

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

**DISSERTAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES PROPÁGULOS**  
**DE *Metarhizium* spp. A ACARICIDAS COMERCIAIS PARA O**  
**CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus***

**ADRIANI DA SILVA CARNEIRO LOPES**

**2021**



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

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES PROPÁGULOS  
DE *Metarhizium* spp. A ACARICIDAS COMERCIAIS PARA O  
CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus***

**ADRIANI DA SILVA CARNEIRO LOPES**

Sob orientação da Professora

**Patrícia Silva Gôlo**

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

Seropédica

Agosto, 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L864a Lopes, Adriani da Silva Carneiro, 1995-  
AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES PROPÁGULOS  
DE *Metarhizium* spp. A ACARICIDAS COMERCIAIS PARA O  
CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* / Adriani da  
Silva Carneiro Lopes. - Rio de Janeiro, 2021.  
66 f. : il.

Orientadora: Patrícia Silva Gôlo.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2021.

1. Fungo entomopatogênico. 2. Carrapaticida. 3.  
Carrapato do boi. 4. Propágulos fúngicos. I. Gôlo,  
Patrícia Silva, 1987-, orient. II Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3859 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.061972/2021-36

Seropédica-RJ, 30 de agosto de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
ADRIANI DA SILVA CARNEIRO LOPES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/08/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

*(Assinado digitalmente em 30/08/2021 12:13 )*  
PATRICIA SILVA GOLO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matrícula: 2221855

*(Assinado digitalmente em 30/08/2021 12:42 )*  
MARIANA GUEDES CAMARGO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 072.326.816-90

*(Assinado digitalmente em 30/08/2021 12:13 )*  
CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 058.965.206-03

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3859**, ano:  
**2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **30/08/2021** e o código de verificação: **dca208207c**

“A ciência e vida cotidiana não podem e não devem ser separadas”  
(Rosalind Franklin)

“Eu nasci para fazer tudo aquilo que dizem que mulher não pode!”  
(Autora desconhecida)

“Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”  
(William Shakespeare)

**Aos meus pais, por serem a força propulsora para a realização de cada sonho que guardo em mim, dedico!**

## AGRADECIMENTOS

À Deus e aos guias de luz que me acompanham, por nunca me deixarem perder a fé em mim mesma.

Aos meus pais, Adriano e Adriana, por serem meu maior pilar, por nunca me deixarem desacreditar da minha capacidade ou sequer perder as minhas raízes, por sempre terem um colo e uma palavra amiga e por vibrarem a cada vitória. Por criarem uma mulher pro mundo, destemida, sem amarras e que sabe se posicionar, enfrentando os desafios da vida. Amo vocês, incondicionalmente, muito obrigada.

Aos meus irmãos, Alexsander e Ariani, minha tia Andréa, meu primo Vitor e meus avós Adelvando, Marlene e Jorge, por compreenderem os estresses de uma mestranda, pela torcida e por compreenderem a minha ausência em alguns momentos em família. Amo vocês, obrigada por tudo.

À minha filha, Lívia, por ter sido um suporte de carinho, sorrisos e amor, e por incentivar a cientista que habita em mim confiando no meu potencial. Amo você, filha.

À minha prima Gizele, por todo cuidado, atenção e preocupação, principalmente com a saúde de uma mestranda “level hard”. Obrigada por tanto carinho e amor.

À Professora Patrícia Gôlo, pelo convite para que fosse sua orientada. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, pelo crescimento pessoal e profissional e por me ensinar a admirar o fantástico mundo dos fungos entomopatogênicos. Você foi a melhor versão de mãe científica que eu poderia ter!

À Professora Sonia Marques, por todos os anos de orientação na graduação, pela amizade, por me ensinar tudo o que sei sobre produção animal sustentável e pelo incentivo à pós-graduação.

A todos os professores que encontraram o meu caminho, sejam os do ensino básico, da graduação ou pós-graduação. Fui absurdamente privilegiada por, em meio a tantas dificuldades, encontrar no sistema público de ensino tantos profissionais dedicados à sua profissão. Por ver a entrega árdua e ininterrupta, mesmo com um sistema que massacra profissionais tão essenciais à sociedade. Sem dúvidas, sou um compilado da dedicação de todos aqueles que me permitiram buscar meus anseios e compartilharam seus conhecimentos comigo. Minha eterna gratidão!

Aos meus amigos Thiago e Milena, por torcerem, ofertar ajuda e por sonharem junto comigo.

As minhas amigas Ananda, Clara, Isabella, Júlia (Estrela) e Alciara, que mesmo não estando sempre por perto torceram e torcem sempre pelo meu sucesso. Amo vocês, meninas.

Aos alunos CTURianos que passaram pela minha jornada e me permitiram compreender a minha real vocação, especialmente minha filha, Nicole, Letícia, Manuela, Jayane, Luciana, Lucas, Amanda, Maria Eduarda, Jennifer, Mayara, Gaia e Aline, por dividirem não somente a sala de aula, mas os corredores da cunicultura e avicultura do CTUR numa troca ímpar de conhecimentos. Vocês são especiais no meu coração.

Aos meus irmãos científicos e amigos do Laboratório de Controle Microbiano, Amanda (Amandinha), Emily (Memily), Thaís (Tatazuda), Laura (Bruxão), Lucas (Cajú), Victória (Vic), Jéssica (Jessiquinha), Caio (Caito), Allan (Allanzito), Mariana (Tia Mari), Matheus (Maravilhoso), Paula (Paulinha), Ricardo (Rick), Pamella (Pamellão) e Ângela (Angel), por toparem a aventura de um experimento a campo e, mais ainda, por se reinventarem comigo num novo projeto em meio ao caos da pandemia. Cada um de vocês me ensinou muito sobre humanidade e provaram que o sucesso profissional de um amigo nunca será um obstáculo para o nosso próprio sucesso. Obrigada, não há no mundo palavras e comidas (queria encher vocês de queijadinha) que possam expressar a minha gratidão por tanto cuidado, carinho e divisão de conhecimento, carrego cada um comigo.

Aos funcionários Zeca e Seu Onofre, por ajudarem nos bastidores para que o show da experimentação científica acontecesse, minha eterna gratidão.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente torceram por mim, obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Adriani da Silva Carneiro Lopes, filha de Adriana Glória Leite da Silva e Adriano Martins Carneiro Lopes, nasceu em 15 de setembro de 1995 na cidade do Rio de Janeiro – RJ.

Em 21 de outubro de 2013 iniciou seus estudos no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-o em dezembro de 2018. Durante os anos de 2014 a 2018 foi bolsista de Apoio Técnico Acadêmico do Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde aprofundou seus conhecimentos na área de produção animal e desenvolvimento rural sustentável. Durante este período participou de eventos científicos, publicou trabalhos em anais de eventos e em revistas científicas.

No ano de 2019 foi aprovada no processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, como aluna de mestrado.

## RESUMO

Lopes, Adriani da Silva Carneiro. **Avaliação da Associação de Diferentes Propágulos de *Metarhizium* spp. a Acaricidas Comerciais para o Controle de *Rhipicephalus microplus***. 2021. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* é um dos grandes causadores de prejuízos econômicos no cenário da bovinocultura mundial, com perdas monetárias significativas e comprometimento da cadeia produtiva. Dentro desse cenário, o uso de acaricidas químicos de forma inapropriada gerou resistência em diversas populações e a diversas bases químicas, comprometendo assim o controle desse ectoparasito. Iniciou-se, portanto, o estudo de uma forma alternativa de controle para o carrapato, o uso de fungos entomopatogênicos. A partir desses olhares, o presente estudo teve como objetivo avaliar a compatibilidade de diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. com acaricidas sintéticos (amitraz, deltametrina e a combinação de cipermetrina, clorpirifós e citronelal) por 1, 5, 10 e 24h. Também foi avaliado o efeito *in vitro* da deltametrina e do amitraz associados a propágulos fúngicos no controle de uma população de fêmeas *R. microplus*. Conídios e microescleródios de *Metarhizium* spp. exibiram maior culturabilidade relativa em comparação aos blastosporos após incubação com acaricidas sintéticos. O tratamento da deltametrina em associação com fungos entomopatogênicos promoveu maior controle do carrapato do que o fungo ou acaricida sintético exclusivamente, a associação de deltametrina com *M. pingshaense* resultou em um maior controle do carrapato. A população de carrapatos usada no presente estudo foi menos suscetível à deltametrina, mas não ao amitraz, impossibilitando avaliar, com essa população de carrapatos, se ocorre algum efeito sinérgico quando o amitraz é combinado com fungos entomopatogênicos para o controle de *R. microplus*. Com base em nossos resultados, não é recomendado que os acaricidas testados sejam preparados / incubados com *Metarhizium* spp. blastosporos antes da aplicação.

**Palavras-chave:** carrapato, microescleródios, fungos entomopatogênicos, blastosporos.

## ABSTRACT

Lopes, Adriani da Silva Carneiro. **Association of diferente *Metarhizium* spp. propagules and synthetic acaricides to control *Rhipicephalus microplus* tick** 2021. 49 p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

*Rhipicephalus microplus* ticks are one of the major causes of economic losses for livestock farmers, with significant economical losses, compromising the production chain. The inappropriate use of synthetic acaricides to control ticks contribute to the selection of resistance in different populations. Accordingly, the study of an alternative methods for tick control, including the use of entomopathogenic fungi, has gained attention. From these perspectives, the present study aimed to evaluate the compatibility of different *Metarhizium* spp. propagules with synthetic acaricides (amitraz, deltamethrin and the combination of cypermethrin, chlorpyrifos and citronellal) for 1, 5, 10 and 24h. The in vitro effect of deltamethrin and amitraz associated with fungal propagules in the control of a population of *R. microplus* females was also evaluated. *Metarhizium* spp. conidia and microsclerotia exhibited higher relative cultureability compared to blastospores after incubation with synthetic acaricides. The treatment of deltamethrin in association with entomopathogenic fungi promoted greater tick control than the fungus or synthetic acaricide alone, the association of deltamethrin with *M. pingshaense* resulted in greater tick control. The tick population used in the present study was less susceptible to deltamethrin, but not to amitraz, making it impossible to assess, with this tick population, whether there is any synergistic effect when amitraz is combined with entomopathogenic fungi for the control of *R. microplus*. Based on our results, it is not recommended that the tested acaricides be prepared/incubated with *Metarhizium* spp. blastospores before application.

**Keywords:** tick, microsclerotia, entomopathogenic fungi, blastospores.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Média  $\pm$  erro padrão da média do peso inicial da fêmea (PIF), peso da massa de ovos (PTMO); percentual de eclosão (PE%); índice de produção de ovos (IPO); índice nutricional (IN) e percentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. associados ou não à deltametrina..... 32

**Tabela 2:** Média  $\pm$  erro padrão da média do peso inicial da fêmea (PIF), peso da massa de ovo (PTMO); percentagem de eclosão (PE); índice de produção de ovos (IPO); índice nutricional (IN) e percentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. associados ou não ao amitraz..... 34

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> (A) <i>Metarhizium pingshaense</i> (LCM S09) e (B) <i>Metarhizium robertsii</i> (ARSEF 2575).....	16
<b>Figura 2:</b> Média e erro padrão da média da culturabilidade relativa (%) de conídios de (A) <i>Metarhizium pingshaense</i> , isolado LCM S09 e (B) <i>Metarhizium robertsii</i> , isolado ARSEF 2575 associado com amitraz, deltametrina, ou combinação de acaricidas (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) por 1, 5, 10 ou 24h. Barras com a mesma letra minúscula no mesmo tempo ou maiúscula no mesmo tratamento não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ).....	21
<b>Figura 3:</b> Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de conídios de (A) <i>M. pingshaense</i> e de (B) <i>M. robertsii</i> .....	22
<b>Figura 4:</b> Média e erro padrão da média da culturabilidade relativa (%) de blastosporos de (A) <i>Metarhizium pingshaense</i> , isolado LCM S09 e (B) <i>Metarhizium robertsii</i> , isolado ARSEF 2575 associado com amitraz, deltametrina, ou combinação de acaricidas (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) por 1, 5, 10 ou 24h. Barras com a mesma letra minúscula no mesmo tempo ou maiúscula no mesmo tratamento não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ).....	24
<b>Figura 5:</b> Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de blastosporos de (A) <i>M. pingshaense</i> e de (B) <i>M. robertsii</i> .....	25
<b>Figura 6:</b> Média e erro padrão da média da culturabilidade relativa (%) de microscleródios de (A) <i>Metarhizium pingshaense</i> , isolado LCM S09 e (B) <i>Metarhizium robertsii</i> , isolado ARSEF 2575 associado com amitraz, deltametrina, ou combinação de acaricidas (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) por 1, 5, 10 ou 24h. Barras com a mesma letra minúscula no mesmo tempo ou maiúscula no mesmo tratamento não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ).....	27
<b>Figura 7:</b> Microescleródios de (A e B) <i>M. pingshaense</i> e (C e D) <i>M. robertsii</i> .....	28
<b>Figura 8:</b> Média e erro padrão da média da culturabilidade relativa (%) de propágulos de <i>Metarhizium pingshaense</i> , isolado LCM S09 e <i>M. robertsii</i> , isolado ARSEF 2575 associado a acaricidas por (A) 1h, (B) 5h, (C) 10h, e (D) 24h. Barras com a mesma letra minúscula no mesmo propágulo ou letra maiúscula no mesmo tratamento não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ).....	30

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	3
2.2 Criações de Bovinos no Brasil e a Influência nas Infestações por <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	4
2.3 <i>Rhipicephalus microplus</i> e o Uso de Bases Químicas: impactos e resistência.....	5
2.4 Controle Microbiano com Fungos Entomopatogênicos .....	7
2.5 <i>Metarhizium</i> spp. ....	8
2.6 <i>Metarhizium</i> spp. como agente de biocontrole de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	10
2.7 O Uso de Propágulos Fúngicos no Controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	11
2.8 Associação entre Fungos Entomopatogênicos e Bases Químicas .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Local do Experimento.....	16
3.2 Obtenção do isolado fúngico .....	16
3.3 Obtenção do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	16
3.4 Acaricidas Químicos Utilizados .....	17
3.5 Compatibilidade de Conídios de <i>Metarhizium</i> spp. com Acaricidas Comerciais. ....	17
3.6 Compatibilidade de Blastosporos de <i>Metarhizium</i> spp. com Acaricidas Comerciais .....	17
3.7 Compatibilidade de Microescleródios de <i>Metarhizium</i> spp. com acaricidas comerciais .....	18
3.8 Testes Biológicos com adultos de <i>R. microplus</i> .....	18
3.9 Análise Estatística.....	19
4 RESULTADOS .....	20
4.1 Análise da Culturabilidade de <i>Metarhizium</i> spp. Associada a Acaricidas Químicos .....	20
4.1.1 Avaliação da Culturabilidade de Conídios de <i>Metarhizium</i> spp. Associados a Acaricidas Químicos .....	20
4.1.2 Avaliação da Culturabilidade de Blastosporos de <i>Metarhizium</i> spp. Associados a Acaricidas Químicos .....	23
4.1.3 Avaliação da Culturabilidade de Microescleródios de <i>Metarhizium</i> spp. Associados a Acaricidas Químicos .....	26
4.1.4 Comparação da Culturabilidade de Distintos Propágulos de <i>Metarhizium</i> spp. Associados a Acaricidas Químicos .....	29
4.2 Bioensaio com adultos de <i>R. Microplus</i> .....	31
5 DISCUSSÃO.....	36

6 CONCLUSÃO.....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

# 1 INTRODUÇÃO

Infestações por *Rhipicephalus microplus* são comuns na bovinocultura de países tropicais, e no Brasil, são estimadas perdas econômicas em US\$ 3,24 bilhões ao ano. O controle do carrapato tem impacto direto na sanidade do rebanho bovino e na ocorrência de doenças como a tristeza parasitária, causada por *Babesia* spp. e a bactéria intracelular *Anaplasma marginale*, que reduz significativamente a produtividade da pecuária de corte e leite.

Atualmente, as estratégias de controle de *R. microplus* envolvem principalmente o uso de acaricidas químicos. As principais classes de acaricidas usadas para controlar *R. microplus* são piretróides sintéticos, organofosforados, amidinas, fenilpirazoles, reguladores de crescimento, e as lactonas macrocíclicas. O uso indiscriminado desses acaricidas somados a métodos inadequados de aplicação tem acelerado o processo de seleção de populações de carrapatos resistentes, levando os pecuaristas a aumentar a frequência de aplicação, impactando negativamente a segurança de carne e do leite. No Brasil, diversos estudos tem relatado a resistência de populações de *R. microplus* a diferentes classes químicas, incluindo o registro de cepas multirresistentes nas diferentes regiões do país, como Sul, Sudeste, Norte e Nordeste. Sendo assim, soluções alternativas de controle são estudadas e, o uso de fungos entomopatogênicos, tais como *Beauveria* e *Metarhizium*, para controle biológico do carrapato *R. microplus* é descrito como uma abordagem potencial, devido a patogenicidade que esses organismos apresentam para diferentes estágios de desenvolvimento desse carrapato. Entretanto, como ainda não há o registro de produtos biológicos para o controle do carrapato dos bovinos, usar fungos e acaricidas químicos concomitantemente para controlar esse ectoparasito é uma abordagem interessante para reduzir a pressão seletiva e outros impactos negativos causados por esses produtos químicos.

Alguns estudos evidenciam a associação de conídios de fungos entomopatogênicos, como *Beauveria* sp. e *Metarhizium anisopliae*, com produtos de diferentes classes químicas. Demonstrando-se que essa é uma interessante ferramenta para o controle do carrapato dos bovinos. Entretanto, esses mesmos estudos explicitam que a interação de fungos com produtos químicos pode provocar, em alguns isolados fúngicos, o comprometimento da germinação fúngica e até do crescimento micelial, demonstrando que são pertinentes estudos a respeito.

Os fungos entomopatogênicos podem produzir diferentes tipos de propágulos durante o seu ciclo de vida, incluindo conídios e corpos de hifas (blastosporos), que são naturalmente produzidas por estes fungos. A produção de um terceiro tipo de propágulo, conhecido como microescleródio, pode ser induzida artificialmente. Os conídios estão envolvidos na dispersão de fungos entomopatogênicos, sendo o propágulo mais utilizado em bioprodutos para controle de pragas, além de apresentarem ampla resistência a condições adversas, como as provocadas por fatores abióticos, e apresentarem alta capacidade de aderir e penetrar ativamente através da cutícula do artrópode hospedeiro. Já os blastosporos, quando produzidos em meio artificial, se apresentam como estruturas vegetativas pleomórficas que são semelhantes aos corpos hifais encontrados na hemocele dos artrópodes. Geralmente germinam mais rápido do que os conídios e podem ser viáveis durante vários meses, dependendo da forma como são armazenados.

Quanto aos microescleródios, na natureza são comumente produzidos por fungos fitopatogênicos e beneficiam a persistência destes fungos no solo. Embora não possa ser produzido naturalmente por fungos entomopatogênicos, fungos do gênero *Metarhizium* podem ser induzidos a produzir microescleródios em meio de cultura líquido, através de fermentação, e é considerado um propágulo promissor no desenvolvimento de micoinseticidas/bioproduto, por ser uma estrutura de hibernação e de fácil armazenamento.

Estudos recentes com propágulos fúngicos entomopatogênicos, mostram seu potencial para serem aplicados no controle de carrapatos. Apesar disso, até onde sabemos, não há literatura abordando a compatibilidade de blastosporos e microescleródios de *Metarhizium* com acaricidas químicos e o uso concomitante desses métodos no controle de carrapatos bovinos. Por conseguinte, o presente estudo visa avaliar a compatibilidade de diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. (ou seja, os conídios, blastosporos e microescleródios) com acaricidas químicos e seu efeito *in vitro* contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Rhipicephalus microplus*

Conhecido popularmente como carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasito de origem asiática (WHARTON, 1974), classificado cientificamente como pertencente ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida e Família Ixodidae (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Este carrapato, outrora classificado como *Boophilus microplus*, foi alvo de estudos morfológicos e moleculares (MURREL E BARKER, 2003), e então reclassificado taxonomicamente como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*. O estudo concluiu que o gênero *Boophilus* fosse reclassificado um sub-gênero de *Rhipicephalus*.

A introdução do carrapato dos bovinos nas Américas, ocorreu em detrimento das importações de gado (WHARTON, 1974). Segundo González (1995) existe a premissa de que o *R. microplus* foi introduzido no Brasil por volta do século XVIII por intermédio do gado que era mantido no Chile. Já no Brasil, fatores como condições climáticas e a presença de bovinos de raças europeias foram favoráveis a dispersão do *R. microplus* por todo o país (GRISI et. al., 2002).

O ciclo de vida do *R. microplus* possui duas fases distintas: fase parasitária e fase não parasitária. A fase de vida parasitária tem seu início com a fixação da larva no corpo do hospedeiro, esse processo permitirá que a larva se alimente através de hematofagia, e após a alimentação, a larva passará pelo processo de muda, dando origem as ninfas, que também irão se alimentar e após a muda, darão origem aos adultos (machos e fêmeas). Após a cópula dos adultos e, posteriormente, o ingurgitamento da fêmea, a mesma cai ao solo. Os machos, ao contrário das fêmeas, permanecem mais tempo sobre o corpo do hospedeiro, acasalando com outras fêmeas, onde a fase de vida parasitária tem uma durabilidade média de 18 a 26 dias. A fase de vida não parasitária, terá início após o desprendimento da fêmea ingurgitada e sua consecutiva queda ao solo, a partir disso terá início a fase de pré-postura que dura de dois a três dias, onde ocorre a fase final de maturação dos ovários das fêmeas ingurgitadas, e conseqüentemente será iniciada a fase de postura, variando de três a seis semanas, a partir disso ocorrerá a incubação dos ovos e a posteriori haverá a eclosão das larvas, que pode variar entre cinco a dez dias. A partir da eclosão, das larvas necessitam de um período de dois a três dias para enrijecimento da cutícula, o que permitirá que estas se tornem capazes de infectar novos hospedeiros e inicie-se assim a vida parasitária dando continuidade ao ciclo (FURLONG, 1993).

A bovinocultura é uma atividade expressiva na pecuária brasileira, segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2017), o Brasil possui cerca de 217,5 milhões de bovinos. Sendo assim, corrobora-se com os dados apresentados pela Estatística da Produção Pecuária de que somente no primeiro trimestre de 2019 foram abatidas 7,89 milhões de cabeças bovinas, a aquisição de leite cru por laticínios foi de 6,20 bilhões de litros e foram recebidos pelos curtumes cerca de 8,49 milhões de peças inteiras de couro cru de bovinos (IBGE, 2019).

Apesar da alta produtividade, a cadeia da bovinocultura brasileira sofre com recorrentes perdas econômicas por conta das infestações por *R. microplus*. Segundo Grisi et al. (2014) estima-se que os prejuízos econômicos na produção sejam de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares anuais, no Brasil. As perdas econômicas

causadas pelas infestações por *R. microplus*, estão ligadas a queda na produtividade de leite e no ganho de peso vivo, mortalidade, danos de pele, morbidade, custos no controle e a ação dos hemoparasitas transmitidos pelo carrapato, os protozoários *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e a bactéria intracelular *Anaplasma marginale* (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018).

Na contemporaneidade, as estratégias de controle para carrapatos se dão em sua maioria com o uso de bases químicas. As principais classes de acaricidas usados para o controle do *R. microplus* no mundo são: piretróides sintéticos, organofosforados, amidinas, fenilpirazoles, reguladores de crescimento e as lactonas macrocíclicas (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Entretanto, o uso desenfreado de carrapaticidas dessas diferentes classes químicas tem acelerado o processo de seleção de populações de carrapatos resistentes, o que tem levado os pecuaristas a aumentar a frequência de aplicação que acelera mais ainda a seleção das populações e, conseqüentemente, têm-se visto resíduos desses produtos na carne e no leite (MENDES et al., 2007; KUMAR et al., 2016).

Assim, surge a necessidade de se trabalhar com formas alternativas para o controle do *R. microplus*, pois o uso indiscriminado de carrapaticidas, também contribui com a poluição ambiental e o desequilíbrio ecológico (NORVAL et al., 1992). Desta forma, sugere-se como possíveis estratégias para o controle do *R. microplus*: 1) bovinos geneticamente resistentes, 2) remoção manual de carrapatos, 3) uso de carrapatos híbridos estéreis, 4) uso de plantas desfavoráveis ao carrapato (óleos essenciais ou compostos isolados de plantas), 5) manejo de pastagem, 6) uso de óleos essenciais e fito-extratos e 7) controle biológico (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018).

## **2.2 Criações de Bovinos no Brasil e a Influência nas Infestações por *Rhipicephalus microplus***

A bovinocultura brasileira é representada por um sistema de criação majoritariamente com acesso a pasto, o que é definido vulgarmente como “boi verde”, esse modelo extensivo de criação é um importante facilitador para as infestações de bovinos por *R. microplus*, considerando que animais a pasto permitem que o ciclo de vida do carrapato se estabeleça de forma facilitada, beneficiando a fase de vida não-parasitária. Ou seja, é importante atuar na prevenção ou no controle do *R. microplus* a campo, considerando o ciclo de vida do carrapato e o sistema de criação no qual o rebanho está inserido (VERÍSSIMO, 2013).

Furlong, Chagas e Nascimento (2002), apresentaram um estudo que equiparou o comportamento de larvas de *R. microplus* em pastagens de *Brachiaria decumbens* no verão e no inverno, e concluíram que havia uma distinção no tempo de chegada ao ápice das gramíneas influenciado pela temperatura, mas que a dispersão das larvas não variava entre as estações. Ou seja, independente do período do ano em que se mantenha os animais a pasto as infestações pelo carrapato dos bovinos ocorre de forma massiva. Segundo Dias-Filho (2014), as pastagens brasileiras estão em torno de 180 milhões de hectares, destes, aproximadamente 50% a 70% se encontram em avançado estado de degradação. Apesar dessa condição de degradação, é fato que os animais criados a campo, como os brasileiros, tendem a ter um volume de infestação muito grande, pois como afirmado por Campo Pereira e Labruna (2008) 95% dos carrapatos são encontrados nas pastagens e somente 5% nos bovinos.

A partir dessa perspectiva, tendo por base o sistema de criação extensivo predominante em nosso país, é de suma importância que se possa avaliar a possibilidade de estratégias de controle do carrapato dos bovinos, mas o fazendo de forma dinâmica e visando a melhoria do controle das populações de *R. microplus* de forma eficiente. Isso pode ser conseguido através da dinamização no sistema de pastejo, com o uso de sistemas de pastejo que incorporem forrageiras diversificadas na constituição da pastagem que sejam capazes de atuar no controle do carrapato *R. microplus* (FERNANDEZ-RUVALCABA et al., 2004) e em pastagens que estejam consolidadas, pode-se atuar com a eficácia de formulações fúngicas para o controle do *R. microplus* (CAMARGO et al. 2014). Mas, além de ser observar e atuar sobre essa vertente do ciclo de *R. microplus*, deve-se atentar-se para o processo como um todo, buscando um controle efetivo para fase parasitária, também, de forma satisfatória (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018).

### **2.3 *Rhipicephalus microplus* e o Uso de Carrapaticidas: impactos e resistência**

A infestações por *R. microplus* são um dos problemas sanitários mais comuns no cenário da bovinocultura mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O uso de carrapaticidas para o controle do carrapato dos bovinos é a forma de controle mais comum. A aplicação de acaricidas ocorre principalmente por aspersão ou imersão, fazendo com que estes produtos ajam sobre os carrapatos por contato, carrapaticidas como as amidinas, organofosforados, fenilpirazóis e piretróides agem dessa forma. Mas, também podem ser aplicados no gado por injeção, agindo de forma sistêmica como as lactonas macrocíclicas e as benzoilfeniluréias (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018; HIGA et al., 2015; KOLLER et al., 2019).

Apesar de sua eficácia comprovada, com o passar dos anos a forma inapropriada como é realizada a aplicação destes produtos e seu uso indiscriminado, beneficiou a ocorrência de resistência aos carrapaticidas em diversas populações de carrapatos (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Segundo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde, define-se por resistência a capacidade se suportar altas doses de um produto tóxico (OMS, 1957). Em relação aos carrapatos, pode-se admitir que existes mecanismo de resistência que se enquadram em distintos grupos: I) insensibilidade ao local-alvo, II) resistência metabólica e III) diminuição da penetração cuticular do acaricida, sendo a insensibilidade ao local-alvo e a resistência metabólica as mais comuns. Pode-se observar de forma isolada ou em conjunto a ação desses mecanismos, permitindo assim a ocorrência de resistência à uma vasta gama de acaricidas (FFRENCH-CONSTANT; DABORN; LE GOFF, 2004; RODRIGUEZ-VIVAS; HODGKINSON; TREES, 2012).

A insensibilidade do local-alvo ou sítio de ligação, como também é chamada, se caracteriza como uma mutação nos nucleotídeos, um ou mais deles, na área onde há codificação de um gene. Dessa forma, pode ocorrer alteração no aminoácido ali existente provocando desta maneira uma modificação da proteína receptora, esse processo dificulta que a molécula se ligue ao local-alvo e, conseqüentemente, provoque resistência (KLAFKE, 2009). Alguns estudos são realizados dentro dessa perspectiva a fim de conhecer a dinâmica das mutações e com isso buscar estratégias que minimizem a ocorrência dos quadros de resistência, foi o que Janer e colaboradores (2021) fizeram, ao desenvolver um estudo com uma reação de em cadeia de polimerase (PCR) com o intuito de avaliar mutações no gene do canal de sódio e *GABA-Cl* correlacionando esse processo com a resistência a fipronil e piretróides.

Enquanto a resistência metabólica pode se apresentar de duas formas, por um aumento da especificidade de enzimas responsáveis por determinada droga, facilitando a sua desintoxicação ou por uma maior quantidade de enzimas expressas, cuja ação seja atuar no metabolismo de determinada droga. Ou seja, a resistência metabólica nada mais é uma ampliação na capacidade do indivíduo de desintoxicar determinados produtos utilizados no controle do carrapato (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007). Outro fator interessante é que dependendo do estágio de desenvolvimento do carrapato, essas enzimas de desintoxicação agem de maneiras distintas, exemplo disso são cepas de carrapato resistentes ao fluazuron, em que as enzimas monooxigenases tem melhor ação nos ovos das cepas resistentes, enquanto as carboxilesterases apresentam melhor desempenho sobre as larvas frente a esse acaricida (GAUDENCIO et al., 2017).

Os relatos de resistência aos acaricidas são vistos em diversos países e ocorrem com diferentes classes de acaricidas (BUSCH et al., 2014; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2013; KLAFKE et al., 2016; VILLAR et al., 2016; SHYMA et al., 2015). No Brasil, um dos primeiros relatos de resistência foi relacionado ao amitraz, na década de 1990 (GLORIA; FLAUSINO; GRISI, 1993); a posteriori relatou-se sobre resistência a doramectina e moxidectina (MARTINS; FURLONG, 2001) e ao longo dos anos além das lactonas macrocíclicas foi-se ampliando as classes de acaricidas como os organofosforados, piretróides, amidinas, fenilpirazóis e benzoilfeniluréia as quais *R. microplus* era resistente (RECK et al., 2014; KLAFKE et al., 2016). Só no Brasil tem-se o registro de 183 produtos veterinários, classificados como ectoparasiticidas para bovinos, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estes contam com aproximadamente 15 princípios ativos distintos e ao menos nove classes químicas, o que nos dá o dimensionamento da gama de produtos que podem ser utilizados de forma inadequada e, por conseguinte, ampliarmos o quadro de resistências (SINDAN, 2017).

Cabe ressaltar, que os relatos de resistência a acaricidas no Brasil ocorrem em diversas regiões do país e com uma diversidade de cepas de *R. microplus*, evidenciando que o uso desenfreado desses acaricidas não está limitado à uma área. Ueno e colaboradores (2011) usaram populações de *R. microplus* de cinco propriedades distintas da região noroeste do estado de São Paulo e verificaram a ocorrência de resistência a cipermetrina, deltrametrina, clorpirifós e a acaricidas associados, evidenciando que as estratégias utilizadas pelos pequenos produtores de leite não estavam sendo eficientes.

Outro interessante relato de resistência no Brasil se deu por Klafke et al. (2017), os pesquisadores elucidaram que carrapatos coletados de diferentes fazendas no estado do Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil, apresentavam-se resistentes a seis classes acaricidas. Os pesquisadores classificaram quatro níveis de resistência, sendo o 4º nível aquele cuja mortalidade das larvas não passava de 25%, a resistência a cipermetrina foi encontrada em 98,08% dos carrapatos avaliados, observou-se também resistência a amitraz, fipronil, ivermectina e clorpirifós. Em adição, 78,85% dos carrapatos analisados apresentavam resistência a três ou mais acaricidas.

Ademais, na região nordeste do Brasil, também existem relatos de populações de *R. microplus* resistentes a acaricidas. Vilela et al. (2020), demonstraram a resistência do carrapato dos bovinos em 26 fazendas da região semi-árida da Paraíba. Com 96% das populações resistentes a cipermetrina e 50% delas resistentes a pelo menos quatro acaricidas, entretanto, nesse estudo, nenhuma das populações apresentou resistência a fipronil. Os pesquisadores ressaltaram que o erro na gestão de controle de *R. microplus* é a principal questão para que haja a ocorrência de tantos casos de resistência na região.

No entanto, o uso desenfreado de acaricidas não causa apenas resistências as múltiplas classes de acaricidas, observa-se também a ocorrência de resíduos destes produtos na carne e no leite, os principais produtos adquiridos da criação de bovinos (FRAGA et al., 2003; VERÍSSIMO et al., 2016). Um estudo realizado com pequenos produtores de leite, na região de Alfenas, em Minas Gerais, na região sudeste do Brasil, evidenciou que todas as propriedades leiteiras da região utilizavam algum acaricida para o controle do carrapato dos bovinos. Mas, um dos dados mais alarmantes é que cerca de 41,1% das propriedades analisadas utilizavam bases químicas legalmente restritas por legislação para animais em atividade leiteira/lactação, onde também se observou desconhecimento sobre o “período de carência” após o uso da droga (NASCIMENTO et al., 2021).

Dessa maneira, pode-se observar que o uso de acaricidas para o combater de *R. microplus* é uma das formas de controle mais utilizada. Em contrapartida, a falta de informação e a mão de obra com pouca qualificação, o uso indiscriminado, as tentativas desesperadas de controle para um parasito de ampla e fácil distribuição, culminam em quadros de resistência cada vez mais amplos, associações de bases químicas que vem se apresentando cada vez menos eficazes e a necessidade da aplicação de estratégias coesas para o controle de *R. microplus*.

#### **2.4 Controle Microbiano com Fungos Entomopatogênicos**

Debach (1968), definiu teoricamente que o controle biológico é 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. Sendo complementado por Parra (2002), de que o controle biológico é um fenômeno natural onde inimigos naturais atacam os diversos estágios de vida do agente, sendo esses inimigos naturais bastante diversificados e setorizados em grupos, como: fungos, vírus, bactérias, peixes, aves, dentre outros.

Desta forma, vem-se desenvolvendo uma diversidade de pesquisas a respeito do controle biológico para *R. microplus*, com um relevante enfoque no controle microbiano. Essa busca por metodologias opcionais de controle foi de encontro a necessidade do desenvolvimento de técnicas que pudessem ser utilizadas em criações de bovinos sob o regime de sistemas alternativos de produção, ou seja, os sistemas orgânicos, agroecológicos, biodinâmicos, entre outros. Segundo, Figueiredo e Soares (2012), a carne bovina e o leite bovino e seus derivados estão entre os produtos orgânicos mais encontrados no mercado brasileiro. Tendo em vista, que nos últimos anos, é crescente o número de propriedades com produções pecuárias de base orgânica (LOURENÇO; SCHNEIDER; GAZOLLA, 2017).

Nesse contexto, os fungos têm sido os microrganismos mais estudados e utilizados dentro do controle biológico, equiparado a bactérias e vírus (THOMAS; READ, 2007). Segundo Maranhão e Maranhão (2009), já em 1726, Réaumur, fez um relato da ação do fungo *Cordyceps* sp. como infectante de larvas de lepidópteros (Lepidoptera: Noctuidae). Inicialmente, no Brasil, relatou-se a respeito da ação de fungos agindo sobre artrópodes em 1923, sendo um relato realizado por Pestana, referindo-se ao *Penicillium anisopliae* como agente favorável ao controle de *Tomaspis* spp. (ALVES, 1998).

A partir desse relato, uma série de novas pesquisas foram executadas, todas elas evidenciando sobre as importantes ações de fungos entomopatogênicos sobre artrópodes. Segundo Samish, Ginsberg e Glazer (2004), os fungos entomopatogênicos são

considerados importantes inimigos naturais de artrópodes por possuírem uma alta capacidade de agir sobre distintos estágios evolutivos do hospedeiro, bem como por terem uma virulência praticamente específica. Além disso, os fungos entomopatogênicos possuem uma característica importante que é a de penetrar ativamente pela cutícula do artrópode (MADELIN; ROBINSON; WILLIAMS, 1967).

Há relatos de que o processo de infecção por fungos entomopatogênicos em artrópodes conta com uma série de mecanismos e que o processo de penetração ativa pela cutícula é minucioso, contando com 1) fixação dos conídios no artrópode, 2) germinação dos conídios, 3) formação de tubo germinativo, 4) formação do apressório, 5) multiplicação no interior do hospedeiro, 6) após a morte do hospedeiro ocorre o crescimento sobre o corpo do mesmo e 7) produção de conídios (BITTENCOURT; MASCARENHAS; FACCINI, 1999; ZIMMERMANN, 2007).

A penetração ativa pela cutícula do hospedeiro é a forma de infecção mais comum utilizada pelos fungos entomopatogênicos, e alguns estudos relatam ser rara a ingestão dos mesmos. Entretanto, estudos recentes apontaram sobre rotas alternativas de infecção por fungos entomopatogênicos, como a via oral de insetos terrestres e aquáticos. Citando, inclusive, achados de hifas de *M. anisopliae* nas regiões de mandíbula e esôfago de *Ephestia kuhniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) e esporos não germinados do intestino de larvas de *Oryctes* sp sugerindo-se que estudos a respeito dessas rotas alternativas devem ser explorados (MANNINO et. al., 2019)

A utilização dos fungos entomopatogênicos, seu mecanismo de ação e sua virulência têm sido alvo de inúmeras pesquisas, onde o principal intuito é evidenciar e caracterizar os fatores de virulência a fim de que se possa dinamizar os seus usos através de melhorias no processo de infecção (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Segundo Alves (1998), existem aproximadamente 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos com potencial patogênico a invertebrados. Sendo esses fungos responsáveis por quase 80% das doenças apresentadas por insetos (CARDOSO et al., 2003).

Dentro dessa dinâmica, os Ascomicetos *Metarhizium* spp. e *Bouveria* spp. têm sido os gêneros mais estudados e utilizados no controle de artrópodes (MASCARIN et al., 2018). Isso se dá por alguns fatores como 1) ampla capacidade de distribuição geográfica, 2) sua capacidade entomopatógena e endofítica, 3) grande variedade de hospedeiros naturais e 4) a ação infectante em múltiplos estágios de vida dos hospedeiros (ALVES, 1998). Por essas questões, e pela diversidade de pesquisas apresentadas, o gênero *Metarhizium* spp. se apresenta como o mais estudado dentro do controle biológico pelo seu representativo potencial entomopatogênicos (ONOFRE et. al., 2001).

## **2.5 *Metarhizium* spp.**

A primeira descrição foi realizada por Metschnikoff em 1879, onde se estabeleceu o primeiro trabalho com fungo para o controle de artrópodes, utilizando-se o fungo *Entomophthora anisopliae* para controlar larvas de *Cleonus punctiventris*, uma expressiva praga para a cultura da beterraba. Pouco tempo depois, Serokin (1883) fez a descrição do gênero *Metarhizium* que apresentava conídios com tamanho similar aos descritos por Metschnikoff em 1879.

O gênero *Metarhizium* spp. compreende espécies de fungos cosmopolitas, ou seja, que podem ser encontrados em locais diferentes e com temperaturas variadas (ROBERTS; ST LEGER, 2004). Estudos apontaram uma importante variabilidade

genética nos isolados de *M. anisopliae*, o que sugeriu que essa espécie era um agregado de espécies (BIDOCHKA et al., 2005). Em 2009, Bischoff, Rehner e Humber realizaram estudos filogenéticos, morfológicos e moleculares e atestaram que a espécie *M. anisopliae* era um complexo constituído por nove espécies 1) *M. pingshaense*, 2) *M. anisopliae*, 3) *M. robertsii*, 4) *M. brunneum*, 5) *M. majus*, 6) *M. lepidiotae*, 7) *M. acridum*, 8) *M. globosum* e 9) *M. guizhouense*. Entretanto, Rehner e Kepler (2017) afirmam que as espécies que mais são isoladas do solo e de artrópodes são *Metarhizium pingshaense*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*, e *Metarhizium brunneum*. Além disso, novos isolamentos continuam sendo realizados a partir de amostras de solos, e novas espécies vem sendo identificadas, exemplo disso é a espécie *Metarhizium alvesii* identificada a partir de amostras de solo de uma plantação de bananas em Quixeré no nordeste do Brasil, sua identificação foi confirmada através de estudos morfológicos e filogenéticos (LOPES et al., 2018).

Por classificação, o *M. anisopliae* pertence ao filo dos Ascomycetes, a classe dos Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Clavicipitaceae, sendo um fungo filamentosos com micélio hialino e septado, com conídios cilíndricos com variações de tom esverdeado e que tem sua formação oriunda de conidióforos também cilíndricos. As colônias se apresentam inicialmente brancas, admitindo um tom levemente amarelado no início da fase de produção dos conídios e apresentando-se num tom de verde escuro quando a colônia já tem os conídios maduros (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009). Segundo, Azevedo (1998) seu cultivo não requer muita sofisticação, pois o mesmo se desenvolve em diversificados meios de cultura, sendo o amido uma importante fonte nutricional para o mesmo.

Alguns outros fatores, sejam em condições ambientais ou experimentais, também são extremamente importantes para o desenvolvimento do *M. anisopliae*. O *M. anisopliae* apresenta uma faixa de temperatura que predispõe o seu desenvolvimento, esta varia entre 15 e 35° C, mas a intersecção ótima à sua germinação está entre 25 e 30° C (ROBERTS; CAMPBELL, 1977; MILNER; SAMSON; MORTON, 2003). A umidade se apresenta como outro fator de extrema importância no desenvolvimento de colônias, Walstad, Anderson e Stambaugh (1970) sugeriram que os isolados de *M. anisopliae* necessitam de 100% de umidade relativa para germinação de seus conídios. E a radiação solar e a ultravioleta são um dos fatores que estão diretamente associados a capacidade de persistência e a viabilidade do *M. anisopliae* (OLIVEIRA et al., 2016).

*M. anisopliae* se apresenta de múltiplas formas na natureza, o mesmo é definido como um fungo saprófita pelo fato de ser encontrado em raízes de plantas, cadáveres de artrópodes como insetos e carrapatos e até mesmo no solo (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; HERNÁNDEZ-DOMÍNGEZ; GUZMÁN-FRANCO 2017; IWANICKI et al 2019). Zimmermann (1993) afirmou que aproximadamente 200 espécies de artrópodes podem ser correlacionadas aos hospedeiros desse fungo, daí sua importante ação como agente de biocontrole. Entretanto, apesar dessa importante diversidade de hospedeiros algumas cepas de *M. anisopliae* podem infectar apenas hospedeiros de forma mais específica (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Sabendo-se da capacidade de infecção do *Metarhizium* spp., havia também uma relevante preocupação a respeito do potencial desse fungo em causar possíveis desequilíbrios em populações que não fossem alvo de biocontrole. Considerando essa questão, Fischhoff, Keesing e Ostfeld (2017) pesquisaram a ação de *M. brunneum* sobre *Ixodes scapularis* e avaliaram a interferência do fungo entomopatogênicos em artrópodes que não eram o alvo da infecção; puderam observar então, que *M. brunneum* não causou

um expressivo biocontrole nas populações que não eram o alvo de sua ação num ambiente natural.

Ademais, a partir das inúmeras pesquisas a respeito de gêneros fúngicos com capacidade patogênica para artrópodes, pôde-se observar a eficácia do uso de *Metarhizium* spp. no controle de diversos hospedeiros, incluindo o carrapato do boi *R. microplus*. Desta maneira, diversos grupos, principalmente no Brasil, buscam pleitear a importância que a espécie fúngica tem no controle biológico e gerar dados cada vez mais concisos a respeito dos mecanismos de infecção, potencial de virulência de isolados variados, compreensão de fatores bióticos ou abióticos favoráveis e desfavoráveis ao desenvolvimento do mesmo.

## **2.6 *Metarhizium* spp. como agente de biocontrole de *Rhipicephalus microplus***

Diversos autores abordam sobre o uso de *Metarhizium* spp. como agente de controle para *R. microplus*, no Brasil e no mundo. As pesquisas evidenciam as ações de isolados desse gênero fúngico sobre o carrapato dos bovinos em testes *in vitro* e *in vivo*, em condições de laboratório, campo e semi-campo, e vem compreendendo sobre a relação de fatores ambientais e esse importante a gente, como a capacidade de termotolerância, tolerância UV-B, virulência de diferentes isolados, dentre outros. Para que se possa desenvolver um bioproduto para carrapato, pois na atualidade ainda não se tem um produto específico para carrapatos registrado (BITTENCOURT; MASSARD; LIMA, 1994; KAAYA et al., 2011; PERINOTTO et al., 2014; CAMARGO et al., 2016; WEBSTER et al., 2017; GALVÉZ, SEGURA, GÓMEZ-VÁZQUEZ, 2019; FERNÁNDEZ-SALAS, ALONSO-DÍAZ, ALONSO-MORALES, 2019; JONES et al., 2021; MARCIANO et al., 2021).

Estudos *in vitro*, bem como em condições de semi-campo abordam sobre a capacidade de *M. anisopliae* agir sobre carrapatos *R. microplus*. Um interessante estudo comparativo entre espécies de fungos entomopatogênicos com potencial acaricida para *R. microplus*, testou 54 cepas de *M. anisopliae*, seis cepas de *Beauveria bassiana* e uma cepa de *Purpureocillium lilacinum* em um grupo de carrapatos resistentes e um grupo susceptível a acaricidas comerciais. Onde se evidenciou que nove das 54 linhagens de *M. anisopliae* eram relevantemente mortais a ambas populações de *R. microplus* (FERNÁNDEZ-SALAS; ALONSO-DÍAZ; ALONSO-MORALES, 2019). Samish, Ginsberg e Glazer (2004) já evidenciavam que distintas estirpes de *M. anisopliae* e *B. bassiana* eram interessantes agentes biocontroladores para carrapato, entretanto o *M. anisopliae* se apresentava com maior potencial de virulência.

Webster et al. (2017) evidenciou que distintas populações de *R. microplus* podem apresentar variações na susceptibilidade à infecção por *M. anisopliae*, sendo essa variação correlacionada a integração de práticas pecuárias e agrícolas e a frequência de aplicação de acaricidas na propriedade, ou seja, aquelas propriedades que realizaram mais de três aplicações de acaricidas ao ano tinham uma população de carrapatos mais susceptível a ação de *M. anisopliae*. Cabe ressaltar, que outros estudos evidenciam que o *M. anisopliae* quando associado a acaricidas comerciais, também apresenta eficácia no controle de *R. microplus* (FIOROTTI et al., 2016).

Além dos testes *in vitro*, *M. anisopliae* passou por testes a campo que demonstram sua eficácia em condições semi-naturais. López, López e Orduz (2009) realizaram um estudo com uma fase laboratorial e uma a campo. Nos testes em laboratório eles utilizaram sete isolados de *M. anisopliae* e observaram que a cepa 137 bm era a que tinha

melhor virulência sobre o carrapato. A partir disso, nos testes a campo, utilizaram essa mesma cepa e verificaram que as vacas que haviam sido tratadas com a cepa *M. anisopliae* 137 bm numa concentração de  $1 \times 10^8$  conídios por mL reduziram suas infestações por *R. microplus* em 75%, além de se observar uma redução na fecundidade dos carrapatos em até três vezes com relação ao grupo controle.

Kaaya et. al. (2011), avaliou os efeitos de aplicações de uma formulação oleosa de *M. anisopliae* com concentração de  $1 \times 10^8$  conídios por mL em intervalos de três semanas em *R. microplus* enquanto parasitavam touros. E evidenciaram que houve uma redução populacional dos carrapatos em 83% num período de três meses após o início das aplicações da formulação.

Os estudos também buscam compreender sobre a ação desses fungos sobre o sistema imune dos carrapatos, visando compreender a fisiologia e a patologia em carrapatos. Uma interessante abordagem é feita por Fiorotti et al. (2018) que relataram sobre os efeitos ultraestruturais e citotóxicos de *M. robertsii* em hemócitos de *R. microplus*, demonstrando através de microscopia importantes alterações celulares nos carrapatos.

Dentro desse contexto, é possível observar que as avaliações quanto a aplicabilidade do *M. anisopliae* como um agente de biocontrole do *R. microplus* são inúmeras, evidenciando o potencial de virulência (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010), informando a respeito das outras formas de propágulos que podem atuar no controle de carrapatos (BERNARDO et al., 2018) e até mesmo compreendendo a dinâmica do sistema imune frente à infecção por *M. anisopliae* (FIOROTTI et al., 2018).

## **2.7 O Uso de Propágulos Fúngicos no Controle de *Rhipicephalus microplus***

Os fungos entomopatogênicos são amplamente utilizados como biocontroladores de artrópodes, incluindo os carrapatos, entretanto a sua eficácia está diretamente ligada a alguns fatores como a espécie do carrapato, o estágio de vida e a cepa de fungo utilizada (WASSERMAN et al., 2016). A partir disso, alguns estudos começaram a ser realizados com distintos propágulos fúngicos, para que se pudesse buscar um melhor modelo de controle para diversas questões, inclusive a resistência. Os propágulos nada mais são do que formas vegetativas produzidas pelos fungos em determinadas circunstâncias (HUMBER, 1997).

Os fungos entomopatogênicos podem apresentar, principalmente, dois propágulos distintos: I) conídios e II) blastosporos (ALKHAIBARI et al., 2016). Porém, há um terceiro propágulo que na natureza, com a presença de condições ambientais ou nutricionais desfavoráveis pode se formar, os microescleródios. Já em condições de laboratório alguns fungos, estes através de cultivo em meio nutricional adequado, pode-se obter os microescleródios por fermentação (MASCARIN et al., 2014; JACKSON; PAYNE, 2016; SONG et al., 2016).

A maior parte dos estudos envolvendo fungos entomopatogênicos, fala sobre o uso de conídios e blastosporos (WANG et al., 2013). Entretanto, grande parte dos estudos e formulações de biopesticidas, utilizam os conídios, principalmente por sua resistência aos fatores abióticos (FARIA; WRIGHT, 2007). Os conídios se apresentam como uma estrutura ligeiramente maior do  $9 \mu\text{m}$  de comprimento, podem ser cilíndricos ou ovóides, não possuem septos, têm formato uniforme, são hidrofóbicos e sua produção se dá em aproximadamente 14 dias em meio de cultura sólido. Os conídios são considerados como

o propágulo mais comum na dispersão de fungos entomopatogênicos, caracterizam-se por ser altamente resistentes e ter ampla capacidade de aderência e penetração na cutícula do hospedeiro. Eles são produzidos pelos conidióforos, na superfície do hospedeiro e por sua alta capacidade de resistência podem permanecer por um longo período de tempo viáveis no solo (HUMBER, 1997; BUTT et al., 2016; ALKHAIBARI et al., 2017, BERNARDO et al., 2020).

Os blastosporos são células que se assemelham a leveduras, que são produzidos por fungos entomopatogênicos e tem a capacidade de infectar artrópodes (IWANICKI et al., 2018). Esse propágulo se apresenta como estruturas vegetativas hidrofílicas, pleomórficas, similares aos corpos hifais encontrados na hemocele dos artrópodes quando produzidos em meio de cultura líquido de 48 a 72 horas. Tendem a germinar mais rapidamente que os conídios e podem ser viáveis por vários meses, a depender de uma forma correta de armazenamento. Os blastosporos podem ser obtidos através do cultivo de conídios em meio de cultura líquido, através de processo fermentativo (ALKHAIBARI et al., 2017, BERNARDO et al., 2018; CORVAL et al., 2020; MASCARIN et al., 2019; BERNARDO et al., 2020).

Alguns pesquisadores afirmam que não existem evidências de que haja um desempenho significativo destes propágulos, um em relação ao outro (WANG et al., 2013; MUÑIZ-PAREDES; MIRANDA-HERNÁNDEZ; LOERA, 2017). Mas, podemos ver relatos de vantagens e desvantagens frente ao uso de determinado propágulo, como os conídios serem hidrofóbicos, os blastosporos poderem ser produzidos em um curto espaço de tempo, mas em contrapartida os blastosporos tendem a ser menos resistentes a fatores estressantes como as altas temperaturas ou os efeitos da radiação UV e menor estabilidade (OTTATI-DE-LIMA et al., 2014; MASCARIN et al., 2015).

Além de conídios e blastosporos, os microescleródios se apresentam também como um propágulo fúngico. Os microescleródios se apresentam como agregados compactos de hifas que sofrem melanização, evidenciando uma estratégia no desenvolvimento desse propágulo, a guarda das reservas nutricionais endógenas, que permitem ao fungo as utilizar quando as condições do ambiente se tornarem benéficas ao mesmo. Além disso, são conhecidos por serem estruturas fúngicas de hibernação, sua produção se dá através de fermentação em meio de cultura líquido, se demonstram altamente resistentes ao estresse oxidativo e à radiação UV (MASCARIN et al., 2014, JACKSON; PAYNE, 2016; SONG et al., 2016).

Outras características dos microescleródios que são importantes para o controle de pragas, é que este propágulo tem a capacidade de formar conídios infectantes *in situ* além da sua capacidade em persistir no ambiente sob condições que possam ser desfavoráveis, além da capacidade de se produzir de forma rápida esse propágulo em relação aos conídios aéreos, pois os mesmos podem ser obtidos através de processo fermentativo em até cinco dias (LIRA; MASCARIN, DELALIBERA-JÚNIOR, 2020; MASCARIN et al., 2014).

Cabe ainda ressaltar, que os microescleródios possuem uma estrutura semelhante a esclerócios, mas exibem diâmetros diferentes. Os esclerócios são uma estrutura produzida naturalmente por alguns fungos na natureza, mas o gênero *Metarhizium* não produz essas estruturas naturalmente, sendo assim os microescleródios advêm do processo fermentativo, através de meio de cultura líquido como já mencionado (JACKSON; PAYNE, 2016; SONG, 2018).

Dentro do cenário do controle microbiano do carrapato dos bovinos *R. microplus* diversas são as abordagens sobre os distintos propágulos, através da avaliação da capacidade dos fungos entomopatogênicos controlarem de forma eficiente as diferentes fases do carrapato, investigou-se sobre a possibilidade de desenvolvimento de formulações fúngicas, a associação dos propágulos a acaricidas, dentre outras questões (BEYS-DA-SILVA et al., 2020).

Diversos estudos avaliaram o uso de conídios de fungos entomopatogênicos para o controle de *R. microplus*, bem como a capacidade de se adequar as condições adversas no ambiente, a possibilidade do desenvolvimento de formulações fúngicas oleosas ou não, a associação de conídios com acaricidas químicos, o uso de formulações fúngicas a campo ou em condições semi-campo, bem como a compreensão do processo de infecção por esse propágulo e suas ações no sistema imune do carrapato (CAMARGO et al., 2014, 2016; QUINELATO et al., 2012; MESQUITA et al., 2020; WEBSTER et al., 2015; CORVAL et al., 2020; FIOROTTI et al., 2018).

Os estudos que abrangem o uso de blastosporos para o controle de carrapatos inicialmente eram comparativos a respeito da eficácia em relação aos conídios de fungos entomopatogênicos (KIRKLAND; CHO; KEYHANI, 2004; KIRKLAND; WESTWOOD; KEYHANI, 2004; BERNARDO et al., 2020), mas alguns pesquisadores aprofundaram suas análises com o intuito de evidenciar de forma mais clara os mecanismos de infecção por esse propágulo (BARNARDO et al., 2018; IWANICKI et al., 2018) e verificar o poder de controle que produtos formulados a base de blastosporos poderiam ter no controle de carrapatos (LORENZ, HUMBERT; PATEL, 2020).

Tratando-se de microescleródios, os estudos a respeito do desenvolvimento desses propágulos em meios de cultura líquido e as análises frente ao seu uso na agricultura são bem relatados (MASCARIN et al., 2014; SONG, 2018; LIRA; MASCARIN; DELALIBERA-JÚNIOR, 2020). Mas, pesquisadores vem buscando contemplar a eficácia desse propágulo no controle de carrapatos. Behle e colaboradores (2013) analisaram a eficácia dos grânulos de microescleródios para o controle de ninfas alimentadas ou não de *Ixodes scapularis*. Marciano et al. (2021) analisou a eficácia de uma formulação granular de microescleródios e blastosporos de *M. robertsii* em condições de semi-campo e observou uma redução nas taxas de larvas recuperadas, obtendo uma eficácia relativa de 64,8%, ressaltando que essa pode ser uma aplicação positiva no controle do carrapato dos bovinos.

Dessa maneira, pode-se observar que os propágulos fúngicos são estudados quanto a sua capacidade de infectar os carrapatos, ao desenvolvimento de formulações fúngicas eficazes, as estratégias de estabilização desses propágulos em condições adversas a nível de campo e a associação com outros produtos como os acaricidas comerciais.

## **2.8 Associação entre Fungos Entomopatogênicos e Bases Químicas**

Associar acaricidas químicos a fungos entomopatogênicos pode ser uma alternativa interessante para o controle de insetos e ácaros, reduzindo os impactos no ambiente, reduzindo a contaminação de produtos de origem animal como carne e leite, obtendo-se uma alternativa para a redução das doses exorbitante de acaricidas químicos aplicados nos rebanhos, quando se pensa no controle de carrapatos (SOARES; MONTEIRO, 2011; BAHIANSE; BITTENCOURT, 2004).

Entretanto, apesar de o sinergismo de entre os produtos químicos e biológicos ser eficiente no tratamento de indivíduos que sejam resistentes ou pouco sensíveis a determinado produto, essa associação deve ser bem estabelecida, pois pode ocorrer comprometimento do crescimento vegetativo e da conidiogênese (MOINO-JÚNIOR; ALVES, 1998). Além disso, a análise da compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos químicos deve ser bem-feita, pois caso haja comprometimento do crescimento vegetativo, pode-se comprometer o processo de infecção da praga-alvo, considerando-se que a infecção é a primeira etapa de todo o processo (ALVES, 1998).

Bahiense e Bittencourt (2004) avaliaram em condições de laboratório o sinergismo entre um isolado de *Beauveria bassiana* e diferentes concentrações de um piretróide, a deltametrina. Esses pesquisadores observaram que a cepa de carrapato resistente a deltametrina apresentava uma taxa de mortalidade satisfatória quando se associava o piretróide sintético ao fungo. Evidenciando-se dessa maneira que o sinergismo entre o produto biológico e o produto químico era eficiente e uma possibilidade de alternativa para o desenvolvimento de nova estratégia no controle de carrapatos resistentes a determinados acaricidas.

Mais tarde, Barci et al. (2009), realizaram testes associando dois isolados de *B. bassiana* a diversos acaricidas, alguns contendo associação de duas ou mais bases químicas, com o intuito de avaliar o sinergismo entre eles. Observou-se que um dos isolados de *B. bassiana*, o IBCB66 apresentou-se compatível a deltametrina, cipermetrina high cis e amitraz, não havendo comprometimento do desenvolvimento do fungo. Enquanto o isolado IBCB21 apresentava-se compatível apenas com deltametrina. Dessa maneira, pode-se evidenciar que o isolado IBCB66 apresentou-se como o mais tolerante a associação com acaricidas em relação ao isolado IBCB21. Isso nos traz a conclusão que diferentes isolado, de uma mesma espécie de fungo entomopatogênicos, pode apresentar comportamentos distintos frente ao sinergismo com acaricidas químicos.

Webster et al. (2015) estudaram a associação de um isolado de *M. anisopliae* associado a cipermetrina e a clorpirifós em condições de laboratório e a campo, para controlar uma cepa resistente de *R. microplus*. Esses autores demonstraram que a compatibilidade do isolado fúngico com os acaricidas, em condições *in vitro*, apresentaram alguns efeitos moderados em relação a viabilidade fúngica. Entretanto, nos estudos a campo quando se comparou os tratamentos com acaricidas, *M. anisopliae* e acaricida associado a *M. anisopliae*, obteve-se uma eficácia de 97,9% para os grupos tratados com a associação do isolado fúngico ao acaricida, quando os acaricidas apenas apresentaram uma eficácia de 71,1% e o isolado fúngico apenas uma eficácia de 56,3%. Dessa maneira, esses pesquisadores elucidam que a associação fungo e acaricida é uma interessante ferramenta no controle de cepas resistentes do carrapato dos bovinos.

Paulo et al. (2016) também realizaram estudos com *M. anisopliae* associado a acaricidas para o controle de *R. microplus*. Nesse estudo, os pesquisadores testaram o uso de uma suspensão fúngica na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e 25 ppm de cipermetrina, testando os produtos de forma isolada e em associação, sobre ovos e larvas de *R. microplus*. Pode-se observar que os produtos quando utilizados nas menores concentrações não apresentavam ação eficaz sobre ovos e larvas do carrapato, ou seja, não havia alteração nos padrões biológicos, em contrapartida, quando se associava o fungo na concentração de  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  a cipermetrina a 25 ppm reduzia-se o percentual de eclodibilidade pela metade e ocorria o dobro de mortalidade das larvas, quando comparado os resultados com os produtos biológico e químico de forma isolada.

Dessa maneira, associação de fungos entomopatogênicos com bases químicas que outrora se apresentem como produtos cujos carrapatos são resistentes, pode ser uma interessante ferramenta no controle de *R. microplus*, tendo em vista que muitos usuários de produtos químicos se mostrem receosos ao uso específico de produtos biológicos (MASCARIN et al., 2018). Portanto, as metodologias de controle que utilizem fungos entomopatogênicos associados com acaricidas químicos para controlar o carrapato *R. microplus* precisam ter seus estudos aprofundados, não somente em condições de laboratório como a campo.

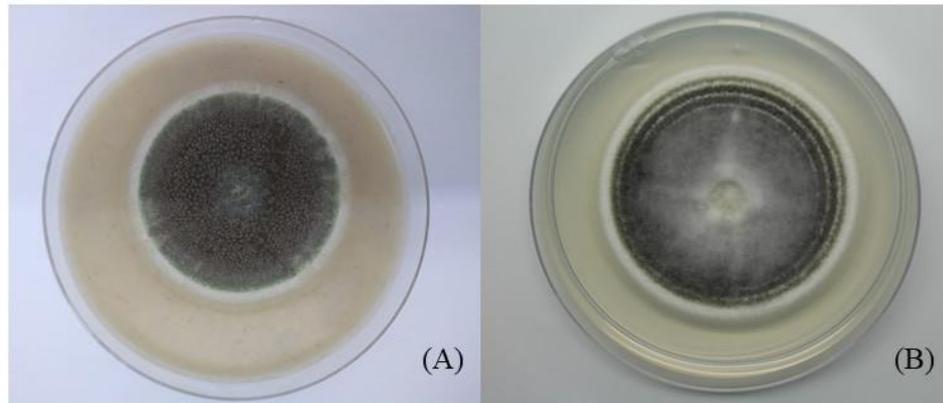
## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local do Experimento

Os experimentos foram realizados na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz (EPPWON) pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica, Baixada Fluminense do Rio de Janeiro.

### 3.2 Obtenção do isolado fúngico

Os isolados fúngicos utilizados no experimento foram: I) *Metarhizium robertsii* isolado ARSEF 2575, cedido pela **Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi** (ARSEF), Laboratório de Plantas, Solo e Nutrição (Ithaca, NY, EUA), originários da região da Carolina do Sul – EUA, possuindo o *Curculio caryae* como substrato e II) *Metarhizium pingshaense* isolado LCMS09, isolado de amostras de solo do município de Seropédica – RJ (Latitude 22° 45' 48" e Longitude 43° 40' 49") (Figura 1). Estes isolados foram selecionados com base nos estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária (LCM). Como o presente estudo teve acesso ao patrimônio genético brasileiro, a pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob o código AA47CB6.



**Figura 1:** (A) *Metarhizium pingshaense* (LCM S09) e (B) *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575).

### 3.3 Obtenção do carrapato *Rhipicephalus microplus*

Foram utilizadas fêmeas de carrapato *R. microplus* obtidas de infestações artificiais realizadas em bezerros mantidos em baias da EPPWON. As fêmeas ingurgitadas foram coletadas do chão das baias de bezerros, 21 dias após a infestação e higienizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,05% por 3 minutos. Deve-se ressaltar que a colônia de carrapatos mantida pelo Laboratório de Controle Microbiano recebeu a devida aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IV da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ nº 9714220419) (Anexo).

### 3.4 Acaricidas Químicos Utilizados

Os acaricidas químicos foram selecionados por possuírem princípios ativos largamente utilizados para o controle do carrapato do boi *R. microplus*, além de serem carrapaticidas de contato. O produto Colosso® possui clorpirifós, cipermetrina e citronelal como princípios ativos, o produto Triatox® possui amitraz como princípio ativo e o Butox® possui deltametrina como princípio ativo. Dessa maneira, pode-se avaliar a relação de bases químicas distintas com *Metarhizium* spp., trabalhar com produtos amplamente utilizados no controle do carrapato *R. microplus* através da aplicação por pulverização no gado e avaliar uma ou mais bases químicas em associação com *Metarhizium* spp.

### 3.5 Compatibilidade de Conídios de *Metarhizium* spp. com Acaricidas Comerciais

Os conídios dos isolados fúngicos ARSEF 2575 e LCM S09 foram produzidos em meio Ágar Aveia (AA), produzido com 60 g de farinha de aveia adicionado a 12,5 g de ágar em 1 litro de água destilada, a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$  por 14 dias. A compatibilidade dos conídios com acaricidas foi avaliada usando três produtos comerciais: amitraz (12,5%, Triatox®, MSD, São Paulo, Brasil), deltametrina (2,5%, Butox®, MSD, São Paulo, Brasil) e uma mistura de piretróide, organofosforado e álcool monoterpenóide (15% cipermetrina, 25% clorpirifós, 1% citronelal, Colosso®, Ourofino, São Paulo, Brasil). Cada acaricida comercial foi adicionado às suspensões de Tween 80® de contendo conídio de *Metarhizium* spp. (concentração final  $1 \times 10^3$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) e deixado em contato em quatro diferentes intervalos de tempo (1h, 5h, 10h e 24h). As concentrações finais dos acaricidas seguiram o que é recomendado por seus fabricantes para serem pulverizados no gado (isto é, 0,025% de amitraz; 0,0025% de deltametrina; e 0,018% de cipermetrina + 0,031% de clorpirifós + 0,0012% de citronelal). Água destilada estéril Tween 80® (0,01%) foi adicionada às suspensões fúngicas nos grupos de controle. As suspensões foram então semeadas em meio de aveia e deixadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$  por 96h (Webster et al, 2015). As unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas e a culturabilidade relativa calculada [CR (%) = GT (grupo tratado) /GC (grupo controle) x 100] conforme descrito por Braga et al. (2001). Os experimentos foram considerados válidos quando as placas de controle tinham pelo menos 95% de conídios germinados. Os experimentos foram realizados três vezes com diferentes lotes de conídios.

### 3.6 Compatibilidade de Blastosporos de *Metarhizium* spp. com Acaricidas Comerciais

Conídios de *Metarhizium* spp. foram cultivados em meio Aveia Ágar. A partir disso, suspensões com os diferentes isolados fúngicos foram produzidas e ajustadas a uma concentração inicial de  $1 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , inoculando-se três mililitros de cada suspensão em 50 mL de meio líquido aveia (60 g de aveia suplementado com 42,1g  $\text{L}^{-1}$  de glicose para um litro de água destilada) para cada frasco de tipo Erlenmeyer. Os frascos foram tampados com algodão hidrofóbico e colocados em agitador orbital (TE-424, Tecnal®) a 200 rpm por 72 horas, em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento do fungo, o meio foi filtrado em funil com auxílio de gaze para remoção do micélio produzido durante o cultivo e colocado em tubos cônicos de 50 mL. O meio contendo os blastosporos passará por dois ciclos de centrifugação a 3410 G por 5 minutos (Rotina 380

R; Hettich®). Após o primeiro ciclo, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 10 mL de água destilada estéril com Tween 80® a 0,02%, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet suspenso em 5 mL de água com Tween 80® a 0,02%, seguido de homogeneização em vórtex. Para quantificação de blastosporos serão colocados 10 µL da solução final de cada tubo falcon em câmara de Neubauer. A quantificação será realizada segundo Alves (1998), ajustando-se a concentração para  $2 \times 10^3$  blastosporos mL<sup>-1</sup>. Após esse processo, foi realizada a associação de 1 ml de suspensão de blastosporos com 1 ml de acaricida, previamente diluído como mencionado anteriormente, obtendo-se uma alíquota de 2 mL em eppendorf. Foram plaqueados 50 µL em meio de cultura Aveia Ágar em placas de Petri 90 x 15 mm, em triplicata, com intervalos de tempos distintos (1h, 5h, 10h e 24h) e mantidos em câmara climatizada a 25°C ± 1°C e UR ≥ 80% por 96h. A posteriori, quantificou-se as UFC'S e calculou-se a culturabilidade relativa conforme descrito por Braga et al. (2001). Os experimentos foram repetidos três vezes.

### **3.7 Compatibilidade de Microescleródios de *Metarhizium* spp. com acaricidas comerciais**

Adicionou-se suspensão conidial com concentração inicial de  $5 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados ARSEF 2575 e LCM S09 em meio de cultura líquido próprio para crescimento de microescleródios em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, mas preenchendo-se apenas 100 mL de sua capacidade (MASCARIN et al., 2014). Os frascos foram depositados em incubadora de agitação rotativa a 25 ± 1° C a 200 rpm (TE-424, Tecnal®) por 5 dias. Após esse processo, os microescleródios foram lavados e centrifugados a fim de se retirar o excesso de meio de cultura. Um ml do caldo de microescleródios foi adicionado em 9 ml de soro fisiológico estéril em tubo falcon de 15 ml e centrifugado a 4.200 rpm a 25°C por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo 9 ml de soro fisiológico estéril, repetiu-se o processo por duas vezes. Uma terceira etapa de centrifugação foi realizada, sendo esta por 15 minutos, após o processo adicionou-se 9 ml de soro e a suspensão foi levada ao vórtex. Em tubos falcon de 15 ml, foram colocados 3 ml de solução contendo os microescleródios e 3 ml de acaricida comercial (com uma concentração final de ~ 300 microescleródios mL<sup>-1</sup>), após esse processo uma alíquota de 100 µL foi depositada em lâmina de vidro sobreposta por lamínula de 24 x 50 mm para contagem dos microescleródios. Foram plaqueados 30 microescleródios em meio Ágar-Ágar, cada grupo obteve três réplicas nos quatro intervalos de tempo (1h, 5h, 10h e 24h), os mesmos foram mantidos em câmara climatizada a 25°C ± 1°C e UR ≥ 80% por 72h. A posteriori, quantificou-se as UFC'S e calculou-se a culturabilidade relativa conforme descrito por Braga et al. (2001). Os experimentos foram realizados três vezes.

### **3.8 Testes Biológicos com adultos de *R. microplus***

Fêmeas totalmente ingurgitadas foram distribuídas em 14 grupos experimentais para cada acaricida sintético (deltametrina ou amitraz). Deltametrina ou amitraz foram testados independentemente. Os carrapatos foram tratados com a associação de deltametrina e propágulos de *M. robertsii* ou *M. pingshaense* (ou seja, conídios, blastosporos ou microsclerotia) ou amitraz e propágulos de *M. robertsii* ou *M. pingshaense*. Propágulos fúngicos não foram incubados previamente com os acaricidas químicos. Os grupos de controle positivo foram tratados com propágulos fúngicos ou

acaricidas químicos isoladamente. No grupo de controle negativo, as fêmeas foram tratadas com Tween 80® suspensão aquosa a 0,01% (vol / vol).

Cada grupo teve 10 fêmeas de *R. microplus* que foram pesadas individualmente e distribuídas homogeneamente nos grupos. Carrapatos tratados com conídios ou blastosporos foram imersos em 1 mL de suspensões fúngicas a  $1 \times 10^8$  propágulos ml<sup>-1</sup> por três minutos. Carrapatos tratados com microescleródios foram imersos em uma suspensão de 100 microescleródios por carrapato por três minutos. As mesmas concentrações de fungos foram utilizadas para os tratamentos de associação. As concentrações finais dos acaricidas seguiram o que é recomendado por seus fabricantes para serem pulverizados no gado.

A metodologia utilizada para o tratamento de fêmeas ingurgitadas foi semelhante à descrita por Perinotto et al. (2017). Os parâmetros biológicos avaliados foram peso inicial das fêmeas (PIF), peso da massa de ovos (PTMO) e porcentagem de incubação das larvas (PE%). A média de cada parâmetro foi utilizada para calcular o índice de produção de ovos (IPO) e o índice nutricional (IN) usando as equações de Bennet (1974). O percentual de controle do carrapato foi obtido pelo cálculo da reprodução estimada segundo Drummond et al. (1971). Os bioensaios foram repetidos duas vezes.

### **3.9 Análise Estatística**

Os dados do teste de compatibilidade (associação de fungos e acaricidas químicos) foram transformados ( $\sqrt{x + 0,5}$ ), submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e ao teste de homogeneidade de variância de Bartlett. Uma vez verificados esses pressupostos, a análise ANOVA de dois fatores e o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) foram aplicados para comparar esses tratamentos. O peso inicial das fêmeas (PIF) teve uma distribuição normal, e os outros parâmetros biológicos (PTMO, PE%, IPO% e IN%) exibiram uma distribuição não normal. Os dados com distribuição normal foram analisados por meio da análise de variância unilateral (ANOVA unilateral) seguida do teste de Tukey ( $P > 0,99$ ), e os dados com distribuição não normal foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ( $P < 0,0001$ ). Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism, v.9.1.2.

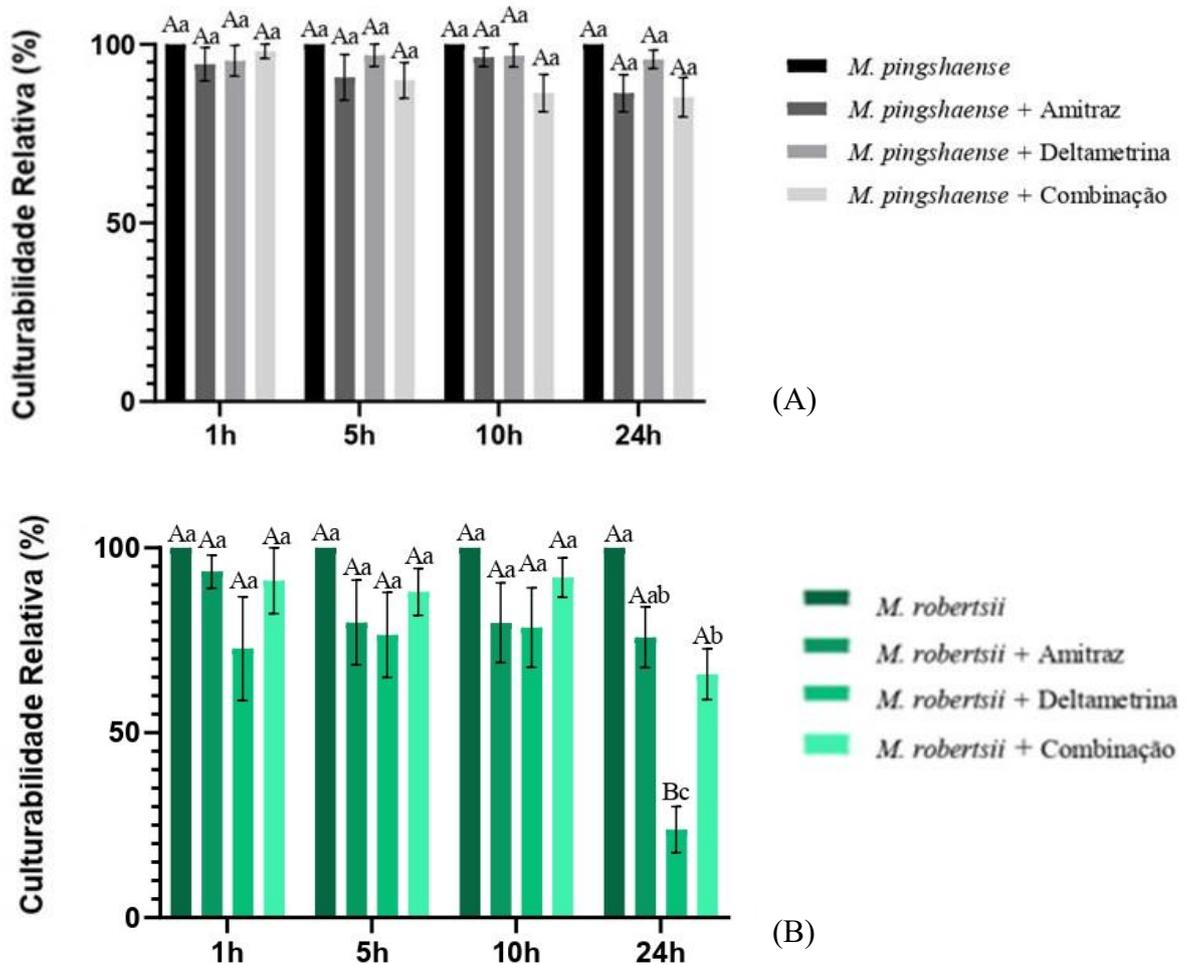
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise da Compatibilidade de *Metarhizium* spp. Associada a Acaricidas Químicos

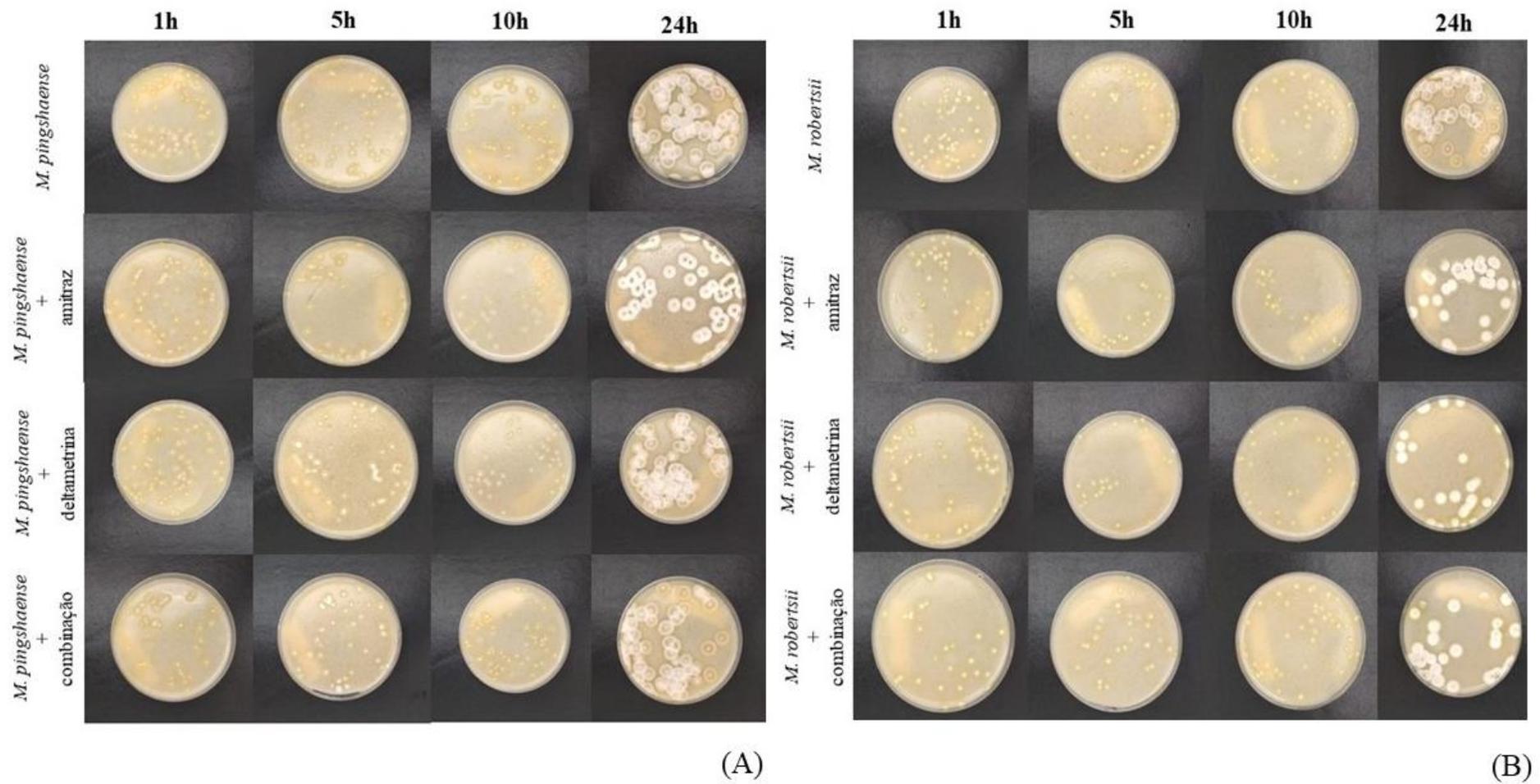
#### 4.1.1 Avaliação da Compatibilidade de Conídios de *Metarhizium* spp. Associados a Acaricidas Químicos

A avaliação da compatibilidade de conídios de *Metarhizium* spp. associados a diferentes acaricidas, após quatro tempos de associação (1h, 5h, 10h e 24h) são apresentados na figura 2. A culturabilidade relativa foi comparada estatisticamente entre isolados associados ou não a acaricidas. Pode-se observar que o percentual no estudo com *M. pingshaense* isolado LCM S09 (Figura 2A), não foram observadas diferenças estatísticas significativas em relação ao percentual de culturabilidade, na comparação entre os diferentes tratamentos. Enquanto, no estudo com *M. robertsii* isolado ARSEF 2575 (Figura 2B), foram observadas diferenças estatísticas entre todos os grupos avaliados no tempo de 24h e, o grupo *M. robertsii* + deltametrina diferiu estatisticamente no tempo de 24h em relação aos outros tempos de tratamento estudados (1h, 5h e 10h). A culturabilidade relativa dos conídios incubados com os diferentes acaricidas químicos testados aqui variou de 98% (conídios de *M. pingshaense* + combinação; 1h de incubação) a 23,8 % (Conídios de *M. robertsii* + deltametrina; 24h de incubação) (Figura 2). Quando se comparou conídios de *M. pingshaense* e *M. robertsii* para todos os tempos de associação (Figura 8), observou-se que no tempo de 24h de associação, *M. robertsii* + deltametrina e *M. robertsii* + combinação (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) é que apresentaram diferença estatística significativa em relação aos demais grupos estudados.

Na figura 3 podem ser observadas as unidades formadoras de colônia de ambos os isolados estudados, *M. pingshaense* isolado LCM S09 (Figura 3A) e *M. robertsii* isolado ARSEF 2575 (Figura 3B), que foram utilizadas para calcular a culturabilidade relativa.



**Figura 2:** Média e erro padrão da média da culturabilidade relativa (%) de conídios de (A) *Metarhizium pingshaense*, isolado LCM S09 e (B) *Metarhizium robertsii*, isolado ARSEF 2575 associado com amitraz, deltametrina, ou combinação de acaricidas (Clorpirifós, Cipermetrina e Citronelal) por 1, 5, 10 ou 24h. Barras com a mesma letra minúscula no mesmo tempo ou maiúscula no mesmo tratamento não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

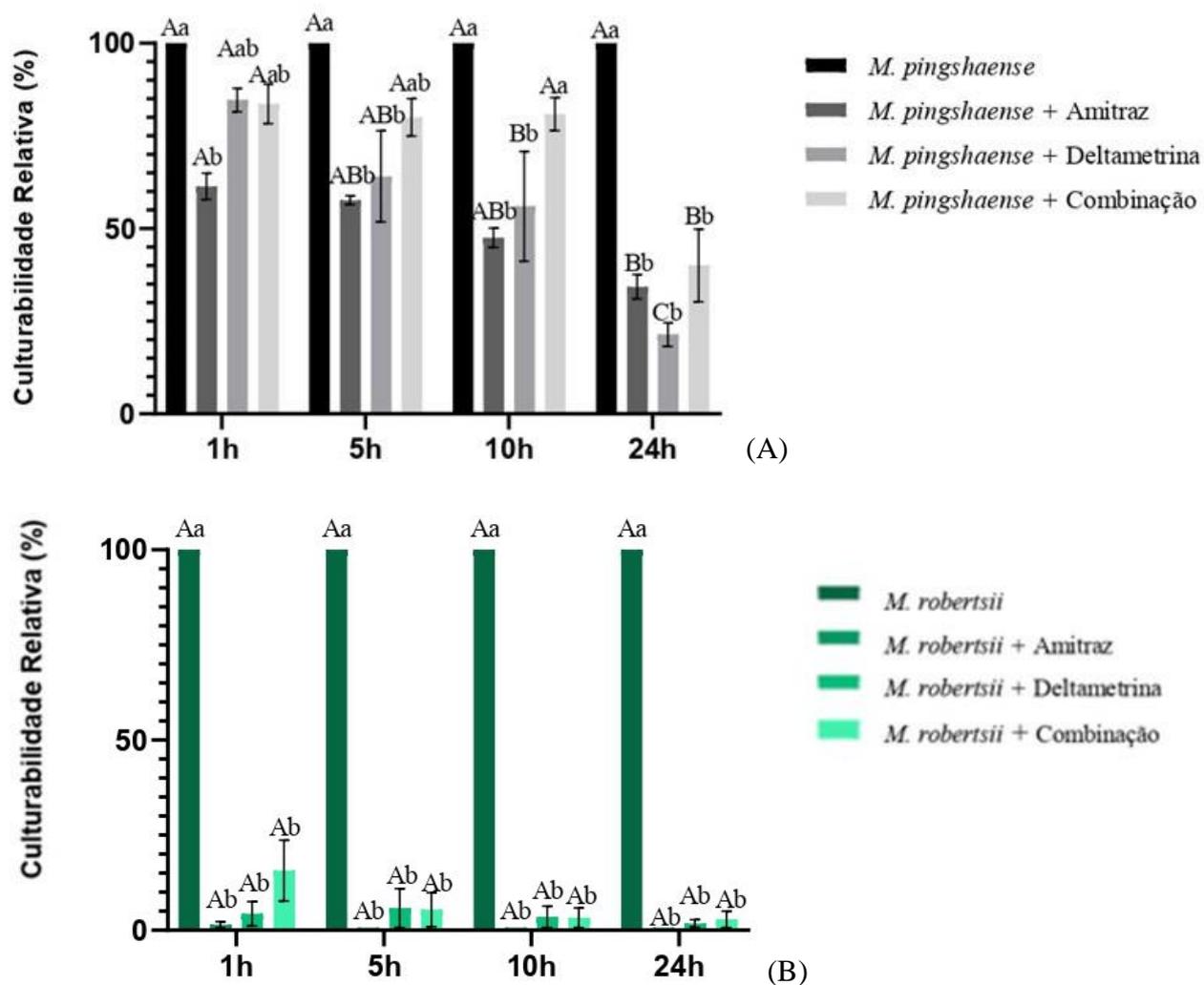


**Figura 3:** Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de conídios de (A) *M. pingshaense* e de (B) *M. robertsii*.

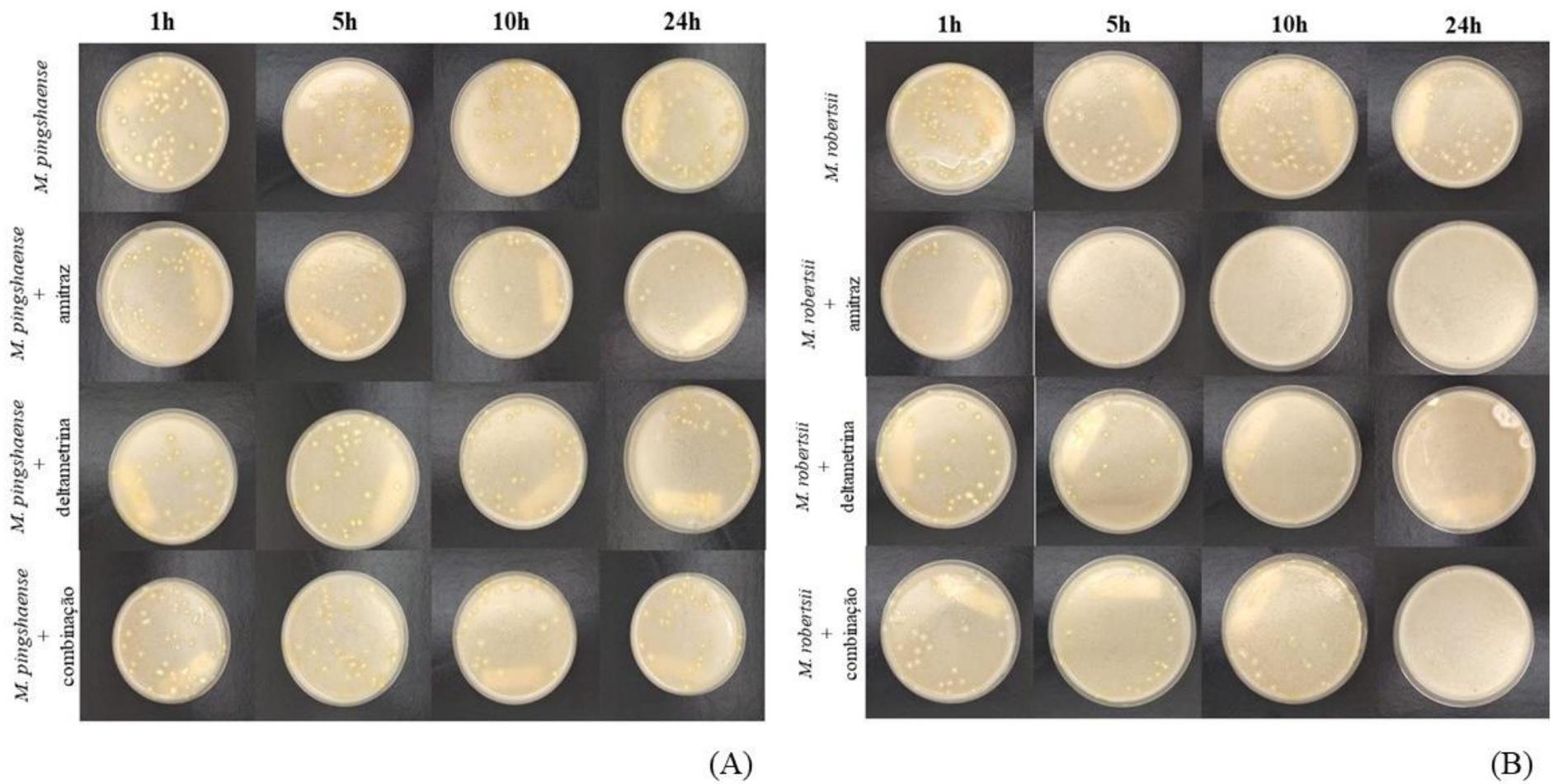
#### 4.1.2 Avaliação da Compatibilidade de Blastosporos de *Metarhizium* spp. Associados a Acaricidas Químicos

A avaliação da compatibilidade de blastosporos de *Metarhizium* spp. associados a diferentes acaricidas, após os quatro tempos de associação (1h, 5h, 10h e 24h) é demonstrada na figura seguinte (Figura 4). Pode-se observar que tanto *M. pingshaense* isolado LCM S09 (Figura 4A) quanto *M. robertsii* isolado ARSEF 2575 (Figura 4B) apresentaram diferenças estatísticas. Para *M. pingshaense* isolado LCM S09, no tempo de 1h *M. pingshaense* + amitraz difere estatisticamente do controle, mas não difere dos demais grupos associados a acaricidas; o mesmo se repete para o tempo de 5h; já no tempo de 10h, *M. pingshaense* + amitraz difere estatisticamente do controle e de *M. pingshaense* + combinação (clorpirifós, cipermetrina e citronelal), mas é estatisticamente igual a *M. pingshaense* + deltametrina; e no tempo de 24h todos os grupos associados a acaricidas diferem estatisticamente do controle. Em relação a comparação estatística de um mesmo grupo para os quatro tempos de associação, pode-se observar que *M. pingshaense* + amitraz difere estatisticamente no tempo de 24h em relação aos demais tempos estudados; *M. pingshaense* + deltametrina difere estatisticamente no tempo de 10h em relação ao tempo de 1h e difere no tempo de 24h em relação aos demais tempos de associação estudados; enquanto *M. pingshaense* + combinação (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) difere apenas no tempo de 24h em relação aos demais tempos de associação analisados.

Quanto a *M. robertsii*, observa-se um padrão para todos os tempos de associação. Ou seja, todos os grupos associados a qualquer um dos três acaricidas testados apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle. Além disso, quando se analisou os diferentes tempos de associação para um mesmo grupo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Dessa maneira, o percentual da culturabilidade relativa de blastosporos associados com acaricidas, variou de 83,6% (*M. pingshaense* blastosporo + combinação; 1h de incubação) a 0,7% (*M. robertsii* blastosporo + amitraz; 24h de incubação). Ao se realizar a comparação de blastosporos de *M. pingshaense* e *M. robertsii* para todos os tempos (Figura 8), observou-se que os isolados apresentam diferenças estatísticas entre si para todos os tempos de associação, e que *M. pingshaense* demonstra-se melhor em relação a *M. robertsii*.



**Figura 4:** Média e erro padrão da média da culturabilidade relativa (%) de blastosporos de (A) *Metarhizium pingshaense*, isolado LCM S09 e (B) *Metarhizium robertsii*, isolado ARSEF 2575 associado com amitraz, deltametrina, ou combinação de acaricidas (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) por 1, 5, 10 ou 24h. Barras com a mesma letra minúscula no mesmo tempo ou maiúscula no mesmo tratamento não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

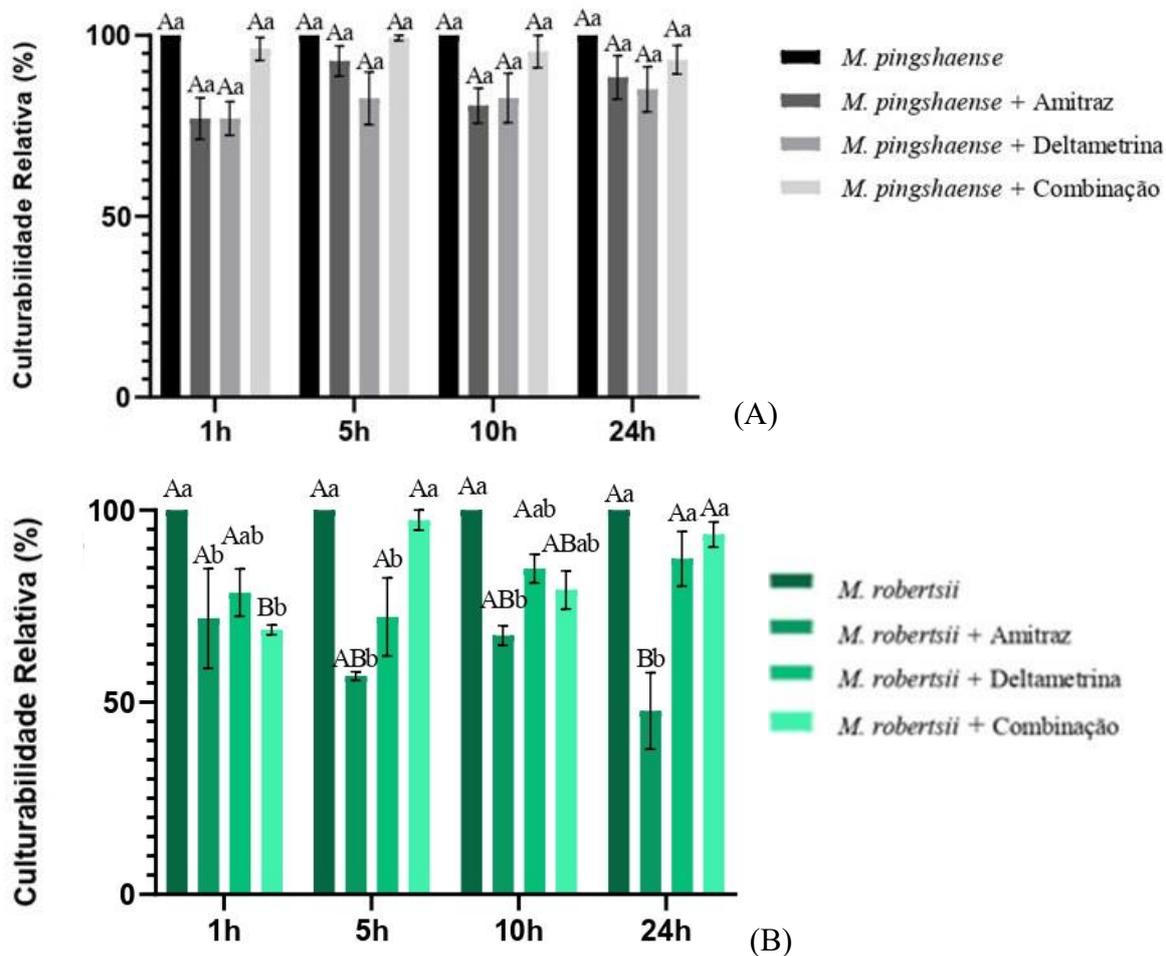


**Figura 5:** Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de blastosporos de (A) *M. pingshaense* e (B) *M. robertsii*.

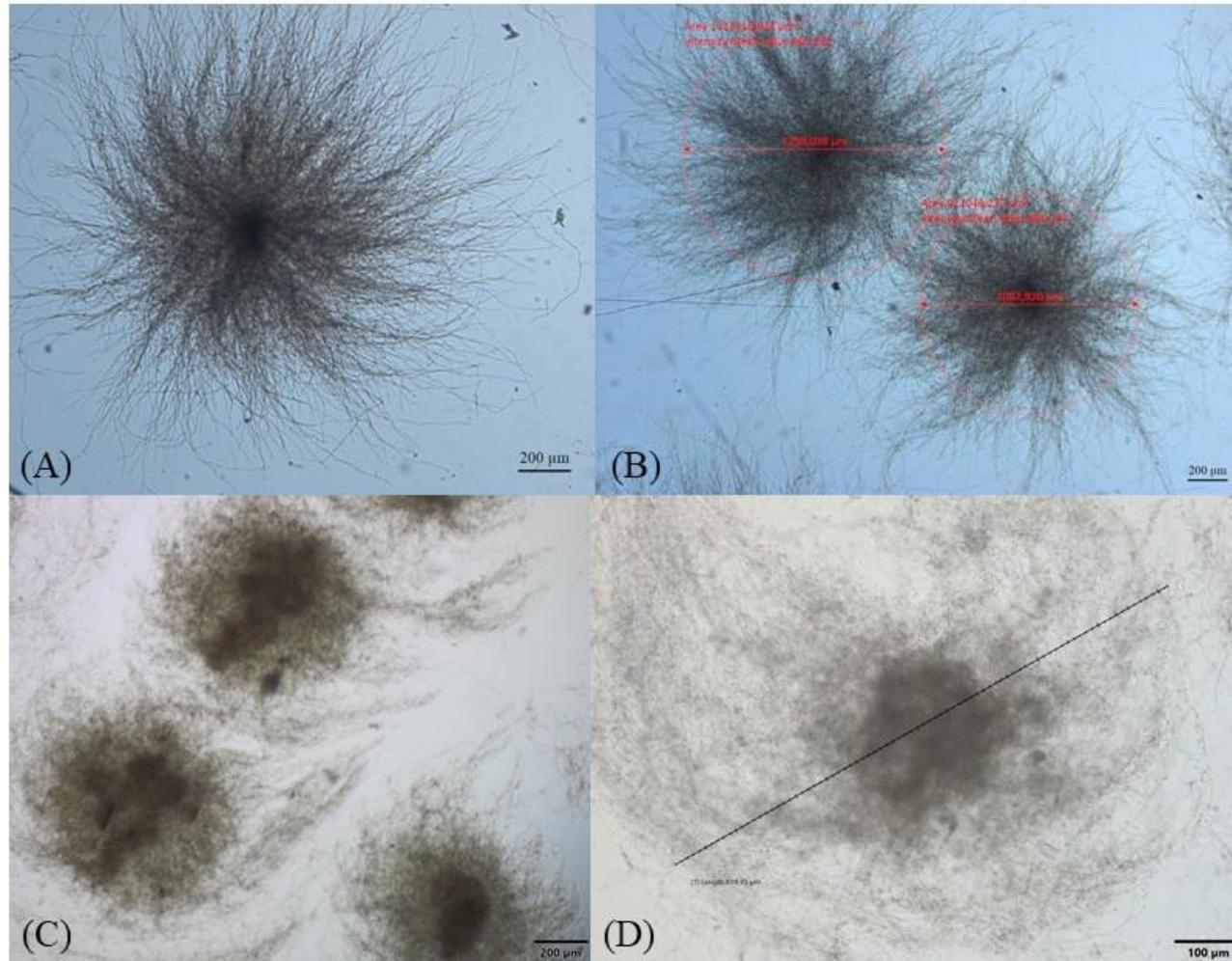
### 4.1.3 Avaliação da Compatibilidade de Microescleródios de *Metarhizium* spp. Associados a Acaricidas Químicos

A avaliação da compatibilidade de microescleródios de *Metarhizium* spp. associados a diferentes acaricidas, após quatro tempos de associação (1h, 5h, 10h e 24h) são mostrados abaixo (Figura 6). Pode-se observar que *M. pingshaense* isolado LCM S09 (Figura 6A) não apresentou diferença estatísticas entre os grupos controle e associados para nenhum tempo de associação, e nem diferença estatística para um mesmo grupo em relação aos tempos de associação analisados. Enquanto, *M. robertsii* isolado ARSEF 2575 (Figura 6B) apresentou algumas diferenças estatística entre os grupos avaliados, *M. robertsii* + amitraz e *M. robertsii* + combinação (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) apresentam diferença estatística em relação ao controle no tempo de 1h; *M. robertsii* + amitraz e *M. robertsii* + deltametrina apresentam diferença estatística em relação aos grupos controle e *M. robertsii* + combinação (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) no tempo de 5h; *M. robertsii* + amitraz apresenta diferença estatística em relação ao controle no tempo de 10h; e *M. robertsii* + amitraz apresenta diferença estatística em relação a todos os demais grupos no tempo de 24h. Além disso, quando se analisou todos os tempos estudados para um mesmo grupo, observou-se que *M. robertsii* + amitraz apresentou diferença estatística significativa no tempo de 24h em relação aos demais tempos analisados. Neste caso, a culturabilidade relativa de microescleródios variou de 99,3% (*M. pingshaense* microescleródio + combinação, 5h de incubação) a 47,8% (*M. robertsii* microesclerotia + amitraz, 24h de incubação).

Pode-se observar na figura 7, as estruturas de microescleródios consideradas para quantificação, tendo em vista que a recomendação é de que estes possuam 50  $\mu\text{m}$  ou mais para serem considerados viáveis. Além disso, na comparação de microescleródios de *M. pingshaense* e *M. robertsii* para todos os tempos (Figura 8), observou-se que há diferença entre os isolados para todos os tempos de associação.



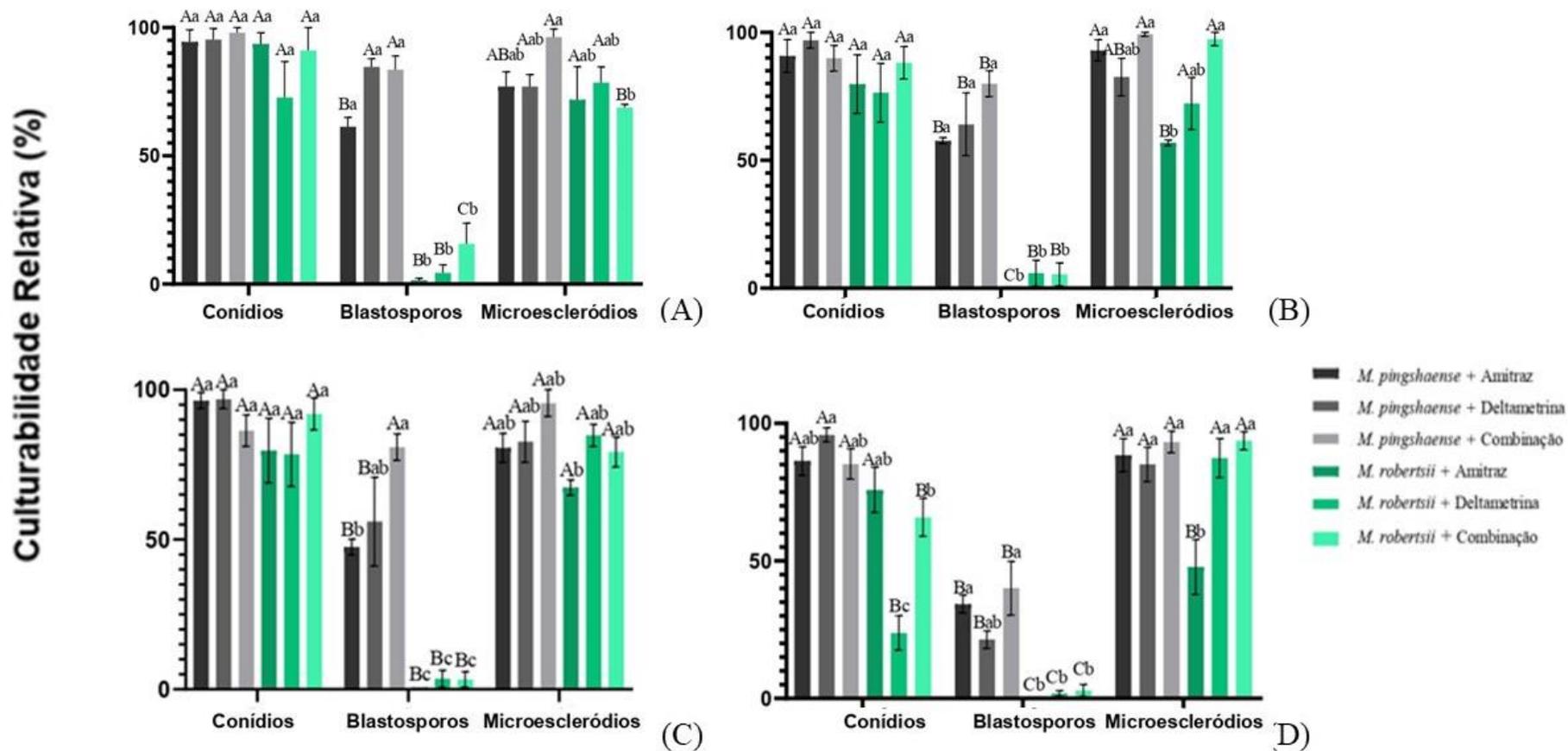
**Figura 6:** Média e erro padrão da média da culturabilidade relativa (%) de microscleródios de (A) *Metarhizium pingshaense*, isolado LCM S09 e (B) *Metarhizium robertsii*, isolado ARSEF 2575 associado com amitraz, deltametrina, ou combinação de acaricidas (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) por 1, 5, 10 ou 24h. Barras com a mesma letra minúscula no mesmo tempo ou maiúscula no mesmo tratamento não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ).



**Figura 7:** Microescleródios de (A e B) *M. pingshaense* e (C e D) *M. robertsii*.

#### **4.1.4 Comparação da Compatibilidade de Distintos Propágulos de *Metarhizium* spp. Associados a Acaricidas Químicos**

Foi realizada a comparação estatísticas entre os isolados *M. pingshaense* e *M. robertsii* para um mesmo propágulo e a comparação de propágulos para um mesmo tratamento. Sendo assim, pode-se observar que *M. pingshaense* conídios e *M. pingshaense* microescleródios não diferiram estatisticamente em nenhum dos tempos associação para todos os grupos analisados e que *M. pingshaense* blastosporos associados aos três acaricidas utilizados, diferem dos demais propágulos pelo menos em algum dos tempos de associação. Quanto a *M. robertsii* conídios, blastosporos e microescleródios associados a amitraz, deltametrina e combinação (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) diferem estatisticamente em pelo menos um tempo de associação (Figura 8). Quando comparados entre si, pode-se observar que *M. pingshaense* apresentou-se melhor que *M. robertsii* em alguns casos, principalmente quando se compararam os blastosporos destes dois isolados.



## 4.2 Bioensaio com adultos de *R. microplus*

A combinação de acaricidas (clorpirifós, cipermetrina e citronelal) não foi usada no bioensaio com fêmeas ingurgitadas porque a suscetibilidade da população de carrapatos testada foi extremamente alta para este produto, mesmo tendo-se buscado realizar os testes com concentrações subletais do produto. Conseqüentemente, as Tabelas 1 e 2 exibem os resultados dos testes de imersão de fêmeas de carrapatos usando diferentes propágulos fúngicos e deltametrina ou amitraz, respectivamente. O peso inicial das fêmeas (PIF) antes da oviposição em ambos os bioensaios (deltametrina ou amitraz) não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ( $P = 0,99$  e  $P = 0,99$  respectivamente).

Quando os isolados fúngicos e seus propágulos foram associados à deltametrina, o PTMO variou de 15,4 mg a 153,1 mg e LH de 71,1% a 94,7%, enquanto no grupo não tratado (CTR), foram observados os valores de 158,7 mg (PTMO) e 97,3% (PE%). O IPO% e IN% produzidos por esses tratamentos variaram de 5,8% a 55% e 11,1% a 64,8%, respectivamente, e que para estes mesmos parâmetros não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle e deltametrina. A maior porcentagem de controle de carrapatos observada foi de 81,5% no tratamento com conídios de *M. pingshaense* + deltametrina, enquanto o controle não apresentou um percentual de controle, a deltametrina apresentou um percentual de controle de 7.23% e os conídios de *M. pinghsaense* apresentaram um percentual de controle de 41.88%.

Carrapatos que foram tratados com fungos e amitraz ou amitraz exclusivamente não tiveram oviposição (PTMO = zero). Conseqüentemente, o PE% não pôde ser calculado para esses grupos, enquanto no grupo não tratado (CTR), as fêmeas tiveram um PTMO médio de 167,7 mg e 98,8% PE%. O IPO% e o IN produzidos nos grupos tratados com amitraz (associado ou não) foram de 0%. Em todos os grupos tratados com amitraz, individualmente ou associado a propágulo fúngico de ambos os isolados, foi observado um percentual de controle de 100%.

**Tabela 1:** Média  $\pm$  erro padrão da média do peso inicial da fêmea (PIF), peso da massa de ovos (PTMO); percentual de eclosão (PE%); índice de produção de ovos (IPO); índice nutricional (IN) e percentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. associados ou não à deltametrina.

Grupos	PIF (mg)	PTMO (mg)	PE (%)	IPO (%)	IN (%)	Percentual de Controle (%)
<b>Controle (CTR)</b>	278.5 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	158.7 $\pm$ 0 a (Md = 0.2) (10)	97.3 $\pm$ 2 a (Md = 100) (10)	57.5 $\pm$ 4 a (Md = 62.6) (10)	77.6 $\pm$ 3.4 ab (Md = 81.3) (10)	
<b>Deltametrina</b>	276.5 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	161.7 $\pm$ 0 a (Md = 0.1) (10)	86.4 $\pm$ 9.8 ab (Md = 97) (10)	58.4 $\pm$ 2.1 a (Md = 59.5) (10)	79.3 $\pm$ 3.4 ab (Md = 81.3) (10)	7.23
<b><i>M. pingshaense</i> (Conídios)</b>	279.2 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	110.6 $\pm$ 0 bc (Md = 0.1) (10)	77.0 $\pm$ 9 bc (Md = 85) (10)	39.8 $\pm$ 3.4 bc (Md = 41.5) (10)	64.2 $\pm$ 3.7 bc (Md = 65.6) (10)	41.88
<b><i>M. pingshaense</i> (blastosporos)</b>	278.2 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	149.1 $\pm$ 0 abc (Md = 0.1) (10)	95.7 $\pm$ 1.1 ab Md = 96.5) (10)	53.8 $\pm$ 2.2 ac (Md = 55.9) (10)	68.7 $\pm$ 2.7 abc (Md = 68.2) (10)	8.57
<b><i>M. pingshaense</i> (Microescleródios)</b>	276.6 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	165.9 $\pm$ 0 a (Md = 0.2) (10)	83.0 $\pm$ 2.5 bc (Md = 80) (10)	60.2 $\pm$ 0.9 a (Md = 60.6) (10)	76.5 $\pm$ 1.6 ab (Md = 77.4) (10)	11.10
<b><i>M. robertsii</i> (Conídios)</b>	278.4 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	138.4 $\pm$ 0 abc (Md = 0.1) (10)	93.2 $\pm$ 1.5 abc (Md = 95.0) (9)	49.6 $\pm$ 5.7 ac (Md = 55.3) (10)	63.57 $\pm$ 7.2 ac (Md = 69.6) (10)	8.23
<b><i>M. robertsii</i> (blastosporos)</b>	278.8 $\pm$ 0 a (Md = 0.3)	170.2 $\pm$ 0 a (Md = 0.2)	89.50 $\pm$ 4.3 abc (Md = 98)	61.0 $\pm$ 1 a (Md = 60.2)	79.6 $\pm$ 1.6 a (Md = 79.8)	2.53

	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	
<b><i>M. roberstii</i> (Microescleródios)</b>	277.4 ± 0 a (Md = 0.3) (10)	165.2 ± 0 a (Md = 0.2) (10)	85 ± 4.4 abc (Md = 89) (10)	59.5 ± 1.5 a (Md = 60) (10)	74.4 ± 1.4 ab (Md = 74) (10)	10.27
<b><i>M. pingshaense</i> (Conídios) + Deltametrina</b>	278.0 ± 0 a (Md = 0.3) (10)	15.4 ± 0 c (Md = 0) (10)	90.6 ± 3 abc (Md = 90) (5)	5.8 ± 2.6 bc (Md = 2.1) (10)	11.1 ± 4.4 c (Md = 4.6) (10)	81.15
<b><i>M. pingshaense</i> (blastosporos) + Deltametrina</b>	278.5 ± 0 a (Md = 0.3) (10)	141.2 ± 0 abc (Md = 0.1) (10)	93.2 ± 1.8 abc (Md = 95) (10)	50.4 ± 2.6 ac (Md = 51.5) (10)	66.3 ± 2 abc (Md = 68.40) (10)	16.04
<b><i>M. pingshaense</i> (Microescleródios) + Deltametrina</b>	276.8 ± 0 a (Md = 0.2) (10)	126.0 ± 0 abc (Md = 0.1) (10)	71.1 ± 5.6 c (Md = 80) (9)	45.6 ± 6 ac (Md = 53.4) (10)	59.7 ± 7.5 abc (Md = 67.3) (10)	34.36
<b><i>M. roberstii</i> (Conídios) + Deltametrina</b>	277.6 ± 0 a (Md = 0.3) (10)	148.0 ± 0 abc (Md = 0.1) (10)	94.7 ± 1.1 abc (Md = 95) (10)	53.48 ± 1.1 ac (Md = 54.2) (10)	64.8 ± 1.3 c (Md = 64.5) (10)	9.84
<b><i>M. roberstii</i> (blastosporos) + Deltametrina</b>	278.6 ± 0 a (Md = 0.3) (10)	141.7 ± 0 ab (Md = 0.2) (10)	86.8 ± 4 abc (Md = 85) (9)	50.7 ± 5.7 ac (Md = 55) (10)	62.73 ± 7.2 abc (Md = 67.7) (10)	12.84
<b><i>M. roberstii</i> (Microescleródios) + Deltametrina</b>	278.4 ± 0 a (Md = 0.3) (10)	153.1 ± 0 ab (Md = 0.1) (10)	88.2 ± 4 abc (Md = 95) (10)	55 ± 0.7 ac (Md = 54.9) (10)	62.7 ± 1.6 abc (Md = 70.2) (10)	13.71

Os valores médios seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente (P> 0,05). Md = mediana. (n) Tamanho da amostra

**Tabela 2:** Média  $\pm$  erro padrão da média do peso inicial da fêmea (PIF), peso da massa de ovo (PTMO); percentagem de eclosão (PE); índice de produção de ovos (IPO); índice nutricional (IN) e percentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. associados ou não ao amitraz.

Grupos	PIF (mg)	PTMO (mg)	PE (%)	IPO (%)	IN (%)	Percentual de Controle (%)
<b>Controle (CTR)</b>	275.0 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	167.7 $\pm$ 0 a (Md = 0.2) (10)	98.8 $\pm$ 0.6 a (Md = 100) (10)	60.85 $\pm$ 1.22 a (Md = 60.67) (10)	76.4 $\pm$ 2.1 a (Md = 77.48) (10)	
<b>Amitraz</b>	277.1 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (9)	< 0.0 $\pm$ < 0.0 b (Md = 0) (9)	-	< 0.0 $\pm$ < 0.0 b (Md = 0) (9)	< 0.0 $\pm$ < 0.0 b (Md = 0) (9)	100
<b><i>M. pingshaense</i> (conídios)</b>	275.0 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	72.0 $\pm$ 0 ab (Md = 0.1) (10)	99.5 $\pm$ 0.2 a (Md = 100) (10)	25.7 $\pm$ 2.1 ab (Md = 27.2) (10)	55.8 $\pm$ 4.1 ab (Md = 55.9) (10)	57.42
<b><i>M. pingshaense</i> (blastosporos)</b>	278.9 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (9)	150.0 $\pm$ 0 a (Md = 0.1) (9)	96.3 $\pm$ 1.3 ab (Md = 98) (9)	57.7 $\pm$ 1.2 a (Md = 59.2) (9)	69.4 $\pm$ 1.6 a (Md = 69.4) (9)	11.89
<b><i>M. pingshaense</i> (Microescleródios)</b>	276.1 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	142.1 $\pm$ 0 a (Md = 0.1) (10)	96.2 $\pm$ 1.5 ab (Md = 98) (10)	51.3 $\pm$ 2.7 a (Md = 53.4) (10)	62.5 $\pm$ 2.1 a (Md = 63.4) (10)	24.92
<b><i>M. robertsii</i> (conídios)</b>	274.9 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	155.9 $\pm$ 0 a (Md = 0.1) (10)	91.9 $\pm$ 3.1 b (Md = 95) (10)	56.9 $\pm$ 1.1 a (Md = 58.4) (10)	68.8 $\pm$ 0.7 a (Md = 69.3) (10)	18.60
<b><i>M. robertsii</i> (blastosporos)</b>	276.1 $\pm$ 0 a (Md = 0.3) (10)	144.1 $\pm$ 0 a (Md = 0.1) (10)	96.4 $\pm$ 1.5 ab (Md = 99.5) (10)	51.8 $\pm$ 3.5 a (Md = 55.6) (10)	67.5 $\pm$ 3.3 a (Md = 72.1) (10)	16.71

<b><i>M. robertsii</i> (Microescleródios)</b>	275.0 ± 0 a (Md = 0.3) (10)	162.4 ± 0 a (Md = 0.2) (10)	89.9 ± 3.6 b (Md = 95) (10)	59 ± 1.3 a (Md = 59.8) (10)	72.9 ± 1.8 a (Md = 75) (10)	17.86
<b><i>M. pingshaense</i> (conídios) + Amitraz</b>	286.9 ± 0 a (Md = 0.3) (8)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	-	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	100
<b><i>M. pingshaense</i> (blastosporos) + Amitraz</b>	284.0 ± 0 a (Md = 0.3) (8)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	-	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	100
<b><i>M. pingshaense</i> (Microescleródios) + Amitraz</b>	268.1 ± 0 a (Md = 0.3) (6)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (6)	-	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (6)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (6)	100
<b><i>M. robertsii</i> (conídios) + Amitraz</b>	279.6 ± 0 a (Md = 0.3) (9)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (9)	-	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (9)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (9)	100
<b><i>M. robertsii</i> (blastosporos) + Amitraz</b>	284.9 ± 0 a (Md = 0.3) (8)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	-	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (8)	100
<b><i>M. robertsii</i> (Microescleródios) + Amitraz</b>	281.6 ± 0 a (Md = 0.3) (7)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (7)	-	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (7)	< 0.0 ± < 0.0 b (Md = 0) (7)	100

Os valores médios seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ). Md = mediana. Quando tiver (-) os dados não tinham n suficiente para o cálculo estatístico. (n) Tamanho da amostra.

## 5 DISCUSSÃO

Alguns estudos relataram que a associação de fungos entomopatogênicos com acaricidas tem potencial aplicabilidade para o controle de *R. microplus*, possibilitando o uso de bases químicas, antes menos eficazes contra algumas populações de carrapatos levando à redução da pressão seletiva para outras bases, fragilizando a ocorrência de resistência a acaricidas químicos (BAHIENSE; BITTENCOURT, 2004; SOARES; MONTEIRO, 2011; WEBSTER et al., 2015; PAULO et al., 2016). Entretanto, apesar de já se ter uma noção sobre a compatibilidade de fungos entomopatogênicos e acaricidas sintéticos, a literatura aborda apenas sobre o uso de um único propágulo, os conídios. Dessa maneira, o presente estudo buscou evidenciar como blastosporos e microescleródios de *Metarhizium* spp., produzidos artificialmente em meio de cultura líquido poderiam se apresentar frente a associação com carrapaticidas.

Nossos resultados mostraram que, em geral, a culturabilidade de conídios e microescleródios de *Metarhizium* spp., foi menos impactada que os blastosporos quando associados aos acaricidas. Os conídios são produzidos pela conidiogênese fialídica, enquanto os microescleródios são um agrupamento de hifas melanizadas altamente resistentes ao estresse oxidativo e capazes de produzir compostos microbianos, e os blastosporos são estruturas vegetativas produzidas por brotamento de hifas que lhes dá uma membrana mais fraca (HALLSWORTH; MAGAN, 1996; SONG et al., 2016; KIM et al., 2013; JACKSON; PAYNE, 2016; BERNARDO et al., 2020; CORVAL et al., 2020). Sugere-se que as diferenças na estrutura física dos propágulos podem impactar na sua suscetibilidade aos acaricidas sintéticos, ou seja, pelo fato dos blastosporos possuírem uma membrana mais delgada/fraca, possivelmente isso viabilize uma maior ação dos constituintes químicos do acaricida sintético sobre esse propágulo.

No presente estudo, os blastosporos de *M. pingshaense* (LCM S09) foram em geral mais tolerantes do que *M. robertsii* (ARSEF 2575) (Figura 8). Além disso, os conídios e microescleródios de *M. pingshaense* (LCM S09) apresentaram maior culturabilidade relativa 24 horas após a incubação com alguns acaricidas sintéticos em comparação com *M. robertsii* (ARSEF 2575) (Figura 8). A associação de fungos entomopatogênicos e acaricidas sintéticos, dependendo da base química e do solvente, pode impactar negativamente na germinação fúngica e no crescimento micelial (MOHAMED et al., 1987; BATISTA FILHO et al., 2001). Além disso, diferentes isolados de *Metarhizium* spp. exibiram diferentes padrões de germinação e crescimento quando acaricidas sintéticos foram incluídos nos meios artificiais (SCHUMACHER; POEHLING, 2012). Nossos resultados revelaram que a associação com acaricidas sintéticos (considerando seus princípios ativos e solventes) pode representar uma condição estressante para fungos entomopatogênicos, como se pode observar com relação aos blastosporos de ambos os isolados e para conídios e microescleródios de *M. robertsii* quando incubados por longos períodos. Além disso, o tempo de associação pode influenciar na culturabilidade apresentada pelos isolados, corroborando com o que é apresentado por Webster et al. (2015).

Uma possível justificativa para o melhor desempenho de *M. pingshaense* em relação a *M. robertsii* nessas situações poderia ser uma melhor expressão de proteínas responsáveis pela proteção/detoxificação de fungos. Estas se apresentam como enzimas oxidativas, sendo as principais as catalases, peroxidases e superóxido dismutases (SOD), as enzimas atuam reduzindo os níveis de peróxido de hidrogênio intracelular e catalisando

a dismutação dos radicais superóxidos, respectivamente. Um aumento na atividade de uma ou mais dessas enzimas pode beneficiar o desenvolvimento do fungo em situações de estresse, ou seja, quando associadas ao acaricida, a ação dessas enzimas poderia proteger o propágulo, favorecendo seu crescimento, germinação e, conseqüentemente, sua virulência (SANTI et al., 2010; BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Ou seja, a distinta culturabilidade superestimada no presente estudo sugere que os isolados testados têm diferentes capacidades para superar situações estressantes. Isso é importante para enquadrar as estratégias para o manejo integrado de pragas. Conseqüentemente, os blastosporos podem ser um propágulo muito eficaz para uso no controle biológico de artrópodes, mas se acaricidas sintéticos forem usados concomitantemente, não é recomendado que esses produtos sejam preparados/incubados combinados.

Não houve inconveniente ao incorporar os propágulos fúngicos com os acaricidas sintéticos, ou seja, os solventes dos acaricidas e seus ingredientes ativos puderam ser homogeneamente misturados com as suspensões dos propágulos fúngicos. Em ambos os bioensaios, *M. pingshaense* (LCM S09) rendeu um percentual de controle de carrapato mais alto do que *M. robertsii* (ARSEF 2575). Alves et al. (1998) sugere que produtos biológicos quando compatíveis com produtos sintéticos poderiam provocar um melhor controle sobre artrópodes que fossem menos susceptíveis ou resistentes a determinados produtos sintéticos. A partir disso, pode-se observar que o percentual de controle de carrapatos era relativamente maior quando se associava os diferentes propágulos de *M. pingshaense* ou *M. robertsii* à deltametrina. E, que os conídios de *M. pingshaense* + deltametrina tiveram um percentual de controle de 81.15% e apresentaram melhores resultados, quando comparados aos conídios de *M. pingshaense* com 41.88% ou a deltametrina com 7.23%. Esses resultados, corroboram com os apresentados por Bahiense et al. (2006), que evidenciaram que conídios de *M. anisopliae* quando associados a deltametrina provocavam maiores taxas de mortalidade do que o isolado fúngico ou o acaricida utilizado de forma isolada. Assim como Webster et al. (2015), que evidenciaram que acaricidas utilizados isoladamente tinham um percentual de controle de 71.1%, *M. anisopliae* utilizado isoladamente apresentava um percentual de controle de 56.3% e a associação desses dois produtos tinham um percentual de controle de 97.9% sobre carrapatos. A população de carrapatos usada no presente estudo foi menos suscetível à deltametrina, mas não ao amitraz. Dessa forma, não foi possível avaliar, com essa população de carrapatos, se há um efeito benéfico quando o amitraz foi combinado com fungos entomopatogênicos para o controle de *R. microplus*.

Além disso, em termos de compatibilidade com acaricidas, conídios e microescleródios são os melhores propágulos para os dois isolados estudados. Porém, considerando os bioensaios *in vitro* para a população de carrapatos utilizada, *M. pingshaense* conídio associado à deltametrina foi o melhor propágulo para o controle de *R. microplus*. É importante enfatizar que estudos de campo seriam pertinentes para avaliar como a associação de acaricidas com propágulos se apresentaria, por exemplo, no controle de gerações de carrapatos em canetas, sabendo que os microescleródios são uma forma de resistência e amplamente estudada pelos seus usos em bioprodutos para aplicação no meio ambiente, podem ser relevantes no controle de larvas/adultos de futuras gerações de carrapatos. Além disso, é importante enfatizar que embora os resultados do blastosporos não tenham sido tão satisfatórios, a avaliação da aplicação separada desse propágulo e do acaricida pode nos fornecer informações pertinentes sobre a melhor forma de estabelecer um protocolo e até mesmo indicar se ocorreria um controle eficiente sobre o carrapato ou a larva. Ainda são necessários estudos que detalhem as condições adequadas de armazenamento, prazo de validade e efeitos da interação com o meio

ambiente, caso um produto seja estabelecido. Além disso, o estudo buscou avaliar como diferentes isolados de *Metarhizium* spp. seriam eficazes contra *R. microplus* quando associados a bases químicas, direcionando se, quando bem elaborados, o uso de acaricidas associados seria capaz de gerar menor impacto ao meio ambiente, promover a redução da ocorrência de resistência a agentes químicos e explicar um potencial processo de transição de protocolos terapêuticos nas propriedades pecuárias, de forma a promover maior sustentabilidade e redução dos custos de produção.

## 6 CONCLUSÃO

- Conídios e microescleródios de *Metarhizium* spp. foram mais tolerantes que blastosporos quando associados a acaricidas sintéticos;
- O tempo de associação dos propágulos fúngicos de *Metarhizium* spp. a acaricidas sintéticos pode influenciar quanto a culturabilidade fúngica.
- O uso de fungos entomopatogênicos associados à deltametrina em uma população de carrapatos não suscetíveis a esse acaricida sintético causou maior controle do carrapato do que o fungo ou o acaricida sintético exclusivamente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.
- ALKHAIBARI, A. M.; CAROLINO, A. T.; YAVASOGLU, S. I.; MAFFEIS, T.; MATTOSO, T. C.; BULL, J. C.; SAMUELS, R. I.; BUTT, T. M.. *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: attack on several fronts accelerates mortality. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 7, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005715>
- ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIENSE, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; MORAES, A. P. R.; TERRA, A. L. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 317-322, 2010.
- AZEVEDO, J. L.. Microorganismos endofíticos. IN: MELO, I.S; AZEVEDO, J.L edit Ecologia microbiana. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap4, p.117-137, 1998.
- BAHIENSE, T. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.. Laboratory Evaluation of the Compatibility and the Synergism between the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* and Deltamethrin to Resistant Strains of *Boophilus microplus*. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 1026, n. 1, p. 319-322, 2004.
- BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Vet. Parasitol*, v. 141, p. 319–324, 2006.
- BARCI, L. A. G.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, J. E. M. de; CAMPOS, A. H. de C.; PRADO, A. P. do. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. *Rev. Bra. de Par. Vet.*, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 63-68, 2009.
- BARROS-BATESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. Carrapatos de importância medico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação das espécies. 1 ed., São Paulo, SP: Butantã, 2006, 223p.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C.. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotrop. Entomol.*, 30: 437–447, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300017>
- BENNETT, G. F.. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, v. 16, 1974.
- BERNARDO, C. C.; BARRETO, L.P.; SILVA, C.R.S.; LUZ, C.; ARRUDA, W.; FERNANDES, E.K.K. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks And Tick-borne Diseases*, v. 9, p.1334-1342, 2018.
- BEYS-DA-SILVA, W. O.; ROSA, R. L.; BERGER, M.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; SANTI, L.. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* para controlar o

- carrapato *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 208, p. 107812, 2020.
- BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; PASSOS, D. O.; GUIMARÃES, J. A. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 2282-2296, 2014.
- BIDOCHKA, M.J.; SMALL, C.L.; SPIRONELLO, M. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1361-1368, 2005.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A.. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. 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.
- 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.
- BRAGA, G.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochem Photobiol.** 2001; 74:734–9. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740734BSUAUR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740734BSUAUR2.0.CO2)
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Dados de rebanho bovino e bubalino no Brasil – 2017. Brasília: **MAPA**, 2018.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. Mar-Abr 2019. Brasília: **IBGE**, 2019.
- BUSCH, J. D.; STONE, N. E.; NOTTINGHAM, R.; ARAYA-ANCHETTA, A.; LEWIS, J.; HOCHHALTER, C.; GILES, J. R.; GRUENDIKE, J.; FREEMAN, J.; BUCKMEIER, G.; BODINE, D.; DUHAIME, R.; MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; OLAFSON, P. U.; SCOLES, G. A.; WAGNER, D. M.. Widespread movement of invasive cattle fever ticks (*Rhipicephalus microplus*) in southern Texas leads to shared local infestations on cattle and deer. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 188, 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.; GÔLO, 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** 205, p. 271–276, 2014.
- CAMARGO, M. G.; NOGUEIRA, M.R.S.; MARCIANO, A.F.; PERINOTTO, W.M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SCOTT, F.B.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42, 2016.

CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Chapter 3. In: CAMPOS PEREIRA, M., LABRUNA, M. B., SZABÓ, M. P. J., KLAFKE, G. M. (Eds.), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência. Medicina Veterinária*, São Paulo, 2008. 169p.

CARDOSO, E.R.; DE FREITAS, S.; NUNES, H.T.; PESSOA, I. G. A.. Seletividade de fungos entomopatogênicos para larvas de primeiro ínstar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) utilizando torre de Potter. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.167, 2003.

COLEY-SMITH, J. R.; COOKE, R. C. Survival and germination of fungal sclerotia. In: Horsfall JG, Baker KF, Zentmyer GA, editors. Annual review of phytopathology. **Annual Reviews Inc.**, Palo Alto, CA; 1971. p. 65-92

CORVAL, A. R. C.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; SILVA, C. S. R.; BITENCOURT, R. O. B.; FERNANDES É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W.; GOLO, P. S.. UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 15-26, 2020. DOI: 10.1002/jobm.202000515

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

DIAS-FILHO, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Documentos Embrapa. **Embrapa Amazônia**, 2014. 36 p.

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

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; TORRE, F. P. de la; CRUZ-VASQUEZ, C.; GARCIAVAZQUEZ, Z. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. **Experimental & Applied Acarology**, v. 32, n.4, p. 293-299, 2004.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; ALONSO-MORALES, R. A. Effect of entomopathogenic native fungi from paddock soils against *Rhipicephalus microplus* larvae with different toxicological behaviors to acaricides. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 204, 2019.

FFRENCH- CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trend Genet**, v. 20, p. 163-70, 2004.

FIGUEIREDO, E. A. P. de; SOARES, J. P. G. Sistemas orgânicos de produção animal: dimensões técnicas e econômicas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. **A produção animal no mundo em transformação: anais**. Brasília, DF: SBZ, 2012.

FIOROTTI, J. P.; CAMARGO, M. G.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; MARCIANO, A. F.; FREITAS, M. C.; MESQUITA, E. S. ; GÔLO, P. S.;

- SPADACCIMORENA, D. D. ; ANGELO, I. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1847-1856, 2018.
- FISCHHOFF, I. R.; KEESING, F.; OSTFELD, R.S. The tick biocontrol agent *Metarhizium brunneum* (= *M. anisopliae*) (strain F52) does not reduce non-target arthropods, *Plos One*, v. 12, 2017.
- FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S.L.], v. 32, n. 61, p. 1578-1586, 2003.
- FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**. v. 8, p. 49-61, 1993.
- FURLONG, J.; CHAGAS, A.C.S.; NASCIMENTO, C.B. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.4, p. 213-217, 2002.
- GÁLVEZ, A. B.; SEGURA, R. P.; GÓMEZ-VÁZQUEZ, A. Control biológico de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* con hongos entomopatógenos. **Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias**, [S. l.], ano 2017, v. 6, n. 12, p. 1-30, 2017.
- GAUDENCIO, F. N.; KLAFKE, G. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; FERREIRA, T. P.; COELHO, C. N.; FONSECA, A. H.; ANGELO, I. C.; PINHEIRO, J.. Activity of carboxylesterases, glutathione-S-transferase and monooxygenase on *Rhipicephalus microplus* exposed to fluazuron. **Parasitology International**, [S.L.], v. 66, n. 5, p. 584-587, 2017.
- GLORIA, M. A.; FLAUSINO, J. R. N.; GRISI, L.. Resistência do *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) ao amitraz no estado do Rio de Janeiro, com base em testes de imersão de ingurgitadas *Anais do VIII Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, Londrina, Brasil (1993), p. A7.
- GONZALES, J. C. O controle dos carrapatos do boi. 2. Ed. Porto Alegre: **Edição do Autor**, 1995. 79p.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, p. 23-28, 2002.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.
- HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Culture Age, Temperature, and pH Affect the Polyol and Trehalose Contents of Fungal Propagules. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p. 2435-2442, 1996.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, C.; GUZMÁN-FRANCO, A.W. Species Diversity and Population Dynamics of Entomopathogenic Fungal Species in the Genus *Metarhizium*— a Spatio temporal Study. **Microbial Ecology**, v.74, p.194-206, 2017.

IWANICKI, N. S.; PEREIRA, A. A.; BOTELHO, A. B. R. Z.; REZENDE, J. M.; MORAL, R. A.; ZUCCHI, M. I.; DELALIBERA-JÚNIOR, I. Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp. in insects, soil and sugarcane roots. **Scientific Reports**, [S. l.], ano 9, n. 4443, p. 1-12, 2019.

IWANICKI, N. S.; FERREIRA, B. O.; MASCARIN, G. M.; DELALIBERA-JÚNIOR, Í. Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 122, n. 9, p. 883-890, 2018.

JACKSON, M.A.; PAYNE, A. R.. Liquid Culture Production of Fungal Microsclerotia. In: GLARE, T.T. and MORAN-DIEZ, M. E. (eds.) *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, New York, v. 1477, p. 71-83, 2016.

JANER, E. C.; DÍAZ, A.; FONTES, F.; BARAIBAR, F.; SAPORITI, T.; OLHAGARAY, M. E.. Molecular survey of pyrethroid and fipronil resistance in isolates of *Rhipicephalus microplus* in the north of Uruguay. **Ticks And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 101747, 2021.

JONES, G. A.; PERINOTTO, W. M. S.; CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; BITTERCOUNT, V. R. E.. (2021). Selection of *Metarhizium* spp. Brazilian isolates to control *Rhipicephalus microplus* ticks: in vitro virulence tests and conidiogenesis. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, 43, e002020. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm002020>

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.

KIM, J. S.; JE, Y. H.; SKINNER, M.; PARKER, B. L.. An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:Aleyrodidae). **Pest Manag Sci**, v. 69, p. 576-581, 2013.

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

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae Tick Species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Bioone Research evolved**, v. 41, n. 4, p. 705–711, 2004.

KLAFKE G.; WEBSTER A.; AGNOL B. D.; PRADEL E.; SILVA J.; de LA CANAL L. H.; BECKER M.; OSÓRIO M. F.; MANSSON M.; BARRETO R.; SCHEFFER R.; SOUZA U. A.; CORASSINI V. B.; SANTOS J.; RECK J.; MARTINS J. R.. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande

do Sul state, Southern Brazil. **Ticks And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 73-80, 2017.

KLAFKE, G. M. *Resistência de R. (B) microplus* contra os carrapaticidas. In: Pereira, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. J. P.; KLAFKE, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência**. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-106, 2009.

KOLLER, W. W.; HIGA, L.; ZIMMERMANN, N. P.; OSHIRO, L. M.; ANDREOTTI, R. Resistência dos carrapatos aos acaricidas. In: ANDREOTTI R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p.

KUMAR, K.G.A., SHARMA, A.K., KUMAR, S., RAY, D.D., RAWAT, A.K.S., SRIVASTAVA, S., GHOSH, S.. Comparative in vitro anti-tick efficacy of commercially available products and newly developed phyto-formulations against field collected and resistant tick lines of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **J. Parasit. Dis**, v. 40, p. 1590–1596, 2016.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annu. Rev. Entomol**, v. 52, p. 231-253, 2007.

LIRA, A. C.; MASCARIN, G. M.; DELALIBERA-JÚNIOR, Í.. Microsclerotia production of *Metarhizium* spp. for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 124, n. 8, p. 689-699, 2020.

LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; ROCHA, L. F. N.; MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R. A.; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 151, p. 165-168, jan 2018.

LÓPEZ, E.; LÓPEZ, G.; ORDUZ, S.. Control de la garrapata *Boophilus microplus* com *Metarhizium anisopliae*, estudos de laboratório y campo. **Revista Colombiana de Entomologia**. v. 35, p. 42-46, 2009.

LOURENÇO, A. V; SCHNEIDER, S.; GAZOLLA, M.. A agricultura orgânica no brasil: um perfil a partir do censo agropecuário 2006. **Extensão Rural**, Santa Maria, 2017.

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

MANNINO, M. C.; HUARTE-BONNET, C.; DAVYT-COLO, B.; PEDRINI, N. Is the Insect Cuticle the only Entry Gate for Fungal Infection? Insights into Alternative Modes of Action of Entomopathogenic Fungi. **Journal of Fungi**. v.5, p.33, 2019.

MARANHÃO, E.A.A.; MARANHÃO, E.H.A. Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae), **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 5-6, p. 209-242, 2009.

MARCIANO, A. F.; MASCARIN, G. M.; FRANCO, R. F. F.; GOLO, P. S.; JARONSKI, S. T.; FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.. Innovative granular

formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. *Sci Rep* 11, 4972 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84142-8>

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DELALIBERA-JÚNIOR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of invertebrate pathology**, v. 127, p. 11–20, 2015.

MASCARIN, G.M.; LOPES, R.B.; DELALIBERA, I.J.; FERNANDES, E.K.K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal Of Invertebrate Pathology**, 2018.

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

MESQUITA, E.; MARCIANO A. F.; CORVAL A. R. C.; FIOROTTI, J.; CORRÊA, T. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; GOLO, P. S.. Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semifield conditions. **Biocontrol**, [S.L.], v. 65, n. 3, p. 353-362, 2020. DOI: 10.1007/s10526-020-10006-1

MILNER, R. J.; SAMSON, P.; MORTON R. Persistence of Conidia of *Metarhizium anisopliae* in Sugarcane Fields: Effect of isolate and formulation on persistence over 3.5 years, **Biocontrol Science and Technology**. v.13, p.507-516, 2003.

MOHAMED, A. K.; PRATT, J. P.; NELSON, F. R. 1987. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathologia* 99, 99–105. DOI: 10.1007 / BF00436913

MUÑIZ-PAREDES, F.; MIRANDA-HERNÁNDEZ, F.; LOERA, O.. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 33-57, 2017.

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

NASCIMENTO, A. F.; NATEL, A. S.; V., L. M.; MELO, C. L.; LACERDA, Y. G.; LIMA, M. K.; ESTEVES, G. F.. Use of anti-tick drugs in dairy farms in the microregion of Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bra. de Par. Vet.**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 1-11, 2021.

NORVAL, R. A. I.; PERRY, B. D.; YOUNG, A. S. The epidemiology of theileriosis in Africa. **Academic Press London**, p. 301-342, 1992.

OLIVEIRA, M. T; MONTEIRO, A. C.; JÚNIOR-SCALA, N. L.; BARBOSA, J. C.; MOCHI, D. A. Sensibilidade de isolados de fungos entomopatogênicos às radiações solar, ultravioleta e à temperatura. **Arquivos do Instituto de Biologia**, [S. l.], v. 83, p. 1-7, 2016.

ONOFRE, S. B.; MINIUIK, C. M.; de BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1478–1480, 2001.

- OTTATI-DE-LIMA, E. L.; B. FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; GASSEN, M. H.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, A. M. B.; ZAPPELLINI, L. O.. Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 342-350, 2014.
- PARRA, J. R.; BOTELHO, P. S. M.; BENTO, J. M; FERREIRA, B. S. Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Editora Manole, São Paulo, 2002. 609p.
- PAULO J. F.; FERREIRA J. R. T.; MARCIANO A. F.; FREITAS, M. C.; COUTINHO-RODRIGUES C. J. B.; CAMARGO M. G.; ANGELO I. C.; BITTENCOURT V. R. E. P.; GÔLO P. S.. Association between *Metarhizium anisopliae* sensu lato and cypermethrin to control *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.38, P.66-74, 2016.
- PERINOTTO, W. M. S; GOLO, P. S; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B; SÁ, F. A; SANTI, L; SILVA, W. O. B; JUNGES, A; VAINSTEIN, M. H; SCHRANK, A; SALLES, C. M. C; BITTENCOURT, V. R. E. P. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], ano 2014, v. 203, p. 189-196, 16 jun. 2014.
- POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, SALLY-ANN. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v. 160, p. 151–157, 2005.
- QUINELATO, S.; GOLO, P. S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556–565, 2012.
- REHNER, S.A.; KEPLER, R. M.. Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 148, p.60-66,2017.
- ROBERTS, D. W.; CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 10, p. 19–76, 1977.
- ROBERTS, D.W.; ST. LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. **Advances In Applied Microbiology**. p.1-70, 2004.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitol Res**, v. 117, p. 3–29, 2018.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; LI, A. Y.; OJEDA-CHI, M. M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; MILLER, R. J.; LEÓN, A. A. P.. In vitro and in vivo evaluation of cypermethrin, amitraz, and piperonyl butoxide mixtures for the control of resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) in the mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 197, n. 1-2, p. 288-296, out. 2013.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**. v. 129, p. 389-413, 2004

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2009.12.012

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

SHYMA, K. P.; GUPTA, J. P.; SINGH, V.; PATEL, K. K.. In Vitro Detection of Acaricidal Resistance Status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* against Commercial Preparation of Deltamethrin, Flumethrin, and Fipronil from North Gujarat, India. **Journal Of Parasitology Research**, [S.L.], v. 2015, p. 1-7, 2015.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários [online]. São Paulo: SINDAM-MAPA; 2017. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/>

SOARES, F. B.; MONTEIRO, A. C.. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with chemical carrapaticides. Archives of the Biological Institute, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 385-391, set. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v78p3852011>.

SONG, Z.; ZHONG, Q.; YIN, Y.; SHEN L.; LI Y.; WANG, Z.. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate morphology, microsclerotia development, and virulence in *Metarhizium rileyi*. **Scientific Reports**, 2016.

SONG, Z.. Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 102, n. 23, p. 9873-9880, 2018.

THOMAS, M.B.; READ, A.F. Fungal bioinsecticide with a sting. **Nature Biotechnology** v. 25, p. 1367-1368, 2007.

UENO, T. H.; MENDES, E. B.; POMARO, S. H. K.; LIMA C. K. P.; GUILLOUX, A. G. A; MENDES, M. C.. Sensitivity profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks of dairy cattle to acaricides in small farms in the northwestern São Paulo State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 177-183, 2012.

VALSONI, L. M.; FREITAS, M. G.; BORGES, D. G. L.; BORGES, F. A.. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluazuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2021. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201091>

VEMMER, M.; PATEL, A.V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agentes. **Biological Control** v.67, p.380-389, 2013.

VERÍSSIMO, C. J.. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, n. 1, p. 14 – 23 2013.

- VERÍSSIMO, C. J.; VASQUES, F.; DUARTE, K. M. R.; PAULINO, V. T.; AMBRÓSIO, L. A.. Management and control of parasites on dairy farms in northwestern region of São Paulo state. **Rev. Bra. de Par. Vet.**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 306-316, 2016.
- VILLAR D.; GUTIÉRREZ J.; PIEDRAHITA D.; RODRÍGUEZ-DURÁN A.; CORTÉS-VECINO J. A.; GÓNGORA-ORJUELA A.; MARTÍNEZ N.; CHAPARRO-GUTIÉRREZ J.J. Resistencia in vitro a acaricidas tópicos de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de cuatro departamentos de Colombia. **Rev. CES Med. Zootec.** 2016; Vol 11 (3): 58-70.
- VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; BEZERRA, R. A.; KLAFKE, G. M.; RIET-CORREA, F.. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 101413, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101413>
- WALSTAD, J. D.; ANDERSON, R. F.; STAMBAUGH, W. J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 16, p. 221–226, 1970.
- WANG, Y. B.; YANG, Z. H.; YU, J. J.; ZHANG, Y. A.; XUE, J. J.; LI, Z.; LI, J. J.; WANG, C. Y.; WANG, Z.; HOU, J. G.. Comparison between conidia and blastospores of *Esteya vermicola*, an endoparasitic fungus of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 29, n. 12, p. 2429-2436, 2013.
- WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J. L. M.; MACKENSTEDT, U.. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 768-771, 2016.
- WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE G. M.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; MARTINS, J. R.; SCHRANK, A.. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Veterinary Parasitology*, [s.l.], v. 207, n. 3-4, p. 302-308, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.021>
- WEBSTER, A.; PRADEL, E.; SOUZA, U. A.; MARTINS, J. R.; RECK, J.; SCHRANK, A.; KLAFKE, G. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated?. **Tick and Tick-borne Diseases** , [S. l.], ano 2017, v. 8, ed. 2, p. 270-274, fev 2017.
- WHARTON, R. H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R.; WHARTON, R. H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. New York, **Plenum Publishing**, 1974, p. 36-52.
- 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.



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no  
Uso de Animais  
Instituto de Veterinária



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Manutenção de colônia de *Rhipicephalus microplus* visando a avaliação do efeito de fungos entomopatogênicos no seu controle", protocolada sob o CEUA nº 9714220419 (ID 001419), sob a responsabilidade de **Vânia R. E. Pinheiro Bittencourt** e equipe; *Patrícia Silva Gôlo; Isabele da Costa Ângelo; Mariana Guedes Camargo; Amanda Costa da Rocha Corval; Laura Nóbrega Meirelles; Allan Felipe Marciano; Emily Mesquita da Silva; Fernanda Sousa Faria; Ricardo de Oliveira Barbosa; Jéssica Fiorotti de Paulo; Julie Rhanna Tavares Ferreira; Thaís Almeida Corrêa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 30/08/2019.

We certify that the proposal "Maintenance of *Rhipicephalus microplus* colony aiming to evaluate the entomopathogenic effect of fungi", utilizing 3 Bovines (3 males), protocol number CEUA 9714220419 (ID 001419), under the responsibility of **Vânia R. E. Pinheiro Bittencourt** and team; *Patrícia Silva Gôlo; Isabele da Costa Ângelo; Mariana Guedes Camargo; Amanda Costa da Rocha Corval; Laura Nóbrega Meirelles; Allan Felipe Marciano; Emily Mesquita da Silva; Fernanda Sousa Faria; Ricardo de Oliveira Barbosa; Jéssica Fiorotti de Paulo; Julie Rhanna Tavares Ferreira; Thaís Almeida Corrêa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 08/30/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2019** a **09/2024**      Área: **Parasitologia Animal**

Origem: **Setor de Bovinocultura da UFRRJ**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 48 meses**

N: **3**

Linhagem: **Mestiços das raças Holandesa e Gir**

Peso: **100 a 400 kg**

Local do experimento: Os animais serão mantidos em baias na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da UFRRJ.

Seropédica, 01 de outubro de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



**Gado de Leite**

**Resultado de Teste de Sensibilidade de Carrapatos a Carrapaticidas**

Teste nº: 102

Propriedade: ADRIANI CARNEIRO LOPES

Município: SEROPEDICA, RJ

Data: 02/09/2021

Produto	Eficácia do Produto (%)
CICLORFÓS	100,0
COLOSSO FC 30	100,0
COLOSSO PULVERIZAÇÃO	100,0
CYPERCLOR PLUS PULVERIZAÇÃO	100,0
FLYTION EC 50	100,0
MÁXIMO PULVERIZAÇÃO	100,0
SUPOKILL	100,0
ECTOBAT 80	98,5
TRIATOX PULVERIZAÇÃO	82,7

Estes resultados são válidos somente para a propriedade na qual foram coletados os carrapatos

**Observações:**

- 1) Escolha um produto com eficácia superior a 90% e o utilize por, no máximo, doze meses. Repita anualmente o teste.
- 2) Leia atentamente a bula antes de utilizar o produto escolhido. Siga rigorosamente as instruções referentes à dosagem e ao preparo da solução carrapaticida. Administre o banho da forma mais calma, correta e caprichada possível. Respeite o período de carência informado pelo fabricante. Durante este período, o leite está impróprio para consumo humano.
- 3) Cuidado redobrado com animais no terço final de gestação. Nestes casos, verifique a possibilidade de substituir a aplicação do carrapaticida por retirada manual e eliminação dos carrapatos (em água fervente ou no fogo).
- 4) Leia atentamente as instruções técnicas que acompanham este resultado para efetuar o tratamento de maneira correta e em época adequada.
- 5) Períodos de carência de alguns carrapaticidas para utilização em vacas em lactação: Ciclorfós: 3,5 dias; Colosso FC 30: 72h; Colosso Pulverização: 72h; Cyperclor Plus Pulverização: 72h; Ectobat 80: 48h; Flytion EC 50: 72h; Máximo Pulverização: 24h; Supokill: 12h; Triatox Pulverização: 3 dias.

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Leite**

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG  
Telefone: (32)3311-7455 – Telefone geral: (32)3311-7405 – Fax: (32)3311-7502  
cnp.gl.carrapato@embrapa.br