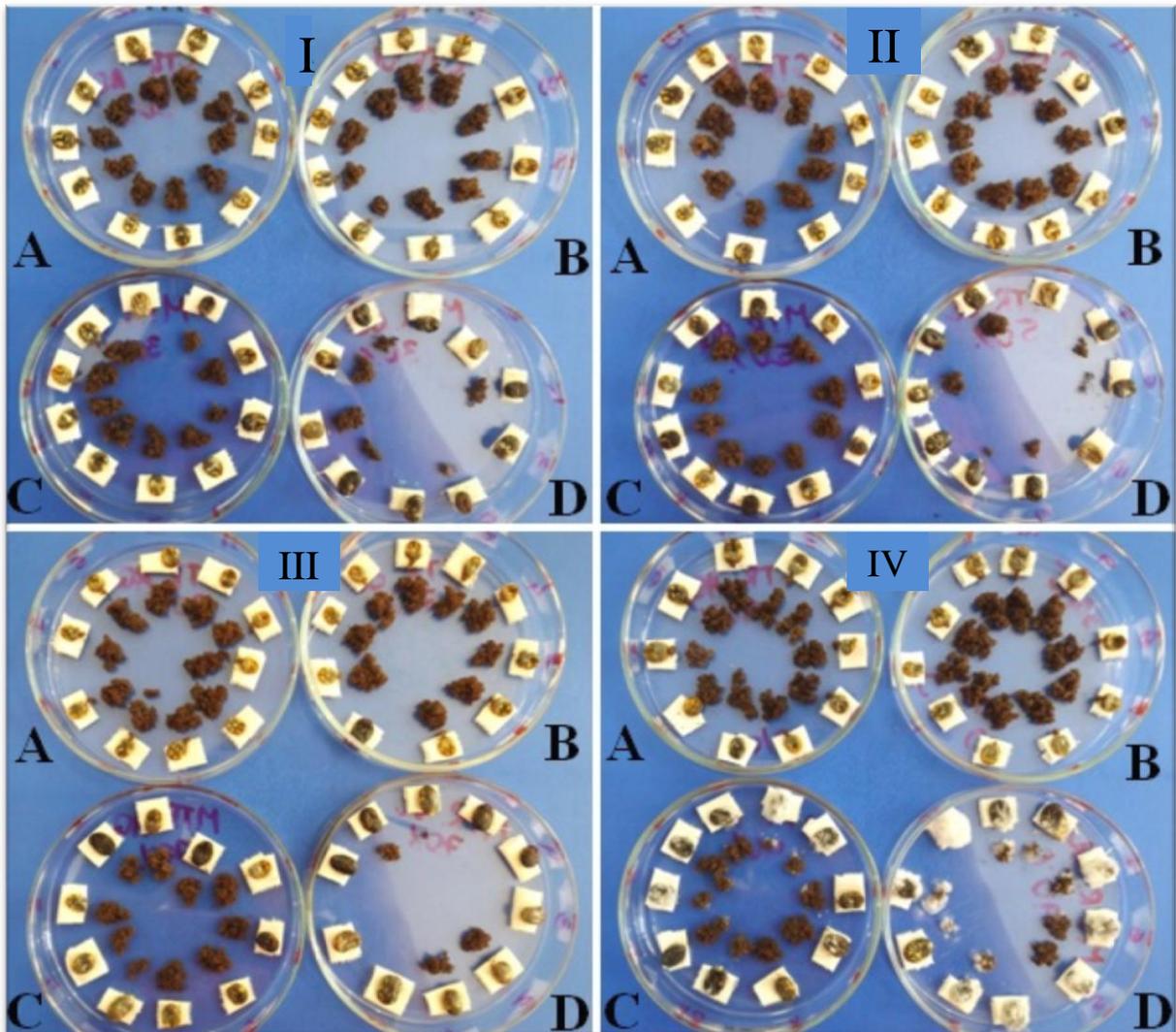
**Tabela 4.** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com suspensão aquosa ou formulação oleosa de Metarril, mantidas em 25 °C e submetidas a diferentes umidades relativas do ar (30, 50, 70 ou 90%).

UR	Grupos	CTR Aquoso <sup>a</sup>	CTR Oleoso <sup>b</sup>
UR 30%	MTR Aquoso	21,76	
	MTR Oleoso	87,72	85,86
UR 50%	MTR Aquoso	10,28	
	MTR Oleoso	87,14	86,40
UR 70%	MTR Aquoso	38,04	
	MTR Oleoso	89,47	87,09
UR 90%	MTR Aquoso	57,69	
	MTR Oleoso	96,29	96,64

<sup>a</sup> Percentual de controle calculado em relação ao grupo controle aquoso.

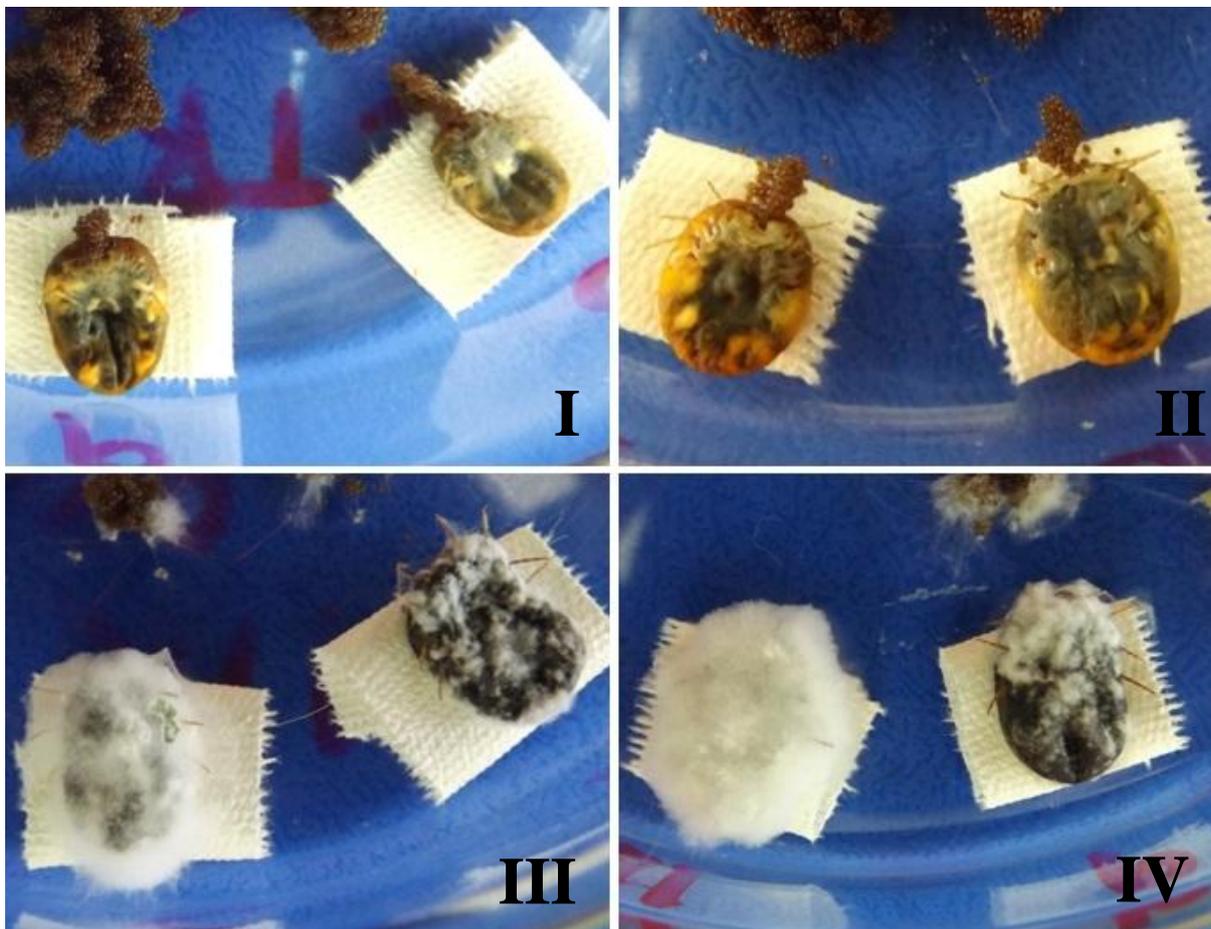
<sup>b</sup> Percentual de controle calculado em relação ao grupo controle oleoso.

A Figura 5 mostra fêmeas de *R. microplus* e suas respectivas posturas nos quatro grupos mantidos nas umidades relativas de 30 (Figura 5 IA, IB, IC e ID), 50 (Figura 5 IIA, IIB, IIC e IID), 70 (Figura 5 IIIA, IIIB, IIIC e IIID) e 90% (Figura 5 IVA, IVB, IVC e IVD) no 10º dia após o tratamento. É possível observar que a postura das fêmeas dos grupos controle aquoso e oleoso não foi alterada quando mantidas nas quatro umidades relativas utilizadas no experimento (Figura 5 IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB). A postura das fêmeas tratadas com a suspensão aquosa de Metarril não foi alterada quando submetidas às umidades relativas de 30 e 50% (Figura 5 IC e IIC), sendo possível perceber macroscopicamente diminuição da massa de ovos quando mantidas em umidade de 90% (Figura 5 IVC). Já as fêmeas tratadas com a formulação oleosa de Metarril tiveram sua postura visivelmente afetada em todas as umidades relativas utilizadas no experimento (Fig. 5 ID, IID, IIID e IV D).



**Figura 5.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* em oviposição no 10º dia após tratamento com Metarril em diferentes umidades relativas do ar. I, II, III e IV: grupos mantidos a 30, 50, 70 e 90% de umidade relativa, respectivamente. A, B, C e D: grupos Controle aquoso, Controle oleoso, Metarril aquoso e Metarril oleoso, respectivamente.

As fêmeas dos grupos tratados com a suspensão aquosa (Figura 6.III) e com a formulação oleosa (Figura 6.IV) de Metarril e mantidas a 90% de umidade relativa apresentavam-se completamente colonizadas pelo fungo no 10º dia após o tratamento. Já as fêmeas dos grupos controle aquoso (Figura 6.I) e controle oleoso (Figura 6.II) mantidas na mesma umidade relativa, permaneceram em oviposição.



**Figura 6.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* mantidas a 90% de umidade relativa e 25°C, 10 dias após o tratamento. I, II, III, IV: grupos Controle aquoso, Controle oleoso, Metarril aquoso e Metarril oleoso, respectivamente.

Todos os resultados apresentados acima demonstraram que, em baixa umidade relativa (30 e 50%), o produto Metarril, quando suspenso somente em água e Tween 80, não foi eficaz contra as fêmeas de *R. microplus*, apresentando efeito somente em umidades mais elevadas (70 e 90%). Contudo, quando o Metarril foi formulado em óleo mineral, mostrou-se eficiente mesmo nas umidades relativas baixas utilizadas no experimento, o que sugere que o óleo mineral é capaz de proteger os conídios fúngicos de baixas umidades relativas do ar e garantir a eficácia de Metarril contra fêmeas de *R. microplus*.

#### 4.2 Teste de Estábulo

Os conídios da formulação de Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral apresentaram 100% de germinação em até 72 horas de incubação em BDA a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ .

Os animais permaneceram saudáveis durante todo o experimento, não sendo observada qualquer alteração física, comportamental ou fisiológica que pudesse ser atribuída como reação adversa aos tratamentos.

A formulação de Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral, quando comparada ao grupo controle, apresentou eficácia de até 50,19, 53,50 e 67,39% na primeira, segunda e terceira semana após o tratamento, respectivamente (Tabela 5). Quando comparada ao grupo controle oleoso, a formulação oleosa de Metarril SP Organic apresentou eficácia de até 42,56, 52,00 e 61,38% na primeira, segunda e terceira semana após o tratamento, respectivamente (Tabela 5).

A eficácia média da formulação fúngica durante todo o período avaliado foi de 47,74% em relação ao grupo controle e de 40,89% em relação ao grupo controle oleoso (Tabela 5).

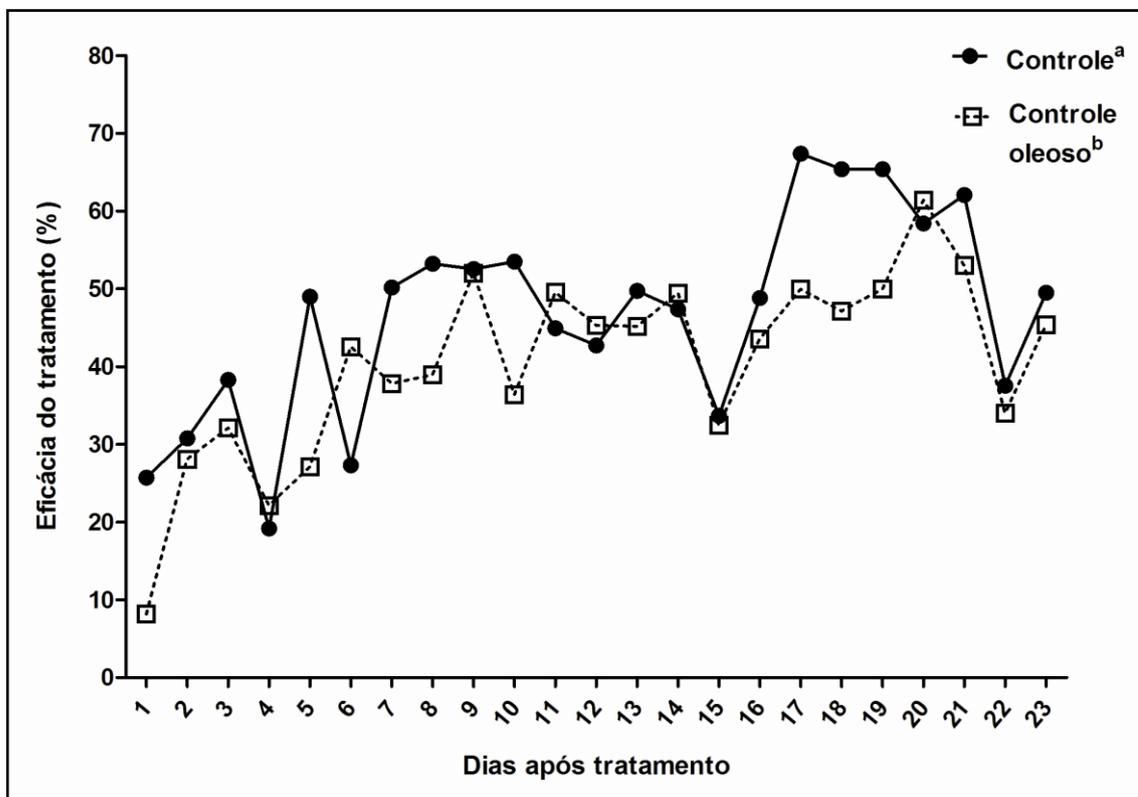
**Tabela 5.** Eficácias (%) diária e média da formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* em teste de estábulo.

	Eficácia diária				Eficácia média		
	Controle <sup>a</sup>	Controle oleoso <sup>b</sup>	Controle <sup>a</sup>	Controle oleoso <sup>b</sup>	Controle <sup>a</sup>	Controle oleoso <sup>b</sup>	
<b>Dia 1</b>	25,75	8,23	<b>Dia 13</b>	50,28	45,17		
<b>Dia 2</b>	30,81	28,13	<b>Dia 14</b>	47,41	49,46	47,74	40,89
<b>Dia 3</b>	38,33	32,14	<b>Dia 15</b>	33,73	32,51		
<b>Dia 4</b>	19,25	22,19	<b>Dia 16</b>	48,86	43,63		
<b>Dia 5</b>	49,02	27,15	<b>Dia 17</b>	67,41	49,96		
<b>Dia 6</b>	27,35	42,59	<b>Dia 18</b>	65,42	47,17		
<b>Dia 7</b>	50,22	37,87	<b>Dia 19</b>	65,41	50,00		
<b>Dia 8</b>	53,23	38,96	<b>Dia 20</b>	58,44	61,40		
<b>Dia 9</b>	52,57	52,02	<b>Dia 21</b>	62,08	53,02		
<b>Dia 10</b>	53,53	36,43	<b>Dia 22</b>	37,57	34,04		
<b>Dia 11</b>	44,96	49,58	<b>Dia 23</b>	49,52	45,40		
<b>Dia 12</b>	42,76	45,35					

<sup>a</sup> Eficácia da formulação oleosa de Metarril SP Organic calculada em relação ao grupo controle.

<sup>b</sup> Eficácia da formulação oleosa de Metarril SP Organic calculada em relação ao grupo controle oleoso.

A eficácia do produto testado aumentou ao longo dos dias de coleta de carrapatos, apresentando um pico na última semana após o tratamento (Figura 7).

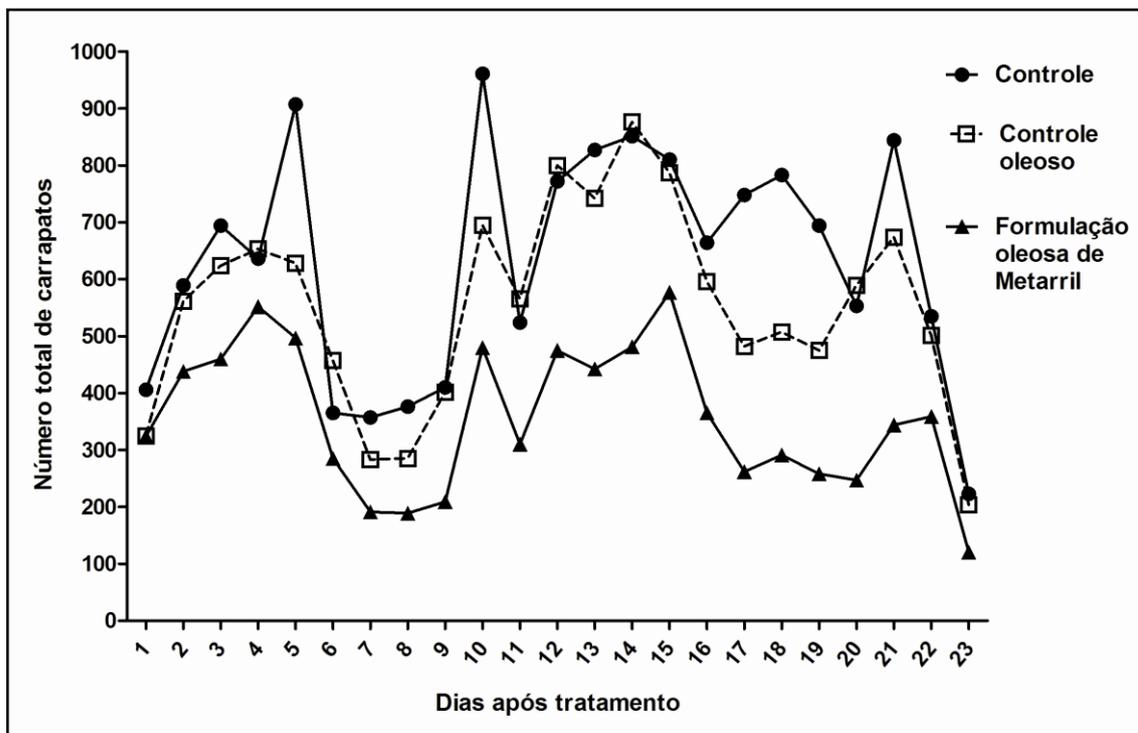


**Figura 7.** Eficácia diária (%) da formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral no controle de *Rhipicephalus microplus*, em teste de estábulo.

<sup>a</sup> Eficácia da formulação oleosa de Metarril<sup>®</sup> SP Organic calculada em relação ao grupo controle.

<sup>b</sup> Eficácia da formulação oleosa de Metarril<sup>®</sup> SP Organic calculada em relação ao grupo controle oleoso.

Os animais banhados com a formulação oleosa de Metarril SP Organic apresentaram redução de até 2,85 vezes no número de carrapatos quando comparados aos animais dos grupos controles (Figura 8). O grupo tratado com a formulação oleosa de Metarril SP Organic apresentou, em todos os dias de avaliação, contagem de carrapatos inferior, além de seguir a mesma tendência dos grupos controles. O número total de carrapatos coletados do piso das baias em cada dia após o tratamento está representado na Figura 8.



**Figura 8.** Número diário de carrapatos *Rhipicephalus microplus* obtido após tratamento dos animais com formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.

As principais alterações nos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram observadas nos dias +1, +2 e +3 (os três primeiros dias após o tratamento), com redução significativa no peso da massa de ovos, percentual de eclosão e nos índices nutricional e de produção de ovos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do piso das baias nos três primeiros dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.

	Dia +1			Dia +2			Dia +3		
	Controle	Controle oleoso	Metarril	Controle	Controle oleoso	Metarril	Controle	Controle oleoso	Metarril
<b>Peso das fêmeas (mg)</b>	302,9 a ± 0,03	304,1 a ± 0,04	302,7 a ± 0,05	304,7 a ± 0,05	307,4 a ± 0,06	323,6 a ± 0,03	282,4 a ± 0,04	302,9 a ± 0,04	285,6 a ± 0,04
<b>Massa de ovos (mg)</b>	162,1 a ± 0,06	177,9 a ± 0,03	103,9 b ± 0,08	177,7 a ± 0,06	191,8 a ± 0,04	169,1 a ± 0,06	150,9 a ± 0,03	157,2 a ± 0,05	113,5 b ± 0,05
<b>Eclosão das larvas (%)</b>	97,21 a ± 6,26	92,19 a ± 17,28	90,38 a ± 24,86	98,94 a ± 3,61	99,32 a ± 1,57	90,16 b ± 24,40	98,29 a ± 3,35	97,21 a ± 7,09	93,95 a ± 22,56
<b>IPO (%)</b>	54,12 a ± 19,41	58,60 a ± 5,46	34,70 b ± 25,95	59,66 a ± 11,63	61,74 a ± 4,92	52,41 b ± 19,00	51,28 a ± 12,74	52,09 a ± 16,47	38,54 b ± 16,15
<b>IN (%)</b>	62,42 a ± 18,35	66,57 a ± 6,01	41,16 b ± 29,20	62,81 a ± 17,24	69,89 a ± 4,22	60,24 a ± 20,79	65,75 a ± 20,52	62,85 a ± 15,63	54,87 b ± 44,08

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha e no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

IPO: Índice de Produção de Ovos (BENNETT, 1974); IN: Índice Nutricional (BENNETT, 1974)

As Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11 apresentam os resultados referentes aos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas coletadas do dia +1 ao dia +23 após o tratamento dos animais. Foi observada diferença significativa entre os grupos no peso das fêmeas coletadas nos dias +4, +8 e +10 (Tabela 7), bem como no peso da massa de ovos (Tabela 8). Lembrando que as fêmeas mantidas em laboratório para a avaliação dos parâmetros biológicos foram escolhidas aleatoriamente, não havendo divisão homogênea por peso entre os grupos. Portanto, qualquer alteração nos demais parâmetros avaliados nestes dias (+4, +8 e +10) não pode ser atribuída à formulação oleosa de Metarril SP Organic.

**Tabela 7.** Peso (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.

	Controle	Controle oleoso	Metarril		Controle	Controle oleoso	Metarril
<b>Dia 1</b>	302,9 a ± 0,03	304,1 a ± 0,04	302,7 a ± 0,05	<b>Dia 13</b>	286,9 a ± 0,04	292,8 a ± 0,04	293,2 a ± 0,04
<b>Dia 2</b>	304,7 a ± 0,05	307,4 a ± 0,06	323,6 a ± 0,03 a	<b>Dia 14</b>	295,0 a ± 0,04	292,7 a ± 0,04	281,7 a ± 0,04
<b>Dia 3</b>	309,1 a ± 0,05	300,9 a ± 0,05	306,4 a ± 0,04	<b>Dia 15</b>	295,7 a ± 0,04	292,9 a ± 0,03	298,5 a ± 0,04
<b>Dia 4</b>	306,9 a ± 0,07	294,9 ab ± 0,04	264,8 b ± 0,05	<b>Dia 16</b>	286,0 a ± 0,04	264,6 a ± 0,04	277,5 a ± 0,05
<b>Dia 5</b>	289,8 a ± 0,03	299,8 a ± 0,06	282,8 a ± 0,05	<b>Dia 17</b>	291,6 a ± 0,04	288,8 a ± 0,04	293,1 a ± 0,04
<b>Dia 6</b>	287,6 a ± 0,04	294,4 a ± 0,05	291,1 a ± 0,05	<b>Dia 18</b>	289,0 a ± 0,03	271,6 a ± 0,04	278,4 a ± 0,04
<b>Dia 7</b>	286,1 a ± 0,05	275,3 a ± 0,04	291,7 a ± 0,05	<b>Dia 19</b>	305,4 a ± 0,04	281,6 a ± 0,03	296,9 a ± 0,05
<b>Dia 8</b>	291,6 a ± 0,03	326,1 b ± 0,04	278,8 a ± 0,03	<b>Dia 20</b>	282,5 a ± 0,05	284,9 a ± 0,05	277,7 a ± 0,04
<b>Dia 9</b>	295,1 a ± 0,04	289,3 a ± 0,05	288,1 a ± 0,05	<b>Dia 21</b>	298,0 a ± 0,04	301,2 a ± 0,04	289,9 a ± 0,05
<b>Dia 10</b>	294,6 a ± 0,05	313,5 a ± 0,03	265,4 b ± 0,04	<b>Dia 22</b>	283,8 a ± 0,04	289,4 a ± 0,04	291,1 a ± 0,06
<b>Dia 11</b>	304,9 a ± 0,04	286,0 a ± 0,04	290,9 a ± 0,06	<b>Dia 23</b>	275,3 a ± 0,04	261,3 a ± 0,04	259,8 a ± 0,06
<b>Dia 12</b>	282,4 a ± 0,04	302,9 a ± 0,04	285,6 a ± 0,04				

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha e no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Além dos dias já citados anteriormente, o peso da massa de ovos diminuiu significativamente entre os grupos no dia +5, como demonstrado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Peso da massa de ovos (g) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.

	Controle	Controle oleoso	Metarril		Controle	Controle oleoso	Metarril
<b>Dia 1</b>	162,1 a ±0,06	177,9 a ± 0,03	103,9 b ± 0,08	<b>Dia 13</b>	156,8 a ± 0,02	151,5 a ± 0,02	143,3 a ± 0,05
<b>Dia 2</b>	177,7 a ± 0,06	191,8 a ± 0,04	169,1 a ± 0,06	<b>Dia 14</b>	150,5 a ± 0,03	154,7 a	133,4 a ± 0,04
<b>Dia 3</b>	150,9 a ± 0,03	157,2 a ± 0,05	113,5 b ± 0,05	<b>Dia 15</b>	151,3 a ± 0,03	134,7 a ± 0,04	140,6 a ± 0,05
<b>Dia 4</b>	179,3 a ± 0,03	175,4 a ± 0,03	117,7 b ± 0,06	<b>Dia 16</b>	143,7 a ± 0,04	138,1 a ± 0,02	149,9 a ± 0,03
<b>Dia 5</b>	170,2 a ± 0,03	179,8 a ± 0,03	133,1 b ± 0,08	<b>Dia 17</b>	160,3 a ± 0,02	150,7 a ± 0,04	151,6 a ± 0,05
<b>Dia 6</b>	171,3 a ± 0,02	168,0 a ± 0,04	167,3 a ± 0,04	<b>Dia 18</b>	146,1 a ± 0,03	136,9 a ± 0,02	140,1 a ± 0,04
<b>Dia 7</b>	157,6 a ± 0,04	152,9 a ± 0,04	153,3 a ± 0,03	<b>Dia 19</b>	153,0 a ± 0,04	127,9 b ± 0,03	160,4 a ± 0,03
<b>Dia 8</b>	160,4 a ± 0,02	168,1 a ± 0,06	129,4 b ± 0,05	<b>Dia 20</b>	160,4 a ± 0,03	147,9 a ± 0,03	144,1 a ± 0,03
<b>Dia 9</b>	177,0 a ± 0,02	168,4 a ± 0,03	169,8 a ± 0,03	<b>Dia 21</b>	156,9 a ± 0,03	162,7 a ± 0,03	156,8 a ± 0,04
<b>Dia 10</b>	172,7 a ± 0,04	187,8 a ± 0,02	139,4 b ± 0,03	<b>Dia 22</b>	153,1 a ± 0,03	151,0 a ± 0,04	144,5 a ± 0,05
<b>Dia 11</b>	1643 ± 0,03 a	1468 a ± 0,04	1383 a ± 0,06	<b>Dia 23</b>	148,1 a ± 0,03	133,8 a ± 0,03	118,7 a ± 0,07
<b>Dia 12</b>	196,3 ± 0,05 a	171,6 a ± 0,03	171,4 a ± 0,07				

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha e no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

O percentual de eclosão das larvas foi reduzido significativamente no grupo tratado com a formulação oleosa de Metarril SP Organic somente no dia +2 (Tabela 9).

**Tabela 9.** Eclosão das larvas (%) provenientes de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.

	Controle	Controle oleoso	Metarril		Controle	Controle oleoso	Metarril
<b>Dia 1</b>	97,21 a ± 6,26	92,19 a ± 17,28	90,38 a ± 24,86	<b>Dia 13</b>	98,35 a ± 4,86	97,85 a ± 8,92	90,25 a ± 22,57
<b>Dia 2</b>	98,94 a ± 3,61	99,32 a ± 1,57	90,16 b ± 24,40	<b>Dia 14</b>	98,26 a ± 3,69	97,58 a ± 3,83	94,68 a ± 10,31
<b>Dia 3</b>	98,29 a ± 3,35	97,21 a ± 7,09	93,95 a ± 22,56	<b>Dia 15</b>	97,58 a ± 6,85	98,58 a ± 3,24	89,11 a ± 28,11
<b>Dia 4</b>	98,95 a ± 1,81	97,20 a ± 4,29	85,47 a ± 30,46	<b>Dia 16</b>	98,79 a ± 4,57	98,80 a ± 4,44	98,10 a ± 4,01
<b>Dia 5</b>	96,82 a ± 6,29	97,79 a ± 4,01	89,71 a ± 25,13	<b>Dia 17</b>	99,60 a ± 1,14	99,89 a ± 0,32	95,30 a ± 18,94
<b>Dia 6</b>	99,25 a ± 1,52	97,32 a ± 4,04	96,40 a ± 5,73	<b>Dia 18</b>	98,40 a ± 3,63	97,63 a ± 5,52	94,21 a ± 20,47
<b>Dia 7</b>	97,58 a ± 4,97	97,05 a ± 5,64	88,84 a ± 26,76	<b>Dia 19</b>	97,65 a ± 6,67	94,94 a ± 18,77	99,65 a ± 0,49
<b>Dia 8</b>	99,21 a ± 1,55	95,15 a ± 7,28	98,85 a ± 1,73	<b>Dia 20</b>	99,68 a ± 0,48	94,40 a ± 17,95	92,65 a ± 22,24
<b>Dia 9</b>	99,84 a ± 0,37	96,79 a ± 8,45	98,65 a ± 3,41	<b>Dia 21</b>	93,72 a ± 13,16	95,70 a ± 13,87	99,53 a ± 1,17
<b>Dia 10</b>	98,58 a ± 4,65	97,10 a ± 9,00	95,65 a ± 11,24	<b>Dia 22</b>	98,11 a ± 5,04	98,37 a ± 3,34	92,70 a ± 22,90
<b>Dia 11</b>	97,68 a ± 4,73	88,06 a ± 23,09	92,44 a ± 19,45	<b>Dia 23</b>	99,80 a ± 0,41	95,90 a ± 10,92	93,72 a ± 23,19
<b>Dia 12</b>	98,39 a ± 3,70	97,05 a ± 5,16	96,42 a ± 7,94				

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha e no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Foi observada redução significativa no índice de produção de ovos das fêmeas ingurgitadas oriundas dos animais banhados com a formulação de Metarril SP Organic coletadas nos dias +1, +2, +3, +10, e +20 (Tabela 10).

**Tabela 10.** Índice de produção de ovos (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.

	Controle	Controle oleoso	Metarril		Controle	Controle oleoso	Metarril
<b>Dia 1</b>	54,12 a ± 19,41	58,60 a ± 5,46	34,70 b ± 25,95	<b>Dia 13</b>	54,71 a ± 5,53	51,94 a ± 5,46	48,52 a ± 14,64
<b>Dia 2</b>	59,66 a ± 11,63	61,74 a ± 4,92	52,41 b ± 19,00	<b>Dia 14</b>	51,09 a ± 10,56	52,99 a ± 7,65	47,10 a ± 9,97
<b>Dia 3</b>	51,28 a ± 12,74	52,09 a ± 16,47	38,54 b ± 16,15	<b>Dia 15</b>	51,24 a ± 7,63	49,04 a ± 10,54	46,78 a ± 13,69
<b>Dia 4</b>	59,09 a ± 5,50	59,99 a ± 8,46	45,42 a ± 22,52	<b>Dia 16</b>	53,63 a ± 4,23	52,18 a ± 4,52	54,06 a ± 4,58
<b>Dia 5</b>	53,57 a ± 16,04	59,79 a ± 6,51	46,68 a ± 26,26	<b>Dia 17</b>	54,98 a ± 3,15	54,37 a ± 2,86	51,56 a ± 14,03
<b>Dia 6</b>	59,57 a ± 2,17	56,94 a ± 6,46	57,87 a ± 12,98	<b>Dia 18</b>	50,69 a ± 8,29	51,45 a ± 7,62	50,06 a ± 12,42
<b>Dia 7</b>	54,56 a ± 10,52	55,24 a ± 8,91	52,76 a ± 10,87	<b>Dia 19</b>	52,86 a ± 7,00	45,34 b ± 12,42	54,22 a ± 4,34
<b>Dia 8</b>	52,28 a ± 12,45	51,52 a ± 15,30	45,94 a ± 16,53	<b>Dia 20</b>	56,73 a ± 2,87	52,24 b ± 6,27	52,04 b ± 7,66
<b>Dia 9</b>	60,20 a ± 3,59	59,23 a ± 10,94	58,96 a ± 6,51	<b>Dia 21</b>	52,29 a ± 5,98	53,97 a ± 6,11	53,97 a ± 12,24
<b>Dia 10</b>	58,34 a ± 10,51	59,83 a ± 3,11	52,45 b ± 5,25	<b>Dia 22</b>	54,03 a ± 8,67	52,17 a ± 9,71	50,02 a ± 16,06
<b>Dia 11</b>	53,52 a ± 5,11	48,78 a ± 15,01	47,47 a ± 18,74	<b>Dia 23</b>	54,43 a ± 6,05	49,81 a ± 11,14	44,81 a ± 23,84
<b>Dia 12</b>	60,05 a ± 17,70	57,03 a ± 5,09	55,68 a ± 20,23				

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha e no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

O índice nutricional das fêmeas oriundas dos animais banhados com a formulação oleosa de Metarril SP Organic diminuiu significativamente nos dias +1, +3, +8 e +10 (Tabela 11).

**Tabela 11.** Índice nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do piso das baias nos 23 dias após o tratamento dos bovinos com a formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste de estábulo.

	Controle	Controle oleoso	Metarril		Controle	Controle oleoso	Metarril
<b>Dia 1</b>	62,42 a ± 18,35	66,57 a ± 6,01	41,16 b ± 29,20	<b>Dia 13</b>	64,64 a ± 7,30	61,33 a ± 5,67	56,53 a ± 15,39
<b>Dia 2</b>	62,81 a ± 17,24	69,89 a ± 4,22	60,24 a ± 20,79	<b>Dia 14</b>	62,65 a ± 9,85	62,77 a ± 6,60	55,95 a ± 10,08
<b>Dia 3</b>	65,75 a ± 20,52	62,85 a ± 15,63	54,87 b ± 44,08	<b>Dia 15</b>	61,51 a ± 7,61	57,11 a ± 14,34	56,73 a ± 14,73
<b>Dia 4</b>	67,75 a ± 6,33	68,32 a ± 9,67	52,86 a ± 24,69	<b>Dia 16</b>	61,85 a ± 10,94	61,97 a ± 5,98	64,65 a ± 5,43
<b>Dia 5</b>	62,30 a ± 15,76	70,36 a ± 6,97	54,60 a ± 29,49	<b>Dia 17</b>	62,40 a ± 3,45	63,16 a ± 5,24	59,09 a ± 21,11
<b>Dia 6</b>	68,46 a ± 2,66	66,74 a ± 7,64	67,59 a ± 13,09	<b>Dia 18</b>	62,74 a ± 7,75	62,14 a ± 5,81	60,82 a ± 12,20
<b>Dia 7</b>	64,82 a ± 6,94	63,59 a ± 8,87	62,08 a ± 11,42	<b>Dia 19</b>	61,65 a ± 13,28	56,82 b ± 11,11	65,60 a ± 4,16
<b>Dia 8</b>	63,84 a ± 9,15	64,74 a ± 6,19	53,68 b ± 18,84	<b>Dia 20</b>	66,43 a ± 3,55	63,71 a ± 7,05	65,25 a ± 5,93
<b>Dia 9</b>	70,35 a ± 4,32	68,76 a ± 13,76	68,86 a ± 6,56	<b>Dia 21</b>	64,77 a ± 5,55	66,78 a ± 5,91	65,25 a ± 14,73
<b>Dia 10</b>	69,81 a ± 14,26	70,20 a ± 4,05	60,62 b ± 6,13	<b>Dia 22</b>	66,10 a ± 8,76	65,30 a ± 7,45	62,25 a ± 14,13
<b>Dia 11</b>	62,60 a ± 4,79	56,61 a ± 16,67	56,15 a ± 21,34	<b>Dia 23</b>	67,27 a ± 4,88	63,15 a ± 9,67	56,07 a ± 29,30
<b>Dia 12</b>	71,07 a ± 12,23	66,63 a ± 4,65	63,20 a ± 22,12				

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha e no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

### 4.3 Teste a Campo

Os conídios da formulação de Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral apresentaram 100% de germinação em até 72 horas de incubação em BDA a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$ .

Os animais permaneceram saudáveis durante todo o experimento, não sendo observada qualquer alteração física, comportamental ou fisiológica que pudesse ser atribuída como reação adversa aos tratamentos.

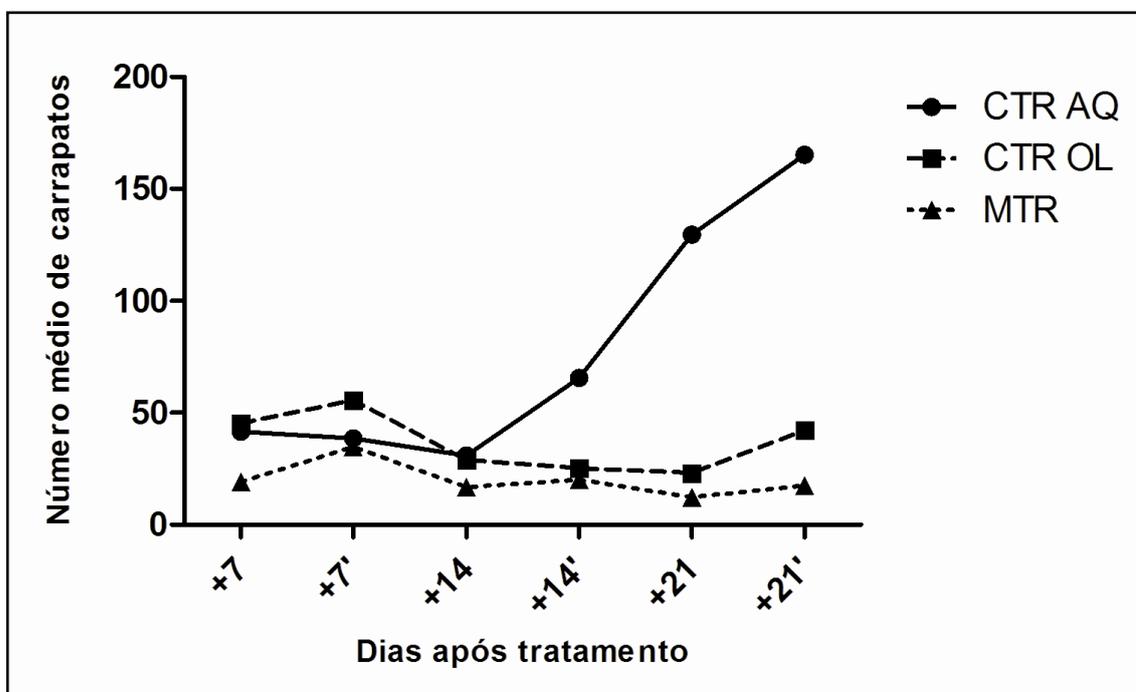
Foi observada redução no número médio de carrapatos no grupo tratado com a formulação oleosa de Metarril SP Organic em relação ao grupo controle a partir da segunda contagem após o segundo tratamento (Dia +14') dos animais. Entretanto, também houve redução no número médio de carrapatos no grupo controle oleoso em relação ao grupo controle a partir do Dia +14' (Tabela 12). O número médio de carrapatos dos grupos controle oleoso e Metarril SP Organic se manteve inferior em relação ao grupo controle até o último dia de contagem, havendo redução de até 5,63 e 10,54 vezes no número de carrapatos nos grupos controle oleoso e Metarril SP Organic em relação ao controle na última semana de contagem (Tabela 12).

**Tabela 12.** Número diário médio de carrapatos *Rhipicephalus microplus* obtido após tratamentos dos animais com formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste a campo.

Dias	Número médio de carrapatos		
	Controle	Controle oleoso	Metarril
<b>Dia +7</b>	41,6 a $\pm$ 24,22	45,3 a $\pm$ 36,69	19,5 a $\pm$ 17,10
<b>Dia +7'</b>	38,5 a $\pm$ 22,74	55,6 a $\pm$ 51,52	34,7 a $\pm$ 17,17
<b>Dia +14</b>	30,9 a $\pm$ 23,71	28,9 a $\pm$ 23,32	16,7 a $\pm$ 8,83
<b>Dia +14'</b>	65,5 a $\pm$ 42,22	25,3 b $\pm$ 26,49	20,0 b $\pm$ 13,70
<b>Dia +21</b>	129,6 a $\pm$ 97,89	23,0 b $\pm$ 23,48	12,3 b $\pm$ 7,65
<b>Dia +21'</b>	165,3 a $\pm$ 132,04	42,0 b $\pm$ 43,46	17,44 b $\pm$ 7,35

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

Na Figura 9 pode-se observar que os três grupos mantiveram-se com um número médio de carrapatos semelhante durante a primeira semana após os tratamentos. A partir da segunda semana, começou a haver diferença significativa no número médio de carrapatos entre os grupos, diferença essa que aumentou consideravelmente na terceira semana após os tratamentos.



**Figura 9.** Número diário médio de carrapatos *Rhipicephalus microplus* obtido após tratamentos dos bovinos com formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste a campo.

A formulação oleosa de Metarril SP Organic apresentou eficácia diária variando entre 8,53 e 90,53% e entre 19,68 e 57,81% em relação aos grupos controle e controle oleoso, respectivamente. A eficácia média da formulação de Metarril SP Organic adicionada de 10% de óleo mineral foi de 75,09 e 46,59% quando comparada aos grupos controle e controle oleoso, respectivamente (Tabela 13).

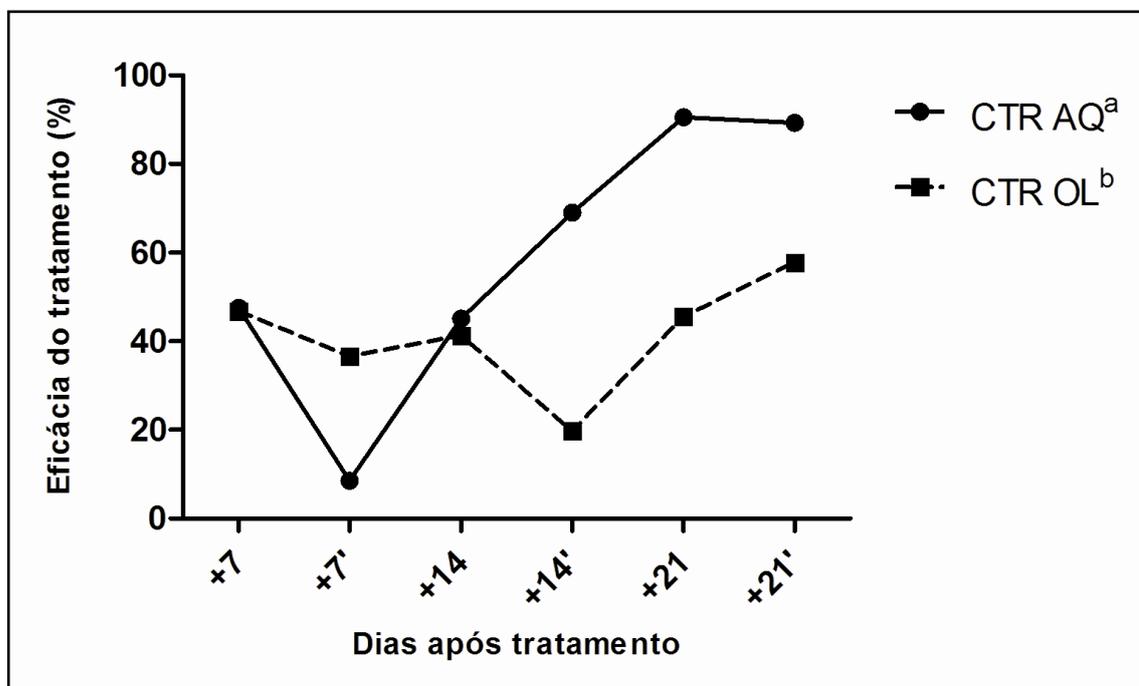
**Tabela 13.** Eficácias (%) diária e média da formulação de Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*, em teste a campo.

Dias	Eficácia diária		Eficácia média	
	Controle <sup>a</sup>	Controle oleoso <sup>b</sup>	Controle <sup>a</sup>	Controle oleoso <sup>b</sup>
<b>Dia +7</b>	47,57%	43,76%	75,09%	46,59%
<b>Dia +7'</b>	8,53%	36,59%		
<b>Dia +14</b>	45,15%	41,29%		
<b>Dia +14'</b>	69,01%	19,68%		
<b>Dia +21</b>	90,53%	45,53%		
<b>Dia +21'</b>	89,29%	57,81%		

<sup>a</sup> Eficácia da formulação oleosa de Metarril SP Organic calculada em relação ao grupo controle.

<sup>b</sup> Eficácia da formulação oleosa de Metarril SP Organic calculada em relação ao grupo controle oleoso.

A eficácia da formulação oleosa de Metarril SP Organic começou a aumentar na segunda semana após os tratamentos, atingindo na terceira semana o pico de 90,53% em relação ao grupo controle e de 57,81% em relação ao grupo controle oleoso, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10.** Eficácia diária (%) da formulação de Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*, em teste a campo.

<sup>a</sup>Eficácia da formulação oleosa de Metarril SP Organic calculada em relação ao grupo controle.

<sup>b</sup>Eficácia da formulação oleosa de Metarril SP Organic calculada em relação ao grupo controle oleoso.

Os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* coletadas do corpo dos animais, no teste a campo, estão apresentados na Tabela 14.

Foi observada alteração significativa no índice de produção de ovos das fêmeas coletadas no dia +14' após os tratamentos, havendo redução deste parâmetro nos grupos controle oleoso e Metarril SP Organic quando comparados ao grupo controle. Não houve alteração significativa nos demais parâmetros biológicos em nenhum dos dias de coleta de carrapatos (Tabela 14).

**Tabela 14.** Média e desvio padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* coletadas do corpo dos bovinos após os tratamentos com a formulação Metarril SP Organic acrescida de 10% de óleo mineral, em teste a campo.

	<b>Grupos</b>	<b>Peso das Fêmeas (mg)</b>	<b>Peso da Massa de Ovos (mg)</b>	<b>Eclosão das Larvas (%)</b>	<b>IPO (%)</b>	<b>IN (%)</b>
<b>Dia +7</b>	<b>Controle</b>	164,4 a ± 0,06	73,7 a ± 0,03	93,3 a ± 27,42	43,36 a ± 13,15	53,88 a ± 11,60
	<b>Controle Oleoso</b>	187,3 a ± 0,06	82,2 a ± 0,03	90,1 a ± 36,44	43,57 a ± 15,03	56,36 a ± 15,76
	<b>Metarril</b>	162,8 a ± 0,05	68,9 a ± 0,05	82,5 a ± 39,97	42,64 a ± 16,44	54,56 a ± 9,06
<b>Dia +7'</b>	<b>Controle</b>	154,2 a ± 0,06	67,7 a ± 0,03	90,5 a ± 30,04	43,67 a ± 8,24	53,29 a ± 8,85
	<b>Controle Oleoso</b>	164,3 a ± 0,03	74,2 a ± 0,03	87,9 a ± 31,25	43,43 a ± 16,24	52,21 a ± 18,78
	<b>Metarril</b>	198,1 a ± 0,05	93,2 a ± 0,04	85,5 a ± 31,49	44,52 a ± 16,16	55,50 a ± 20,03
<b>Dia +14</b>	<b>Controle</b>	112,9 a ± 0,05	32,2 a ± 0,03	71,0 a ± 40,95	30,00 a ± 18,57	36,47 a ± 23,20
	<b>Controle Oleoso</b>	152,3 a ± 0,06	68,7 a ± 0,05	87,5 a ± 28,80	42,55 a ± 14,13	54,55 a ± 16,76
	<b>Metarril</b>	158,5 a ± 0,06	56,7 a ± 0,05	50,0 a ± 49,22	31,93 a ± 22,66	42,45 a ± 28,95
<b>Dia +14'</b>	<b>Controle</b>	206,5 a ± 0,03	122,7 a ± 0,02	99,1 a ± 1,52	59,38 a ± 3,67	72,21 a ± 4,82
	<b>Controle Oleoso</b>	185,0 a ± 0,07	94,0 a ± 0,05	89,2 a ± 31,38	50,12 b ± 13,04	66,61 a ± 13,86
	<b>Metarril</b>	194,7 a ± 0,04	94,5 a ± 0,04	83,4 a ± 34,75	47,81 b ± 18,06	67,76 a ± 26,42
<b>Dia +21</b>	<b>Controle</b>	180,2 a ± 0,04	87,8 a ± 0,02	96,5 a ± 31,07	47,43 a ± 16,44	61,74 a ± 18,98
	<b>Controle Oleoso</b>	168,9 a ± 0,04	89,7 a ± 0,04	88,7 a ± 32,22	49,72 a ± 11,38	67,89 a ± 8,32
	<b>Metarril</b>	164,3 a ± 0,05	80,2 a ± 0,04	86,2 a ± 29,70	48,33 a ± 10,78	66,62 a ± 13,28
<b>Dia +21'</b>	<b>Controle</b>	162,2 a ± 0,05	83,3 a ± 0,04	91,5 a ± 25,17	49,15 a ± 12,00	66,92 a ± 11,63
	<b>Controle Oleoso</b>	182,1 a ± 0,04	88,9 a ± 0,03	83,1 a ± 33,64	49,30 a ± 11,27	62,98 a ± 12,32
	<b>Metarril</b>	160,9 a ± 0,04	90,4 a ± 0,03	95,8 a ± 12,59	55,54 a ± 5,47	68,90 a ± 8,48

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna e no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

IPO: Índice de Produção de Ovos (BENNETT, 1974); IN: Índice Nutricional (BENNETT, 1974).

## 5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento e utilização de produtos comerciais a base de fungos para o controle de insetos e ácaros têm aumentado substancialmente nas últimas décadas em todo o mundo. Entretanto, a maior parte destes produtos é desenvolvida para o controle de pragas da agricultura, sendo um pequeno número produzido para o controle de carrapatos (FARIA; WRAIGHT, 2007). Dentre estes, encontram-se o Metarril SP Organic e o Metarril, produtos a base de esporos concentrados do fungo *Metarhizium anisopliae* desenvolvidos para o controle de insetos que acometem plantações. Este é o primeiro trabalho a avaliar a ação destes produtos associados a óleo mineral contra o carrapato *Rhipicephalus microplus* em testes *in vitro* e *in vivo*. Com o presente estudo propôs-se avaliar a ação destes produtos sobre o carrapato dos bovinos, pois se trata de produtos já formulados, portanto de fácil transporte, armazenamento, manuseio e aplicação, além de serem produzidos em grande escala. Foi adicionado 10% de óleo mineral ao Metarril SP Organic e Metarril visando potencializar a ação do fungo sobre o carrapato, além de protegê-lo dos fatores abióticos não adequados para o desenvolvimento fúngico.

A primeira etapa do processo de infecção de fungos artropodopatogênicos é a penetração ativa através da cutícula do artrópode, que se inicia com a germinação dos conídios em até 24 horas (BITTENCOURT et al., 1999; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). No presente estudo, os conídios do fungo *M. anisopliae* contidos nos produtos avaliados, que foram formulados em 10% de óleo mineral, apresentaram 100% de germinação 72 horas após a incubação em meio de cultura BDA. Acredita-se que este atraso na germinação fúngica tenha ocorrido devido ao afastamento físico entre os conídios e a superfície do meio de cultura gerado pelo óleo, já que os conídios são englobados pelas micelas. Com o tempo, o óleo vai sendo absorvido e os conídios entram em contato com o meio de cultura, iniciando a germinação. Polar et al. (2005) ao avaliarem o efeito de diferentes formulações sobre *M. anisopliae* concluíram que as formulações de óleo de coco, parafina líquida e de óleo adjuvante emulsionável de parafina líquida, possuem pouco efeito sobre a velocidade de germinação dos conídios, já que o percentual de germinação dos conídios formulados variou de 86,0% a 91,6% após 24 horas de incubação, e após 48 horas de incubação este percentual foi de aproximadamente 100% para a maioria das formulações. Estes resultados demonstram a importância de se avaliar o efeito dos constituintes das formulações sobre os conídios dos fungos artropodopatogênicos, uma vez que podem retardar ou até mesmo inibir a germinação.

Apesar do atraso na germinação em meio de cultura, acredita-se que os óleos utilizados como adjuvantes em formulações facilitam a adesão dos conídios fúngicos à cutícula dos carrapatos, já que esta apresenta característica hidrofóbica conferida pela sua constituição (PRIOR et al., 1988; JENKINS et al., 1998). Desta forma, os conídios que são suspensos somente em meio aquoso têm a adesão à cutícula do hospedeiro dificultada. Os conídios de alguns isolados fúngicos também apresentam propriedade hidrofóbica, o que dificulta ainda mais a sua adesão à cutícula do carrapato quando suspensos exclusivamente em água (PRIOR et al., 1988; JENKINS et al., 1998). Nos testes com variação de umidade do presente estudo, a formulação oleosa de Metarril foi mais eficiente do que a suspensão aquosa contra fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, mesmo quando mantidas em umidade relativa de 90%. A partir destes resultados sugere-se que, além da proteção contra baixas umidades, o óleo mineral facilita a adesão dos conídios à cutícula dos carrapatos, já que possui propriedade quitinofílica. Esta propriedade dos óleos pode ter aumentado a afinidade dos conídios hidrofóbicos com a cutícula do carrapato, aumentando também a infectividade e, conseqüentemente a virulência do isolado fúngico.

Outro fato que deve ser levado em consideração na explicação da superioridade da formulação oleosa sobre a suspensão aquosa observada no teste com diferentes umidades relativas do presente estudo, é o melhor espalhamento de formulações oleosas em relação às suspensões aquosas. Esta afirmação é sustentada pelos resultados encontrados por Alves et al. (2001), que observaram um melhor espalhamento de formulações contendo óleos adjuvantes emulsionáveis sobre superfícies hidrofóbicas quando comparadas a suspensões à base de água. Este fato é explicado pela diminuição da tensão superficial do líquido causada pelo óleo, o que facilita o espalhamento dos conídios e a aderência dos mesmos sobre a cutícula do hospedeiro. Desta forma, a proporção de conídios em contato com a cutícula do artrópode é aumentada por formulações à base de óleo, já que um mesmo volume desta formulação tende a se espalhar melhor do que um volume equivalente de uma suspensão à base de água (ALVES et al, 2001).

A ação dos fungos artropodopatogênicos é fortemente afetada pelos condicionantes ambientais. A temperatura, a umidade relativa e a radiação solar são os fatores abióticos que mais influenciam na virulência destes patógenos (ZIMMERMANN, 2007a), podendo diminuir a eficácia e até mesmo inviabilizar a ação dos fungos contra os artrópodes em condições extremas. Segundo Alves (1998), a umidade relativa atua nas fases de germinação, penetração e disseminação, além de ser importante para a reprodução de algumas espécies fúngicas. Normalmente, os isolados do fungo *M. anisopliae* necessitam de umidade relativa próxima a 100% para germinarem, o que dificulta o sucesso deste fungo no biocontrole de artrópodes em condições ambientais. No presente estudo, foram testadas suspensão aquosa e formulação oleosa do produto Metarril, em diferentes condições de umidade relativa, com o intuito de avaliar o desempenho deste produto nestas condições e de demonstrar a ação protetora do óleo mineral sobre os conídios fúngicos em condições extremas, como baixa umidade relativa do ar. Os resultados dos experimentos com variação de umidade relativa confirmaram esta teoria, já que a formulação de Metarril contendo 10% de óleo mineral foi capaz de alterar significativamente todos os parâmetros biológicos das fêmeas do carrapato dos bovinos, mesmo quando submetida a baixas umidades relativas (30 e 50%), diferente da suspensão fúngica aquosa, que alterou os parâmetros biológicos das fêmeas somente quando mantida em umidades relativas mais elevadas (70 e 90%). Além disso, o percentual de controle da formulação fúngica oleosa foi alto nos quatro níveis de umidade relativa avaliados, apresentando pouca variação, o que demonstra que a formulação oleosa de Metarril foi eficaz no controle do carrapato *R. microplus* inclusive em baixa umidade, diferente da suspensão fúngica aquosa, que apresentou variação elevada no percentual de controle, sendo este consideravelmente menor nos níveis mais baixos de umidade relativa avaliados. Possivelmente, o óleo mineral dificultou a dessecação dos conídios através da formação de micelas que protegem o conídio e evitam a perda de água para o ambiente, mantendo a umidade relativa necessária para o desenvolvimento fúngico.

Os óleos atuam de diversas maneiras na proteção e potencialização do desempenho dos fungos no controle de artrópodes. Segundo Bateman et al. (1993) as formulações a base de óleo melhoram a virulência dos isolados fúngicos através da diminuição da dependência de água em ambientes com baixa umidade. Outra característica importante dos óleos utilizados como adjuvantes em formulações é a capacidade de evitar a dessecação dos conídios sobre elevadas temperaturas, diminuindo a evaporação e mantendo o ambiente úmido por mais tempo para atender as necessidades hídricas exigidas pelos patógenos (ALVES et al., 2000). Bateman et al. (1993) observaram melhor desempenho do fungo *M. acridum* (*M. flavoviride*) quando formulado em óleo de semente de algodão contra gafanhotos do deserto (*Schistocerca gregaria*), em baixa umidade relativa (35% UR). Peng e Xia (2011) relataram um aumento na virulência de *M. anisopliae* var. *acridum* formulado em óleo, contra gafanhotos (*Locusta migratoria*), ao adicionarem um diluente à formulação fúngica, em baixa umidade relativa.

Segundo estes autores, isto ocorreu, provavelmente pela diminuição da dependência de água dos conídios em ambientes com baixa umidade, mantendo a umidade necessária para a germinação e penetração do fungo no hospedeiro. Os resultados encontrados por estes pesquisadores citados acima, em adição aos resultados apresentados no presente trabalho fortalecem a teoria de que, os diferentes tipos de óleos utilizados como adjuvantes em formulações contra insetos e ácaros protegem os fungos contra condições ambientais não favoráveis, como baixa umidade relativa do ar.

Inúmeros trabalhos demonstraram a patogenicidade, *in vitro*, de fungos artropodopatogênicos sobre diferentes espécies de carrapatos (BITTENCOURT et al., 1992; REIS, et al., 2001; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Entretanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos testando a ação destes patógenos em condições ambientais, sendo importante para a consolidação de programas de controle microbiano avaliar a influência não só dos fatores ambientais, como também a relação fungo/carrapato/bovino nas condições reais nas quais todos estes fatores se encontram e atuam. Neste sentido, foram desenvolvidos testes *in vivo* (testes de estábulo e a campo) com o intuito de avaliar a ação do produto Metarril SP Organic sob a influência de todos estes fatores bióticos e abióticos encontrados no ambiente que este produto será utilizado para o controle microbiano do carrapato dos bovinos.

Com o teste de estábulo foi possível observar que a formulação de Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral foi eficaz na redução do número de carrapatos de *R. microplus* após o tratamento dos bovinos. A eficácia média da formulação avaliada foi de 47,74%, significando uma redução de quase 50% do número de carrapatos em um período de três semanas com apenas uma aplicação do produto. Leemon et al. (2008), ao avaliarem o efeito de uma formulação oleosa de *M. anisopliae* no controle de *R. microplus* em testes de estábulo, observaram alta mortalidade de fêmeas não ingurgitadas coletadas imediatamente após o tratamento dos bovinos e incubadas *in vitro*, além da redução significativa da massa de ovos de fêmeas coletadas nos três primeiros dias após o tratamento. Entretanto, estes autores observaram pouco efeito da formulação fúngica na contagem de carrapatos sobre os bovinos. Os autores acreditam que a temperatura elevada do ambiente interferiu negativamente na virulência dos fungos contra os carrapatos. Além disso, houve uma grande variação na contagem de carrapatos entre os animais de um mesmo grupo, agravada pelo número reduzido de animais (três bovinos) por grupo utilizado por estes pesquisadores, o que pode ter interferido na análise estatística dos dados. A diferença entre os resultados obtidos por Leemon et al (2008) e os resultados observados no presente estudo pode ser devido a diversos fatores, tais como as diferenças na metodologia utilizada tanto para o tratamento dos animais quanto para a avaliação da eficácia, os diferentes isolados de *M. anisopliae* utilizados, populações distintas do carrapato, raças dos bovinos, além da variação das condições ambientais nos locais onde foram realizados os testes de estábulo.

O controle estratégico de carrapatos propõe a concentração de banhos dos bovinos na época desfavorável ao desenvolvimento do carrapato na pastagem, sendo que o sistema estratégico convencional é realizado com um tratamento com carrapaticida de contato a cada 21 dias ou menos (FURLONG; PRATA, 2005). No presente estudo, a formulação fúngica avaliada no teste de estábulo obteve eficácia média de 47,74% e causou efeito deletério nos parâmetros biológicos das fêmeas coletadas nos três primeiros dias após o tratamento com apenas um banho dos animais. No teste a campo, a formulação oleosa de Metarril avaliada apresentou eficácia média de 75,09% banhando os animais duas vezes com um intervalo de três dias entre os banhos. Acredita-se que a eficácia do produto possa ser potencializada com a elaboração de um protocolo de tratamentos, ou seja, estabelecer um determinado número de banhos dos animais com a formulação fúngica em um período de tempo. Esta teoria é fortalecida pelos resultados obtidos por Kaaya et al. (2011) que, ao avaliarem o efeito de uma formulação oleosa de *M. anisopliae* aspergindo-a uma vez a cada três semanas durante um

ano em bovinos infestados com os carrapatos *Rhipicephalus evertsi evertsi* e *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, em condições de campo, observaram uma redução de até 83% da população de carrapatos. Alonso-Díaz et al. (2007) observaram eficácia entre 0 e 91,2% de uma suspensão de *M. anisopliae* ao banharem bovinos naturalmente infestados com *R. microplus* a cada 15 dias durante dois meses, em condições de campo. Estes resultados corroboram a necessidade de se elaborar um protocolo de tratamento dos bovinos visando potencializar a ação das formulações fúngicas para o controle de carrapatos *in vivo*.

A eficácia da formulação fúngica avaliada nos testes *in vivo* aumentou no decorrer das semanas após os tratamentos dos bovinos. No teste de estábulo, a eficácia foi de até 50,22% na primeira semana, aumentando na segunda semana (até 53,53%) e tendo um pico de 67,41% na última semana de avaliação. No teste a campo, a eficácia começou a aumentar consideravelmente 14 dias após o segundo tratamento, sendo de até 47,57, 69,01 e 90,53% na primeira, segunda e terceira semana, respectivamente. Estes resultados indicam o efeito da formulação fúngica sobre os estágios adulto, ninfal e larval do carrapato, respectivamente, presentes nos bovinos nos dias dos tratamentos, demonstrando que a formulação fungica causou um efeito deletério maior nas larvas do que em ninfas e adultos presentes nos bovinos nos dias dos tratamentos. Logo, um menor número de carrapatos foi coletado na última semana do experimento (terceira semana após os banhos), período no qual as larvas presentes nos bovinos no dia dos tratamentos atingiriam o estágio adulto. Estudos anteriores demonstraram a diferença na susceptibilidade aos fungos artropodopatogênicos entre os diferentes estágios de desenvolvimento dos carrapatos (CASTRO et al., 1997; KAAYA; HASSAN, 2000; BAHIENSE et al., 2007; CAMARGO et al., 2012). Kaaya e Hassan (2000) ao avaliarem o efeito de formulações oleosas de *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* sobre os carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* na pastagem observaram mortalidade de 100%, 80-100% e 80-90% em larvas, ninfas e adultos, respectivamente, demonstrando que os estágios imaturos de desenvolvimento são mais susceptíveis.

No teste de estábulo, foram observadas alterações significativas nos parâmetros biológicos de fêmeas coletadas nos três primeiros dias após o tratamento. Este fato deve ter ocorrido devido ao maior contato das fêmeas ingurgitadas com a formulação fúngica neste período, já que com o passar do tempo, a concentração fúngica em contato com os carrapatos no corpo do animal tende a diminuir devido ao animal se lambem, se coçar e deitar-se no chão, retirando assim o produto. Bahiense et al. (2008), ao avaliarem o efeito da suspensão de *M. anisopliae* associada a deltametrina no controle do carrapato *R. microplus* em teste de estábulo, também observaram alterações significativas nos parâmetros biológicos das fêmeas coletadas principalmente nos dois primeiros dias após o tratamento. Leemon et al. (2008) observaram 100% de mortalidade das fêmeas dos carrapatos coletados imediatamente após os tratamentos com formulações oleosas de *M. anisopliae*, assim como redução significativa da massa de ovos das fêmeas coletadas nos três primeiros dias após os tratamentos, em teste de estábulo. No entanto, estes pesquisadores coletaram as fêmeas para avaliação da mortalidade e dos parâmetros biológicos direto do corpo dos bovinos, antes do total ingurgitamento e queda ao chão. Já no presente trabalho, as fêmeas foram coletadas do chão das baias após o ingurgitamento total e desprendimento do corpo dos animais, sendo lavadas com água corrente para remoção de sujidades e fezes dos bovinos e secas em papel toalha para a remoção do excesso de água. Este procedimento de lavagem e secagem das fêmeas pode ter removido parte dos conídios ainda presentes na superfície dos carrapatos e interferido na avaliação do efeito da formulação fúngica nos parâmetros biológicos deste artrópode.

No teste a campo, ocorreu alteração significativa em apenas um dos parâmetros biológicos avaliados, o índice de produção de ovos, e em um único dia, dia +14' após os tratamentos, não havendo alteração significativa nos demais parâmetros em nenhum dos dias de coleta de carrapatos. Kaaya et al. (2011) observaram 93 e 100% de mortalidade de *R. e.*

*evertsi* e *R. (B.) decoloratus*, respectivamente, ao banharem bovinos com formulação de *M. anisopliae* acrescida de 20% de óleo de girassol, em teste a campo. Entretanto, estes pesquisadores coletaram os carrapatos do corpo dos bovinos imediatamente após o tratamento com a formulação fúngica, diferente da metodologia utilizada no presente estudo, no qual os carrapatos foram coletados nos dias +7, +14 e +21 após cada tratamento. Apesar de o fungo ter sido capaz de matar grande parte das larvas e ninfas presentes nos bovinos no momento dos tratamentos, já que houve uma diminuição considerável do número de carrapatos no grupo tratado com a formulação fúngica, acredita-se que, com o passar do tempo parte do fungo possa ter sido removida pelos animais ao se lambem e deitarem, não atingindo assim todos os carrapatos. Outro fator que pode ter influenciado neste resultado é a possibilidade de reinfestação natural dos bovinos, já que estes permaneceram soltos no pasto. Estas larvas que possam ter subido nos animais após os tratamentos, possivelmente tiveram menos ou nenhum contato com a formulação fúngica, quando comparadas às larvas presentes nos bovinos no momento dos tratamentos. Sendo assim, tanto os carrapatos que sobreviveram ao tratamento, quanto os que subiram nos animais após os tratamentos foram coletados já adultos para a avaliação dos parâmetros biológicos e não tiveram seu desenvolvimento afetado.

Em todos os experimentos desenvolvidos na presente tese foi possível notar alguma alteração, mesmo que pequena, no grupo controle oleoso quando comparado ao controle aquoso. Camargo et al. (2012) e Nogueira (2014), ao avaliarem o efeito de suspensões aquosas e formulações oleosas do fungo *M. anisopliae*, também observaram alterações significativas causadas pelo óleo sobre os estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*. Seria necessário fazer uma análise minuciosa de cada componente presente no óleo e, em seguida, avaliar o efeito destes constituintes sobre o carrapato para afirmar um possível efeito tóxico. Além disso, acredita-se que o óleo mineral possa interferir na fisiologia do carrapato, atrapalhando na respiração cuticular das larvas e na respiração traqueal de ninfas e adultos, obstruindo os espiráculos respiratórios. Foi possível notar, durante os ensaios biológicos, que o óleo mineral também atrapalha a locomoção dos carrapatos, principalmente das larvas e ninfas, que ficam completamente presas nas gotas de óleo, não conseguindo se mover. Esta interferência do óleo na fisiologia dos carrapatos pode ter acarretado nas alterações observadas na mortalidade e parâmetros biológicos destes parasitos tratados somente com o óleo mineral.

No presente estudo não foram observadas reações adversas nos bovinos que pudessem ser atribuídas ao tratamento com a formulação de *M. anisopliae*, sugerindo que a formulação de Metarril SP Organic é segura para os bovinos. Estes resultados estão em acordo com o observado por Zimmermann (2007b), que concluiu que *M. anisopliae* é seguro e apresenta riscos mínimos para mamíferos e seres humanos. Os pesquisadores Kaaya et al. (2011) e Alonso-Díaz et al. (2007) também não relataram reações adversas nos bovinos banhados com as formulações de *M. anisopliae*.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as formulações de Metarril SP Organic e de Metarril, acrescidas de 10% de óleo mineral, apresentam eficácia para o controle de *R. microplus* em laboratório e em condições ambientais, podendo ser uma importante ferramenta no controle deste carrapato. Entretanto, estudos a longo prazo, com mais de uma aplicação desta formulação nos bovinos visando elaborar um protocolo de tratamento são importantes para potencializar a ação deste biopesticida, contribuindo para o controle estratégico do carrapato *R. microplus* a campo.

## 6 CONCLUSÕES

A suspensão aquosa de Metarril é eficaz para o controle biológico de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus* em umidade relativa do ar acima de 70%, em condições laboratoriais.

A formulação de Metarril acrescida de 10% de óleo mineral é uma ferramenta promissora para o controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, tanto em umidade relativa alta (70 e 90%) quanto em umidade relativa baixa (30 e 50%), em condições laboratoriais.

O produto Metarril SP Organic, acrescido de 10% de óleo mineral é promissor para o controle biológico do carrapato *R. microplus*, em teste de estábulo.

O produto Metarril SP Organic, acrescido de 10% de óleo mineral é promissor para o controle biológico do carrapato *R. microplus*, em teste a campo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, o principal entrave para a utilização efetiva dos fungos artropodopatogênicos no controle do carrapato dos bovinos é a diminuição ou até mesmo a perda total da eficácia destes patógenos quando submetidos às condições ambientais. Por isso, o maior conhecimento a cerca da ação dos fatores abióticos sobre os fungos é de extrema importância para a elaboração de formulações que irão proteger e viabilizar a utilização destes micro-organismos a campo.

Com o presente trabalho pôde-se confirmar os benefícios da adição do óleo mineral como adjuvante à formulação de Metarril quando submetida a diferentes níveis de umidade relativa do ar, em condições laboratoriais. Estudos que avaliam a eficácia da formulação oleosa de Metarril sob a interferência de outros fatores abióticos, tais como temperaturas elevadas e a incidência de radiação UV são fundamentais e estão sendo desenvolvidos no Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ. Com esses resultados espera-se aprimorar o conhecimento da ação do óleo mineral como adjuvante na formulação e sua ação na proteção dos fungos artropodopatogênicos, contribuindo assim para o desenvolvimento de uma formulação efetiva no controle a campo do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Os testes de estábulo e a campo desenvolvidos no presente trabalho mostraram que a formulação oleosa de Metarril SP Organic apresenta potencial para o biocontrole do carrapato dos bovinos. Entretanto, acredita-se que estudos mais longos, com um maior número de banhos dos animais com o produto, inclusive testando diferentes concentrações fúngicas e do adjuvante oleoso, sejam necessários para se estabelecer o protocolo ideal de tratamento com Metarril SP Organic a ser utilizado em um programa de controle biológico do carrapato. Outras questões como avaliações de custo e até mesmo a aceitação do produto biológico pelos produtores rurais serão importantes para a futura comercialização e utilização do produto a base de fungos no controle do carrapato *R. microplus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAIFY, S.; SOLIMAN, M. M. M. Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (acari: ixodida: amblyommidae) infesting cattle in Egypt. **Acarologia**, v. 44, p. 23-30, 2004.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 336-340, 2007.

ALVES, S. B.; RISCO, S. H.; ALMEIDA, L. C.. Influence of photoperiod and temperature on the development and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Journal of Applied Entomology**, v. 97, p. 127-129, 1984.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M.; STIMAC, J. L.; VIEIRA, S. A. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 575-581, 1996.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Volatility comparisons of different formulations used to apply mycoinsecticides. **In: International Congress of Entomology, 21.; Brazilian Congress of Entomology, 18.**, 2000, Foz do Iguaçu. Abstracts. Embrapa Soja, 2000. p. 512.

ALVES, R. T.; OLIVEIRA, M. A. S.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Espalhamento e eficiência de uma formulação de fungo à base de óleo adjuvante emulsionável. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** – Embrapa Cerrados, Planaltina, n. 6, p. 1-14, 2001.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of Different Formulations on Viability and Medium-Term Storage of *Metarhizium anisopliae* Conidia. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 91-99, 2002.

ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIENSE, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; MORAES, A. P. R.; TERRA, A. L. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.

BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 243-245, 2007.

BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination

with Deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 242–245, 2008.

BARROS, T. A. M.; EVANS, D. E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infectantes do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, p. 17-21, 1989.

BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, v. 122, p. 145-152, 1993.

BENJAMIN, M. A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 723-728, 2002.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, 1974.

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

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. 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, p. 197-202, 1992.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 41-47, 1994.

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

BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. E. S.; MASCARENHAS, A. G.; ALVES, S. B. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 49-52, 1997.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário**. Brasília: MAPA/ACS, 2012. 401 p.

- CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140-147, 2012.
- CASTRO, A. B. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E. C. Eficácia in vivo do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Universidade Rural**, v. 19, p. 73–82, 1997.
- COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic Fungi. An Account of their Biology, Activities and Classification. San Francisco, CA: W.H. Freeman. 1964.
- 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.
- FARGUES, J.; MANIANIA, N. K.; DELMAS, J. C.; SMITS, N. Influence of temperature on *in vitro* growth of entomopathogenic hyphomycetes. **Agronomie**, v. 12, p. 557, 564, 1992.
- FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.
- FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 270–274, 2004.
- FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v. 98, p. 324-332, 2006.
- FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 237–243, 2007.
- FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**. v.46, p. 71-93, 2008.
- FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 69–78, 2008.
- FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; CHONG, J. P.; RANGEL, D. E. N.; MILLER, M. P.; ROBERTS, D. W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 115–128, 2010.

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

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A. Conhecimento básico para controle do carrapato dos bovinos. In: FURLONG, J. **Carrapato: problemas e soluções**. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005, cap. 1, p. 9-20.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

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, p. 23-28, 2002.

HEDGECOCK, S.; MOORE, D.; HIGGINS, P. M.; PRIOR, C. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, p. 371-377, 1995.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricides against the brown wheat mite. **Journal Economic Entomology**, v. 48, p. 157-161, 1955.

HOLDSWORTH, P. A.; KEMP, D.; GREEN, P.; PETER, R. J.; DE BRUIN, C.; JONSSON, N. N.; LETONJA, T.; REHBEIN, S.; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 29-43, 2006.

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

HORNBOSTEL, V. L.; OSTFELD, R. S.; ZHIOUA, E.; BENJAMIN, M. A. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 922-929, 2004.

HUANG, B. F.; FENG, M. G. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a descriptive of a modeling method to assess lethal dose. **Mycopathologia**. v. 168, p. 145-152, 2009.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; TARIQ, M. B.; STRASSER, H. **Fungi as Biological Control Agents**. CAB International, Wallingford, pp. 23-69, 2001.

JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of massproduction technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v. 19, p. 21N-31N, 1998.

KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous

fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 15-20, 1996.

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

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

KIRKLAND, B. H.; CHO, E.; KEYHANI, N. O. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, p. 414- 421, 2004.

LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, v.39, p.6-12, 2009.

LAZZARINI, G. M. J.; ROCHA, L. F. N.; LUZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v. 110, p. 485–492, 2006.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ Jr., I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 1-11, 2003.

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

LEEMON, D. M.; TURNER, L. B.; JONSSON, N. N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 248-260, 2008.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; MACHADO, L. A.; CARDOSO, C. L.; HAYASHI, M. S. Efeito do óleo de soja e do óleo mineral na proteção do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. contra a radiação ultravioleta 2537Å. **In Resumos do Congresso Brasileiro de Entomologia**, p. 308, 1993.

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**, v. 16, p. 27-31, 2007.

MADÉLIN, M. F.; ROBINSON, R. K.; WILLIAMS, R. J. Apressoriumlike structures in insects parasiting deuteromycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 404–412, 1967.

MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; PRADO, A. P. Determinação da frequência de realização de bioensaios para o monitoramento da resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 87-93, 2007.

- MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**, v. 114, p. 49–56, 2010.
- MENT, D.; IRAKI, N.; GINDIN, G.; ROT, A.; GLAZER, I.; ABU-JREIS, R.; SAMISH, M. Thermal limitations of *Metarhizium anisopliae* efficacy: selection for application on warm-blooded vertebrates. **BioControl**, v. 56, p. 81–89, 2011.
- MILNER, R. J.; HUPPATZ, R. J.; SWARIS, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 121–123, 1991.
- MONTEIRO, S. G.; BAHIENSE, 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.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.
- NOGUEIRA, M. R. S. **Eficácia *in vitro* de diferentes formulações de *Metarhizium anisopliae* s.l. no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2014. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.
- NORVAL, R. A. I.; PERRY, B. D.; YOUNG, A. S. The epidemiology of theileriosis in Africa. **Academic Press London**, 1992. p. 301-342.
- NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*: La Garrapata Común del Ganado Vacuno**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1982. 184p.
- PENG, G.; XIA, Y. The mechanism of the mycoinsecticide diluent on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. **BioControl**, v. 56, p. 893-902, 2011.
- PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 4, p. 65, 1990.
- POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, SALLY-ANN. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v. 160, p. 151–157, 2005.
- PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C.; GARCIA, A. C.; SOARES, V. E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 855–861, 2005.
- PRIOR, C.; JOLLANDS, P., LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera:Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 66–72, 1988.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 116–125, 2005.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; SOUZA, E. J.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius,1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 544-547, 2001.

REIS, R. C. S.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Fungal Formulations to Control *Rhipicephalus sanguineus* Engorged Females. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, v. 1149, p. 239–241, 2008.

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

ROBERTS, D. W.; CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 10, p. 19–76, 1977.

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. Lako Parasit. Klistete *Ixodes ricinus*. **Zoologie List**, v. 39, p. 93-97, 1957.

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

SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Evaluation of in vitro effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p. 127-131, 1999.

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

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.

WALSTAD, J. D.; ANDERSON, R. F.; STAMBAUGH, W. J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 16, p. 221–226, 1970.

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

XIA, Y. X.; WANG, Z. K.; PENG, G. X.; ZENG, D. Y. A mycoinsecticide diluent. China Patent ZL02134002.1, 2002.

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

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553-596, 2007 a.

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

## **ANEXOS**

Anexo A – Declaração de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
BR 465, Km 7 – Centro – Seropédica – Rio de Janeiro – CEP: 23.890-000  
Telefone: (21) 2692-3451 – E-mail: [www.ufrj@vetera2.com](mailto:www.ufrj@vetera2.com)

Seropédica 12 de fevereiro de 2014

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 017/2014 intitulado “**Utilização de formulação comercial de *Metarhizium anisopliae* no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* em teste a campo.**” encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 12 de fevereiro de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott  
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva  
Vice-Cordenador CEUA-IV