

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

DISSERTAÇÃO

**Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari:
Ixodidae): Uso de formulações oleosas de
Metarhizium spp. em condições seminaturais**

Allan Felipe Marciano

2016



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

**CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE): USO DE
FORMULAÇÕES OLEOSAS DE *Metarhizium* spp. EM CONDIÇÕES
SEMINATURAIS**

ALLAN FELIPE MARCIANO

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

E Coorientação do Professor
Wendell Marcelo de Souza Perinotto

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

Seropédica - RJ
Dezembro de 2016

1.1 UFRRJ / Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos

595.429

M319c

T

Marciano, Allan Felipe, 1990-
Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): uso de formulações oleosas de *Metarhizium* spp. em condições seminaturais / Allan Felipe Marciano - 2016.
80 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

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

Bibliografia: f. 53-67.

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

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

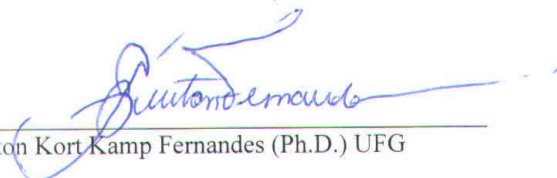
ALLAN FELIPE MARCIANO

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03 /10 /2016.



Vânia R. E. P. Bittencourt (Ph.D.) UFRRJ



Everton Kort Kamp Fernandes (Ph.D.) UFG



Isabele Costa Angelo (Ph.D.) UFRRJ

Quanto mais me aprofundo na Ciência, mais me aproximo de Deus”

(Albert Einstein)

"Devemos preservar cada pedaço de biodiversidade como algo inestimável enquanto aprendemos a entender o que ela significa para a humanidade"

(E.O. Wilson)

“O desafio do novo modelo tecnológico é aumentar a produtividade levando-se em conta a qualidade de processos e produtos, sem degradação ambiental, e, se possível, de uma forma sustentável”

(José Roberto Postali Parra)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
à minha família e aos meus amigos...*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

À minha família, que é a base do meu crescimento e que é sustentada por duas pessoas fundamentais na minha vida, meus pais, *Antonio Fernandes Marciano* e *Maria Aparecida de Fátima Marciano* que sempre foram exemplos de boas virtudes, me educando com muito amor e bons exemplos de cumplicidade, caráter e força frente aos desafios.

Ainda no contexto familiar, não posso deixar de agradecer a meus irmãos, *Almir Felix Marciano*, *Altieres Fernando Marciano* e *Almira Fernanda Marciano*, que mais do que uma ligação de sangue, são meus amigos e mestres para a vida, me servem de espelhos e sem dúvida são partes fundamentais da minha personalidade hoje. Além disso, trouxeram pessoas que são sobre tudo fonte de incentivo, são elas: meus sobrinhos, *Andrew Fernando Marciano*, *Naila Luana Costa Marciano*, *João Pedro Fernandes Marciano*, *Ana Beatriz Marciano de Oliveira* e minhas Cunhadas, *Ana Carolina da Silva (in memorian)* e *Luana Guedes da Fonseca* e também meu cunhado *Rogério Aparecido de Oliveira*.

Agradeço de forma muito especial minha orientadora, *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt*, que me permitiu imergir na ciência desde o tempo de graduação, sendo referência em como conduzir com afinco e responsabilidade a pesquisa acadêmica e por sempre fornecer subsídios ao meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu Coorientador e amigo, *Wendell Marcelo de Souza Perinotto* que por vezes me incentivou e me orientou quanto aos melhores caminhos.

À banca avaliadora, *Everton Kort Kamp Fernandes* e *Isabele Costa Angelo*, assim como os membros suplentes *Simone Quinelato* e *Patrícia Golo* que aceitaram participar da construção deste trabalho e contribuir para o meu aprimoramento acadêmico científico, até mais por serem membros da equipe e família LCM (Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de importância Veterinária) que serão mencionados a seguir com muito carinho.

Tal equipe que me orgulho em fazer parte, por buscar de forma excepcional a desenvolvimento sólido e inovador do controle biológico na Medicina Veterinária, e que ultrapassa o ambiente laboratorial atingindo níveis “familiares”, por isto gratifico meus amigos e irmãos científicos que foram substanciais para a construção deste trabalho: *Mariana Camargo*, *Caio Monteiro*, *Sabrina Rezende*, *Fabricio Galdêncio*, *Michel Nogueira*, *Caio Coutinho-Rodrigues*, *Fillipe Sá*, *Jéssica Fiorotti*, *Maria Clemente*, *Giselle Jones*, *Ricardo de Oliveira Barbosa*, *José Luiz Paixão*, *Adônis Rodrigues de Lima*, *Laura Meireles*, *Thaís Almeida*, *Emily Mesquita* e *Julie Tavares*.

Aos meus amigos pessoais *Vinicius Vasconcellos*, *Bruna Patrícia Siqueira Raimundo*, *Candida Lucena*, *Bruna Fernanda*, *Arthuro Romero* e *Davy Hidalgo Cháves* pelos trabalhos em equipe, por todos os momentos de descontração, companheirismo, prosas, churrascos e ajudas durante os experimentos.

À minha companheira, amiga e porto seguro *Maryella Resende* que muito tem se dedicado a estar ao meu lado e me fazer feliz a cada dia.

Aos professores do Programa de *Pós-Graduação em Ciência Veterinárias - PPGCV* por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do *Laboratório de Hemoparasitos e Vetores* e funcionários da *Estação Experimental Wilhelm Otto Daniel Martin Neitz* e do *Departamento de Parasitologia Animal* da UFRRJ que contribuíram para a minha formação.

À *Capes* e ao *CNPq* por todos estes anos ter fornecido a mim a bolsas de Mestrado e o financiamento dos projetos.

E, por fim, a todos que de certa forma ajudaram direta ou indiretamente na elaboração deste manuscrito.

Muito obrigado por tudo.

BIOGRAFIA

Allan Felipe Marciano, filho de Antônio Fernandes Marciano e Maria Aparecida de Fátima Marciano, nasceu em 06 de Abril de 1990, no município de São José dos Campos, SP.

Estudou de 2005 a 2008 na Escola Estadual Benedito Matarazzo, localizado no município de São José dos Campos, onde concluiu o Ensino Médio.

Em Setembro de 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em Janeiro de 2015.

Durante o período da graduação, foi bolsista técnico acadêmico em Doenças Parasitárias no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ, estagiário no Hospital de Grandes Animais e no Setor de Reprodução Animal da mesma universidade.

Em 2011, sob orientação da Prof^a. Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt ingressou no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, como bolsista de Iniciação Científica permanecendo até o final de sua graduação.

Durante todo o período de vida acadêmica, participou de Congressos e Simpósios, tendo publicado junto ao grupo de pesquisa resumos e trabalhos científicos em revistas especializadas nacionais e internacionais.

Para alcançar o título de bacharel em Medicina Veterinária, realizou seu trabalho de conclusão de curso na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Gado de Leite e na Cooperativa de Laticínios de São José dos Campos.

Em Março de 2015 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

MARCIANO, Allan Felipe. **Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): Uso de formulações oleosas de *Metarhizium* spp. em condições seminaturais.** 2016. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é considerado um dos principais agentes de parasitismo em bovinos por representar significativas perdas econômicas na pecuária de leite e corte. Sendo o fungo *Metarhizium* spp, um promissor agente biocontrolador para este artrópode, por apresentar grande virulência e eficácia contra este ectoparasita. Agentes microbianos quando lançados a campo, podem sofrer grande influência pelas intempéries ambientais, devendo estes receberem componentes que favoreçam a sua patogenicidade, permanência e viabilidade no ambiente, a fim de atingirem resultados satisfatórios. Visto isto, diferentes veículos oleosos vêm sendo alvos de estudos como componentes adjuvantes. O objetivo deste trabalho foi investigar, sob condições seminaturais, a permanência no solo, a virulência e a eficácia de dois isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* s.l. (ARSEF 3641 e CG 148) formulados em óleo (soja e mineral) sobre fêmeas de *R. microplus*, assim como a taxa e recuperação de larvas. O fungo foi produzido em massa a partir do cultivo dos isolados em arroz e para a formação do ambiente seminatural, sementes de *Brachiaria brizantha*, cultivar Marandu, foram plantadas em vasos de polipropileno. O experimento foi composto por sete grupos: Controle CTR (grupo sem tratamento); Controle OLV (tratado com óleo vegetal e Tween 80 a 0,1%), Controle OLM (tratado com óleo mineral e Tween 80 a 0,1%), Tratado 3641 OLV (tratado com o isolado ARSEF 3641 + óleo vegetal + Tween 80 a 0,1%); Tratado 3641 OLM (tratado com o isolado fúngico ARSEF 3641 + óleo mineral + Tween 80 a 0,1%); Tratado CG 148 OLV (tratado com o isolado 148 + óleo vegetal + Tween 80 a 0,1%); Tratado CG 148 OLM (tratado com o isolado CG 148 + óleo mineral + Tween 80 a 0,1%). Cada grupo conteve dez vasos. Foram pulverizados sobre a superfície do solo de cada vaso, 80ml da formulação a 10^8 conídios/ml de acordo com o grupo proposto para cada formulação e posteriormente 5 fêmeas ingurgitadas de peso médio e homogêneo foram adicionadas em cada vaso. Os mesmos foram vistoriados diariamente para a avaliação da mortalidade das fêmeas. O percentual de eficácia das formulações dos isolados testados foi obtido a partir da comparação entre o número de larvas vivas coletadas no ápice das folhas da forrageira dos grupos controles e dos grupos tratados. A coleta de larvas foi realizada no 7º, 14º e 21º após a eclosão das mesmas. Para a avaliação da presença de *Metarhizium* spp. no solo, foi estabelecido e validada uma metodologia para a quantificação do número de colônias encontradas em amostras coletadas de cada vaso antes da pulverização e no 3º, 7º, 21º e 60º dia após o tratamento. A validação do método se fez pelo confronto da avaliação de três observadores utilizando o teste Kaapa. Para a análise estatística dos demais dados, os mesmos foram submetidos à distribuição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk sendo classificados como não paramétricos e foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para análise de variância, seguido do Student-Newman-Keuls para comparação entre as ordenações médias. Os grupos tratados com as formulações fúngicas oleosas apresentaram eficácia média no controle de *R. microplus* variando entre 85,08 e 96,13% em relação aos seus respectivos grupos controles durante o período de avaliação do número de larvas infestantes. O isolado ARSEF 3641 formulado tanto em óleo vegetal quanto em óleo mineral apresentou os melhores percentuais de eficácia. Durante o período de postura das fêmeas, foi possível encontrar a exteriorização de *Metarhizium* sp. nas mesmas em todos os grupos tratados com as formulações fúngicas, confirmando a capacidade dos isolados fúngicos em se manterem e realizarem todas

as fases de desenvolvimento sobre o artrópode em condições seminaturais. Ambos os isolados testados, nas duas condições de formulações propostas, mostraram-se aptos a permanecerem ativos no ambiente seminatural, virulentos e eficazes contra fêmeas de *R. microplus*, sendo capazes de reduzir significativamente gerações futuras do carrapato.

Palavras-chave: fungo entomopatogênico; carrapato dos bovinos; reisolamento; Adjuvantes; solo.

ABSTRACT

MARCIANO, Allan Felipe. *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) Control: *Metarhizium* spp. oil-based formulations in semi-natural conditions. 2016. 67p. Dissertation (Master Science in Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The tick *Rhipicephalus microplus* has been considered the most important parasite in cattle. It causes economic loss in dairy and beef cattle. As the fungus *Metarhizium* spp., a promising biocontrol agent, with remarkable virulence and efficacy against this arthropod. Environmental conditions can directly influence entomopathogenic fungal activity when it is released on the field. Therefore, adjuvants should be used to enhance fungal pathogenicity, stability and viability under unfavorable environmental conditions. Accordingly, several oily vehicles have been studied as adjuvant components. The present study aimed to investigate under semi-natural conditions, the permanence of fungi in the soil, the pathogenicity and the efficacy of two isolates of *Metarhizium anisopliae* sensu lato (ARSEF 3641 and CG 148) formulated in oil (soy and mineral), on engorged females of *R. microplus*. The fungus was mass produced on rice cultivation and the semi-natural environment was framed from pots with *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. The experiment was composed of seven groups: Control OLV (treated with vegetable oil and 0,1% of Tween 80), Control OLM (treated with mineral oil and 0,1% of Tween 80), Treated 3641 OLV (treated with isolated ARSEF 3641 + vegetable oil); Treated 3641 OLM (treated with ARSEF 3641 isolated + mineral oil); Treated CG 148 OLV (treated with CG148 isolated + vegetable oil); Treated CG 148 OLM (treated with CG 148 isolated + mineral oil). Each group contained ten pots. The soil of each pot was sprayed with 80 ml of formulation at 10^8 conidia/ml in accordance with the proposed group. Afterwards, 5 engorged females were put on each pot. All pots were daily inspected for evaluating the percent mortality of females. The efficacy of formulations tested was obtained by comparison of the number of live larvae collected at the apex of forage leaves of the control groups with the number of larvae from the treated groups. The collection of larvae was held on the 7th, 14th and 21st after the hatch. To evaluate the presence of *Metarhizium* spp. in the soil, a methodology was established to quantify the colonies number found in samples collected from each pot before the spraying and at 3th, 7th, 21th and 60th day after treatment. For the standardization of the methodology set out in the quantification of colonies in the soil, data from three evaluators were confronted by Kaapa test, the statistical analysis of data were submitted to the distribution of normality by the Shapiro-Wilk test. Data were analyzed as nonparametric and we used the Kruskal-Wallis test for analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls to compare the mean. The tested oil fungal formulations showed daily efficacy ranging between 85,08 and 96,13% compared to their respective controls. The group treated with isolated ARSEF 3641 formulated both in mineral oil and vegetable oil showed the better efficacy when compared to the respective control groups. Also, during tick females' laying period, it was possible to observe *Metarhizium* spp. externalization on *R. microplus* engorged females cuticle in all groups that were exposed to fungal formulations, confirming the ability of these fungal isolates to develop all growth stages over this arthropod in semi-natural conditions. Both fungal isolates formulated in vegetable or mineral oil showed to be able to remain active in semi-natural environment as they were pathogenic and effective against engorged females, and able to reduce significantly future generations of the tick.

Keywords: entomopathogenic fungi, cattle tick, re-isolation, adjuvants, soil.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Isolados de *Metarhizium* sp., hospedeiro ou substrato fonte do isolamento, regiões geográficas de origem e espécie. 17
- Tabela 2** – Método de mensuração de colônias fúngicas, baseado no número de cruces (+) que categoriza a quantidade de colônias isoladas em placas de Petri após a inoculação das amostras de solo em meio seletivo CTC para *Metarhizium* sp..... 30
- Tabela 3** – Intervalos de medidas de concordâncias interobservadores, segundo o teste Kappa, em uma determinada avaliação..... 30
- Tabela 4** – Média e desvio padrão da mortalidade acumulativa (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos dias de avaliação após a exposição das mesmas em solo não tratado (CTR) ou trado com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com os isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM), em condições seminaturais..... 35
- Tabela 5** - Número médio por dia de coleta e número total de larvas infestantes provenientes de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, expostas ao solo não tratado (CTR) ou trado com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com os isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM) em condições seminaturais..... 38
- Tabela 6** - Eficácia (%) da aplicação direta no solo de formulações oleosas de *Metarhizium anisopliae* s.l., sobre a taxa de recuperação larvas infestantes provenientes de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao ambiente não tratado (CTR) ou trados com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com o isolado ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), formulação com o isolado ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), formulação com o isolados CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou formulação com o isolado CG148 + óleo mineral (148 OLM), em condições seminaturais. 39
- Tabela 7**- Comparação da intensidade da concordância entre as avaliações feita por três observadores (OBS) do número de colônias de *Metarhizium* sp. em placas de Petri contendo meio seletivo (CTC - Meio BDA acrescido de Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Avaliação dos grupos tratado com os isolados CG 148 ou ARSEF 3641 de *Metarhizium anisopliae* s. l. formulados em óleo mineral ou óleo de soja. A concordância foi mensurada utilizando o método de análise Kappa, onde o valor máximo é igual a 1, o que representa total concordância ou quanto mais próximos de 1 os valores indicam a concordância esperada pelo acaso, se negativos ou próximo de zero indicam nenhuma concordância. 41
- Tabela 8** – Mensuração feita segundo o método de cruces (+) da quantidade de colônias por dia (3°, 7°, 21° e 60°) isoladas do solo dos diferentes grupos após o tratamento de dez vasos com formulações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM) e mantidos em condições seminaturais..... 43

Tabela 9 - Mensuração feita segundo o método de cruces (+) da quantidade de colônias isoladas por grupo nos diferentes dias de coleta (3º, 7º, 21º e 60º dia) após o tratamento de dez vasos com formulações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM) e mantidos em condições seminaturais.....45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Isolamento de colônias de *Metarhizium* sp. e outras colônias de fungos contaminantes (setas laranjas) em meio seletivo CTC a partir de amostras de solo. A: Placa sem colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com sinal de menos (-) contendo apenas colônias de fungos contaminantes (setas); B: Placa contendo de 1 a 25 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com uma cruz (+) e apresentando colônias de fungos contaminantes (setas); C: Placa contendo de 26 a 50 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com duas cruces (++) e apresentando colônia de fungo contaminante (seta); D: Placa contendo de 51- 75 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com três cruces (+++) e apresentando colônia de fungo contaminante (seta); E: Placa contendo colônias mais de 76 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com quatro cruces (++++). 29

Figura 2 – Variação diária da umidade relativa (UR), máxima (Max), média (Méd), mínima (Mín) e precipitação (mm) durante os 60 dias de avaliação experimental, com destaque (*) dos dias de coletas de solo para o acompanhamento da presença de *Metarhizium* sp. no solo dos vasos mantidos em condições seminaturais. 32

Figura 3 - Variação da temperatura (T) máxima (Máx), média (Méd) e mínima (Mín) durante os 60 dias de avaliação experimental, com destaque (*) dos dias de coletas de solo para o acompanhamento da presença de *Metarhizium* sp. nos vasos mantidos em condições seminaturais. 33

Figura 4 - Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* coletadas 20 dias após a aplicação de formulação oleosa contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. sobre o solo e mantidos em condições seminaturais. Todas apresentando exteriorização fúngica de coloração verde sobre a cutícula (característica de *Metarhizium* sp.). A: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado CG 148 formulado em óleo vegetal, com pouca postura e de aspecto ressecado. B: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado CG 148 formulado em óleo mineral com pouca postura de aspecto ressecado. C: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo mineral antes de realizar postura. D: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo vegetal com pouca postura. Setas vermelhas indicam a postura. 36

Figura 5 - Variação do número médio de larvas (log 10) de *Rhipicephalus microplus* recuperadas dos ápices da forrageira *Brachiaria brizantha* 7, 14 e 21 dias após o início da eclosão. Larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas expostas ao solo não tratado (CTR) ou tratado com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com os isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM), em condições seminaturais. 37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2	Controle Microbiano e a Utilização de Fungos Entomopatogênicos	4
2.3	<i>Metarhizium anisopliae</i>	7
2.4	Intempéries ambientais	9
2.5	Formulações Fúngicas	12
2.6	Óleos como adjuvantes em formulações	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Local de Realização dos Experimento	16
3.2	Monitoramento das condições climáticas	16
3.3	Manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
3.4	Obtenção dos Isolados Fúngicos	16
3.5	Produção dos Conídios em Arroz	17
3.6	Preparo das Formulações Oleosas	17
3.7	Preparação dos Vasos e Cultivo de <i>Brachiaria brizantha</i>	17
3.8	Delineamento experimental	18
3.9	Ensaio biológico em condições seminaturais	18
3.9.1	Avaliação da mortalidade das fêmeas ingurgitadas e recuperação das larvas do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> após tratamento dos vasos com as formulações fúngicas	18
3.10	Viabilidade dos conídios	19
3.11	Isolamento e identificação de colônias de <i>Metarhizium</i> spp. para a avaliação da persistência do fungo no solo	19
3.11.1	Isolamento fúngico e identificação a partir do solo	19
3.11.2	Padronização da técnica de mensuração da quantidade de colônias	19
3.11.3	Isolamento fúngico e identificação a partir de <i>Rhipicephalus microplus</i>	30
3.12	Análise Estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Condições Climáticas	31
4.2	Viabilidade das formulações	34
4.3	Ensaio em Condições Seminaturais	34
4.3.1	Avaliação da mortalidade de fêmeas ingurgitadas	34
4.3.2	Isolamento de <i>Metarhizium</i> sp. a partir de fêmeas ingurgitadas	36
4.3.3	Avaliação no número de larvas	37
4.3.4	Percentual de eficácia dos tratamentos	39
4.4	Reisolamento de <i>Metarhizium</i> sp. a partir do solo	39
4.4.1	Mensuração da presença de <i>Metarhizium</i> sp – Análise de concordância	39
4.4.2	Reisolamento de <i>Metarhizium</i> spp dos solos tratados	42
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

2 INTRODUÇÃO

A pecuária tem papel fundamental na economia mundial, sendo o Brasil um protagonista no cenário da bovinocultura. Porém, a produtividade bovina muitas vezes é desacelerada por diversos fatores, dentre eles o parasitismo é causador direto de prejuízos para os pecuaristas e/ou empresários rurais.

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*, é um importante ectoparasita de difícil controle, que transmite patógenos e ocasiona estresse aos animais, provoca espoliação sanguínea, danos ao couro, impacta negativamente nos índices zootécnicos e conseqüentemente reduz a produção de leite e carne.

Visto que a maior parte do rebanho bovino nacional é criada a pasto, e que 95% da população de carrapatos de uma propriedade está contida no ambiente, torna-se necessário estudos de alternativas de controle deste artrópode em seu local de maior ocorrência.

No manejo integrado de pragas destaca-se o controle biológico, essa técnica é uma alternativa à utilização exclusiva dos produtos químicos. Além disso, limita o desenvolvimento de resistência as bases sintéticas e também atende ao mercado consumidor que atualmente procura por produtos livres de componentes tóxicos.

Considerando as técnicas de controle biológico, a utilização de fungos entomopatogênicos é promissora para o controle de artrópodes. Esses microrganismos cosmopolitas possuem capacidade de infecção ativa (sem a necessidade de ingestão pelo hospedeiro), são comumente encontrados no solo e têm demonstrado bons resultados em testes *in vitro* e *in vivo* no controle do carrapato bovino.

Dentre os microrganismos patogênicos para artrópodes o fungo *Metarhizium* spp. é amplamente utilizado para controle de diversas pragas no mundo. Muitos produtos comerciais estão no mercado ou em fase de desenvolvimento, porém, a grande maioria destes para uso agrícola. Entretanto, pesquisas mostram o potencial patogênico deste agente para artrópodes de importância veterinária, tornando-o promissor para uso no controle biológico na pecuária.

O gênero *Metarhizium* apresenta uma grande variabilidade genética, podendo apresentar isolados que possuem diferentes especificidades para artrópodes. Variando dentre outros aspectos, o grau de virulência, a patogenicidade, a resistência à dessecação, a tolerância à temperatura e a tolerância à radiação Ultravioleta (UV).

Sendo assim, para obter um produto eficaz, devem ser selecionados isolados fúngicos com características desejáveis. Considerando a especificidade à praga alvo, as condições (temperatura, umidade, luminosidade) a qual será armazenado e onde este microrganismo será aplicado.

Tratando-se da utilização de bioagentes a campo, quando o mesmo é lançado no ambiente e exposto às intempéries locais, essas podem reduzir sua atividade. Frente a isso, torna-se necessário formulá-lo, ou seja, associar adjuvantes que irão garantir o sucesso do biocontrolador.

Os óleos emulsionáveis são classificados como adjuvantes, garantindo ao produto características como: melhor espalhamento, possibilidade de aplicação com equipamentos convencionais e proteção aos conídios. Também aumentam a infectividade do fungo, diminuem a evaporação e minimizam a ação deletéria dos raios UV sobre os conídios.

Óleos vegetais e minerais possuem características químicas diferentes. Apresentam divergências quanto a estabilidade ambiental, à toxicidade ao artrópode ou aos microrganismos aos quais são formulados. Além disso podem também variar o custo de produção.

Muitas pesquisas mostram os efeitos benéficos de formulações oleosas em diferentes condições e formas de aplicação. A fim de elucidar pontos chaves para sua futura utilização em pastagem, esse trabalho comparou a utilização de dois diferentes veículos oleosos na elaboração de uma formulação bioacaricida. Um a base de óleo mineral (Vaselina líquida) e outro a base

óleo de soja (vegetal). Analisando frente as adversidades ambientais a eficácia do produto, a virulência e a sobrevivência do agente controlador sobre o carrapato *R. microplus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Rhipicephalus microplus*

A espécie *Rhipicephalus microplus*, é amplamente conhecida como carrapato dos bovinos. Dentre os artrópodes, um dos que representam maior interesse econômico na América Latina e em outras partes do mundo, sendo o motivo de grande preocupação para os pecuaristas por influenciar diretamente na produtividade animal (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Encontra-se distribuído nos rebanhos bovinos das Américas Central e do Sul, África, sudoeste da Ásia (NUÑEZ et al., 1982; ESTRADA-PEÑA et al., 2012). Segundo Powell (1982) este parasito tem como origem o continente asiático e adaptou-se perfeitamente ao clima das áreas tropicais ocidentais, onde temperatura e umidade propiciam condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie.

Foi introduzido em regiões tropicais e subtropicais, mais especificamente nas Américas, pela importação do gado bovino por colonizadores (WHARTON, 1974; GEORGE, 1987). No Brasil, sua introdução parece ter acontecido no início do século XVIII no sul do país, devido à compra de animais advindos do Chile e posteriormente, espalhou-se por todo território nacional, onde sua população varia de acordo com as condições climáticas e os tipos raciais de bovinos explorados (GONZALES, 1995).

O carrapato *R. microplus* pertence ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). A partir de estudos moleculares, morfológicos e de análises filogenéticas, Murrel e Barker (2003), evidenciaram que algumas espécies de *Rhipicephalus* (Koch, 1844) são mais estreitamente relacionadas às espécies de *Boophilus* (Curtice, 1891) do que para outras espécies de *Rhipicephalus*. Sugerindo então que *Boophilus* fosse mantido como um subgênero de *Rhipicephalus*, tornando-o assim *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, uma sinônimia de *Boophilus microplus*.

No ciclo de vida dos ixodídeos, após a eclosão das larvas existe apenas um estágio ninfal e posteriormente se desenvolvem em adultos prontos para a cópula. Dentre estes, o carrapato *R. microplus* caracteriza-se pela predileção em parasitar um único hospedeiro (monoxeno), isto é, depende de apenas de um único animal para realizar todo seu ciclo de vida, preferencialmente os bovinos (SONENSHINE, 1991).

O carrapato dos bovinos apresenta duas fases distintas e complementares: Uma de vida livre ou não parasitária, que tem início com o desprendimento da fêmea ingurgitada do hospedeiro. No solo, a fêmea tem o período de pré-postura, onde procura locais abrigados do sol e úmidos, iniciando a digestão dos componentes do sangue para a formação dos ovos. Três dias depois de sua queda no solo, inicia a postura.

Considerando o período de oviposição e maturação dos ovos, em função da umidade e da temperatura, os ovos, em torno de três mil por fêmea, se desenvolvem e originam as larvas num período médio de 60 dias nos meses quentes e úmidos do ano e 120 dias nos meses frios e secos na região do Brasil-Central (FURLONG, 2005). Dois a três dias após a eclosão, a larva apresenta sua cutícula fortalecida e está apta para subir nas pastagens por geotropismo negativo (FURLONG, 2005; SONENSHINE, 1991).

O crescimento populacional de *R. microplus* no ambiente depende, entre outros fatores, das condições climáticas e do tipo de forrageira que constitui a pastagem (GAUSS; FURLONG, 2002). No Brasil, registros de longevidade larval no Rio Grande do Sul mostraram capacidade de sobrevivência larval por até 36 semanas. Por outro lado, em períodos de verão no Sudeste brasileiro, a maioria das larvas morre ou perde seu poder infestante, a partir de 60 dias devido ao clima mais quente e seco (GUGLIELMONE et al., 2006; BARROS-BATTESTI et al., 2006).

A fase de vida parasitária, se inicia quando a larva se fixa no hospedeiro, e dura em média 18 a 26 dias. Neste período, sempre após a alimentação ocorre a troca da cutícula e o desenvolvimento para os estágios de ninfa e adulto. O acasalamento acontece a partir do 17º dia da infestação (LONDET; ARTUR, 1975). O ingurgitamento ocorre em torno de 24 horas antes da queda. Uma vez repleta, tendo aumentado cerca de duzentas vezes o seu peso, a fêmea se desprende do animal, de preferência nas primeiras horas da manhã para dar início a fase seguinte (FURLONG, 2005). O macho permanece por um período maior sobre o hospedeiro e copula com outras fêmeas (FURLONG; 1993).

É importante ressaltar que, durante todo o período de parasitismo, as infestações por carrapatos em diferentes estágios geralmente se sobrepõem, ou seja, infestações com novas larvas ocorrem antes do desprendimento das primeiras fêmeas ingurgitadas, tornando-se perpétua a formação de novos adultos e exponencialmente o surgimento a de novos descendentes nas pastagens (FACCINI; BARROS-BATTESTI, 2006).

Sabe-se que aproximadamente 95% dos carrapatos estão na vegetação (fêmeas ingurgitadas em postura, ovos em incubação e larvas esperando o hospedeiro) e 5% estão parasitando os bovinos (larvas, ninfas e adultos) (POWELL, 1982). Entretanto, a maioria dos estudos e tecnologias, estão direcionados a apenas aos 5% da fase parasitária, por ser o estágio que causa os prejuízos diretos (hematofagismo e lesões na pele) e indiretos (babesiose e anaplasmose bovina) (calcAS, 2001).

O carrapato dos bovinos é considerado um dos principais agentes de parasitismo, causando graves prejuízos à bovinocultura brasileira, causando perdas de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2014). Além dos danos diretos causados pelo parasitismo (espoliação sanguínea e do couro) o carrapato é um importante transmissor de patógenos, causador de estresse que levam a redução da produtividade, além do aumento dos custos com a produção bovina, mediante a aquisição de produtos para a manutenção da sanidade do rebanho, mão de obra e reposição de animais (CASTRO; NEWSON, 1993; MONTEIRO et al., 2003; ROSÁRIO-CRUZ et al., 2009; GRISI et al., 2014).

A identificação de substâncias químicas com propriedades acaricidas, levou rapidamente à adoção de acaricidas químicos como o método predominante de controle do carrapato em todo o mundo (GUERRERO, 2012). Porém, os artrópodes estão em constante adaptação e por mais bemfeita que seja a aplicação de carrapaticidas nas propriedades os carrapatos desenvolvem mecanismos de resistência (FURLONG; MARTINS, 2000). Os principais mecanismos dos carrapatos para que sobrevivam à aplicação dos carrapaticidas são: redução na taxa de penetração do produto; mudanças no metabolismo, armazenamento e eliminação do produto e alterações no local de ação das moléculas, possibilitando ao parasito uma menor sensibilidade aos efeitos provocados pelo acaricida (FURLONG, 1992).

Existem diversas formas de controle integrado para este parasita, como: utilização de animais geneticamente resistentes; controle imunológico através do desenvolvimento de vacinas e homeopatia; gerenciamento de pastagem com alternância de espécies animais e utilização de forrageiras; controle biológico; rotação de pastagem; introdução de carrapatos machos estéreis na população (LEAL et al., 2003; GAZIM, 2010; VERISSIMO, 2013). Sendo assim, já há algum tempo estratégias alternativas, como o uso de vacinas, fitoterápicos e agentes de controle biológico estão sob intenso estudo e aperfeiçoamento (GEORGE, 2000).

3.2 Controle Microbiano e a Utilização de Fungos Entomopatogênicos

O controle biológico foi definido por DeBach (1968) como “a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências”. Alves (1998), por sua vez, traz uma definição mais contemporânea, onde o controle microbiano é a principal meta da patologia

de insetos e representa um ramo do controle biológico, ressaltando a utilização racional dos patógenos, tendo em vista a manutenção da população de pragas.

Uma vez que os fungos são grandes causadores de patologias em insetos e ácaros pragas, esses tornam-se responsáveis pela regulação natural da população de artrópodes (MASCARIN; PAULI, 2010). Sendo que, dentre os microrganismos patogênicos para os artrópodes os fungos possuem larga variabilidade genética e capacidade de atuar em diversos estádios de seus hospedeiros, uma vez que infectam ativamente as superfícies quitinosas que os acompanham durante todas as suas fases de vida. Também possuem relativa especificidade, dando-os a qualidade de interessantes agentes para o controle de pragas (ALVES, 1998; SAMISH et al., 2004).

Porém, sob determinadas condições, epizootias naturais de fungos entomopatogênicos nativos podem suprimir populações de artrópodes-praga. Entretanto, as epizootias de ocorrência natural não podem ser consideradas como uma forma de controle previsível, pois ocorrem esporadicamente, geralmente não são cíclicas e dependem de vários fatores bióticos e abióticos para se desencadarem, principalmente em agroecossistemas com constante intervenção antrópica (MASCARIN, 2010).

Entretanto, uma das principais vantagens da utilização de fungos no controle biológico de insetos pragas está na facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial, facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo em práticas agrícolas, e principalmente, o reduzido impacto ambiental nos programas estabelecidos até hoje (ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011). Além disso, foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano, sendo que aproximadamente 80% das doenças têm como agentes etiológicos os fungos (ALVES, 1998).

Antigamente os fungos entomopatogênicos eram colocados no filo Deuteromycota e classe Hyphomycetes (fungos anamórficos/assexuados), tais como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium* spp., *Hirsutella* spp., *Isaria* spp. (= *Paecilomyces* spp.) entre outros. Com a identificação da fase teleofórmica (sexual) desses microrganismos na natureza (gêneros: *Cordyceps*, *Torrubiella* ou *Hypocrella*), eles foram classificados no filo Ascomycota (HUMBER, 2007).

Diversos estudos apontam que a versatilidade de isolados dentro da mesma espécie de fungos artropodopatogênicos está intimamente relacionada a diferentes níveis de virulência para vários hospedeiros (inclusive carrapatos), por inferir nos aspectos morfológicos e fisiológicos destes microrganismos, principalmente no processo de infecção (ALVES, 1998; LOMER et al., 2001; FERNANDES et al., 2004; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; FERNANDES et al., 2010).

A infecção por fungos ocorre pela penetração da cutícula através de processos químicos (como digestão enzimática) e processos físicos (pressão mecânica) (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Tal característica favorece o desempenho no ambiente e utilização no controle de pragas, uma vez que o mesmo não necessita ser ingerido pelo hospedeiro (MADELIN et al., 1967).

Numa escala dos fungos mais utilizados como ingredientes ativos de micoinseticidas no mundo estão: *Beauveria bassiana* s. l., *Metarhizium anisopliae* s. l., *Isaria fumosorosea*, e *B. brongniartii* respectivamente. (FARIA, 2007). Além destas espécies citadas anteriormente, já foram descritos ação patogênica do fungo *Lecanicillium lecanii*, para artrópodes das classes Insecta e Arachnida (CHANDLER et al., 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; ANGELO, 2010).

O desenvolvimento de pesquisas tem aumentado significativamente nos últimos anos, sendo crescente o número de biopesticidas à base de fungos desenvolvidos para o controle de insetos e ácaros em diversos ambientes. Muitos destes trabalhos discutem a eficácia, a forma de aplicação, a patogênese, as tendências futuras e os aspectos regulatórios dos micoinseticidas (COPPING; MENN, 2000; NEALE, 2000; INGLIS et al., 2001; WRAIGHT et al., 2001;

CASTRILLO et al., 2005, POLAR et al., 2005; FERNANDES, BITTENCOURT; ROBERTS, 2012; CAMARGO et al., 2012; PERINOTTO et al., 2013; MARCIANO et al., 2013; CAMARGO et al., 2014; SAMISH et al., 2014).

Segundo Copping e Menn (2000), o emprego de biopesticidas ainda era limitado, porém, a longo prazo teria um potencial para desenvolver-se em outras áreas da ciência, visto que há uma maior aceitação pelos produtores devido a tendência atual da produção orgânica e pelo fato de possibilitar a utilização conjunta com os pesticidas químicos, reduzindo assim suas taxas de utilização.

A compatibilidade entre um acaricida químico e biológico, foi reportado por Bahiense et al. (2008), o qual mostrou a possibilidade de utilização da Deltametrina com os fungos *B. bassiana* s.l. e *M. anisopliae* s.l. como ferramenta para o manejo integrado de *R. microplus* sob condições naturais.

Bahiense et al. (2008), avaliaram *in vitro* a associação entre Deltametrina e o fungo *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *R. microplus* resistentes a piretroide, observando que a população de carrapatos era resistente, mas taxas de mortalidade elevadas foram alcançadas quando o produto químico foi associado com artropodopatógeno, indicando que esta associação pode ser usada como no controle integrado do carrapato bovino.

Os estudos com fungos entomopatogênicos no país começaram em 1923, quando Pestana identificou duas espécies de cigarrinhas infectadas por *M. anisopliae*, que naquela ocasião foi denominado de *Penicillium anisopliae*. Esta espécie também foi utilizada no primeiro trabalho de pulverização realizado no país, no controle a cigarrinha *Tomaspsis liturata* (ALVES; FARIA, 2003).

Nas últimas décadas a necessidade de novas tecnologias na pecuária e o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de carrapatos tem aumentado, visto que a utilização exclusiva de carrapaticidas está a cada dia menos viável frente ao cenário atual de resistência e uso indiscriminado de produtos químicos, tornando o controle biológico com fungos uma tecnologia promissora a ser empregada para o controle desta praga (BARROS; EVANS 1989, GARCIA et al., 2011).

Diversos estudos reportaram a virulência dos fungos artropodopatogênicos para carrapatos em condições de laboratório (BITTENCOURT et al., 1994; REIS et al., 2001; FERNANDES et al., 2004, FERNANDES et al., 2006; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; ANGELO et al., 2010; SAMISH, 2014). Dentre todas as espécies de fungos testadas, as dos gêneros *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. mostram-se potencialmente melhores para o controle de carrapatos do mundo inteiro como *Dermacentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma cajennense* s.l., *R. appendiculatus*, *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. (B.) microplus* (MWANGI et al.1995; KAAYA et al. 1996; KAAYA; HASSAN, 2000; GINDIN et al., 2001; LOPES, 2007; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; SOUZA, 2009; PERINOTTO, 2013).

Além de testes em laboratório, existem alguns trabalhos a campo envolvendo o emprego de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos, ao qual vêm demonstrando uma promissora utilização a campo (BAHIENSE, 2008; KAAYA, 2011; GARCIA et al., 2011; CAMARGO et al., 2014; SAMISH et al., 2014)

Camargo et al. (2014), demonstraram em testes com bovinos estabulados que após formular com óleo mineral um produto a base de *M. anisopliae* s. l. utilizado na agricultura, o mesmo foi capaz de controlar o carrapato *R. microplus*. Estudos a campo de Samish et al. (2014) também mostraram resultados positivos para o controle de *Rhipicephalus annulatus* quando expostos ao solo artificialmente contaminado com *Metarhizium brunneum*.

É importante ressaltar que o controle microbiano não é proposto como substituto do controle químico, mas, o que se pode afirmar é que ambos podem conviver sinergicamente; nesta tentativa, alguns conceitos de manejo integrado têm sido testados, mas a sua utilização

ainda deve ser mais explorada (MESSIAS, 1989). Desta forma, faz-se necessária a preservação e o conhecimento destes microrganismos, por conseguinte, é importante conhecer a compatibilidade do uso de entomopatógenos e outras medidas de controle, além das possibilidades de serem utilizados na agropecuária a fim de evitar o insucesso do controle microbiano (HIROSE et al., 2001).

3.3 *Metarhizium anisopliae*

O início dos estudos com o gênero *Metarhizium* sp. datam o ano de 1879, quando Metschnikoff o isolou de lavas do besouro *Anisopliae austriaca*, classificando-o como *Entomophthora anisopliae*. Posteriormente, em 1880, o mesmo foi descrito como *Isaria destructor*. Em 1833 Sorokin, classificou este fungo como *Metharhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, permanecendo assim até os dias de hoje (LIMA, 1989; ALVES, 1998).

Entretanto, ao longo dos tempos diversas alterações vêm sendo propostas por taxonomistas, desde revisões ortográficas nomenclaturais, como reportado por Roberts; Leger (2004), até modificações taxonômicas baseadas em características morfológicas como em 1976, por Tulloch. Este último autor, promoveu uma revisão taxonômica do gênero, admitindo apenas duas espécies, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae*, sendo esta última dividida nas variedades *major* e *anisopliae*.

Desde então, novas pesquisas foram conduzidas com o advento da biologia molecular, juntamente com outros estudos morfológicos, (LIANG et al., 1992; DRIVER et al., 2000; LIU et al., 2002; PANTOU et al., 2003; SUNG et al., 2007). Tais estudos possibilitaram a diferenciação do gênero *Metarhizium* sp. em duas fases, uma sexuada e outra assexuada. A forma teleomórfica (sexuada) é denominada Cordyceps, tendo descritas três espécies: *C. brittlebankisoides* (LIU et al., 2001), *C. taii* (LIANG et al., 1991) e *C. camposterni* (ZHANG et al., 2004). Sung et al. (2007) propuseram uma nova nomenclatura para o gênero *Metarhizium* sp. em sua forma teleomórfica, de *Cordyceps* para *Metacordyceps*.

A forma anamórfica (assexuada) possui uma classificação mais recente, proposta por Bischoff et al. (2009), que avaliaram a partir de relações filogenéticas multigênicas um grupo monofilético, dentro do que classificaram como complexo *Metarhizium anisopliae*, caracterizando-o em nove espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. brunneum*, descrevendo também duas novas espécies, *M. globosum* e *M. robertsii*.

Desta forma, os isolados pertencentes ao complexo *M. anisopliae* apresentam colônias de coloração branca em sua fase inicial, ficando normalmente amarela durante as fases de desenvolvimento dos conídios e verde quando os conídios encontram-se maduros (BISCHOFF et al., 2009).

Estes hifomicetos geralmente apresentam micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, sob os quais surgem conídios normalmente uninucleados e cilíndricos. Apresentam fiálides cilíndricas, as quais sustentam cadeias de conídios de coloração normalmente esverdeada (DRIVER; MILNER, 1998).

M. anisopliae s. l. é um fungo filamentosos, que possui uma distribuição mundial como membro da flora natural do solo, ocupando principalmente a rizosfera de plantas ou em cadáveres de artrópodes (ZIMMERMANN, 2007; SCHARANK; VAINSTEIN, 2010). Por sua capacidade de causar doenças em níveis epizooticos (grande número de insetos infectados) em populações de artrópodes, este é um dos agentes de biocontrole mais utilizados no mundo, exercendo um importante papel em programas de manejo integrado de pragas (MASCARIM; QUINTELA, 2013).

Apesar do efeito patogênico para artrópodes pragas, investigações sobre a segurança e o efeito de *M. anisopliae* s. l. contra mamíferos também foram conduzidas, primeiramente por

Schaerffenberg (1968). Mais tarde, vários aspectos relacionados a segurança da aplicação de *M. anisopliae* s. l. para o homem, outros vertebrados e organismos benéficos não-alvos foram publicados por diversos autores (STEINHAUS, 1957; HEIMPEL, 1971; BURGESS, 1981; SHADDUCK, 1982; HALL, et. al., 1982; GOETTEL, et. al., 1990, 2001; LAIRD, et. al., 1990; SAIK et. al., 1990; SIEGEL; SHADDUCK, 1990; ZIMMERMANN, 1993, 2007a, 2007b; COOK et. al., 1996; GOETTEL; JARONSKI, 1997; VESTERGAARD et. al., 2003) e vários reportando baixo riscos da utilização deste microrganismo.

Segundo Vestergaard (2003), em geral, não é possível reduzir uma população de pragas sem afetar também outros componentes do ecossistema. Entretanto, *M. anisopliae* sl. foi testado contra uma ampla gama de organismos não-alvos e os resultados foram considerados normais dentro deste contexto, visto que os efeitos no campo foram mais baixos do que aqueles encontrados em laboratório (ZIMMERMANN, 2007).

Zimmermann (2007) revisaram o risco da aplicação de *M. anisopliae* sl. para mamíferos, aves, peixes, invertebrados, relatando diversos estudos que garantem a seguridade deste agente para os diversos animais estudados. Ressalta ainda a comercialização e registo de futuros isolados de *M. anisopliae* s. l., aos quais ainda devem ser desenvolvidos regulamentos e testes, a fim de proporcionar ao manipulador e consumidor um produto de controle biológico seguro.

A prática da utilização em massa deste microrganismo no mundo começou entre 1880 e 1890, quando Metschnikoff, e mais tarde Krassiltschik, realizaram várias experiências de controle contra diversos insetos-praga na antiga União Soviética, produzindo uma grande quantidade de esporos de *M. anisopliae* s. l. em laboratório (próximo de 55 kg / 4 meses) que foram utilizados com sucesso para o controle de *Cleonus punctiventris* (ZIMMERMANN, 2007).

Segundo Alves (1998), no Brasil, *M. anisopliae* s.l. foi empregado a partir de 1975, reduzindo cerca de 72% das infestações de *Mahanarva spectabilis* sobre pastagens. Desde então é considerado o fungo mais utilizado nos programas de controle biológico, em virtude de ser um excelente agente no combate para pragas da cana-de-açúcar e da pastagem (MICHEREFF FILHO et al., 2009; LI et al., 2010).

A patogenicidade deste agente sobre *R. microplus* foi descrita em 1994 por Bittencourt e colaboradores, evidenciando a ação deste fungo sobre artrópodes de importância veterinária. Bittencourt et al. (1999) comprovaram que o mecanismo de ação deste biocontrolador, desenvolve-se por penetração no tegumento em *R. microplus*. E mais tarde Schrank e Vainstein (2010), demonstraram os processos químicos (como digestão enzimática) e processos físicos, por pressão mecânica desta etapa de infecção.

O processo de infecção de *M. anisopliae* é semelhante a outros fungos entomopatogênicos, devendo ocorrer por contato. Após a ligação do esporo com a cutícula do hospedeiro, o conídio inicia o processo de germinação e essa etapa sofre influência de fatores externos, como: umidade, temperatura, pH, oxigênio, nutrientes, podendo ainda ser afetada pela presença de substâncias químicas da superfície do artrópode e pela microbiota saprofítica (ARRUDA et al., 2005).

Posteriormente, inicia-se a germinação com o surgimento do tubo e formação do apressório, que são responsáveis pela pressão mecânica exercida sobre a superfície cuticular (ARRUDA, 2005) e química através da ação digestiva de enzimas proteolíticas, lipolíticas e quitinolíticas (ST. LEGER et al., 1986; 1992; 1995; ARRUDA, 2005; BEYS-DA-SILVA et al., 2009).

Após adentrar a cutícula, há formação de corpos hifais, também conhecidos como blastosporos, responsáveis pela nutrição do fungo com a degradação das fontes de carbono da hemolinfa dos hospedeiros (BEYS-DA-SILVA, 2009).

A hemocele do artrópode contém nutrientes importantes para manutenção e viabilidade do fungo por período prolongado, até a produção de conídios na sua superfície, que podem se disseminar infectando outros indivíduos ou permanecerem no solo (ALVES, 1998)

Com a colonização bem-sucedida e sob condições ambientais apropriadas ao desenvolvimento, inicia-se a fase saprofítica de exteriorização e conidiogênese sobre o artrópode cadáver, para posterior disseminação dos conídios sobre outros hospedeiros, e desta forma permite a continuidade do ciclo na natureza (CHANDLER et al., 2000). Caso as condições ambientais estejam muito secas, o fungo pode persistir na fase de hifas dentro do cadáver. O período de incubação depende da espécie do hospedeiro, a fase de vida do mesmo, da temperatura e umidade ambiental, assim como a virulência do isolado fúngico (ZIMMERMANN, 2007a).

A temperatura é considerada ponto chave para o sucesso do desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* e da conidiogênese deste agente, devendo variar entre 20 e 30°C (VILACORTA, 1978). Em altas temperaturas, como 40 e 45°C, não há germinação deste fungo (VIEIRA, 2007) e em temperaturas abaixo de 16°C a germinação dos conídios é nula (ALVES; NOGUEIRA, 1984).

Sendo assim, apesar do fungo *M. anisopliae* s.l. ser conhecido devido à patogenicidade que apresenta sobre um grande número de artrópodes em condições naturais, algumas dificuldades podem ocorrer quando a produção dos fungos é realizada em escala industrial e a sua aplicação é efetuada em grandes áreas (ALVES, 1998).

Visto isto, alguns pontos chave devem ser estudados como: caracterização, padronização de linhagens, métodos de produção massal de conídios, formulações, manutenção de linhagens agressivas, métodos de aplicação, compatibilidade do fungo com inseticidas, controle associado e, principalmente, os fatores que regulam epizootias nas condições de campo (ALVES, 1998).

3.4 Intempéries ambientais

Metarhizium anisopliae possui uma ampla distribuição global, ocorrendo desde climas temperados, até climas tropicais. Tal característica atribui a este organismo boa plasticidade adaptativa para diversos ambientes, tornando-o promissor agente controlador a nível mundial (ZIMMERMANN, 2007). Em especial, na América Latina o controle biológico encontra condições muito favoráveis em função do clima e por sua rica biodiversidade, resultando em um grande arsenal de inimigos naturais para pragas (MASCARIN, 2010). Porém, mesmo nos locais de maior incidência, a variabilidade dos fatores ambientais pode interferir na prevalência deste fungo, tornando fundamental a compreensão dos efeitos abióticos e bióticos na ecologia de *M. anisopliae* para o seu desenvolvido como um agente de controle biológico de sucesso (RODDAM; RATH, 1997).

Estudos ecológicos envolvendo estes agentes de controle, focalizam em dois aspectos: o primeiro são os fatores ambientais e biológicos que afetam a interação microrganismo-inseto, e o segundo refere-se à persistência e estabilidade dos patógenos após a introdução em um ecossistema. Ambos os tipos de estudos têm envolvido trabalhos realizados em laboratório e no campo para investigar a influência do tipo de solo, umidade, temperatura, luz e competição com outros microrganismos (RATH et al., 1992). Visto que, dentre os fatores ambientais que mais afetam a germinação, a esporulação e a virulência, estão: a temperatura, a umidade, a luz e o pH (BLANFORD; THOMAS, 1999).

Na utilização de biopesticidas a campo, devem ser considerados fatores abióticos, como temperatura, umidade relativa e radiação ultravioleta (UV), visto que estas intempéries podem alterar o crescimento vegetativo, a produção de conídios e a germinação fúngica, interferindo

na capacidade invasiva no artrópode alvo e conseqüentemente sua virulência (ROBERTS; YENDOL, 1971; THOMAS; JENKINS, 1997; GOETTEL et al., 2000).

Diversos são os estudos que provam ser muito variável os fatores ambientais que influenciam os artropodopatógenos, mas, particularmente a temperatura está estritamente relacionada com a taxa de infecção destes microrganismos e o tempo de morte do hospedeiro (INGLIS et al., 2001). As altas temperaturas parecem ser severamente limitantes para desempenho do patógeno em determinados momentos do desenvolvimento, interferindo significativamente no desenvolvimento, sobrevivência ou processo de infecção destes patógenos (GOETTEL; INGLIS, 2000).

Thomas; Jenkins (1997), avaliaram o efeito da temperatura para a germinação, extensão radial de hifas e esporulação no crescimento de *M. flavoviride* em gafanhotos, evidenciando que a faixa de temperatura ótima foi de 24° a 30°C. Em *M. acridum*, Arthus e Thomas (2001) encontraram uma variação maior, entre 10° a 40°C, atingindo melhores resultados quando em maiores níveis de umidade. Evidenciaram também, que a esporulação está correlacionada com o teor de água do hospedeiro.

No entanto, na maior parte das regiões tropicais existem isolados de *M. anisopliae* s. l. que são capazes de crescer a temperaturas acima de 35,8°C. Este é um dado importante por diferentes aspectos, uma vez que possibilita a estabilidade de conídios ou do produto a temperaturas elevadas; permite uma possível infecção e crescimento à temperatura do corpo dos mamíferos; melhora a avaliação da tolerância do ponto da morte térmico e aumenta a eficácia do fungo contra pragas de artrópodes de áreas tropicais e subtropicais (ZIMMERMANN, 2007).

De modo geral, a faixa favorável de temperatura para aplicação de fungos entomopatogênicos a campo é de 20 a 30°C, porém, deve existir uma temperatura ideal para cada fase do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (ALVES, 1998). Outro fator muito interessante envolvendo a temperatura é que a resistência do fungo a esta variável, pode servir para a classificação de isolados de *Metarhizium* s. l. e junto com a virulência e a especificidade do hospedeiro é um importante fator para a seleção de isolados a serem utilizados como micoinseticidas (MILNER, 2000).

A umidade também é importante, uma vez que não afeta apenas a eficácia, mas também a sobrevivência do entomopatógeno (ZIMMERMANN, 2007).

Geralmente, elevadas taxas de umidade relativa (U. R.) são necessárias para a germinação de *M. anisopliae* s. l., onde as melhores germinações ocorrem próximas a 100% de UR (WALSTAD et al., 1970). Porém, muitos patógenos encontram condições ótimas para germinar e infectar seus hospedeiros, apenas com umidade fornecida pela camada microclimática formada ao redor da folha ou tegumento do inseto (WRAIGHT et al., 2000).

A baixa UR associada a temperaturas elevadas pode causar a inviabilidade do conídio ou impedir a germinação do mesmo sobre a cutícula de carrapatos, uma vez que esta etapa exige elevados percentuais da mesma. (ZIMMERMANN, 2007).

Camargo (2014), avaliando a eficácia de um produto comercial a base de *M. anisopliae* s. l. sobre diferentes percentuais de U. R. (30, 50, 70 e 90%), verificou que suspensões aquosas e formulações oleosas foram mais eficazes no controle de *R. microplus* quando a 90% de UR, porém se reduzida para menos de 50%, apenas formulações oleosas mantinham significativo o efeito controlador quando comparada as formulações aquosas, evidenciando a interferência da umidade nos conídios não protegidos pelo adjuvante oleoso.

Dentre as intempéries ambientais, destacam-se também a radiação ultravioleta (UV), que são provenientes da luz solar e se comportam como fatores estressantes aos fungos, reduzindo gravemente a viabilidade de conídios no campo, tornando-se assim, um importante obstáculo para o sucesso da utilização de *M. anisopliae* (RANGEL et al., 2004).

Alguns trabalhos evidenciam os prejuízos que a radiação pode causar a agentes de controle microbiano, em geral, algumas horas de exposição direta a radiação solar pode desnaturar ou atrasar a germinação dos fungos entomopatogênicos, interferindo drasticamente na sobrevivência dos mesmos (BRAGA et al., 2001; RANGEL et al., 2004; ZIMMERMANN, 2007).

O dano causado pela radiação UV-B, está relacionada a alterações diretas no DNA originando mutações, enquanto pela radiação UV-A é responsável pela geração de estresse oxidativo o qual, por meio de espécies reativas de oxigênio causa dano indireto ao material genético (BRAGA et al., 2006).

No entanto, selecionar isolados naturalmente tolerantes a radiação UV, além de formulá-los com adjuvantes oleosos e protetores de UV, pode viabilizar significativamente a persistência destes fungos em habitats inóspitos, e assim aumentar a eficácia destes agentes contra as pragas alvos (FARGUES et al., 1996; GOLO et al, 2014).

Além dos efeitos diretos da radiação solar, Rangel et al. (2004), demonstraram que o estresse físico e nutritivo do meio de crescimento de fungos entomopatogênicos são fatores que podem induzir maior ou menor tolerância à radiação UVB.

Visto isto, um último fator a ser levado em consideração e que está ligado principalmente com o microambiente ao qual o fungo será submetido, é o solo, no qual a persistência do mesmo, varia com a temperatura, com o tipo de solo, umidade e antagonistas presentes (LINGG; DONALDSON, 1981). Sendo que temperaturas baixas ou medianas e valores intermediários de saturação do solo favorecem a sobrevivência dos conídios (LINGG; DONALDSON, 1981), enquanto altas temperaturas e teores de saturação elevados reduzem a sobrevivência (STUDDERT; KAYA, 1990).

Já fatores como tipo de solo, grau de compactação, pH, textura, podem exercer efeito significativo na sobrevivência dos conídios, uma vez que ambiente do solo pode ser visto como um ecossistema extremamente complexo envolvendo as interações primárias entre insetos hospedeiros e patógenos fúngicos (RATH, 1992).

Vänninen et al. (2000) avaliaram a persistência de conídios de *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* na superfície de solo argiloso no período de 1988-1991, em condições caracterizadas pela presença de neve permanente durante o inverno. Constataram que após três anos da aplicação do inóculo os propágulos de *M. anisopliae* permaneceram ativos, o mesmo não aconteceu com os de *B. bassiana*, que desapareceram.

A mobilidade de esporos de fungos no solo é influenciada pelo tipo de solo, água (da chuva), organismos no solo e pelas raízes das plantas (KELLER; ZIMMERMANN, 1989).

Há pouca informação sobre o destino e comportamento de *M. anisopliae* em superfícies aquáticas. Em contraste, existem muitos trabalhos sobre a mobilidade e persistência no solo, que relatam a aderência de conídios nos 20 cm superiores e pode persistir até 34 anos, com taxas de decaimento mensais (revisado por ZIMMERMANN, 2007).

Mobilidade e persistência estão intimamente relacionadas com a adesão de microrganismos, que é de fundamental importância na interação entre os microrganismos, visto que aderência assegura que os mesmos não sejam eliminados do seu ecossistema em particular (MARSHALL; BITTON, 1980).

De modo geral as condições ambientais onde o fungo será ativo devem ser levadas em consideração, assim como a escolha de um isolado para o desenvolvimento de um biopesticida (MC CAMMON; RATH, 1994). Por outro lado, também deve ser considerado o tipo de praga alvo a ser controlada (QUEDRAOGO et al.; 1997).

Tratando-se da administração dos agentes de controle microbiano a campo, é indicado que seja aplicado no período final da tarde, quando há menos incidência de raios ultravioleta e a temperatura é mais amena, preferencialmente logo após chuvas (TONUS, 1999).

3.5 Formulações Fúngicas

As formulações são classificadas de acordo com o modo de preparo, matérias-primas utilizadas e aspecto físico. Faria e Wraight (2007) identificaram os diferentes tipos de formulações fúngicas mundialmente utilizadas, baseando-se em dados da Crop Life International, 2002; Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO e World Health Organization - WHO (2002).

Faria e Wraight (2007) verificaram as seguintes apresentações de formulações: Pó molhável (WP), Granulado (GR), Isca (pronto uso) (RB); Grânulos dispersíveis em água (WG); Pó para contato (CP), sendo que este último foi categorizado de acordo com os que não se enquadraram nos outros tipos de formulação, sendo eles: Suspensão concentrada (SC); Suspensão concentrada miscível em óleo - suspensão miscível em óleo (OF); Suspensão para aplicação a ultra baixo volume (ULV) Suspensão (SU); Dispersão oleosa (OD). Sendo que, dispersões de óleo contendo fungos artropodopatogênicos têm sido referidos mais comumente na literatura como suspensões emulsionáveis ou suspensões oleosas emulsionáveis e identificado pela sigla ES (FARIA; WRAIGHT, 2007).

De forma geral as ES são as apresentações de formulação mais investigadas, e podem ser classificadas como suspo-emulsões, definidas pela ABNT (2004), como formulações heterogêneas que consistem de uma dispersão estável de ingredientes sob a forma de partículas sólidas finas e de glóbulos na fase aquosa.

Trata-se de uma tecnologia relativamente nova para o mercado agrícola e têm um grande potencial para a formulação e aplicação de micoacaricidas para controle de pragas (ALVES, 2002). As formulações a base de compostos orgânicos emulsionáveis, podem ser pulverizadas por um volume muito baixo, por técnicas de aplicação controlada de gotas e ainda permitem o uso de pulverizadores hidráulicos convencionais, tornando-se um produto uscom custo menor e de mais fácil transporte (ALVES et al., 1998).

Alves (1998), considera que toda combinação de ingredientes adjuvantes com agentes de controle biológico, é definida também como formulação, onde os componentes devem contribuir para o incremento da estabilidade, virulência e eficácia. Sendo que, os ingredientes adjuvantes devem minimizar a interferência desfavorável das intempéries ambientais, melhorar manuseio e desempenho das formulações no campo, além de permitir o armazenamento sob condições nas quais se reduza os custos, com perda mínima da qualidade do produto.

A aplicação no campo geralmente é efetuada por pulverização, e tem como principal diluente a água, entretanto, a homogeneidade é dificultada em função da natureza hidrofóbica da superfície conidial de inúmeros fungos entomopatogênicos (BOUCIAS et al., 1988). Fator este que deve ser levado em consideração, e corrigida pela adição de substâncias lipofílicas a formulação, uma vez que em razão do mecanismo de ação diferenciado dos fungos, a aplicação do micopesticida deve garantir o contato das unidades infectivas com a praga alvo (BATEMAN et al., 2000).

Além do ingrediente ativo como componente básico de formulações, incluem-se adjuvantes, como dispersantes, umectantes, protetores contra radiação ultravioleta e fatores promotores de virulência ou sinergistas (MOORE; CAUDWELL, 1997; JONES; BURGESS, 1998). Sendo assim, para a obtenção de uma apresentação final eficiente faz-se necessário a adição de diferentes componentes à calda, não somente para permitir a suspensão e dispersão em veículo apropriado, mas também para aumentar a deposição, espalhamento, molhamento, adesão, retenção e toxicidade sobre o alvo para qual é dirigido (COSTA et al., 2003).

Deve-se também levar em consideração durante o desenvolvimento de uma formulação fúngica os efeitos de seus componentes sobre a viabilidade de conídios e desta forma selecionar produtos compatíveis com o agente microbiano (MOLA; AFKARL, 2012)

Além destes requisitos, o prazo de validade, e as propriedades biológicas e físicas da formulação são questões importantes para fins comerciais, devendo-se levar em consideração dois pontos críticos para a obtenção da mesma: O primeiro está correlacionada com as características do fungo e capacidade de produção em massa, já o segundo, relaciona-se com o ambiente onde será armazenado e aplicado. Como o ingrediente ativo é um organismo vivo, sua sobrevivência deverá ser mantida de forma satisfatória para que no campo o efeito esperado seja adequado (JONES; BURGESS, 1998).

Sendo assim, a produção adequada é essencial para o sucesso na utilização de produtos biológicos comerciais (DAOUST et al., 1983), pois, muitas combinações podem influenciar o crescimento vegetativo, a viabilidade, a esporulação, ou até mesmo a composição genética dos fungos entomopatogênicos, alterando desta forma a virulência destes microrganismos (ALVES et al. 1998).

3.6 Óleos como adjuvantes em formulações

Dentre os ingredientes mais promissores para a produção comercial de formulações fungicidas, a utilização de óleos como adjuvantes tem se destacado nas pesquisas em busca de microacaricidas eficientes. Alguns trabalhos têm relatado que formulações de fungos entomopatogênicos, obtiveram maior eficácia quando preparadas em base oleosa, especialmente em baixas umidades relativas (BATEMAN et al., 1993; SAMISH, 2014, CAMARGO, 2014).

Segundo Alves; Faria (2010) na escolha de óleos emulsionáveis vegetais ou minerais devem ser considerados alguns pontos. Dentre as vantagens de se utilizar os de origem vegetal é que estes podem ser certificados e utilizados como produtos orgânicos, estes também costumam ser mais viscosos e por isso dão maior adesividade à superfície da praga alvo ou do ambiente onde se destina o controle, também não são inflamáveis e por isso mais seguros, conferem certa proteção aos raios ultravioletas e são menos voláteis quando comparados aos minerais.

Em contrapartida, formulações a base de óleos minerais não podem ser certificados como naturais, alguns podem ser inflamáveis e menos seguros durante o armazenamento nas fábricas (quando estão puros) e nem todos protegem contra radiação UV (ALVES; FARIA, 2010).

Com relação a fatores comerciais, muitos estudos relatam os efeitos dos óleos minerais e vegetais quanto ao armazenamento a médio e a longo prazo, sobre a viabilidade de conídios destinados ao controle de pragas (STATHERS et al., 1993; MCCLATCHIEET al. 1994; HEDGECOCK et al. 1995; MOORE et al. 1995; 1996; ALVES, 2002). Alves; Faria (2010), relatam que conídios de uma formulação com óleo vegetal que tiverem teor de água acima de 10%, podem dar início ao processo de germinação depois de alguns meses em virtude da presença de nutrientes (resíduos de grãos), reduzindo assim o tempo de prateleira.

Ao contrário dos óleos vegetais, os minerais não fornecem nutrientes e por isso dificilmente os conídios germinam, logo, os mesmos conferem a formulação maior tempo de armazenamento (ALVES; FARIA, 2010). Porém, de modo geral, o tempo de prateleira é influenciado principalmente pela temperatura, teor de umidade do produto e pela umidade atmosférica de armazenamento, alterando significativamente a longevidade dos conídios (HONG et al., 1997, ALVES et al., 2002).

Alves et al. (2002) avaliaram a viabilidade de conídios de *M. acridum* formulados em cinco óleos emulsionáveis (OAE), em um óleo vegetal e em uma mistura de dois óleos minerais, além de conídios puros e secos, e seus efeitos no armazenamento a 10°C e 27°C durante 40 semanas, concluindo que a viabilidade conidial de uma mesma formulação declinou com o passar do tempo, porém foi mantida acima de 90% a 10°C em todos os formulados testados.

Porém conídios secos e puros em óleo de amendoim foram os únicos tratamentos que a viabilidade de conídios foi mantida superior a 90% em ambas temperaturas após 40 semanas de armazenamento.

Além de evitar a dessecação, adição de compostos oleosos tem demonstrando prolongar a sobrevivência dos conídios e diminuir a sensibilidade à radiação UV em comparação com suspensões aquosas (PRIOR; JOLLANDS, 1988; MOORE et al., 1993; INGLIS et al., 1995; GÔLO, 2014).

Diversos estudos consideram também que o óleo confere ao conídio um efeito termoprotetor (Mc CLATCHIE et al. 1994; BARRETO et al. 2016; ALVES et al. 2016). Barreto et al. (2016) relataram que conídios não formulados em óleo mineral e expostos a temperatura de 45°C por 4h tiveram uma menor germinação e produção de apressório sobre a cutícula do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em comparação com conídios formulados com o óleo.

Já foram demonstradas que formulações acrescidas de diferentes óleos melhoram a adesão dos conídios fúngicos à superfície externa do artrópode. Tal capacidade é possível, devido aos óleos promoverem uma característica lipofílica à formulação, aumentando a adesão e penetração dos conídios na cutícula hidrofóbica dos artrópodes (PRIOR, 1988; BATEMAN et al., 1993).

Outro fator importante, é que formulações oleosas de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, mostram-se mais eficazes tanto para estudos de controle de pragas em laboratório quanto a campo, se comparadas a formulações aquosas (KAAYA, 2000; MARANGA, 2005; CAMARGO, 2014; SAMISHI, 2014).

Desta forma, os óleos tornam-se boa alternativa na utilização como adjuvante em caldas de pulverização, permitindo a aplicação do agente microbiano com equipamentos convencionais já utilizados pelos produtores rurais, além de aumentar a infectividade do fungo (ALVES et al., 1998), e dispensar a incorporação de agentes molhantes ou adesivos (SAMISHI, 2014).

Alguns trabalhos têm demonstrado a viabilidade de uso de fungos entomopatogênicos em conjunto com estes compostos orgânicos, tanto como adjuvantes em formulações (NANKINGA et al., 2000; ALVES, 2001; ALVES et al., 2002; CONSOLO et al., 2003; LUZ et al., 2004; SILVA, 2006; SANTI, 2011; PERINOTTO, 2013, SAMISHI, 2014; CAMARGO, 2014; GÔLO, 2014;) quanto como sinergistas no controle de pragas (BATISTA FILHO et al., 1994; 1995; LEITE et al., 1995; HAZZARD et al., 2003).

Segundo Kaaya (2000), formulações a base de óleo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram mais eficazes no controle de larvas de *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus decoloratus* do que suspensões aquosas, em condições de laboratório e campo.

Maranga et al. (2005) estudando o efeito de formulações de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na espécie de carrapato *A. variegatum*, constataram que formulações em óleo são mais eficazes do que apresentações aquosas dos mesmos fungos. Alguns trabalhos revelam maior eficácia de formulações em óleos vegetais no controle de insetos, provavelmente pela característica lipofílica da formulação, que aumenta a adesão e penetração dos conídios no tegumento (PRIOR; JOLLANDS, 1988; BATEMAN et al., 1993).

Estudos para identificar bases oleosas de diferentes origens (mineral e vegetal) para formulações, Prior et al. (2005), não encontraram diferenças significativas entre o tempo médio de sobrevivência medias de *R. microplus* tratados com formulações de *M. anisopliae* a base parafina líquida, óleo de coco e OAE.

Apesar destes resultados, Prior et al. (2005), notaram um possível efeito tóxico ao artrópode pelo óleo de coco, porém sem resultados expressivos se comparados as outras

formulações, o óleo de origem vegetal apresentou também maior efeito deletério aos conídios fúngicos quando comparado a parafina líquida.

Por sua vez, óleos vegetais são mais facilmente digeridos e absorvidos, penetrando com maior facilidade as membranas biológicas do que os óleos minerais, além dos mesmos conterem mais moléculas com ligações duplas e assim a sua fluidez é relativamente maior (ALUYOR et al., 2009) facilitando a aplicação e homogeneização de formulações.

Quando comparado os óleos vegetais e minerais, o primeiro contém moléculas de oxigênio e tem ambas as regiões polares e não polares, o que não acontece em óleos minerais; isto faz os óleos vegetais terem menor estabilidade térmica, hidrolítica e oxidativa, tornando-os mais instáveis em condições ambientais naturais do que óleos derivados de petróleo (ALUYOR et al., 2009).

Os óleos vegetais também podem conter outras substâncias químicas, além de lípidos, incluindo os polifenóis e ésteres. Cada uma destas características pode influenciar a interação carrapato-fungo-óleo (SAMISH, 2014). Os óleos puros também são conhecidos como pesticidas, principalmente através da ação por asfixia, por vedarem os espiráculos respiratórios dos artrópodes; podendo também agir como repelente para oviposição, agindo na interrupção celular (VINCENT et al, 2003; NAJAR RODRÍGUEZ et al, 2008). A concentração de óleo a ser utilizada também é um fator importante, a qual vem sendo investigada, pois pode refletir no custo final total do produto, na aplicação, na homogeneização e na toxicidade, tanto do microrganismo (AGUDA et al., 1986) como do artrópode (ABDEL-SHAFY; SOLIMAN, 2004).

Alguns autores ressaltam o efeito tóxico dos óleos aos carrapatos e o sinergismo com os fungos entomopatogênicos, tornando o mesmo um adjuvante promissor para a utilização na formulação de bioprodutos (ABDEL-SHAFY; SOLIMAN, 2004; CAMARGO et. al., 2012; PERINOTTO, 2013).

Os processos de produção e formulação devem ser orientados também com base econômica. O preço do produto deve ser compatível com a realidade do mercado, em relação a inseticidas químicos e demanda potencial, para que o bioinseticida possa tornar-se competitivo (ALVES; BATISTA-FILHO, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Realização dos Experimento

O trabalho foi realizado no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado no município de Seropédica – RJ. Os testes em condições seminaturais foram conduzidos na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz (EEPPWON) e no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária (LCM), pertencente ao Departamento de Parasitologia Veterinária (DPA) do Instituto de Veterinária (IV).

A área determinada da EEPPWON para a condução dos testes está situada a 22° 45' 54.9" Sul e 43° 41' 57.2" Oeste. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Aw, isto é, tropical semi-úmido, seco e frio no inverno, com verão quente e úmido, com precipitação média anual em torno de 1354 mm e temperatura média anual próxima de 23,5 °C.

4.2 Monitoramento das condições climáticas

Para monitorar a precipitação ocorrida na cidade onde se conduziu o experimento, foi utilizado os dados da Estação Meteorológica da Fazendinha Agroecológica situada na mesma área do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Ainda para maior precisão quanto as variações de temperatura e umidade, instalou-se um aparelho registrador (HOBO® data loggers) para monitorar as mudanças climáticas a cada 3h no local onde o experimento foi alocado.

4.3 Manutenção da colônia de *Rhipicephalus microplus*

A colônia de *R. microplus* foi mantida na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz da UFRRJ. Bezerros foram submetidos a infestações artificiais com larvas provenientes de 150 mg de ovos de *R. microplus*, por três dias consecutivos (Protocolo CEUA 113/2014). Vinte e um dia após a infestação, fêmeas totalmente ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e levadas ao laboratório. No LCM, estas foram devidamente higienizadas em água corrente e imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% para assepsia da cutícula, em seguida secas em papel toalha. Parte das fêmeas foi destinada aos ensaios biológicos e outra parte mantida em câmara climatizada *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D) com umidade relativa e temperatura controladas ($UR \geq 80\%$ e $27 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente), para manutenção da colônia.

4.4 Obtenção dos Isolados Fúngicos

Na realização do experimento foram utilizados dois isolados brasileiros CG148 e ARSEF 3641 de *Metarhizium* spp. (Tabela 1), obtidos de culturas puras (que não tinham sido repicados por mais de três vezes em meio de cultura após a passagem pelo carrapato) mantido na coleção do LCM. A escolha destes isolados foi efetuada com base em resultados promissores obtidos em ensaios *in vitro* (PERINOTTO, 2013; GOLO, 2014).

Tabela 1 - Isolados de *Metarhizium* sp., hospedeiro ou substrato fonte do isolamento, regiões geográficas de origem e espécie.

Isolado	Hospedeiro / substrato	Origem Geográfica	Espécie
CG 148	<i>Deois flavopicta</i>	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i>
ARSEF 3641	Solo	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.

Os conídios foram primeiramente produzidos em meio artificial de batata-dextrose-ágar (BDA, Kasvi imp. e dist. de produtos para laboratório Ltda., Londrina, PR, Brasil) em placas de Petri (9,0 × 1,5 cm) durante 10–12 dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D. à temperatura de 25 °C e UR > 80%.

4.5 Produção dos Conídios em Arroz

A partir dos conídios obtidos do cultivo em placas, foram preparadas suspensões aquosas de cada isolado fúngico numa concentração de 10⁸ conídios/mL, que foram quantificadas com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico segundo Alves (1998).

Em capela de fluxo laminar, um alíquota de 2ml da suspensão de cada isolado foi inoculada em sacos de polipropileno de 20 × 30 × 0,01cm, contendo 100 g de arroz parboilizado e 30 ml de solução peptonada a 0,5% previamente autoclavados (SANTI et al., 2010). Os sacos foram identificados e devidamente vedados com algodão hidrofóbico e fechados com auxílio de barbantes. Posteriormente, os sacos foram armazenados em câmaras climatizadas tipo B.O.D à temperatura de 25 °C, UR > 80%, por vinte dias. Diariamente, todos os sacos eram agitados manualmente para a fragmentação de agregados do substrato e para melhor crescimento fúngico sobre o arroz. Após os vinte dias, os sacos com os substratos totalmente colonizados foram armazenados em câmara fria até o dia do experimento.

4.6 Preparo das Formulações Oleosas

As formulações começaram a ser produzidas cerca de três horas antes da pulverização. Sob condições assépticas, foi colocado em cada saco de polipropileno 500 ml de solução aquosa de Tween 80® a 0,1% (v/v), seguida de vigorosa manipulação externa para remoção dos conídios do arroz. Logo após, a suspensão obtida foi coada em peneira de Nylon de malha fina estéril para evitar o entupimento do bico do borrifador na aplicação. Após este procedimento, as suspensões conidiais foram quantificadas em microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 10⁸ conídios/ml e acrescidas em 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou vegetal (ABC Industria e Comércio S/A, Uberlândia, MG, Brasil).

4.7 Preparação dos Vasos e Cultivo de *Brachiaria brizantha*

Três meses antes do início do experimento, sementes de *Brachiaria brizantha*, cultivar Marandú foram plantadas em vasos de polipropileno com dimensões de 22 cm de diâmetro e 22 cm de altura preenchidos como preenchimento dos vasos foi utilizado condicionador de solo (Natussolos do Brasil Ltda., Taubaté, SP, Brasil), todos os vasos foram mantidos em área com incidência direta de sol e chuva nas instalações externas do LCM.

Sete dias antes do experimento todos os vasos receberam poda, padronizando a altura da forrageira em 35 cm, sendo que os vasos que não obtiveram preenchimento completo e cobertura vegetal homogênea foram excluídos.

No dia zero (dia do tratamento), antes da pulverização, os vasos foram distribuídos nos respectivos grupos de forma randomizada. A partir de então, os vasos não receberam qualquer tipo de manejo, inclusive, foram isentos de irrigação artificial durante todo o período de experimentação, para evitar interferências no microclima nos vasos e simular de forma mais fiel as condições reais do campo.

4.8 Delineamento experimental

O experimento foi composto por sete grupos: Controle – CTR, grupo que não recebeu tratamento algum; Controle OLV, tratado com óleo vegetal e Tween 80 a 0,1%; Controle OLM, tratado com óleo mineral e Tween 80 a 0,1%; Tratado 3641 OLV, tratado com o isolado ARSEF 3641 + óleo vegetal; Tratado 3641 OLM, tratado com o isolado ARSEF 3641 + óleo mineral; Tratado 148 OLV, tratado com o isolado CG 148 + óleo vegetal; Tratado 148 OLM, tratado com o isolado CG148 + óleo mineral. Cada grupo conteve dez vasos, portanto dez replicas.

4.9 Ensaio biológico em condições seminaturais

No dia zero, após as 16h (horário de menor radiação solar e temperatura mais amena) e antes da introdução das fêmeas, o solo de cada vaso foi pulverizado com 80ml da formulação a 10^8 conídios/ml proposta para cada grupo, atingindo assim uma concentração no solo de $1,6 \times 10^7$ conídios por cm^2 . Da mesma forma foram tratados o solo dos vasos dos grupos controles oleosos com a emulsão de óleo vegetal ou mineral. Após o tratamento, grupos de peso médio e homogêneo contendo cinco fêmeas ingurgitadas foram adicionados em cada vaso, sendo cada grupo composto por 10 vasos, totalizando 50 fêmeas ingurgitadas por grupo.

4.9.1 Avaliação da mortalidade das fêmeas ingurgitadas e recuperação das larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus* após tratamento dos vasos com as formulações fúngicas

Após o tratamento foram realizadas vistorias diárias nos vasos durante 21 dias, para avaliação do percentual de mortalidade acumulativa das fêmeas do carrapato, presença de crescimento fúngico no solo ou sobre as fêmeas, presença de postura e presença de predadores ou outros artrópodes colonizados.

Após a término da postura e incubação dos ovos foi aguardada a eclosão das larvas e o fortalecimento de suas cutículas até tornarem-se larvas infestantes (42 dias após a introdução das fêmeas). Para a quantificação das larvas, as mesmas foram recuperadas cortando os ápices das forrageiras, aos 42, 49 e 56 dias após a introdução das fêmeas. Em cada coleta, o material obtido em cada vaso foi acondicionado em um saco de plástico, que foi lacrado, identificado e congelado para posterior contagem das larvas. As larvas fixadas na folhas coletadas foram removidas com o auxílio de um pincel e colocadas em placa de Petri. Em seguida foram cuidadosamente separadas e quantificadas, com ajuda de pinça, estilete e lupa.

Para a certificação da ausência de larvas remanescentes nos vasos após o 56º dia da introdução das fêmeas e da finalização da quantificação das larvas, foi estabelecido uma inspeção dos vasos. Onde, todo o capim foi diariamente vistoriado por duas semanas.

Para avaliar o efeito das formulações fúngicas sobre a recuperação das larvas de *R. microplus* a eficácia foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ eficácia} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde A = média de larvas recuperadas no respectivo grupo controle oleoso e B = média de larvas recuperadas no grupo tratado (BITTENCOURT et al. 2003).

4.10 Viabilidade dos conídios

Uma alíquota da suspensão aquosa e das formulações oleosas de cada isolado foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e cloranfenicol 0,05% e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ em até 48 horas para a avaliação da viabilidade. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

4.11 Isolamento e identificação de colônias de *Metarhizium* spp. para a avaliação da persistência do fungo no solo

4.11.1 Isolamento fúngico e identificação a partir do solo

Para monitorar o desenvolvimento do fungo inoculado em cada vaso foram coletadas aleatoriamente três amostras de solo de pontos distintos. As amostras foram homogeneizadas formando posteriormente uma única amostra composta. Os momentos de coleta foram: no dia do tratamento, antes da pulverização (dia 0), afim de verificar se o solo já apresentava *Metarhizium* sp., e no 3°, 7°, 21° e 60° dia após o tratamento.

Posteriormente foram pesadas em microtubos uma alíquota de 0,35g de cada amostra composta e diluídas em 1ml de solução de tween 80 a 0,01%. Após agitação vigorosa por trinta segundos em agitador tipo Vortex, uma alíquota de 50µl foi adicionada em placas de Petri (três placas de Petri para cada vaso) contendo meio CTC e distribuído com auxílio a alça Drigalski de forma homogênia sobre o meio de cultura, conforme a metodologia descrita por Fernandes et al., (2010).

As placas foram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 21 dias, sendo analisadas a cada sete dias quanto a presença ou não de colônias características de *Metarhizium* sp.. A avaliação da quantidade das colônias seguiram de acordo com o método proposto neste trabalho (Item 3.10.1). Também foi feita a análise das características microscópicas das colônias encontradas, a partir da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIDDELL, 1950).

As características macro e microscópicas foram avaliadas seguindo as descritas na literatura por Tulloch (1976); Driver et al. (2000) e Bischoff et al. (2009). Devendo apresentar macroscopicamente colônia com pigmentação inicial branca, passando à amarela e tomando uma coloração verde com seu amadurecimento. Microscopicamente devem apresentar forma cilíndrica a oval, ligeiramente estreitados no meio, podendo ser truncados em ambas as extremidades, com medidas podendo variar entre 3,5 x 9,0 µm de comprimento e dispostos em cadeias de colunas.

4.11.2 Padronização da técnica de mensuração da quantidade de colônias

Para mensurar a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. anisopliae* nas amostras de solo, foi desenvolvido neste trabalho e a partir de experimentos prévios, um

método de avaliação baseando-se no número de colônias encontradas em placas de Petri contendo meio seletivo CTC (Meio BDA acrescido de Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida) para *Metarhizium* sp. (Figura 1), nas quais foram inoculadas amostras de solo segundo a metodologia de Fernandes et al. (2010).

Este método categoriza o número de colônias de *Metarhizium* sp observadas em cada placa em intervalos de classe variando entre sem cruz (-) a quatro cruzes (++++), ou seja, sem cruz (-) equivale a nenhuma (zero) colônia fúngica, uma cruz (+) equivalem ao intervalo de 1 a 25 colônias fúngicas, duas cruzes (++) equivalem ao intervalo de 26 a 50 colônias fúngicas, três cruzes (+++) equivalem ao intervalo de 51 a 75 e quatro cruzes (++++) equivalem a uma observação de mais de 76 colônias, como demonstrado na Tabela 2.

Para a validação deste método de avaliação, três observadores diferentes analisaram visualmente as características macro e micromorfológicas das colônias de *Metarhizium* sp presentes em cada placa de Petri e as classificaram com base no método de cruzes descrito acima.

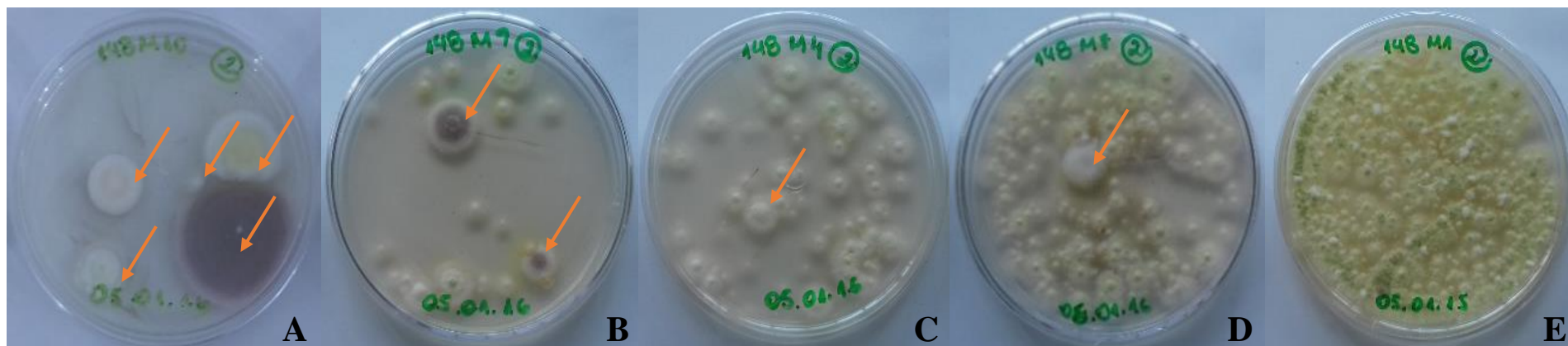


Figura 1 – Isolamento de colônias de *Metarhizium* sp. e outras colônias de fungos contaminantes (setas laranjas) em meio seletivo CTC a partir de amostras de solo. A: Placa sem colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com sinal de menos (-) contendo apenas colônias de fungos contaminantes (setas); B: Placa contendo de 1 a 25 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com uma cruz (+) e apresentando colônias de fungos contaminantes (setas); C: Placa contendo de 26 a 50 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com duas cruzes (++) e apresentando colônia de fungo contaminante (seta); D: Placa contendo de 51- 75 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com três cruzes (+++) e apresentando colônia de fungo contaminante (seta); E: Placa contendo colônias mais de 76 colônias características de *Metarhizium* sp avaliada com quatro cruzes (++++).

Tabela 2 – Método de mensuração de colônias fúngicas, baseado no número de cruces (+) que categoriza a quantidade de colônias isoladas em placas de Petri após a inoculação das amostras de solo em meio seletivo CTC para *Metarhizium* sp.

Número de cruces	Intervalo de classe do número de colônias
-	0
+	1 – 25
++	26 – 50
+++	51 – 75
++++	≥76

4.11.3 Isolamento fúngico e identificação a partir de *Rhipicephalus microplus*

Durante a avaliação da mortalidade das fêmeas, todas aquelas encontradas mortas (enegrecidas, secas, com cutícula rompida ou sem reação a estímulos externos) foram recolhidas e mantidas em câmara úmidas sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante sete dias ou até a exteriorização fúngica. Posteriormente, em condições assépticas amostras do material fúngico exteriorizado sobre a cutícula de cada fêmea foram coletadas, para identificação de suas características microscópicas através da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula supracitada.

4.12 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise descritiva e posteriormente feito a distribuição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para a comparação entre as médias. Para a análise dos dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido do Student-Newman-Keuls para comparação entre as ordenações médias.

Na avaliação do número de colônias, para a análise de concordância entre os observadores, foi utilizado a estatística de Kappa seguindo a interpretação segundo Landis JR; Koch G.G. (1977), (Tabela 3).

Tabela 3 – Intervalos de medidas de concordâncias interobservadores, segundo o teste Kappa, em uma determinada avaliação.

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Nenhuma concordância
0 – 0,19	Baixa concordância
0,20 – 0,39	Razoável concordância
0,40- 0,59	Moderada concordância
0,60 – 0,79	Substancial concordância
0,80-1,00	Quase/perfeita concordância

5 RESULTADOS

5.1 Condições Climáticas

A partir do quinto dia após o tratamento houve a presença de chuvas durante o período do experimento, sendo que houve chuvas que variaram de 0,2 a 16,4mm ao dia (Figura 2) e chegaram a 9,6mm em uma hora. Dentro dos sessenta dias de experimentação a precipitação total foi de 119,0 mm (Figura 2). A umidade média foi 79,0%, variando entre 25,5 e 98,5% (Figura 2) e a temperatura média foi 25,0 °C, variando entre 16,2 e 37,3 °C (Figura 3).

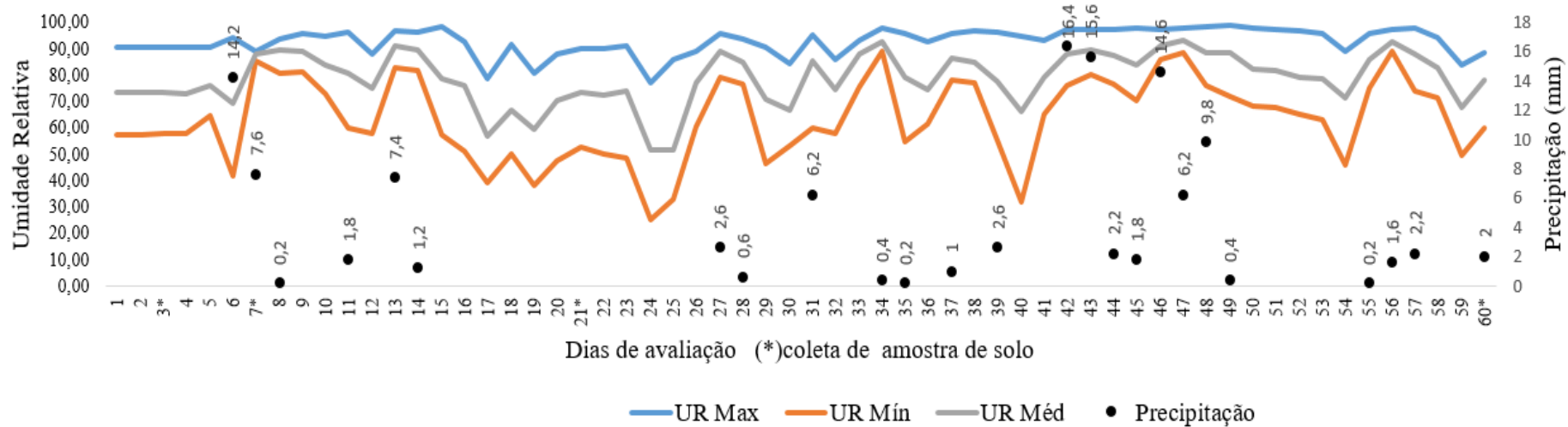


Figura 2 – Variação diária da umidade relativa (UR), máxima (Max), média (Méd), mínima (Mín) e precipitação (mm) durante os 60 dias de avaliação experimental, com destaque (*) dos dias de coletas de amostra de solo para o acompanhamento da presença de *Metarhizium* sp. no solo dos vasos mantidos em condições seminaturais.

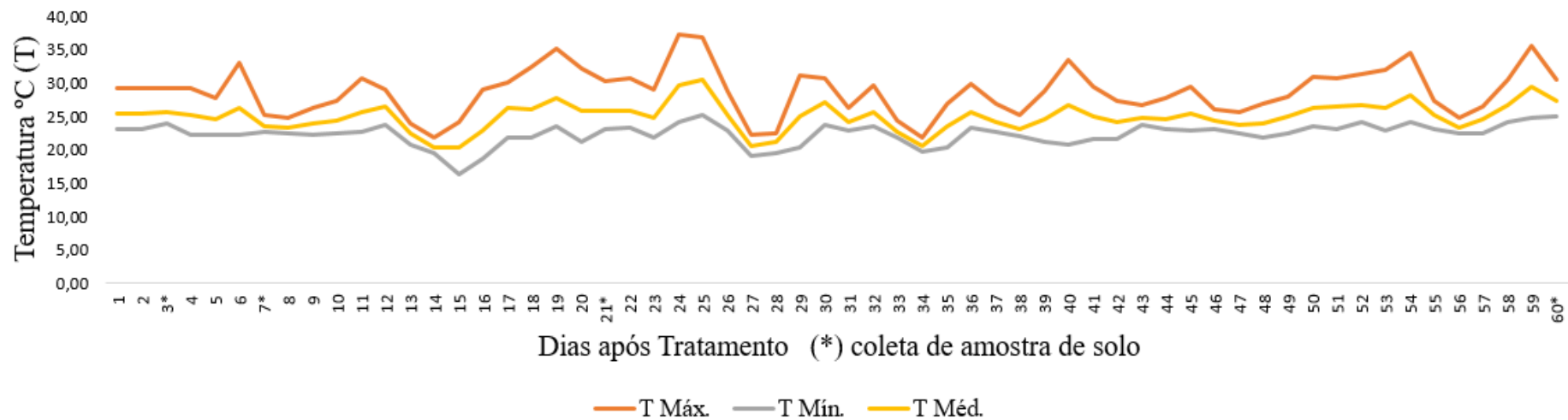


Figura 3 - Variação da temperatura (T) máxima (Máx), média (Méd) e mínima (Mín) durante os 60 dias de avaliação experimental, com destaque (*) dos dias de coletas de solo para o acompanhamento da presença de *Metarhizium* sp. nos vasos mantidos em condições seminaturais.

5.2 Viabilidade das formulações

Os conídios das suspensões aquosas dos isolados CG148 e ARSEF 3641 apresentaram 100% de germinação após 24h de incubação.

Por sua vez, os conídios dos isolados testados formulados em óleo vegetal apresentaram 100% de germinação em até 36 horas de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$, diferentemente dos conídios formulados em óleo mineral, que apresentaram 100% de germinação após 48 horas de incubação nas condições de temperatura e umidade citadas acima.

5.3 Ensaio em Condições Seminaturais

5.3.1 Avaliação da mortalidade de fêmeas ingurgitadas

Durante o período de avaliação da mortalidade das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* sobre o solo, não foi observada diferença estatística no percentual de mortalidade entre os grupos controle, indicando que os veículos adjuvantes oleosos não são prejudiciais para a fêmeas do carrapato (Tabela 4).

A partir do 17º dia após o tratamento, foi possível notar diferença significativa na mortalidade das fêmeas no grupo tratado com o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo mineral quando comparado com os grupos controles (Tabela 4).

Por sua vez, quando o isolado ARSEF 3641, formulado em óleo mineral foi comparado com os demais grupos contendo *Metarhizium* s. l., não foram encontradas diferenças estatísticas (Tabela 4).

As formulações conidiais com óleo mineral causaram maior mortalidade com ambos os isolados testados, 14 e 20% para CG148 e ARSEF 3641 respectivamente, enquanto as formulações com óleo de soja alcançaram um percentual de mortalidade igual a 12,0 e 12,5% com os isolados CG148 e ARSEF 3641, respectivamente.

O isolado ARSEF 3641 obteve melhores percentuais de mortalidade em ambos os tipos de tratamentos com formulações se comparado ao isolado CG148.

Quando avaliada a eficácia das formulações fúngicas em causar morte das fêmeas, verificou-se uma eficácia entre 10 e 20% entre os grupos tratados, durante o período de avaliação.

Tabela 4 – Média e desvio padrão da mortalidade acumulativa (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos dias de avaliação após a exposição das mesmas em solo não tratado (CTR) ou tratado com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com os isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM), em condições seminaturais.

Grupos/ Dias de avaliação	1°	2°	3°	5°	7°	9°	11°	13°	15°	17°	19°	21°
CTR	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	2,86 ± 7,56 a	2,86 ± 7,56 a	2,86 ± 7,56 a	2,86 ± 7,56 a	2,86 ± 7,56 a	2,86 ± 7,56 a	2,86 ± 7,56 ac	2,86 ± 7,56 ac	2,86 ± 7,56 ac
OLV	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	2,22 ± 6,67 a	2,22 ± 6,67 a	2,22 ± 6,67 a	2,22 ± 6,67 ac	2,22 ± 6,67 ac	2,22 ± 6,67 ac
OLM	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
3641 OLV	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	12,50 ± 18,32 a	12,50 ± 18,32 a	12,50 ± 18,32 a	12,50 ± 18,32 a	12,50 ± 18,32 a	12,50 ± 18,32 a	12,50 ± 18,32 ab	12,50 ± 18,32 ab	12,50 ± 18,32 ab
3641 OLM	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	15,00 ± 14,14 a	15,00 ± 14,14 a	15,00 ± 14,14 a	15,00 ± 14,14 a	15,00 ± 14,14 a	15,00 ± 14,14 a	20,00 ± 14,14 b	20,00 ± 14,14 b	20,00 ± 14,14 b
148 OLV	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	10,00 ± 10,54 a	10,00 ± 10,54 a	10,00 ± 10,54 a	10,00 ± 10,54 a	10,00 ± 10,54 a	10,00 ± 10,54 a	12,00 ± 10,33 bc	12,00 ± 10,33 bc	12,00 ± 10,33 bc
148 OLM	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	2,00 ± 6,32 a	14,00 ± 13,50 a	14,00 ± 13,50 a	14,00 ± 13,50 a	14,00 ± 13,50 a	14,00 ± 13,50 a	14,00 ± 13,50 bc	14,00 ± 13,50 bc	14,00 ± 13,50 bc

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa (p>0,05).

5.3.2 Isolamento de *Metarhizium* sp. a partir de fêmeas ingurgitadas

Durante o período de postura das fêmeas em condições seminaturais, foi possível observar a exteriorização de *Metarhizium* sp. sobre a cutícula das mesmas, confirmando a capacidade dos isolados em se manterem viáveis no solo e realizarem todas as fases de crescimento sobre o artrópode em condições seminaturais (Figura 3).

As fêmeas dos grupos tratados que não apresentaram exteriorização fúngica sobre a cutícula durante o período que estavam no ambiente foram submetidos a incubação em câmara úmida durante 7 dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$. Posteriormente foi feita a identificação e confirmação da presença do fungo a partir da coleta de conídios da superfície do artrópode e inoculação em lâminas de microcultivo após 14 dias de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$.

Todas as lâminas de microcultivo apresentaram colônias com características morfológicas compatíveis com as descritas na literatura (TULLOCH, 1976; DRIVER et al., 2000; BISCHOFF et al., 2009). Logo todas as fêmeas coletadas obtiveram confirmação da infecção por *Metarhizium* sp.. Para as fêmeas encontradas mortas nos grupos controles, foi aplicada a mesma técnica de incubação e microcultivo, porém não foram observadas estruturas fúngicas características de *Metarhizium* sp., descartando a causa da morte por infecção pelo fungo avaliado.

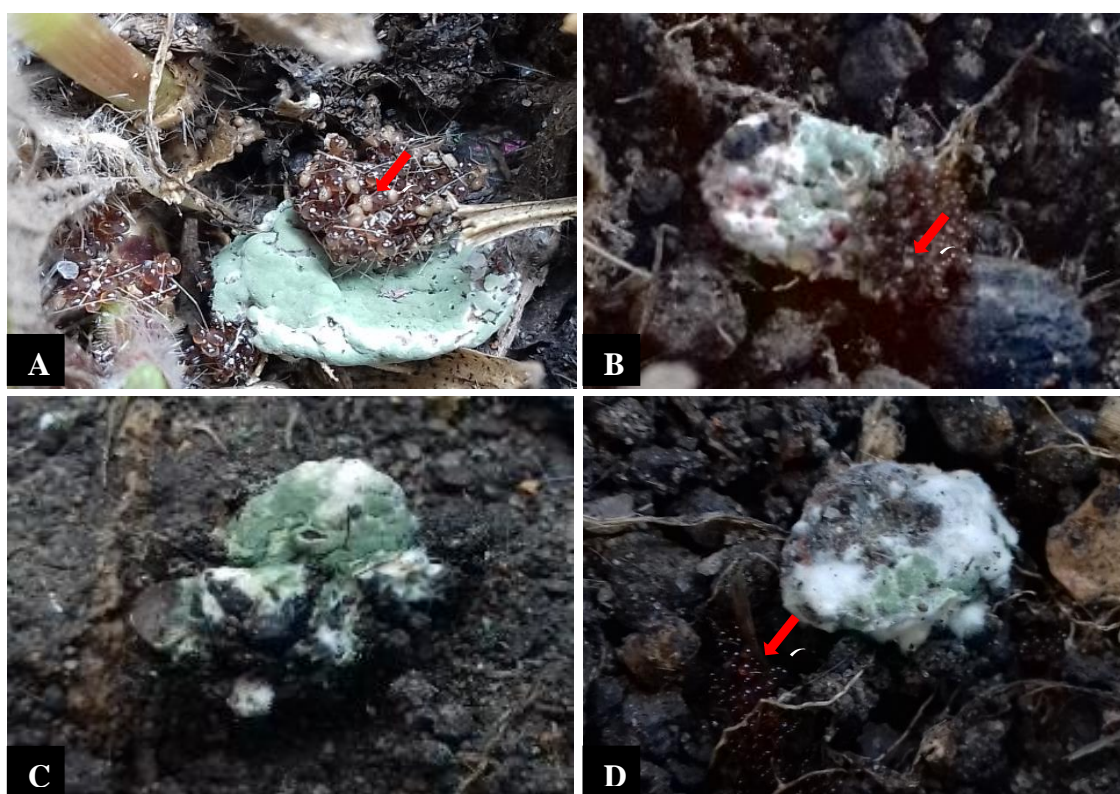


Figura 4 - Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* coletadas 20 dias após a aplicação de formulação oleosa contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. sobre o solo e mantidas em condições seminaturais. Todas apresentando exteriorização fúngica de coloração verde sobre a cutícula (característica de *Metarhizium* sp.). A: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado CG 148 formulado em óleo vegetal, com pouca postura e de aspecto ressecado. B: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado CG 148 formulado em óleo mineral com pouca postura de aspecto ressecado. C: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo mineral antes de realizar postura. D: Fêmea morta do grupo tratado com o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo vegetal com pouca postura. Setas vermelhas indicam a postura.

5.3.3 Avaliação no número de larvas

As eclosões de larvas infestantes foram observadas no 42º dia após o tratamento. Nos grupos controle, seguidos 7 dias após a eclosão das primeiras larvas ocorreu um gradativo aumento das mesmas, atingindo um pico aos 14 dias e posteriormente uma queda (Figura 4), não havendo diferença estatística entre estes grupos nos três momentos de avaliação (Tabela 5).

Nos grupos tratados com as formulações fúngicas oleosas, o número médio de larvas recuperadas apresentou uma tendência decrescente em todos os dias de coleta (Figura 4), não havendo, no entanto, diferença significativa entre eles. Porém, se comparados os grupos controle com os grupos tratados com as formulações fúngicas oleosas, o número médio de larvas recuperadas foi significativamente mais baixo nos grupos tratados com as formulações fúngicas em todos os dias de avaliação quando comparado com os grupos controle (Tabela 5).

O isolado CG 3641 formulado em óleo mineral obteve os melhores resultados quanto ao número de larvas recuperadas sendo capaz de reduzir 27,2 vezes o total de larvas quando comparado ao grupo controle que recebeu o óleo mineral. Neste mesmo tratamento foram recuperadas larvas apenas no 7º dia após o início da eclosão das larvas, não tendo sido encontradas larvas no 14º e 21º dias após o início da eclosão.

Semelhantes resultados foram obtidos quando o mesmo isolado foi formulado em óleo vegetal, onde houve uma infestação 8,3 vezes menor quando comparado com o grupo controle óleo vegetal.

Se comparado o isolado CG 148 formulado com óleo mineral ou vegetal com seus respectivos grupos controles oleosos, o isolado fúngico formulado em óleo mineral foi capaz de reduzir 8 vezes o número de larvas infestantes, enquanto o óleo vegetal reduziu em média 7 vezes.

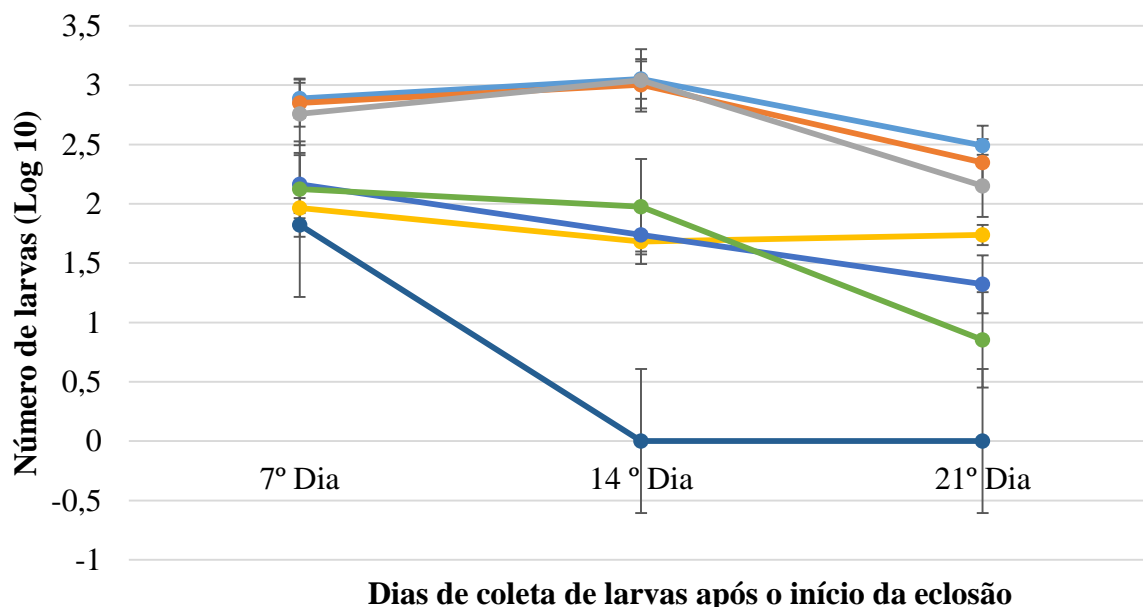


Figura 5 - Variação do número médio de larvas (log 10) de *Rhipicephalus microplus* recuperadas dos ápices da forrageira *Brachiaria brizantha* 7, 14 e 21 dias após o início da eclosão. Larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas expostas ao solo não tratado (CTR) ou tratado com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com os isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM), em condições seminaturais.

Nos dois primeiros momentos de coleta de larvas vivas (7° e 14° dia), a infestação dos vasos foi estatisticamente menor nos grupos que receberam o tratamento com as formulações fúngicas oleosas, quando comparado aos grupos controle sem tratamento e aos controles tratados apenas com os veículos adjuvantes (Tabela 5).

No terceiro e último dia de avaliação (21° dia), os grupos tratados com as formulações oleosas ainda obtiveram valores estatisticamente reduzidos de larvas quando comparados aos demais grupos, sendo que, os tratamentos contendo o isolado ARSEF 3641 formulado em ambos os óleos testados e o tratamento com o isolado CG 148 formulado apenas em óleo mineral, mostraram-se significativamente melhores em reduzir o número de larvas infestantes (Tabela 5).

Quanto ao grupo tratado com o isolado CG 148 formulado em óleo vegetal, este apresentou níveis de infestação estatisticamente semelhantes ao grupo controle óleo mineral apenas no 21° dia após as eclosões (Tabela 5). Entretanto, quando comparamos os grupos controles com os tratamentos contendo os isolados fúngicos formulados em óleo vegetal e mineral, o somatório do número de larvas vivas recuperadas obteve significativa redução da infestação em todos os grupos tratados com ambos os isolados, e tipos de óleos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 - Número médio por dia de coleta e número total de larvas infestantes provenientes de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, expostas ao solo não tratado (CTR) ou tratado com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com os isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM) em condições seminaturais.

GRUPOS	7° dia	14° dia	21° dia	Número total de larvas
CTR	774,4 ± 144,3 aAB	1126,7 ± 467,4 aA	309,6 ± 179,0 aB	2210,7 ± 711,4 a
OLV	707,2 ± 204,7 aA	1005,3 ± 471,9 aA	221,3 ± 197,2 aB	1933,9 ± 588,3 a
OLM	571,5 ± 191,6 aA	1096,9 ± 535,0 aAC	140,6 ± 3,4 acB	1809 ± 737,3 a
3641 OLV	133,2 ± 166,9 bA	93,5 ± 123,0 bA	6,12 ± 11,8 bdA	232,9 ± 234,7 b
3641 OLM	66,4 ± 75,2 bA	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 bA	66,4 ± 75,2 b
148 OLV	92 ± 106,2 bAB	47,2 ± 55,1 bB	53,6 ± 38,8 cdAB	192,8 ± 137,1 b
148 OLM	146,5 ± 125,7 bAC	53,6 ± 38,76 bAB	20 ± 38,5 bdB	220,1 ± 136,4 b

Médias do número de larvas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas á nível de 5%. Médias seguidas de letras maiúscula diferentes na linha apresentam diferenças significativas á nível de 5%.

5.3.4 Percentual de eficácia dos tratamentos

As formulações fúngicas oleosas testadas apresentaram eficácia diária variando entre 74,37 e 100% em relação aos seus respectivos controles durante o período de avaliação do número de larvas infestantes (Tabela 6).

O isolado ARSEF 3641 formulado tanto em óleo vegetal quanto em óleo mineral obteve crescente aumento de eficácia durante o período avaliado, diferente do isolado CG148 que apresentou maior eficácia no 14º dia de avaliação após o período de eclosão e um menor valor no 21º (Tabela 6).

Dentre os isolados testados, destacou-se o ARSEF 3641 formulado em óleo mineral, que apresentou 100% de eficácia já no 14º dia após a eclosão das larvas, obtendo eficácia média de 96,33% (Tabela 6).

Quanto a condição de formulação (em óleo vegetal ou mineral) dos isolados testados, o isolado ARSEF 3641 atingiu melhores percentuais de eficácia quando formulado em óleo mineral (96,13%) e o isolado CG148 alcançou maior eficácia formulado em óleo vegetal (90,03%) (Tabela 6).

Tabela 6 - Eficácia (%) da aplicação direta no solo de formulações oleosas de *Metarhizium anisopliae* s.l., sobre a taxa de recuperação larvas infestantes provenientes de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao ambiente não tratado (CTR) ou tratados com emulsão com Óleo Vegetal (OLV), emulsão com Óleo Mineral (OLM), formulação com o isolado ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), formulação com o isolado ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), formulação com o isolados CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou formulação com o isolado CG148 + óleo mineral (148 OLM), em condições seminaturais.

	7º Dia	14º Dia	21º Dia	Média
CTR	0,00	0,00	0,00	0,00
OLV	8,68	10,77	28,50	15,98
OLM	26,20	2,65	54,57	27,80
3641 OLV	81,16	90,70	97,23	89,69
3641 OLM	88,39	100,00	100,00	96,13
148 OLV	86,99	95,31	75,78	86,02
148 OLM	74,37	95,11	85,78	85,08

5.4 Reisolamento de *Metarhizium* sp. a partir do solo

5.4.1 Mensuração da presença de *Metarhizium* sp. – Análise de concordância

Perante as mensurações feitas pelos três avaliadores, a partir do teste Kaapa foi obtido concordância variando entre 0,74 e 0,95 entre os mesmos, com intervalos de 95% de confiança, visto que estes valores os classificam como de superficial a quase perfeita concordância.

Na Tabela 6 pode-se verificar o grau de concordância entre os observadores e seus respectivos intervalos de confiança, onde nota-se que foi frequente a perfeita concordância entre as avaliações.

Verifica-se que na análise do grupo tratado com o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo vegetal, não foi possível estimar a correlação entre os observadores 1 e 2, e 1 e 3, pois, a dimensão (número de cruces) dada pelo avaliador 1 chegou até 5 cruces em uma determinada amostra de todo o grupo, enquanto para o avaliador 2 e 3 o número máximo de cruces dada entre todas as amostras foi 4, o que inviabiliza a comparação estatística neste determinado caso (Tabela 7). Porém quando comparados os avaliadores 2 e 3 houve concordância satisfatória.

Tabela 7- Comparação da intensidade da concordância entre as avaliações feita por três observadores (OBS) do número de colônias de *Metarhizium* sp. em placas de Petri contendo meio seletivo (CTC - Meio BDA acrescido de Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Avaliação dos grupos tratado com os isolados CG 148 ou ARSEF 3641 de *Metarhizium anisopliae* s. l. formulados em óleo mineral ou óleo de soja. A concordância foi mensurada utilizando o método de análise Kappa, onde o valor máximo é igual a 1, o que representa total concordância ou quanto mais próximos de 1 os valores indicam a concordância esperada pelo acaso, se negativos ou próximo de zero indicam nenhuma concordância.

	ISOLADO CG 148 + ÓLEO VEGETAL			ISOLADO CG 148 + ÓLEO MINERAL			ISOLADO ARSEF 3641 + ÓLEO VEGETAL			ISOLADO ARSEF 3641 + ÓLEO VEGETAL		
	OBS 1	OBS 2	OBS 3	OBS 1	OBS 2	OBS 3	OBS 1	OBS 2	OBS 3	OBS 1	OBS 2	OBS 3
OBS 1	-----	0,81* [0,73;0,89]	0,83* [0,76;0,91]	-----	0,75* [0,65;0,84]	0,87* [0,800,94]	-----	#	#	-----	0,74* [0,64;0,83]	0,92* [0,86;0,98]
OBS 2	0,81* [0,73;0,89]	-----	0,95* [0,91;0,99]	0,75* [0,65;0,84]	-----	0,88* [0,81;0,95]	#	-----	0,91* [0,94;0,97]	0,74* [0,64;0,83]	-----	0,79* [0,70;0,88]
OBS 3	0,83* [0,76;0,91]	0,95* [0,91;0,99]	-----	0,87* [0,800,94]	0,88* [0,81;0,95]	-----	#	0,91* [0,94;0,97]	-----	0,92* [0,86;0,98]	0,79* [0,70;0,88]	-----

*Significantes ao nível de $\alpha=5\%$ # Não foi possível estimar a correlação entre os observadores

5.4.2 Reisolamento de *Metarhizium* spp. dos solos tratados

Nas amostras de solo coletadas de todos os grupos no dia zero, antes do tratamento, não foram encontradas colônias características de *Metarhizium* sp. A partir das avaliações do terceiro dia após o tratamento com as formulações, o grupo controle (sem tratamento) e os grupos controles oleosos (tratados apenas com os veículos adjuvantes) não apresentaram colônias de *Metarhizium* sp. em nenhum dos dias avaliados.

De forma geral em todos os grupos tratados com as formulações fúngicas foi isolado colônias de *Metarhizium* sp. nos diferentes dias de avaliação. Porém, dentre os dez vasos avaliados de cada grupo, por vezes houve amostras de vasos em que não foi possível isolar colônias de *Metarhizium* sp. (Tabela 9). Apesar destes resultados, em dias posteriores de coleta estes mesmos vasos obtiveram amostras positivas para colônias de *Metarhizium* sp. (tabela 9).

Após 3 dias do tratamento, foi possível isolar colônias de *Metarhizium* sp. de todas as amostras de solo dos dez vasos tratados com o isolado CG148 formulado em óleo mineral (148OLM) e com o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo vegetal (3641OLV), de tal forma que estes grupos apresentaram diferença significativa das demais formulações (Tabela 8).

No segundo dia de coleta (7º dia após o tratamento) todos os grupos apresentaram dentre os 10 vasos avaliados amostras de solo positivas para a presença de unidades formadoras de colônias (UFC), não havendo diferença significativa entre os grupos tratados com as formulações fúngicas. Sendo que 50%, de todas as amostras de solo avaliadas, apresentaram 2 cruzeiros (1-25 colônias por placa) (Tabela 8).

Na coleta feita no 21º dia após o tratamento foram isoladas colônias de *Metarhizium* sp. em todos os grupos, porém em menor número no grupo CG 148 formulado em óleo vegetal (148OLV), tendo os demais grupos apresentado estatisticamente mais colônias de *Metarhizium* sp. em suas amostras de solo (Tabela 8).

De forma geral obteve-se um crescente reisolamento de *Metarhizium* sp. ao passar do tempo após os tratamentos, visto que, a frequência de placas negativas para colônias de *Metarhizium* sp. foi menor de acordo com o tempo e um número maior de colônias eram isoladas por placa (Tabela 9).

No 60º dia após o tratamento pode-se observar que um aumento significativo do número de colônias em todos os grupos se comparado com o 3º dia de coleta. Destacando-se o isolado ARSEF 3641 formulado em óleo vegetal que obteve mais de 90% das amostras classificadas com 5 cruzeiros (Tabela 9).

Na coleta do 60º dia observa-se que no grupo tratado com o isolado ARSEF 3641 formulado tanto em óleo vegetal quanto em óleo mineral, houve mais colônias por placa se comparados com as formulações do isolado CG148 (Tabela 8).

Se comparadas as duas formulações oleosas do isolado CG148, a formulação com óleo mineral obteve mais colônias nas amostras coletadas do 3º e 21º dia (Tabela 8). Já para o isolado ARSEF 3641, a quantidade de colônias de *Metarhizium* sp. foi igual entre os dois tipos formulações testadas em todos os dias de avaliação, salvo o grupo tratado com a formulação em óleo de soja, que no 3º dia de coleta apresentou consideravelmente mais colônias (Tabela 8).

Tabela 8 – Mensuração feita segundo o método de cruces (+) da quantidade de colônias por dia (3°, 7°, 21° e 60°) isoladas do solo dos diferentes grupos após o tratamento de dez vasos com formulações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM) e mantidos em condições seminaturais.

Vasos	3° dia				7° dia			
	148 OLV	148 OLM	3641 OLV	3641 OLM	148 OLV	148 OLM	3641 OLV	3641 OLM
1	++	++++	++++	+	-	+	-	++
2	+++	+++	++++	-	+	++	-	-
3	-	++++	++++	-	++	-	+	+
4	-	+++	++++	+	+++	++++	+	+
5	-	++	+	-	++	+	+	+
6	-	++++	++++	+	-	+	+	++
7	-	++++	++	-	+	+++	-	+
8	-	+++	++++	-	+	++	+	++
9	-	+	++++	-	-	+	+	+
10	-	+	-	-	+	++++	+	-
Significância	a	b	b	a	a	a	a	a

Tabela 8. Continuação

Vasos	21° dia				60° dia			
	148 OLV	148 OLM	3641 OLV	3641 OLM	148 OLV	148 OLM	3641 OLV	3641 OLM
1	-	++++	+	-	++++	++	++++	+++
2	-	++++	++	+	++	++	++++	++++
3	+	+++	+	+	+++	++	++++	+++
4	+++	++++	+++	++	+	++	++++	+
5	++++	++	+	+	+++	+	++++	++++
6	-	+++	+	-	+	+++	++++	++++
7	++	++	++	++	+	++++	++++	+
8	+	+++	++	+++	+	+++	++++	+
9	+	++++	-	++	+	++	+++	++++
10	++	++++	-	+	+	+++	++++	+++
Significância	a	b	b	b	a	a	b	ab

Letras minúsculas diferentes no mesmo dia e na mesma linha apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$) segundo o teste de Friedman.

Legenda:

- Zero colônia de *Metarhizium* sp. isolada
- + 1 a 25 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas
- ++ 26 a 50 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas
- +++ 51 a 75 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas
- ++++ ≥ 76 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas

Tabela 9 - Mensuração feita segundo o método de cruces (+) da quantidade de colônias isoladas por grupo nos diferentes dias de coleta (3°, 7°, 21° e 60° dia) após o tratamento de dez vasos com formulações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 3641 + óleo vegetal (3641 OLV), ARSEF 3641 + óleo mineral (3641 OLM), CG 148 + óleo vegetal (148 OLV) ou CG148 + óleo mineral (148 OLM) e mantidos em condições seminaturais.

Vasos	148 OLV				148 OLM			
	3° dia	7° dia	21° dia	60° dia	3° dia	7° dia	21° dia	60° dia
1	++	-	-	++++	++++	+	++++	++
2	+++	+	-	++	+++	++	++++	++
3	-	++	+	+++	++++	-	+++	++
4	-	+++	+++	+	+++	++++	++++	++
5	-	++	++++	+++	++	+	++	+
6	-	-	-	+	++++	+	+++	+++
7	-	+	++	+	++++	+++	++	++++
8	-	+	+	+	+++	++	+++	+++
9	-	-	+	+	+	+	++++	++
10	-	+	++	+	+	++++	++++	+++
Significância	a	a	ab	b	a	ab	ab	b

Tabela 9 - Continuação

Vasos	3641 OLV				3641 OLM			
	3º dia	7º dia	21º dia	60º dia	3º dia	7º dia	21º dia	60º dia
1	++++	-	++	++++	+	++	-	+++
2	++++	-	+++	++++	-	-	+	++++
3	++++	+	++	++++	-	+	+	+++
4	++++	+	++++	++++	+	+	++	+
5	+	+	++	++++	-	+	+	++++
6	++++	+	++	++++	+	++	-	++++
7	++	-	+++	++++	-	+	++	+
8	++++	+	+++	++++	-	++	+++	+
9	++++	+	+	+++	-	+	++	++++
10	-	+	+	++++	-	-	+	+++
Significância	a	a	b	b	a	b	b	c

Letras minúsculas diferentes no mesmo grupo e na mesma linha apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$) segundo o teste de Kruskal Wallis.

Legenda:

- Zero colônia de *Metarhizium* sp. isolada
- + 1 a 25 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas
- ++ 26 a 50 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas
- +++ 51 a 75 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas
- ++++ ≥ 76 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas

6 DISCUSSÃO

Metarhizium anisopliae é considerado um promissor agente de controle biológico de carrapato. Diversos estudos reportaram a alta eficácia para o controle de fêmeas ingurgitadas e de larvas em testes laboratoriais (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; POLAR et al., 2008; CAMARGO et al., 2012; PERINOTTO et al., 2013; MARCIANO et al., 2013).

No presente trabalho os isolados CG 148 e ARSEF 3641 de *M. anisopliae*, foram testados em condições seminaturais e selecionados previamente através de trabalhos de Perinotto (2013) e Golo (2014). Estes autores reportaram que tais isolados apresentaram alta virulência contra *Rhipicephalus microplus*, boas características quanto produção de conídio e resistência a fatores abióticos (radiação ultravioleta e temperatura). Características ideais para a utilização no controle do carrapato bovinos a campo.

Perinotto (2013) ao testar diferentes isolados brasileiros constatou que o isolado CG148 destacou-se como um dos mais virulentos e interferiu significativamente na redução dos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* tratadas. Golo (2014) avaliou *in vitro* este mesmo isolado (como ARSEF 782) e também o isolado ARSEF 3641, sendo que os mesmos se destacaram por apresentarem resultados consideravelmente satisfatórios quanto à virulência para *R. Microplus*, termotolerância e tolerância à radiação UV-B quando comparados a outros 19 isolados de *Metarhizium* spp.

Visto isto, sob condições seminaturais preconizou-se mimetizar o ambiente onde se encontra a maior parte da população do carrapato *R. microplus*, a pastagem. Nestas condições tanto agente controlador quanto a praga alvo foram constantemente desafiados frente as adversidades ambientais.

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a associação do fungo com os veículos oleosos de diferentes origens (vegetal e mineral) foi capaz de manter o fungo viável por um período de até 60 dias após o tratamento e obter neste intervalo de tempo um percentual de eficácia médio de 85,08 até 100% sobre o artrópode.

Alguns estudos reportam o controle do carrapato dos bovinos utilizando a pulverização de suspensão aquosa de *Metarhizium* sp. em pastagem. Bittencourt et al (2003) avaliaram a ação de *M. anisopliae* aplicada sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *R. microplus*, onde relataram até 53,78% de controle de larvas depois de um protocolo de três aplicações de suspensões conidiais sobre a forrageira. Garcia et al., (2011) avaliaram o efeito da aplicação do mesmo fungo em pastagem, naturalmente infestada e submetida ao pastejo com bovinos, não observando diferença nas contagens de fêmeas nos bovinos do pasto controle e do pasto tratado. Porém, o mesmo isolado fúngico quando testado em laboratório sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato reduziu significativamente o peso da massa de ovos, a taxa de eclosão e a eficiência reprodutiva das fêmeas.

Tal achado sugere que em geral, sob condições ambientais, o conídio pode não germinar ou penetrar na cutícula, e/ou pode causar infecções sub letais (SAMISH et al., 2004) provavelmente influenciado por variações de temperatura, umidade, radiação, fatores microclimáticos, composições químicas e pela microbiota do hospedeiro ou do solo (ALVES, 1998; POLAR et al., 2005), entre outros.

Para reverter estes problemas, formulações apropriadas podem ser desenvolvidas para proteger o conídio das adversidades e, deste modo melhorar sua capacidade de germinar e de iniciar o processo de penetração da cutícula em condições a campo (BITTENCOURT et al. 2002).

Perinotto (2013) em testes laboratoriais, obteve percentuais de controle muito semelhante aos apresentados neste manuscrito, quando utilizou as mesmas condições de

formulações (óleo vegetal e mineral) propostas nos experimentos descritos aqui. Este autor descreve percentuais de controle de fêmeas de *R. microplus* próximos a 95% em três dos cinco isolados testados com óleo mineral, sendo que as formulações com óleo vegetal mantiveram altos percentuais de controle, em torno de 75%, o que é extremamente relevante dentro do contexto de controle biológico.

Os óleos vegetais e minerais são testados em formulações fúngicas com intuito de proteger os conídios de dessecação e também por proporcionar um efeito sinérgico, melhorando a eficiência dos fungos sobre a praga alvo (ALVES, 1998). Sendo assim, o presente trabalho testou a aplicação de formulações oleosas sobre o solo, uma vez que é confirmada por diversos autores a necessidade de se formular fungos entomopatogênicos (PRIOR; JOLLANDS, 1988; BATEMAN et al., 1993; MOORE et al. 1993; INGLIS et al. 1995; SAMISH, 2014, CAMARGO et al., 2014; GOLO, 2014).

Pôde-se notar que durante os experimentos o número de colônias, por placa de reisolamento, variou nos diversos momentos de coleta havendo alguns vasos em que não foi possível reisolamento de *Metarhizium* sp., porém, em coletas seguintes os mesmos vasos se apresentavam positivos a presença de colônias características do fungo, com isso podemos afirmar que todos grupos tratados com as formulações fúngicas mantiveram o microorganismo. Tal inconstância notada pode ser justificada pela forma aleatória dos pontos de coleta preconizada em cada vaso, entretanto deve-se levar em conta a variação das condições climáticas como temperatura, umidade, e precipitação que exercem grande influência na mobilidade e ocorrência do microorganismo no solo.

Foi registrado ocorrência de fortes precipitações a partir do 6º dia após o tratamento, visto que houve dias atingindo até 9,9mm em uma hora, o suficiente para deslocar os conídios no solo, diluindo-os no meio e conseqüentemente reduzindo a concentração na superfície de onde partiam as amostras coletadas. Tal intempérie pode justificar a inconstância do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por amostra.

Inyang et al. (2000), mostraram que a precipitação pode reduzir o inóculo de *M. anisopliae*, e assim, exercer um efeito prejudicial no controle de pragas. Estes mesmos autores descreveram que veículos oleosos mais viscosos parecem melhorar a aderência de *M. anisopliae* à superfície das plantas e tem seu deslocamento reduzido pela chuva.

Altas variações de temperatura foram observadas durante o experimento, havendo uma média 25°C, porém uma variação entre 16,2 e 37,3 °C, que podem gerar grande estresse aos conídios, interferindo na sua germinação, permanência no ambiente e virulência para o artrópode. A maior temperatura alcançada no presente trabalho é muito próxima a relatada por Alves et al., (2016) como limítrofe a sensibilidade de conídios de *M. anisopliae*, onde os autores relatam que o fungo apresentou um atraso de germinação quando exposto a 40°C durante 2, 4 ou 6h.

Estes mesmos autores relataram um decréscimo na germinação quando comparada suspensões aquosas e formulações oleosas conídios de *M. anisopliae* durante 5 dias. Conídios formulados em óleo mineral e expostos a um ciclo de 40° por 4h e 25° por 19h, apresentaram variação na germinação de 92,8 a 87,2% do 1º dia até o 5º dia, enquanto conídios não formulados apresentaram a germinação de 79,3 a 39,1% do 1º dia ao 5º dia, respectivamente.

Além de virulento para o artrópode a qual se destina o controle, o isolado fúngico precisa resistir aos estresses abióticos presentes no meio ambiente. Isso implica na reunião de vários fatores fundamentais para a seleção de isolados candidatos à aplicação a campo. Uma vez que, espera-se que fungos patogênicos sejam naturalmente mais tolerantes as intempéries do meio e tenham resultados ainda mais satisfatórios quando formulados (GOLO, 2014).

Fatores que afetam a proliferação fúngica suspendendo ou inibindo a processo de colonização do ambiente, sem que ocorra a eliminação dos fungos ali já existentes tem sido

apontado por diversos estudos (LINGG; DONALDSON, 1981; SHIELDS et al., 1981; SHARAPOV; KALVISH, 1984; GRODEN; LOCKWOOD, 1991).

Visto isto torna-se claro que os conídios provenientes dos tratamentos aqui expostos sofreram com relação aos fatores ambientais e possivelmente a eficácia dos tratamentos foi influenciada. Nota-se tais consequências sobre a mortalidade de fêmeas, uma vez que mesmo sendo formulados em óleo, os isolados testados atingiram no máximo 20% de mortalidade de fêmeas de *R. micropus*. Entretanto as duas condições de formulações oleosas propostas, foram eficazes em reduzir significativamente o número de larvas do artrópode.

Também em condições ambientais, Samish et al., (2014), ao comparar duas formulações oleosas de *M. brunneum*, uma a base de óleo mineral e outra à base de óleo de Canola (óleo vegetal), para o controle de *R. annulatus*, relatam resultados similares aos expostos neste manuscrito, quanto ao impacto no número de descendentes das fêmeas do carrapato exposto ao tratamento do solo com formulações fúngicas oleosas. Onde, os mesmos descrevem que as formulações testadas reduziram drasticamente o número de larvas por interferir nos índices reprodutivos das fêmeas infectadas, assim como, no desenvolvimento de ovos que posteriormente acabavam por ser colonizados. Neste mesmo trabalho, foi alcançado um percentual médio de mortalidade de fêmeas ingurgitadas igual a 80 e 21%, para os grupos tratado com óleo mineral e com óleo vegetal respectivamente.

Dentre os diversos fatores para as divergências quanto a mortalidade das fêmeas, sugere-se que a espécie de fungo utilizada, assim como o artrópode hospedeiro, e a umidade constante mantida por irrigação artificial e cobertura vegetal preconizadas no trabalho de Samish et al., (2014) possam ter contribuído para esta diferença de resultados, uma vez que, estes são fatores importantes a serem levados em consideração no controle microbiano.

A infecção fúngica natural varia consideravelmente de acordo com o estágio e a espécie de carrapato e com as condições ecológicas (SAMISH et al., 2004). A cobertura do solo altera as condições abióticas do microambiente em que os carrapatos se refugiam e serve como um “tampão” para condições ambientais extremas em rápida mudança. Além disso, as coberturas, especialmente as orgânicas, pode afetar a composição química e a população microbiana da camada superior do solo (GARCIA et al., 2013).

Obter maior número de colônias após 60 dias do tratamento quando comparado aos valores obtidos ainda no 3º dia após a pulverização das formulações sobre o solo, ressaltam ainda mais a capacidade de sobrevivência e permanência dos isolados testados nas condições as quais foram submetidos. Encontrar cadáveres de fêmeas ingurgitadas ainda no solo contendo a fase conidiogênica sobre a cutícula, demonstrou a capacidade dos isolados utilizados de se manterem e sobreviverem a todas as variações do ambiente.

Notavelmente, os isolados testados completaram os seus ciclos de vida e os conidióforos formados sobre as fêmeas de *R. microplus* a campo, evidenciam esta característica importante. Visto que, uma nova geração de conídios crescidos em carrapatos mortos, garante a persistência do inóculo infeccioso no micro-ambiente, sendo esta uma nova fonte potencial de transmissão para outros carrapatos (GINDIN et al., 2001).

Quanto ao impacto das formulações no número de larvas, os resultados descritos aqui mostram que, não houve diferença significativa entre os dois isolados fúngicos utilizados nas duas condições em que os mesmos foram formulados, ou seja, em condições seminaturais não houve diferença entre o óleo mineral e o óleo vegetal.

Deve-se destacar que em alguns estudos, utilizando os óleos como adjuvantes em formulações fúngicas, os de origem mineral por vezes apresentaram melhores resultados de um modo geral (POLAR et al, 2005; PERINOTTO, 2013; SAMISH, 2014). Sabe-se também que um dos primeiros passos no desenvolvimento de uma formulação micoinsecticida é avaliar os

efeitos de seus componentes na viabilidade dos conídios, afim de selecionar produtos compatíveis com os conídios do fungo (ALVES et al., 2002).

Sendo assim, preconizou-se testar a viabilidade e o tempo de germinação dos conídios sem retirar o óleo dos mesmos, afim de verificar qualquer interferência destes adjuvantes sobre os conídios. A viabilidade das formulações com óleo mineral e com óleo de soja os mesmos chegaram ao 100% de germinação dos conídios, porém, houve uma germinação mais rápida dos conídios não formulados e dos formulados em óleo vegetal quando comparado ao óleo mineral.

Tal achado corrobora com os encontrados por Samish et al. (2014), onde houve a germinação mais rápida de conídios formulados em óleos provenientes de plantas (Canola e Oliva), quando comparados aos derivados de petróleo (Parafina e Mineral). Alves; Faria (2010) relataram que o teor de água em formulações a base de óleo vegetal pode conferir um processo de germinação mais acelerado aos conídios, devido a combinação com resíduos provenientes da matéria prima dos óleos, servindo de fonte nutricional ao fungo.

Aluyor et al., (2009) descreveram que os óleos de origem vegetal por possuírem características insaturadas, os fazem mais fluidos o que facilita os processos de degradação, além disto, o mesmo estudo elucida que os óleos vegetais possuem menor estabilidade oxidativa e são mais instáveis no ambiente que os óleos minerais. Logo, sugere-se que além da fonte nutricional oferecida aos conídios pelos óleos vegetais, os mesmos por serem mais facilmente “degradáveis” no ambiente, podem dar ao conídio uma superfície de contato mais rápida com o meio e acelerar o processo de germinação, ao contrário dos óleos minerais que por suas características mais estáveis, fazem com que o conídio fique mais tempo no interior da micela o que impede o mesmo de se comunicar com fatores ambientais que possam despertar a germinação.

A pesar da diferença de tempo de germinação em meio de cultura reportados aqui, não podemos afirmar que os diferentes óleos testados podem influenciar no tempo de germinação dos isolados CG148 e ARSEF 3641 de *M. anisopliae* (s.l.) quando em outra superfície de contato, uma vez que Barreto et al. (2016) relataram que a germinação de conídios formulados em óleo é mais rápida sobre a cutícula de carrapatos, do que conídios apenas suspensos em água. Tal fenômeno ocorre devido características lipofílicas da cutícula dos artrópodes.

A viabilidade dos conídios também foi acompanhada sobre as condições seminaturais onde pode-se observar, a partir dos testes de reisolamento de *Metarhizium* sp. do solo, que no grupo tratado com o isolado CG 148 formulados em óleo mineral, obteve-se mais colônias no 3º e 21º dias após o tratamento se comparado a formulação do mesmo isolado com óleo de soja.

Visto isto, infere-se que devido as características do óleo mineral supracitadas, o mesmo conferiu ao conídio a possibilidade de ficar mais tempo no interior da micela e logo maior proteção aos fatores abióticos quando lançado a campo. O óleo mineral pode ter influenciado na permanência do fungo no solo, e com isto torná-lo possivelmente mais viável e apto a dar continuidade ao ciclo de vida e colonização do ambiente.

Os experimentos discutidos aqui, mostraram que os isolados de *M. anisopliae* s. l. formulados tanto em óleo mineral, quanto em óleo vegetal, obtiveram resultados satisfatórios nas avaliações da presença do fungo no solo após o tratamento e também no teste de controle do carrapato na pastagem. Estes achados corroboram com diversos outros trabalhos que evidenciam que além de prevenir dessecação a adição de compostos oleosos prolongam a sobrevivência dos conídios e diminui a sensibilidade à radiação UV (PRIOR; JOLLANDS, 1988; MOORE et al. 1993, INGLIS et al. 1995, GOLO, 2014).

Os óleos facilitam que os conídios tenham maior adesão a superfície externa do artrópode (PRIOR, 1988), e conseqüentemente auxiliaram na penetração da cutícula do carrapato que caminha principalmente nos primeiros dias após a queda sobre o solo a procura

de abrigo. Deve-se destacar a capacidade dos isolados fúngicos em ambas as condições de formulações de manterem o ciclo de vida no ambiente e causar morte da praga alvo em até 60 dias da aplicação.

O fungo foi encontrado no solo durante todo o período de avaliação após o tratamento, onde as fêmeas ingurgitadas fizeram a postura e onde eclodiram as larvas. Tornando as condições favoráveis para o encontro entre o fungo e a praga alvo. Sendo assim pode-se inferir que foi alcançada a ação patogênica na fêmea e/ou nos ovos contidos no solo e até mesmo na haste da gramínea atingindo as larvas, provocando conseqüentemente o controle de todas as fases do carrapato *R. microplus*, visto que foi possível reduzir o número de larvas infestantes nos grupos tratados.

O desenvolvimento de epizootias induzida por fungos entomopatogênicos depende da relação entre o hospedeiro e a densidade do inóculo na cultura. Para o controle de pragas, o nível de inóculo introduzido e mantido na cultura deve exceder o limiar epizoótico (LUI, et al., 1989; BUTT et al. 1994).

A partir dos resultados obtidos pode-se considerar satisfatório a concentração das formulações a 10^7 conídios/cm² para atingir o controle esperado, visto que ocorreu o controle do carrapato e houve a manutenção dos isolados no ambiente. Estas observações, levam a crer que numa futura reintrodução de fêmeas do carrapato (até 60 dias) no ambiente tratado, ainda seria possível encontrar a ação biocontroladora em níveis satisfatórios. Monteiro (2014) ao investigar em condições seminaturais o controle de *R. microplus*, com nematoides entomopatogênicos, conseguiu registrar após 65 dias do primeiro tratamento, uma segunda infecção após a reintrodução de novas fêmeas no ambiente tratado.

No presente trabalho não houve diferença entre os resultados obtidos nos diferentes tratamentos oleosos propostos, porém é relevante considerar outros fatos relacionados ao custo de produção, uma vez que os óleos vegetais e minerais por vezes possuem custos variados, assim como podem agregar valores diferenciados ao produto, já que se utilizado óleo mineral o produto não pode ser certificado e utilizado como orgânicos.

Os resultados descritos aqui ainda podem futuramente ser otimizados por meio de adoção de algumas estratégias na adequação das formulações e no intervalo das aplicações, de modo que favoreça ainda mais o uso, a eficácia, a produção e a futura comercialização destes promissores acaricidas.

7 CONCLUSÕES

Após todas as avaliações, foi possível concluir que:

As formulações dos isolados CG 148 e ARSEF 3641 de *M. anisopliae* (s.l.) contendo 10% de óleo mineral ou óleo de soja são eficazes no controle da fase não parasitária de *R. microplus* quando aplicadas sobre o solo em condições seminaturais.

Ambos os isolados CG 148 e ARSEF 3641 testados nas duas condições de formulações propostas e quando aplicados sobre o solo, mostraram-se em condições seminaturais aptos a realizarem o ciclo de vida sobre o hospedeiro alvo e permanecerem ativos frente as intempéries ambientais por pelo menos 60 dias após o tratamento.

Os isolados CG 148 e ARSEF 3641 de *M. anisopliae* (s.l.), formulados em óleo mineral e vegetal, obtiveram notável virulência contra fêmeas de *R. microplus* expostas ao solo tratado, mesmo em condições seminaturais, e foram capazes de reduzir significativamente a população de larvas infestantes no ambiente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. NBR 12679 - Agrotóxicos e Afins - Produtos Técnicos e Formulações - Terminologia. Rio de Janeiro, 2004.

ABDEL-SHAFY, S.; SOLIMAN, M. M. M., 2004 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.

AGUDA, R. M.; ROMBACH, M. C.; SHEPARD, B. M. Effect of nim oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **International Rice Research New**, v. 11, p. 34–35, 1986.

ALUYOR, E. O.; OBAHIAGBON, K. O.; ORI-JESU, M. Biodegradation of vegetable oils: a review. **Scientific Research and Essays**, v. 4, p. 543–548, 2009.

ALVES, F. M.; BERNARDO, C. C.; PAIXÃO, F. R. S.; BARRETO, L. P.; LUZ, C.; HUMBER R. A.; FERNANDES, E. K. K. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: Viability (in vitro) and virulence (in vivo) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v. 115, p. 1-11, 2016.

ALVES, L. F. A.; FILHO, A. B. Formulação de entomopatógenos - uma boa formulação é a base para o sucesso de um inseticida microbiano. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, p. 32-34, 1998.

ALVES, R. T.; Faria, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. DF: Embrapa Cerrado, p. 50, 2010.

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**. Embrapa Cerrados, 2001. 14p.

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.

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

ALVES, S. B.; NOGUEIRA, N. L. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9, 1984, Londrina. **Resumos...** Londrina, p. 170.

ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIANSE, 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.

ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005. 144p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of Temperature and Relative Humidity on Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in Mycosed Cadavers of *Schistocerca gregária*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 78, 59–65, 2001.

BACCHI, 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.

BARRETO, L. P.; LUZ, C.; MASCARIN, G. M.; ROBERTS, D. W.; ARRUDA, W.; FERNANDES, E. K. K. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.l. on tick cuticle and artificial medium. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 138, p. 94-103, 2016.

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.

BARROS-BATTESTI, D. M. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, SP: Butantan, 2006, 223p.

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

BATEMAN, R. P.; MATHEWS, G. A.; HALL, F. R. **Ground-based application equipment**. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Dordrecht Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 77-112.

BATISTA-FILHO, A.; LEITE, L. G.; RAGA, A.; SATO, M.E. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolites sordidus* (German) adults. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 405-408, 1995.

BATISTA-FILHO, A.; LEITÃO, A. E. F.; SATO, M. E.; LEITE, L. G.; RAGA, A. Efeito da associação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill com óleo mineral, na mortalidade de *Cosmopolites sordidus* German (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 23, p. 379-383. 1994.

BEYS-DA-SILVA, W. O. **O complexo lipolítico de *Metarhizium anisopliae* e sua relação com o processo de infecção de hospedeiros artrópodes**. 2009. 165p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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.; BAHIANSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; SOUZA, E. J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p. 38-42, 2003.

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

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

BLANFORD, S.; THOMAS, M. B. Host thermal biology: the key to understanding host-pathogen interactions and microbial pest control?. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 1, p. 195–202, 1999.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1795–1805, 1988.

BRAGA G. U.; RANGEL, D. E.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 481-422, 2006.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61° N to 54°. **S. J. Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 98–108, 2001.

BURGES, H. D. Safety: safety testing and quality control of microbial pesticides. In: Burges H. D. **Microbial control of pests and plant diseases**. Academic Press, 1981, p.737-767.

BUTT, T. M.; IBRAHIM, L.; BALL, B. V.; CLARK, S. J. Pathogenicity of the entomogenous, hyphomycete fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. **Biocontrol Science and Technology**, v. 4, 207-214, 1994.

CAMARGO, M. G. **Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: testes em condições laboratoriais e a campo**. 2014. 60 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

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

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

CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A., BITTENCOURT, V. R. E. P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 271–276, 2014.

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

CASTRO, J. J.; NEWSON, R. M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology Today**, v. 9, p. 13-17, 1993.

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

CONSOLO, V. F.; SALERNO, G. L.; BERON, C. M. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. **Biocontrol**, v. 48, p. 705-712, 2003.

COOK, R. J.; BRUCKART, W. L.; COULSON, J. R.; GOETTEL, M. S.; HUMBER, R. A.; LUMSDEN, R. D.; MADDOX, J. V.; MCMANUS, M. L.; MOORE, L.; MEYER, S. F. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v.7, p. 333-351, 1996

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science** v. 56, p. 651–676, 2000.

COSTA, E. A. D.; ALMEIDA, J. E. M.; LOUREIRO, E. S.; SANO, A. H. Compatibilidade de adjuvantes no desenvolvimento “in vitro” dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil**, v. 22, p. 38-40, 2003.

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

DEBACH, P. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. México: Editora Continental, 1968, 927p.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, p. 134-150, 2000.

DRIVER, F.; MILNER, R. J. PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. **Applications in PCR mycology**. CABI Publishing, 1998. p. 153-186.

FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI D. M. Aspectos gerais da biologia e identificação e carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Instituto Butantan, 2006. p. 05-12.

FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L. A.; LOMER, C. J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v. 135, p. 171–181, 1996.

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

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

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*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 270-274, 2004.

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.

FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N.; ROBERTS, D. W. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p. 197-205, 2010.

FLECHTMANN, C. A. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p.

FURLONG, J. **Carrapatos: soluções e problemas**. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 65p.

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.; MARTINS, J. R. S. **Resistência dos Carrapatos aos Carrapaticidas**. Circular Técnica 59. Juiz de Fora: EMBRAPA GADO DE LEITE - CNPGL, 2000. 25p.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABO, M. P. J.; MOCHI, D. A.; SIMI, L. D.; CARVALHO, W. M.; TSURUTA, S. A.; BARBOSA, J. C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 267-273, 2011.

GAUSS, C. L. B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, v. 32, p. 467-472, 2002.

GAZIM, Z. C.; FERREIRA, F. B. P.; SILVA, A. V.; BOLOGNESE, K. C.; MERLIN, E.; MESSA, V.; JESUS, R. M.; COUTINHO, C. A.; SILVA, L. C. M. Efficiency of tick biotherapeutic on the control of infestation by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Dutch dairy cows. **International Journal of High Dilution Research**, v. 9, p. 156-164, 2010.

GEORGE J. E. Cattle fever tick eradication programme in the USA: history, achievements, problems and implications for other countries. In: **“The eradication of ticks”, Proceedings of the expert consultation on the eradication of ticks with special reference to Latin America**, FAO animal production and health paper. 1987. p. 1–7.

GEORGE, J. E. Present and future technologies for tick control. **Annals of de New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 583–588, 2000.

GINDIN, G; SAMISH, M; ALEKSEEV, E; GLAZER, I. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science Technology**, v. 11 p. 111–118, 2001.

GOETTEL, M. S.; HAJEK, A. E.; SIEGEL, J. P; EVANS, H. C. Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford. UK: CABI International. 2001. p. 347-376.

GOETTEL, M. S; JARONSKI, S. T. Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 83-99, 1997.

GOETTEL, M. S; POPRAWski, T. J; VANDENBERG, J. D; LI, Z.; ROBERTS, D. W. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M, Lacey, L.A; Davidson, E.W. editors. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, CRC Press. 1990. p. 209-232.

GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D.; WRIGHT, S. P. Fungi. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000. p. 255-282.

GOLO, P. S *Metarhizium spp.*: **Caracterização de isolados com potencial para biocontrole de pragas**. 2014. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

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

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

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

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Mecanismos de resistência aos acaricidas em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 1-6, 2012.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PENÃ, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1. ed. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. p. 05-12.

HALL, R. A.; ZIMMERMANN, G.; VEY, A. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. **Entomophaga**, v. 27, p. 121-127, 1982.

HAZZARD, R. V.; SCHULTS, B. B.; GRODEN, E.; NGOLLO, E. D.; SEIDLECKI, E. Evaluation of oils and microbial pathogens for control of lepidopteran pests of sweet corn. **New Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 1653-1661.

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

HEIMPEL, A. M. Safety of insect pathogens for man and vertebrates. In: BURGESS, H. D.; HUSSEY, N. W. **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press: 1971. p. 469-489.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O.; ZEQUI, J. A. C.; MARTINS, L. H.; PERALTA, C. H.; MOINO, J. R. A. M. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 419-423, 2001.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H.; MOORE, D. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. **Annals of Botany**, v. 79, p. 121-128, 1997.

HUMBER, R. A. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates, www.sipweb.org/fungi/humber.pdf. 2007. Acesso em: 09.abr.2016.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, v. 5 p. 581-590, 1995.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H., 2001. Use of *hyphomycetous* fungi for managing insect pests. In: BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N. **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**. CAB International: Wallingford, 2001. p. 23- 69.

INYANG, E. N.; MCCARTNEY, H. A.; OYEJOLA, B.; IBRAHIM, L.; PYE, B. J.; ARCHER, S. A.; BUTT, T. M. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological Research**, v. 104, p. 653-661, 2000.

JENKINS, N. E.; GOETTEL, M. S. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. **The Memoirs Entomology Society of Canada**, v. 171, p. 37-48, 1997.

JONES, K. A.; BURGESS, H. D. Technology of formulation and application. In: BURGESS, H. D. **Formulation of Microbial Pesticides – Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 7-30.

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

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, 1998.

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.

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.

KAAYA, G. P. Laboratory and field evaluation of entomogenous fungi for tick control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 559-564, 2000.

KELLER, S.; ZIMMERMANN, G. Mycopathogens of soil insects. In: WILDING N, COLLINS, N. M; HAMMOND, P. M; WEBBER, J. F. **Insect-fungus interactions**. London: Academic Press. 1989. P. 239-270.

LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990, 259p.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v. 33, p.159-74, 1977.

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.

LEITE, L.G., TAKADA, H. M.; CARDOSO, C. L.; VILLELA, O.V.; BATISTA-FILHO, A. & AGUIAR J. C. 1995. Controle do gorgulho aquático do arroz *Oryzophagus oryzae*, pelo fipronil e óleo mineral associado ao fungo *Beauveria bassiana*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 24, p.339-344.

LI, Z.; ALVES, S. B.; ROBERTS, D. W.; FAN, M.; DELALIBERA JUNIOR, I.; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 117–136, 2010.

LIANG, Y.Y.; DE ZAMAROCZY, M.; ARSÈNE, F.; PANQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasiliense* Sp7: involvement of nifA, glnA and glnB gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 79, p. 113-119, 1992.

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

LINGG, A. J.; DONALDSON, M. D. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 191-200, 1981.

LIU, Z. Y.; LIU, A. Y.; YAO, Y. J.; HYDE, K. D.; YU, Z. N. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences. **Mycological Research**, v. 106, p. 1100-1108, 2002.

LIU, S. D.; LIN, S. C.; SHIAU, J. F. Microbial control of coconut leaf beetle (*Brontispa longissima*) with green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p. 307-314, 1989,

LOMER, C. J.; BATEMAN, R. P.; JOHNSON, D. L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 667–702, 2001.

LONDT, J. G. H.; ARTHUR, D. R. The structure and parasitic lifecycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarin: Ixodide). **Journal of Entomological Society of South Africa**, v. 38, p. 321-40, 1975.

LUZ, C., I. G.; SILVA, B. P.; MAGALHÃES, C. M. T.; CORDEIRO TIGANO, M. S. Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: *Triatominae*) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil.: Preliminary assays on formulation and application in the field. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 101-110, 1999.

LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; NERY, G. V.; MAGALHÃES, B. P.; TIGANO, M. S. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordidain* peridomestic areas in Central Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p.211-218, 2004.

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

MARCIANO, A. F.; FIOROTTI J. P.; SOUZA, L. A.; CAMARGO, M. G.; PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO I. C.; GÔLO, P. A.; SÁ, F. A.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT V. R. E. P. Eficiência *in vitro* de uma formulação oleosa

de *Metarhizium anisopliae* sensu lato no controle de *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35(Supl.2), p. 28-34, 2013.

MARSHALL, K. C.; BITTON G. Microbial adhesion in perspective. In: BITTON G; MARSHALL, K. C. **Adsorption of microorganisms to surfaces**. New York: J. Wiley & Sons. 1980. p. 1-5.

MASCARIM, G. M.; QUINTELA, E. D. **Técnica de Produção do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para Uso em Controle Biológico**. Documentos 289. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 17p.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa, MG: Epamig, 2010. p. 169–195.

MC CAMMON, S. A.; RATH, A. C. Separation of *Metarhizium anisopliae* strains by temperature dependent germination rates. **Mycological Research**, v. 98, p. 1253-1257, 1994.

MC CLATCHIE, G. V.; D. MOORE, R. P.; BATEMAN; C. PRIOR. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. **Mycological Research**, v. 98, p. 749-756, 1994.

MESSIAS, C. L. Fungos, sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, supl. III, p. 57-59, 1989.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. Micoinseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após 4 décadas?. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 769–779, 2009.

MILNER, R. J. Current status of *Metarhizium* and mycoinsecticide in Australia. **Biocontrol News Information**, v.2, p. 47-50, 2000.

MOLA, F. L.; AFKARI, R. Effects of different vegetable oils formulations on temperature tolerance and storage duration of *Beauveria bassiana* conidia.. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 4707-4711, 2012.

MONTEIRO, C. M. O. Controle de *Rhipicephalus microplus* (acarí: ixodidae) com nematoides entomopatogênicos: aplicação em formulação inseto cadáver e compatibilidade com outros agentes de controle. 2014. 198 p. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

MONTEIRO, S. G.; BAHIANSE, T. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nittens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acarí: Ixodidae). **Ciência Rural**, v. 33, p. 559-563, 2003.
MOORE, D.; BRIDGE, P. D.; HIGGINS, P. M.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, v. 122, p. 605–616, 1993.

MOORE, D.; DOURO-KPINDOU, O. K.; JENKINS, N. E.; LOMER, C. J. Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Biocontrol Science Technology**, v. 6, p. 51-61, 1996

MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; PRIOR, C. Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. **Biocontrol Science Technology**, v. 5, p. 193-199. 1995.

MOORE, D.; CAUDWELL, R. W. Formulation of entomopathogens for the control of grasshoppers and locust. In: GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L. **Microbial Control of Grasshoppers and Locusts**. Memoirs of the Entomological Society of Canada, v. 171, p. 49-67, 1997.

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

MWANGI E. N.; KAAAYA G. P.; ESSUMAN, S. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. **Journal of African Zoology**, v. 109, p.151–160, 1995

NAJAR-RODRÍGUEZ, A. J.; LAVIDIS, N. A.; MENSAH, R. K.; CHOY, P. T.; WALTER, G. H. Evidence for an alternative mode of action and possible new control options. **Food and Chemicals Toxicology**, v. 46, p. 3003–3014, 2008.

NANKINGA, C. M.; D. MOORE. Reduction of banana weevil populations using different formulations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science Technology**, v. 10, p. 645-657, 2000.

NEALE, M. The regulation of natural products as crop-protection agents. **Pest Management Science**, v. 56, p. 677–680, 2000.

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

PANTOU, M. P.; MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: Excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 159-174, 2003.

PERINOTTO, W. M. S.; Atividade enzimática e patogênica de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. no controle biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2013. 78 p. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

PERINOTTO, W. M. S.; CAMARGO, M. G.; GÔLO, P. A.; ANGELO I. C.; QUINELATO, S.; MONTEIRO, C. M. O.; SÁ, F. A.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCIANO, A. F.; FIOROTTI J. P.; BITTENCOURT V. R. E. P. Controle de *Dermacentor nitens* utilizando

uma formulação comercial a base de *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35 (Supl.2), p. 35-42, 2013.

POLAR, P.; MOORE, D.; KAIRO, M. T. K.; RAMSUBHAG, A. Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p.119–148, 2008.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.; 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.

POWELL, R. T.; REID, T. J. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**, v. 108, p. 279-300, 1982.

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

QUEDROGO, A; FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; LOMER, C. J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Mycopathologia**, v. 137, p.37-43, 1997.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERT, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 112, p. 1362-1372, 2008.

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

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

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950

ROBERT, D. W.; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

ROBERTS, D.W.; YENDOL, W. G. Use of microbial control of insects. In: BURGESS, H.D. **Microbial control of insects and mites**. New York: Academic Press, p. 125-149, 1971.

RODDAM, L. F.; RATH, A. C. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 285–288, 1997.

ROSARIO-CRUZ, R.; ALMAZAN, C.; MILLER, R. J.; DOMINGUEZ-GARCIA, D. J.; HERNANDEZ-ORTIZ, R.; DE LA FUENTE, J. Genetic basis and impact in tick acaricide resistance. **Frontiers in bioscience**, v. 1, p. 2657-2665, 2009.

SAIK, J. E.; LACEY, L. A.; LACEY, C. M. Safety of microbial insecticides to vertebrates domestic animals and wildlife. In: LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, FL: CRC Press. 1990. p. 115-132.

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

SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 206, p. 258–266, 2014.

SANTI, L.; SILVA, L. A. D.; SILVA, W. O. B.; CORRÊA, A. P. F.; RANGEL, D. E. N.; CARLINI, C. R.; SCHRANK, A. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 2297-2303, 2011.

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

SHADDUCK, J. A.; ROBERTS, D. W.; LAUSE, S. Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*. Preliminary results. **Environmental Entomology**, v. 11, p. 189-192.

SHARAPOV, V. M.; KALVISH, T. K. Effect of soil fungistasis on zoopathogenic fungi. **Mycopathology**, v. 85, p. 121-128, 1984.

SHIELDS, M. S. et al. Identification of a *Penicillium urticae* metabolite which inhibits *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 374-377, 1981.

SIEGEL, J. P.; SHADDUCK, J. A. Safety of microbial insecticides to vertebrates/humans. In: LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, CA: CRC Press: 1990. p. 101-113.

SILVA, R. Z.; NEVES, P. M. O. J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and in vitro phytosanitary products. **Pest Management Science**, v. 61 p. 667-674, 2005.

SILVA, R. Z.; NEVES, P. M. O. J.; SANTORO, P. H.; CAVAGUCHI, S. A. Efeito de Agroquímicos à Base de Óleo Mineral e Vegetal sobre a Viabilidade dos Fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **BioAssay**, v. 1, p. 1-6, 2006.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. vol. 1. New York: Oxford University Press, 1991. 447 p.

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

ST LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 120, p. 119-124, 1992.

ST. LEGER, R. J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogens of insects. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1119-1125, 1995.

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal of Genetical Microbiology**, v. 132, p. 1509-1517, 1986.

STATHERS, T. E.; MOORE, D.; PRIOR, C. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 111-115, 1993.

STEINHAUS, E. Concerning the harmlessness of insect pathogens and the standardization of microbial control products. **Journal of Economic Entomology**, v. 50, p. 715-720, 1957.

STUDDERT, J. P.; KAYA, H. K.; DUNIWAY, J. M. Effect of water potential, temperature, and clay-coating on survival of *Beauveria bassiana* conidia in a loam and peat soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 417-427, 1990.

STUDDERT, J. P.; KAYA, H. K. Water potential, temperature, and soil type on theation of *Beauveria bassiana* soil colonies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 56, p. 380-386, 1990.

SUNG, G. H.; HYWEL JONES, N. L.; SUNG, J. M.; LUANGSA ARD, J. J.; SHRESTHRA, B.; SPATAFORA, J. W. Phylogenetic classification of Cordyceps and the Clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, p. 5-59, 2007.

THOMAS, M. B.; JENKINS, N. E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Mycological Reserach**, v. 101, p. 1469-1474, 1997.

TONUS, M. Manejo integrado controla cigarrinhas em pastagens. **Revista Balde Branco**, São Paulo, n. 421, 1999.

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

VÄNNINEN, I.; TYNI JUSLIN, J.; HOKKANEN, H. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. **Biocontrol**, v. 45, p. 201-222, 2000.

VERÍSSIMO, C. J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Conselho Regional de Medicina Veterinária**, v. 11, p. 14-23, 2013.

VESTERGAARD S., CHERRY A, KELLER S, GOETTEL M. Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: HOKKANEN, H. M. T.; HAJEK, A. E. **Environmental impacts of microbial insecticides**. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers. 2003. p. 3562.

VIEIRA, P. D. S.; SILVA, W. M. T.; PAIVA, L. M.; ALVES-LIMA, L.; CAVALCANTI, V. L. B. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação dos conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* em diferentes temperaturas. **Biológico**, v. 69, p. 17-21, 2007.

VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4, Bahia. 1978. p. 70.

VINCENT, C.; HALLMAN, G.; PANNETON, B.; FLEURAT-LESSARD, F. Management of agricultural insects with physical control methods. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 261–281, 2003. .

WALSTAD, J. D.; ANDESON, R. F.; STAMBAUGH, W. J.; Effects of environmental conditio on to species of muscardini fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, **Journal Invertebrate Pathology**, v. 16:p. 221-226, 1970.

WHARTON, R. H. In: **Control of arthropods of medical and veterinary importance**. London: Plenum Press, p.134-177. 1974.

WRAIGHT, S. P.; CARRUTHERS, R. I.; JARONSKI, S. T.; BRADLEY, C. A.; GARZA, C. J.; GALAINI; WRAIGHT, S. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Biological Control**, v. 17, p. 203–217, 2000.

WRAIGHT, S. P.; JACKSON, M. A.; DE KOCK, S. L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**. CAB International, Wallingford: p. 253–287, 2001.

ZIMMERMANN G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science**, v. 37, p. 375-379, 1993.

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

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