

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

**DISSERTAÇÃO**

**Desenvolvimento de formulação oleosa a base de**  
***Cordyceps javanica* para controle do carrapato**  
***Rhipicephalus microplus* sob diferentes**  
**condições de estudo.**

**JOANA DA ROCHA MATOS**

**2025**



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

**Desenvolvimento de formulação oleosa a base de *Cordyceps javanica* para controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* em diferentes condições de estudo.**

**JOANA DA ROCHA MATOS**

*Sob a orientação da Dr<sup>a</sup>.*

**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

*e Co-orientação da Professora Dr<sup>a</sup>.*

**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, RJ

Fevereiro 2025

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

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

M425d      Matos, Joana da Rocha, 1999-  
Desenvolvimento de formulação oleosa a base de  
Cordyceps javanica para controle do carrapato  
Rhipicephalus microplus sob diferentes condições de  
estudo. / Joana da Rocha Matos. - Seropédica, 2025.  
67 f.: il.

Orientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt .  
Coorientadora: Patrícia Silva Gôlo.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias , 2025.

1. fungo entomopatogênico. 2. formulação . 3.  
controle biológico. 4. carrapato do boi. I.  
Bittencourt , Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959-,  
orient. II. Gôlo, Patrícia Silva, 1987-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias .  
IV. Título.



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



**ATA Nº 407 / 2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)**

**Nº do Protocolo: 23083.008344/2025-56**

**Seropédica-RJ, 20 de fevereiro de 2025.**

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

**JOANA DA ROCHA MATOS**

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

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/02/2025**

*(Assinado digitalmente em 20/02/2025 16:52)*

**ISABELE DA COSTA ANGELO**  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matricula: ###60297

*(Assinado digitalmente em 20/02/2025 16:51)*

**VANIA RITA ELIAS PINHEIRO  
BITTENCOURT**  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: ###7982

*(Assinado digitalmente em 14/05/2025 08:18)*

**ALLAN FELIPE MARCIANO**  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.198-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsf> informando seu número: **407**, ano:  
**2025**, tipo: **ATA**, data de emissão: **20/02/2025** e o código de verificação: **2d65be4222**

**Dedico este trabalho a Deus,  
aos meus pais e ao meu companheiro de vida Maicon.**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha eterna gratidão a Deus, por me permitir realizar esse sonho, por ser meu alicerce em cada passo desta jornada e por Sua fidelidade inabalável. Tenho plena certeza de que, sem Sua mão me sustentando, eu não teria alcançado este momento. Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de inúmeras pessoas que, ao longo desta caminhada, estiveram ao meu lado de diversas formas. À minha família, minha base, que sempre apoiou minhas iniciativas. À minha avó Angela, pelo amor incondicional, pelas palavras de conforto diárias e por suas constantes orações. Aos meus pais, Elisângela e Daniel, por ter proporcionado tudo o que precisei e por me ensinar valores como perseverança e honestidade, qualidades que tenho orgulho de dizer ser herança de vocês. Ao meu irmão Danilo, pois me alegra em momentos que não pode imaginar e por acreditar e apoiar minhas ideias. Aos meus tios (padrinhos), Elison e Amanda, por me encorajar, acreditar e ser bons ouvintes das minhas histórias diárias, assim como meus primos Thiago e Guilherme. Ao meu eterno amor, Maicon, que acreditou em cada sonho, mesmo os mais difíceis de alcançar. Obrigada por cada palavra de carinho, por cada gesto de amor, por cada dia de consolo, pelos inúmeros momentos de aconchego e por ser meu porto seguro nos dias mais desafiadores. Te amo, bê. Não poderia deixar de falar dos nossos filhos do coração: Raika e Simba (*in memoriam*), Loki, Tita, Amora e Dora, não tenho palavras para expressar o amor que sinto e por todo carinho, é um prazer partilhar a vida com cachorros tão amáveis. Aos meus queridos amigos e irmãos do LCM, que transformaram momentos caóticos de experimentos e escrita em dias mais leves e felizes. Fui acolhida por uma verdadeira família que me incentiva diariamente e torna as tardes mais doces com um bom café. Agradeço especialmente a Bório sereia gótica; Adriani, com quem compartilho gargalhadas em sintonia; Emily, que faz jus ao seu nome de preciosidade; Laura, uma mãezinha que equilibra zoeira e ternura; Thaís, uma piadista com um sorriso contagiante; Américo, pela paciência e por sempre me ensinar, mesmo quando eu falo sem parar; Vinicius, com seu jeito peculiar de alegrar os dias de experimento, Talita e Tamiris que são as minhas companhias nos dias frustrantes de retorno para casa. A todos vocês, minha eterna admiração e carinho. À Mariana, minha inspiração, que acreditou no meu potencial e me apresentou a uma família. Obrigada por estar presente, mesmo à distância, nos dias em que pensei que não conseguiria. Às minhas orientadoras, Vânia Bittencourt e Patrícia Gôlo, minhas mães científicas, por todo cuidado, incentivo, pelos puxões de orelha necessários e por acreditarem no meu potencial. Ser

orientada por vocês é uma honra. Sinto muito orgulho de termos trilhado e concluído esta jornada juntas. Aos funcionários da estação, que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho, especialmente ao Zeca, por sua inestimável ajuda em minhas demandas e por sempre zelar pela minha segurança nos fins de semana.

Por fim, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro, essencial para a concretização desta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## **BIOGRAFIA**

Joana da Rocha Matos, filha de Elisangela da Rocha Pereira e Daniel Pinto da Rocha Júnior, nasceu em 06 de janeiro de 1999 no município de Belford Roxo, Rio de Janeiro. Estudou de 2011 a 2016 no Colégio Estadual Jardim Alvorada, localizado no município de Nova Iguaçu, onde concluiu o ensino médio.

Em fevereiro de 2018 iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade do Grande Rio, concluindo o grau de licenciatura em dezembro de 2020.

Em março de 2021 iniciou o curso de especialização em Necropsia Forense com habilitação em entomologia no Instituto For SCI, concluindo o curso em dezembro de 2021.

Em março de 2022 iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Celso Lisboa, concluindo o grau de bacharelado em dezembro de 2022. No mesmo ano, em junho, ingressou no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Mariana Guedes Camargo.

Em dezembro de 2022 fundou um projeto social intitulado Vivência com Inseto, que possui como objetivo principal a divulgação científica de estudos sobre entomologia. Com parcerias com Secretarias de Meio Ambiente e Clima e da Guarda Ambiental do estado do Rio de Janeiro e do município de Nova Iguaçu. O projeto social alcançou 10.000 alunos da rede pública e privada de ensino da baixada fluminense do Rio de Janeiro até o presente momento. Durante a vida acadêmica participou de cursos de aperfeiçoamento, congressos e simpósios, tendo publicado em anais de eventos científicos.

Em 2023 foi aprovada no processo de seleção do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na UFRRJ.

Em 2024 foi aprovada no processo de seleção de Pós-Graduação lato sensu da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul para o curso de Tutoria a Distância e no processo de seleção do Instituto Federal de Minas Gerais no curso de Educação Inclusiva.



## RESUMO

MATOS, Joana da Rocha. **Desenvolvimento de formulação oleosa a base de *Cordyceps javanica* para controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* em condições de semi-campo**. 2025. p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

*Rhipicephalus microplus*, comumente conhecido como carrapato do boi, é responsável por prejuízos econômicos e de saúde significativos, particularmente na pecuária, afetando a produtividade, aumentando os custos da fazenda e reduzindo o bem-estar animal. Acaricidas químicos, quando usados de forma inadequada, podem selecionar populações de carrapatos resistentes, levando à necessidade de soluções alternativas e integrativas. Os micoacaricidas oferecem uma abordagem promissora no controle biológico de carrapatos. Os fungos entomopatogênicos mais estudados para o controle de carrapatos são *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp., enquanto as espécies do gênero *Cordyceps* são menos exploradas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de uma formulação de óleo de milho à base de *Cordyceps javanica* para controlar as fases não parasitárias do carrapato do boi em condições de laboratório e semi-campo. Para assegurar a compatibilidade no microrganismo com os formulantes, em diferentes concentrações de óleo de milho (1, 3 ou 5%) e óleo de silicone (0,01%) foram testadas antes dos ensaios biológicos. As análises de germinação foram realizadas após 24h e 48h após inoculação em BDA. A germinação de conídios de *C. javanica* com formulações de óleo em água foi superior a 98% após 24 h, as maiores concentrações de óleo não inviabilizaram o crescimento fúngico. Ensaios biológicos foram conduzidos com as formulações de *C. javanica*  $10^7$  conídios/mL e  $10^8$  conídios/mL em larvas e fêmeas de *R. microplus*. Larvas de *R. microplus* tratadas em condições de laboratório com  $10^8$  conídios/mL + 5% de óleo de milho e óleo de silicone apresentaram mortalidade de 95,17% cinco dias após o tratamento. Fêmeas ingurgitadas expostas às mesmas condições apresentaram redução de 72,5% no peso da massa de ovos em comparação ao controle. Resultados semelhantes foram apresentados nas formulações com 3% de óleo de milho. A formulação  $10^8$  conídios/mL + 3% foi selecionada para o teste em condições de semi-campo, sendo realizado três coletas do solo para análise de persistência dos conídios (D-1, D+1, D+30), observando a redução de 89% da recuperação larval em comparação ao grupo controle aquoso. A persistência de conídios de *C. javanica* no solo tratado foi avaliada. Mesmo após 30 dias de tratamento, as amostras de solo dos vasos tratados com *C. javanica* apresentaram colônias fúngicas, evidenciando a persistência do fungo no solo. Nosso estudo apoia a integração de micoacaricidas vegetais oleosos como parte de uma estratégia de manejo integrado de pragas, oferecendo uma solução mais sustentável que reduz a dependência química na pecuária. O uso bem-sucedido de *C. javanica* como um agente de controle biológico pode, portanto, melhorar a saúde animal, promover a segurança alimentar e contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de criação de gado.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, controle biológico, formulação

## ABSTRACT

MATOS, Joana da Rocha. **Development of an oily formulation based on *Cordyceps javanica* to control the *Rhipicephalus microplus* tick in semi-field conditions**. 2025. pg. Dissertation (Master of Science, Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

*Rhipicephalus microplus*, commonly known as the cattle tick, is responsible for significant economic and health losses, particularly in livestock, affecting productivity, increasing farm costs and reducing animal welfare. Chemical acaricides, when used inappropriately, can select resistant tick populations, leading to the need for alternative and integrative solutions. Mycoacaricides offer a promising approach in the biological control of ticks. The most studied entomopathogenic fungi for tick control are *Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp., while species of the genus *Cordyceps* are less explored. The present study aimed to evaluate the effect of a corn oil formulation based on *Cordyceps javanica* to control the non-parasitic stages of the cattle tick under laboratory and semi-field conditions. To ensure compatibility of the microorganism with the formulants, different concentrations of corn oil (1, 3 or 5%) and silicone oil (0.01%) were tested prior to the biological assays. Germination analyses were performed 24h and 48h after inoculation in PDA. Germination of *C. javanica* conidia with oil-in-water formulations was greater than 98% after 24h, and the highest oil concentrations did not prevent fungal growth. Biological assays were conducted with *C. javanica* formulations  $10^7$  conidia/mL and  $10^8$  conidia/mL in larvae and females of *R. microplus*. *R. microplus* larvae treated under laboratory conditions with  $10^8$  conidia/mL + 5% corn oil and silicone oil showed 95.17% mortality five days after treatment. Engorged females exposed to the same conditions showed a 72.5% reduction in egg mass weight compared to the control. Similar results were presented in the formulations with 3% corn oil. The formulation  $10^8$  conidia/mL + 3% was selected for testing under semi-field conditions, with three soil collections being performed for analysis of conidial persistence (D-1, D+1, D+30), observing an 89% reduction in larval recovery compared to the aqueous control group. The persistence of *C. javanica* conidia in the treated soil was evaluated. Even after 30 days of treatment, soil samples from pots treated with *C. javanica* presented fungal colonies, evidencing the persistence of the fungus in the soil. Our study supports the integration of oily plant mycoacaricides as part of an integrated pest management strategy, offering a more sustainable solution that reduces chemical dependence in livestock. The successful use of *C. javanica* as a biological control agent can therefore improve animal health, promote food security and contribute to the sustainability of livestock farming systems.

Keywords: entomopathogenic fungi, biological control, formulation

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Mortalidade média (%) $\pm$ desvio padrão de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com suspensão ou formulações de <i>Cordyceps javanica</i> em diferentes concentrações conidiais e avaliadas em diferentes tempos após o tratamento .....	21
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> imersas em suspensão ou formulações oleosas de <i>Cordyceps javanica</i> a $10^7$ conídios/mL em condições in vitro .....	24
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> imersas em suspensão ou formulações oleosas de <i>Cordyceps javanica</i> a $10^8$ conídios/mL em condições in vitro .....	25

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formulações de *Cordyceps javanica* em 1%, 3% e 5% de óleo de milho e 0,01% de óleo de silicone (A), formulações após remoção do óleo, com o auxílio de Solub'Oil®, e processo de centrifugação (B), avaliação da germinação de conídios do grupo formulado com 3% de óleo de milho, após remoção do óleo e 24 horas de incubação (C). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025. .... 14
- Figura 2:** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* após tratamento fixadas em placa de petri em decúbito dorsal. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025. .... 16
- Figura 3:** Vasos com *Urochloa decumbens* oriundos a partir do plantio de sementes, na área externa da Estação Experimental W.O. Neitz (Seropédica, Brasil). Os vasos foram tratados, sendo os grupos controle aquoso, controle silicone, controle de óleo 3%, controle de óleo 3% + óleo de silicone e fungo formulado, onde ficaram expostos à luz solar, chuva e variações de temperatura. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025. .... 18
- Figura 4:** Larvas de *Rhipicephalus microplus* 5 dias após tratamento formulado por fungos (emulsão de conídios em óleo de milho 1% (A), 3% (B) ou 5% (C) e óleo de silicone (0,01%) em Tween 80® a 1%). Setas vermelhas indicam larvas de *R. microplus* colonizadas por *Cordyceps javanica*. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025. .... 22
- Figura 5:** Efeito do *Cordyceps javanica* formulado na sobrevivência de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas topicamente. (A) Formulação fúngica de óleo de milho a 1%; (B) Formulação fúngica de óleo de milho a 3%; e (C) Formulação fúngica de óleo de milho a 5%. Sobrevivência percentual média e desvio padrão, de acordo com Log-rank ( $P < 0,05$ ). Experimentos representativos de três repetições independentes são mostrados, onde (\*\*) representa uma diferença estatística entre o controle aquoso e o controle de óleo da formulação fúngica de óleo de milho a 3% ( $P = 0,027$ ), (\*\*\*) representa uma diferença estatística entre o controle aquoso e o controle de óleo da formulação fúngica de óleo de milho a 5% ( $P = 0,0026$ ), (\*\*\*\*) representa uma diferença estatística entre o controle aquoso e o fungo formulado com  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL de formulação fúngica de óleo de milho a 1%, 3% e 5% ( $P < 0,0001$ ). .... 27
- Figura 6:** Média e desvio padrão do número de larvas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas de vasos de *Urochloa decumbens* 35 dias após tratamento fúngico. Controle aquoso: vasos tratados com suspensão aquosa de Tween 80® a 1%); Controle silicone: vasos tratados com emulsão de 0,01% de silicone mais 1% de Tween 80®; Controle óleo 3%: vasos tratados com emulsão de óleo de milho e Tween 80® a 1%; Controle óleo 3% e silicone: vasos tratados com emulsão de óleo de milho, 1% de Tween 80® e 0,01% de silicone; Fungo formulado 3%: emulsão de  $10^8$  conídios/mL em óleo de milho 3% e silicone (0,01%) em Tween 80® a 1%. Cada grupo teve dez vasos, que receberam três fêmeas totalmente ingurgitadas de peso

homogêneo. A mesma letra não difere significativamente considerando $P < 0,05$ (One Way ANOVA seguida de teste de Tukey).....	28
<b>Figura 7:</b> Fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (indicada pelo círculo) em vasos cultivados com <i>Urochloa decumbens</i> . (A) Fêmea do grupo controle aquoso; (B) Fêmea do grupo fungo formulado após 5 dias de tratamento; (C) Fêmeas do grupo fungo formulado após 15 dias de tratamento colonizadas por <i>Cordyceps javanica</i> . <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal, 2025. ....	29
<b>Figura 8:</b> Larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> no ápice das folhas de <i>Urochloa decumbens</i> (indicada pelo círculo). (A) grupo controle aquoso; (B) grupo fungo formulado. <b>Fonte:</b> Arquivo pessoal, 2025. ....	29
<b>Figura 9:</b> Temperatura máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em setembro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha vermelha indica a temperatura máxima; linha verde a temperatura média; linha azul temperatura mínima. ....	30
<b>Figura 10:</b> Valores de umidade relativa máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em setembro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha verde indica a umidade máxima e a linha azul umidade mínima. ....	31
<b>Figura 11:</b> Temperatura máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em outubro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha vermelha indica a temperatura máxima; linha verde a temperatura média; linha azul temperatura mínima. ....	32
<b>Figura 12:</b> Valores de umidade relativa máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em outubro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha verde indica a umidade máxima e a linha azul umidade mínima. ....	33
<b>Figura 13:</b> Unidade formadora de colônia (UFC) de <i>Cordyceps javanica</i> reisoladas dos vasos tratados com emulsão fúngica 24 horas e 30 dias após o tratamento. A análise estatística foi realizada com teste t pareado com correção de Welch's. ....	34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	3
2.2 Desafios no controle de carrapatos no rebanho bovino brasileiro .....	5
2.3 Micoacaricidas: uma alternativa eficaz e sustentável no controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	6
2.3.1. <i>Cordyceps javanica</i> no controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	9
2.3.2 Formulações oleosas com fungos entomopatogênicos .....	11
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1 Local de Realização dos Experimentos .....	13
3.2 Obtenção do isolado fúngico de <i>C. javanica</i> e preparo da formulação .....	13
3.3 Obtenção de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	13
3.4 Teste de compatibilidade dos conídios de <i>Cordyceps javanica</i> com óleo de milho e óleo de silico .....	14
3.5 Ensaio biológico <i>in vitro</i> com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	15
3.6 Ensaio biológico <i>in vitro</i> com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	15
3.7 Ensaio biológico com fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições de semi-campo .....	16
3.8 Persistência de <i>Cordyceps javanica</i> no solo tratado .....	18
3.9 Análise estatística .....	19
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Teste de compatibilidade de suspensão de <i>Cordyceps javanica</i> emulsionada com óleo de milho e óleo de silicone .....	20
4.2 Ensaio biológico <i>in vitro</i> com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	20
4.3 Ensaio biológico <i>in vitro</i> com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	22
4.4 Ensaio biológico usando fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições de semi-campo .....	27
4.5 Persistência de <i>Cordyceps javanica</i> em solo tratado .....	34
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>40</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>

# 1 INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus microplus* é um ectoparasito de grande importância na pecuária, especialmente para bovinos, devido aos danos causados à produtividade e ao potencial de transmissão de patógenos (da Silva et al., 2013; Santos et al., 2017; Klafke et al., 2024). Ao infestar o rebanho, esse parasito pode reduzir significativamente o peso e a produção de leite, comprometendo a qualidade da carne (Klafke et al., 2024). Atualmente, o controle de carrapatos no Brasil utiliza acaricidas químicos, entretanto, o uso indevido desse método tem levado à seleção de populações de carrapatos resistentes (Andreotti, 2010; Klafke et al., 2024). A múltipla resistência dos carrapatos a diferentes classes de acaricidas (Reck et al., 2014) é uma questão que impulsiona a busca por alternativas sustentáveis de controle. Fungos entomopatogênicos como *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp. têm sido estudados como alternativas para o controle de carrapatos tanto em condições de laboratório quanto de campo (Camargo et al., 2014; 2016; Beys-da-Silva et al., 2020; Mesquita et al., 2020; Marciano et al., 2021; Meireles et al., 2023). Esses fungos atuam como agentes naturais de controle, infectando e colonizando o hospedeiro, o que leva à morte do parasito e à redução da população de carrapatos. Estudos recentes demonstram a alta eficácia de formulações à base de óleo vegetal contendo esses microrganismos. Alguns autores discutem como esse tipo de óleo pode favorecer a adesão cuticular dos fungos, contribuindo para sua eficiência e persistência em superfícies de carrapatos (Camargo et al., 2012; Mesquita et al., 2020; Marciano et al., 2020; 2021).

O uso do fungo entomopatogênico *Cordyceps* spp. (anteriormente *Isaria*) é pouco explorado para o controle de carrapatos, com a maioria das pesquisas focadas em pragas agrícolas (Lopes et al., 2023). Embora Lee et al., (2022) tenham rastreado a ação de vários isolados de *Cordyceps* contra o carrapato *Haemaphysalis longicornis* e relatado baixa virulência, há evidências de que *Cordyceps militaris* tem potencial para controle de carrapatos devido à produção de compostos bioativos com propriedades antiparasitárias (Wei et al., 2025). Além disso, estudos com fungos entomopatogênicos do gênero *Isaria* demonstraram virulência significativa contra *R. microplus*. Formulações contendo conídios fúngicos mostraram-se eficazes na redução das densidades larvais de carrapatos em condições laboratoriais e de campo (Angelo et al., 2012; Wang et al., 2023). Essas descobertas são corroboradas por Lopes et al., (2023), que investigaram a diversidade de *Cordyceps* spp.

anamórficos em locais agrícolas brasileiros, ressaltando o potencial mais amplo desses fungos no biocontrole.

Vários estudos avaliaram o uso de formulações oleosas combinadas com fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos (Camargo et al., 2016; Marques et al., 2019; Muniz et al., 2020; Nogueira et al., 2020). Essas formulações têm como um dos principais objetivos proteger os conídios contra fatores abióticos (Murillo-Alonso et al., 2023). Além disso, sua associação com adjuvantes oleosos melhora a adesão à superfície do artrópode, aumentando a eficácia no controle (Beys-da-Silva et al., 2020; Nogueira et al., 2020). Kim et al., (2011) formularam conídios de *Cordyceps fumosorosea* com óleo de milho, evidenciando armazenamento de longo prazo e possibilitando seu uso para controle biológico de *Trialeurodes vaporariorum*, popularmente conhecida como mosca-branca.

Além desses adjuvantes, o óleo de silicone também tem sido usado como herbicidas, inseticidas e acaricidas, pois melhora a espalhabilidade dos componentes ativos, impactando também a fisiologia dos artrópodes ao promover asfixia (Cowles et al., 2000; Chen et al., 2022). Barbieri et al., (2023) relataram um teste de campo usando uma formulação acaricida à base de *Metarhizium* com óleo de silicone e óleo mineral como adjuvantes, aplicados sobre os bovinos, para controlar *R. microplus*. O teste de campo demonstrou que as formulações à base de óleo mineral de *Metarhizium* (2,5% de óleo mineral + 0,01% de óleo de silicone) reduziram efetivamente as infestações de carrapatos nos bovinos; uma das formulações atingiu até 66% de eficácia no dia 21. Apesar da eficácia do óleo mineral em formulações fúngicas, os óleos vegetais podem oferecer vantagens sobre os óleos minerais devido à sua natureza renovável e biodegradável, o que pode reduzir o impacto ambiental de longo prazo e garante uma abordagem mais sustentável (Siniawski et al., 2007; Rosado-Aguilar et al., 2017; Lee et al., 2022). Além disso, sua menor toxicidade para organismos não-alvo, como insetos benéficos e microbiota do solo, apoiam o equilíbrio do ecossistema (Angelo et al., 2015).

Esses avanços destacam a necessidade de aprofundar as pesquisas sobre o uso de fungos entomopatogênicos e formulações inovadoras no controle de carrapatos, especialmente devido ao impacto econômico e sanitário causado por esses parasitos na pecuária. Este estudo contribui significativamente ao comparar, pela primeira vez, a compatibilidade de diferentes formulações à base de óleo vegetal de milho e uma concentração de óleo de silicone com o fungo *Cordyceps javanica*, e o uso dessas formulações para controlar o carrapato *R. microplus* em condições de laboratório e semi-campo.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

Os principais hospedeiros do *R. microplus* são os bovinos, afetados em grande escala devido à sua importância econômica e alta densidade populacional em regiões de prevalência do carrapato. No entanto, outros animais domésticos, como cavalos, ovinos, caprinos e até mesmo cães, podem ser parasitados por esse artrópode (Dzemo, 2022). Em algumas regiões, há registros de infestações em animais silvestres, que podem atuar como reservatórios alternativos para o carrapato e os patógenos que ele transmite. (Alves-Branco et al., 2008; Dzemo, 2022).

O carrapato bovino *R. microplus* (anteriormente descrito como *Boophilus microplus*) (Murrel e Barker, 2003) é uma das pragas pecuárias mais importantes em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Segundo a classificação do National Center for Biotechnology Information (NCBI: TXID 6941), *R. microplus* pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida e família Ixodidae, sendo um dos principais carrapatos de interesse veterinário nessas regiões (NCBI, 2024).

O ciclo de vida do *R. microplus* é monoxênico, ou seja, ocorre em um único hospedeiro ao longo de todas as suas fases parasitárias. Após a postura de ovos no solo pela fêmea ingurgitada, as larvas eclodem e sobem na vegetação, aguardando a passagem de um animal adequado. Ao encontrá-lo, as larvas se fixam e começam a se alimentar, mudando de estágio diretamente no mesmo. Ocorrem mudas de larvas para ninfas e ninfas para adultos machos e fêmeas, que acasalam. Após a cópula, as fêmeas continuam a se alimentar de sangue até atingirem o ingurgitamento completo. As fêmeas completamente ingurgitadas, desprendem-se do animal, caem no solo para postura dos ovos no ambiente, reiniciando o ciclo. (Campos Pereira et al., 2008; Andreotti et al., 2019).

Estudos mostram ainda que a infestação deste carrapato causa irritação na pele, predispõe os animais a ataques de moscas resultando em lesões, que podem evoluir para miíases e infecções secundárias (Borges et al., 2011). Recentemente, estudos revelaram o impacto econômico significativo das infestações por *R. microplus* em países como Brasil e México. No mundo, as perdas anuais devido a esse carrapato foram estimadas em US\$ 18,7 bilhões; só no Brasil, foram US\$ 3,24 bilhões (Grisi et al., 2014; Sunguirai et al., 2018). Diante disso, é fundamental implementar estratégias de controle populacional que incluam o

uso racional de carrapaticidas, manejo integrado de pastagens, e, possivelmente, o desenvolvimento de vacinas eficazes para minimizar os impactos econômicos e sanitários causados por esse parasito.

O controle químico é o método mais amplamente utilizado, baseado na aplicação de acaricidas para eliminar os carrapatos. Bases químicas, como piretróides, amidinas e organofosforados, são comumente aplicados em banhos ou em forma de pour-on para controlar a infestação (Andreotti, 2010). No entanto, o uso frequente e inadequado de produtos químicos tem comprometido a eficácia do controle químico, reduzindo sua eficiência ao longo do tempo (Rodriguez-Vivas et al., 2018). Os organofosforados atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, resultando em acúmulo de ACh e causando hiperexcitação neuronal (Baxter et al., 1999; Anderson et al., 2012). Já os piretróides afetam a função dos canais de sódio nas membranas dos neurônios, prolongando a abertura desses canais e levando à paralisia e morte dos carrapatos (Soderlund; Bloomquist, 1989). As amidinas, como o amitraz, atuam como agonistas dos receptores octopaminérgicos, resultando em disfunção neuromuscular e morte do ectoparasito (Graf et al., 2004).

Entre os mecanismos de resistência, destaca-se a insensibilidade à acetilcolinesterase, que reduz a eficácia dos organofosforados (Foil et al., 2004; Temeyer et al., 2010), além da resistência associada a mutações nos canais de sódio contra piretróides e a dessensibilização dos receptores octopaminérgicos às amidinas.

Além disso, o uso frequente de acaricidas químicos contribui para o descarte inadequado de resíduos, contaminando o meio ambiente e expondo animais e humanos a riscos de toxicidade (Freitas et al., 2005; Marthe et al., 2010). A exposição prolongada a organofosforados pode causar efeitos adversos em mamíferos, como distúrbios cardiorrespiratórios, tremores e sudorese excessiva (Miler-da-Silva et al., 2021).

O controle biológico de *R. microplus* representa uma alternativa promissora para reduzir as infestações de carrapatos em bovinos, minimizando o impacto ambiental e a resistência aos acaricidas químicos (Veríssimo et al., 2013). Dentre as principais estratégias, destacam-se o uso de fungos entomopatogênicos, bactérias, nematóides e vírus, que atuam diretamente sobre o carrapato, reduzindo sua população de forma eficaz.

Além dos fungos, outras formas de controle biológico incluem o uso de bactérias, como *Bacillus thuringiensis*, que produzem toxinas letais aos carrapatos, e nematóides entomopatogênicos, como *Steinernema* e *Heterorhabditis*, que infectam e matam *R.*

*microplus* (Grewal et al., 2005). A exploração de vírus entomopatogênicos para o controle de *R. microplus* tem ganhado destaque como uma abordagem emergente. Entre eles, os baculovírus são os mais estudados, atuando por meio da infecção oral ou pela penetração em células específicas do hospedeiro, onde se replicam e desencadeiam lise celular, resultando na morte do carrapato (Szewczyk et al., 2006). Por outro lado, os fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae* e *B. bassiana*, destacam-se por infectar diretamente o carrapato através da penetração da cutícula, tornando-os ferramentas valiosas no manejo, conforme discutido por Castro-Saines et al., (2024).

Adicionalmente, produtos naturais, como óleos essenciais e extratos vegetais, têm sido investigados por sua ação acaricida. Compostos extraídos de plantas como citronela e eucalipto demonstraram eficácia na redução de infestações, inibindo enzimas vitais ao sistema nervoso dos carrapatos, como a acetilcolinesterase (Dohi et al., 2009; Silva et al., 2018). Sua baixa toxicidade para o ambiente e o gado os tornam aliados neste modelo de controle.

## **2.2 Desafios no controle de carrapatos no rebanho bovino brasileiro**

O controle de ectoparasitos no rebanho bovino brasileiro é um desafio constante para os produtores, devido à diversidade e resistência desses parasitos, além do impacto negativo na produtividade. No Brasil, os bovinos são parasitados, principalmente, por *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino), *Stomoxys calcitrans* (mosca dos estábulos) e *Haematobia irritans* (mosca do chifre) (Grisi et al., 2014). A infestação parasitária gera estresse aos animais e transmite agentes patogênicos causadores de diversas doenças (Jonsson, 2006).

Um dos maiores desafios neste controle é o surgimento de populações resistentes aos produtos químicos disponíveis no mercado. Estudos têm demonstrado que a resistência aos acaricidas é um problema crescente, especialmente em relação ao carrapato *R. microplus* (Andreotti, 2010; Klafke et al., 2024; Jonsson, 2006). Esse fenômeno é agravado pela falta de rotação de princípios ativos e pelo uso indiscriminado dos mesmos, o que leva à diminuição da eficácia de produtos comerciais disponíveis (Klafke et al., 2006).

As condições climáticas tropicais do Brasil favorecem a proliferação dos ectoparasitos, tornando o controle mais difícil e exigindo intervenções contínuas (Grisi et al., 2014). Temperatura e umidade elevadas criam um ambiente propício para o desenvolvimento e a reprodução desses parasitos, aumentando a frequência e a intensidade das infestações (Monteiro et al., 2014). Estas geram estresse nos animais, perda de peso, redução na produção

de leite e carne, além de levar a transmissão de protozoários do gênero *Babesia* spp. e da bactéria *Anaplasma marginale*, causadores da tristeza parasitária bovina (Grisi et al., 2014).

Outro desafio significativo é a falta de conhecimento e capacitação técnica dos produtores rurais em relação às melhores práticas de manejo e controle de parasitos. Muitas vezes, os produtores não seguem as recomendações do produto, como forma de aplicação, dosagem e período de carência, comprometendo, assim, a eficácia dos tratamentos (Klafke et al., 2024). A educação continuada e a assistência técnica são fundamentais para melhorar a adesão às práticas recomendadas e garantir um controle mais eficiente (Jonsson, 2006).

A limitação de infraestrutura e recursos disponíveis para pequenos e médios produtores também representam um obstáculo para o sucesso do combate dos ectoparasitos. A falta de acesso a produtos de qualidade, as dificuldades financeiras para investir em tecnologias mais avançadas e a ausência de programas governamentais de apoio dificultam a implementação de medidas de controle adequadas (Alonso-Díaz et al., 2021). A colaboração entre setor público e privado é essencial para proporcionar soluções acessíveis para todos os produtores, independentemente do tamanho de suas propriedades (Klafke et al., 2024).

O controle efetivo de ectoparasitos no rebanho bovino brasileiro requer uma abordagem multifacetada que inclua alternativas inovadoras, com o foco em ações biodegradáveis. A integração de métodos biológicos, vacinas e práticas de manejo adequado pode reduzir a dependência de produtos químicos e mitigar a resistência (De la Fuente et al., 2007). Assim, incentivo a pesquisas científicas, e a utilização de novas tecnologias, como monitoramento digital e diagnósticos precisos podem contribuir para um controle mais eficiente e direcionado, minimizando o impacto dos ectoparasitos na produção bovina (Grisi et al., 2014).

### **2.3 Micoacaricidas: uma alternativa eficaz e sustentável no controle de *Rhipicephalus microplus***

Os fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, têm sido amplamente pesquisados e demonstram potencial significativo no combate ao *R. microplus* (Mesquita et al., 2020; Carneiro et al., 2022; Bório et al., 2022; Fantatto et al., 2022; Meireles et al., 2023;). Esses microrganismos infectam o carrapato ao aderirem à cutícula do artrópode, germinarem e penetrarem no exoesqueleto por meio da liberação de enzimas como quitinases, proteases e lipases, que degradam as barreiras físicas. Além disso produzem

toxinas secundárias, como destruxinas, beauvericinas e oosporinas, que contribuem para a desregulação do sistema imune do hospedeiro, aumento do estresse oxidativo e comprometimento das funções fisiológicas. Uma vez dentro do hospedeiro, o fungo prolifera, causando disfunção celular e desequilíbrios metabólicos que levam à morte do carrapato, geralmente acompanhada pela formação de estruturas fúngicas externas, como conidióforos (Beys-da-Silva et al., 2020). Apesar de resultados promissores em condições laboratoriais, fatores ambientais como temperatura, umidade e radiação solar podem comprometer sua eficácia em campo (Butt et al., 2001; Ojeda-Chi et al., 2010).

A eficácia dos micoacaricidas depende principalmente da capacidade do fungo entomopatogênico de penetrar no exoesqueleto do carrapato, o que levará à morte do hospedeiro em alguns dias (D'alessandro, 2012; Andreotti et al., 2019). Estudos laboratoriais demonstram que fungos como *M. anisopliae* e *B. bassiana* são capazes de causar alta mortalidade em carrapatos, tornando-se uma ferramenta eficiente no controle biológico (Corrêa et al., 2021; Zeina et al., 2022; Alonso-Díaz et al., 2021).

A produção de fungos entomopatogênicos pode ser realizada por meio de diferentes métodos, sendo os principais a fermentação líquida e a fermentação sólida. Na fermentação líquida, os fungos são cultivados em meio líquido rico em nutrientes, permitindo a obtenção de conídios em alta concentração, que podem ser formulados como suspensões ou biopesticidas microencapsulados. Já na fermentação sólida, o crescimento do fungo ocorre em substratos sólidos, como grãos e resíduos agroindustriais, onde os conídios são formados diretamente na superfície do material.

No Brasil, a produção em larga escala é predominantemente realizada por fermentação sólida, utilizando o arroz como substrato. Esse método é amplamente adotado devido ao baixo custo, à facilidade de escalonamento e à alta viabilidade dos conídios produzidos. Após o crescimento fúngico no substrato, o material é seco, triturado e comercializado na forma de pó molhável, que pode ser facilmente disperso em água para aplicação no campo (Faria et al., 2001; Faria et al., 2022).

Nos últimos anos, o uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico tem ganhado destaque na agricultura e na pecuária, com diversos produtos registrados e disponíveis no mercado brasileiro (Agrofit, 2024). Espécies como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* têm sido amplamente empregadas para o manejo de pragas agrícolas e ectoparasitas, demonstrando eficácia sob diferentes condições ambientais. Embora a maior parte dos bioacaricidas comerciais tenha sido desenvolvida para

o controle de insetos fitófagos, a crescente comprovação da eficiência desses fungos contra carrapatos reforça seu potencial para uso em sistemas veterinários (Mascarin et al., 2010; 2024). O desenvolvimento de formulações mais adaptadas ao campo, aliadas a estratégias de aplicação adequadas, pode consolidar esses agentes biológicos como ferramentas essenciais no manejo integrado de parasitos (Mesquita et al., 2023).

No entanto, para que os micoacaricidas se tornem ainda mais eficazes em campo, é essencial que estudos continuem avaliando a sua aplicação em diferentes condições ambientais e buscando formulações que protejam os conídios de fatores adversos, garantindo a persistência e virulência dos fungos (Angelo et al., 2015; Barbieri et al., 2023). Ensaios *in vitro* têm demonstrado que fungos como *M. anisopliae* e *B. bassiana* possuem alto potencial de infecção de carrapatos, com taxas de mortalidade significativas, variando de 80% a 90%, dependendo das condições de umidade e temperatura (Mascarin et al., 2010). Além disso, em testes *in vivo*, esses fungos mostraram eficácia no controle de populações de *R. microplus*, proporcionando uma alternativa promissora aos acaricidas tradicionais, com um efeito residual que pode reduzir a necessidade de aplicações frequentes, minimizando o impacto ambiental e a resistência (Barbieri et al., 2023).

Recentemente, novas abordagens têm sido exploradas para aprimorar o controle de *R. microplus* com fungos entomopatogênicos. A combinação de *Fusarium oxysporum* com nanopartículas de prata, por exemplo, aumentou significativamente a atividade entomopatogênica, melhorando a taxa de mortalidade dos carrapatos (Sumera et al., 2023). Além disso, estudos com *M. anisopliae* mostraram que o fungo pode inibir a dopamina nos carrapatos, interferindo em suas funções fisiológicas e motoras, o que potencializa seu efeito letal (Bório et al., 2022). O uso de diferentes cepas, como *B. bassiana* e *Aspergillus flavus*, também tem mostrado resultados favoráveis, com variações nos fatores de virulência, permitindo uma seleção mais eficaz para diferentes estágios do ciclo de vida dos carrapatos e condições ambientais (Arreguin-Perez et al., 2023).

O Ministério da Agricultura e Pecuária possui atualmente 10 produtos registrados com o gênero *Cordyceps* (= *Isaria*), incluindo oito referente a *Isaria fumosorosea* e somente dois de *Isaria javanica*, com formulações variando entre suspensão concentrada, dispersão de óleo, suspensão concentrada em óleo e pó molhável (Agrofit 2025). A maioria desses produtos tem indicações de uso voltadas para o controle de *Bemisia tabaci* (mosca-branca), *Dalbulus maidis* (cigarrinha-do-milho), *Diaphorina citri* (psílideo) e *Unaspis citri* (escama-farinha). Além disso, há apenas um produto registrado do gênero *Cordyceps*, especificamente *C.*

*javanica*, também direcionado ao controle dessas mesmas pragas. Atualmente, não há registros de produtos à base de fungos entomopatogênicos especificamente aprovados para o controle de *Rhipicephalus microplus* em bovinos, evidenciando a ausência de formulações comerciais voltadas para esse ectoparasito. Esse cenário se deve, em grande parte, à falta de vias regulatórias específicas que permitam a homologação e o uso desses bioacaricidas no setor veterinário. Enquanto na agricultura os bioinsumos já possuem normativas estabelecidas que viabilizam sua comercialização e aplicação, a regulamentação para uso em animais ainda é limitada, representando um desafio para a inserção desses produtos no mercado pecuário.

### **2.3.1. *Cordyceps javanica* no controle de *Rhipicephalus microplus***

A taxonomia do gênero *Cordyceps* passou por mudanças significativas ao longo das últimas décadas, com avanços na filogenia molecular refinando sua classificação. Em 2007, Sung et al., conduziram um estudo seminal que reorganizou a filogenia dos fungos clavicipitáceos, separando diversas espécies anteriormente incluídas em *Cordyceps* para novos gêneros, como *Ophiocordyceps* e *Elaphocordyceps*. Posteriormente, em 2017, Kepler et al., aprofundaram essa revisão, demonstrando que *Isaria*, um gênero historicamente reconhecido como anamórfico, deveria ser incorporado ao gênero *Cordyceps*, levando à reclassificação de espécies como *Isaria fumosorosea* para *Cordyceps fumosorosea*. No Brasil, Lopes et al. (2023) destacaram a diversidade de linhagens anamórficas de *Cordyceps* isoladas de solos e insetos, reforçando a presença e o potencial desses fungos para controle biológico em ecossistemas tropicais.

*Cordyceps javanica* é um fungo entomopatogênico com registros de estudos no controle biológico de pragas agrícolas, este fungo com morfologia característica apresenta corpos frutíferos que surgem sobre o hospedeiro, com esporos de coloração variando de branco a amarelo, e estrutura filamentosa que auxilia na penetração nas membranas do hospedeiro (Bunsap et al., 2024).

Lopes et al. (2023) destaca a diversidade de *Cordyceps* spp. (anteriormente classificado como *Isaria*) anamórficos isolados de sítios agrícolas brasileiros, incluindo cepas que se mostram eficazes contra uma gama de pragas de interesse econômico. O estudo apontou a importância de se considerar a diversidade genética e ambiental ao escolher isolados para aplicação no controle de pragas específicas, como o *R. microplus*. Em comparação com outras espécies do gênero *Cordyceps*, como *C. fumosorosea*, o estudo de

Behle et al. (2022) indicou que *C. javanica* apresenta uma eficácia superior em termos de produção e taxa de mortalidade de insetos-alvo, evidenciando seu potencial para ser utilizado no controle de *R. microplus*. Além disso, o estudo de Wu et al., (2021) demonstrou que isolados de *C. javanica* possuem uma virulência considerável contra diversas pragas, destacando sua aplicabilidade em ambientes agrícolas e pecuários.

Além disso, o estudo de Angelo et al (2012) com *I. fumosorosea* apresentaram maior virulência em carrapatos, resultando em uma taxa de mortalidade mais elevada e em menor tempo quando comparado com outros fungos entomopatogênicos como, *Purpureocillium lilacinum*. A redução do número de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* resultou em 59,02%, enquanto *P. lilacinum* não causou redução significativa. A mortalidade variou conforme o estágio do carrapato, sendo maior nas larvas e menor nos adultos, além de reduzir a oviposição e a viabilidade dos ovos, afetando o ciclo reprodutivo do parasito (Angelo et al., 2012). Mais recentemente, estudos têm demonstrado a eficácia desse fungo em diferentes contextos de controle de pragas, mostrando seu amplo espectro de ação e a versatilidade para a aplicação em diversos insetos e outros artrópodes como, psilídideo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* (Domingues et al., 2022); e lagarta-mede-palmo, *Trichoplusia ni* (Behle et al., 2022).

Além disso, pesquisas como a de Domingues et al. (2022) mostraram que *Cordyceps javanica* tem potencial para controlar pragas de importância agrícola, como a mosca-branca, e também possui atividades patogênicas relevantes em demais insetos como, psilídeo-asiático-dos-citros *Diaphorina ascitri* Kuwayama. A compatibilidade desse fungo com outros métodos biológicos, como o uso do parasitoide *Eretmocerus hayati*, foi abordada por Ou et al. (2019), sugerindo um efeito de sinergismo para o controle de pragas.

Arévalo-Rojas et al. (2023) demonstram que *Cordyceps* sp. apresentam uma boa produção de conídios, um fator crucial para a eficácia do fungo em larga escala. O estudo apresentou dados referente a resistência à radiação ultravioleta-B e a alta tolerância a temperaturas elevadas são características que conferem maior robustez ao fungo, permitindo sua aplicação em diferentes condições ambientais. Boaventura et al. (2022) realizaram uma modelagem dependente da temperatura e previsões espaciais para identificar áreas geográficas no Brasil adequadas ao uso de *Cordyceps javanica* no controle da mosca-branca. Os resultados indicaram que a adaptação do fungo às variações térmicas é um fator determinante para sua viabilidade como agente de biocontrole, reforçando a importância de considerar a distribuição geográfica e as condições climáticas locais ao planejar sua aplicação. Esses



achados ressaltam o potencial do gênero *Cordyceps* como um bioacaricida eficaz em diferentes cenários ambientais, ampliando suas perspectivas de uso no controle de *Rhipicephalus microplus*.

### 2.3.2 Formulações oleosas com fungos entomopatogênicos

As formulações oleosas com fungos entomopatogênicos têm se mostrado uma abordagem inovadora e eficaz no controle de carrapatos e outros artrópodes, oferecendo uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de controle químico. Essas formulações consistem em misturas que utilizam óleos vegetais ou minerais como adjuvantes para otimizar a aplicação e eficácia dos fungos que atuam como agentes biológicos, como *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Alves et al., 2010).

A eficácia dessas formulações é influenciada pela escolha do tipo de óleo utilizado. Formulações oleosas são conhecidas por facilitar a adesão dos conídios dos fungos à superfície do carrapato, aumentando sua capacidade de penetração na cutícula hidrofóbica do parasita (Prior et al., 1988). Entre elas são destacadas formas de produção como, grânulos, suspensão, pó molhável, grânulos em água, iscas, pó de contato, suspensão em óleo, dispersão oleosa e suspensão de ultra baixo volume (Meirelles et al., 2023). Isso ocorre porque os óleos conferem características lipofílicas à formulação, tornando-a mais aderente e garantindo que o agente biológico alcance seu alvo de forma eficiente (Bateman et al., 1993).

O uso de óleos vegetais como adjuvantes apresenta várias vantagens. Por serem produtos orgânicos, eles podem ser certificados para uso em sistemas de produção orgânica. Além disso, os óleos vegetais são mais viscosos, conferindo maior adesividade ao agente biológico na superfície da praga e proporcionando proteção contra a radiação ultravioleta (Carolino et al., 2012; Camargo et al., 2014). Essa proteção é especialmente importante em ambientes expostos ao sol e as altas temperaturas, uma vez que a radiação UV pode diminuir a viabilidade dos conídios. Por outro lado, os óleos minerais, apesar de tradicionalmente não serem certificados como produtos orgânicos, passaram a ser considerados como tais a partir da Portaria nº 52 do Mapa, publicada em 2021, que estabelece diretrizes para a certificação de óleos minerais, permitindo sua utilização em sistemas de produção orgânica, desde que atendam aos critérios de fabricação e ingredientes definidos pela legislação (Alves et al., 2010; Samish et al., 2014; Camargo et al., 2014). Estudos demonstraram que a utilização de óleos vegetais e minerais em formulações pode prolongar a sobrevivência dos conídios e reduzir sua

sensibilidade à radiação UV em comparação com suspensões aquosas, aumentando a eficácia no controle de carrapatos, além de fornecer melhor facilidade aplicação pois formulações aquosas podem escorrer facilmente, dificultando a aplicação em áreas específicas ou sujeitas a condições climáticas adversas (Marques et al., 2019; Muniz et al., 2020). Além disso, essas formulações têm mostrado um efeito termoprotetor, conferindo maior resistência aos conídios quando expostos a altas temperaturas (Barreto et al., 2016).

O sucesso das formulações oleosas também depende da seleção de óleos compatíveis que não interfiram na viabilidade e infectividade dos fungos. Por exemplo, *M. anisopliae* e *B. bassiana* têm mostrado maior eficácia em condições de campo quando aplicados em formulações oleosas, resultando em maior controle de carrapatos em relação às formulações aquosas (Kaaya, 2000; Maranga et al., 2005; Camargo et al., 2014; Angelo et al., 2015; Alves et al., 2016; Marciano et al., 2020).

A aplicação de formulações oleosas é uma alternativa viável e eficaz para os produtores rurais, uma vez que podem ser utilizadas com equipamentos convencionais de pulverização, facilitando a incorporação dessa técnica nos manejos já existentes (Camargo et al., 2014; Marciano et al., 2021). Além disso, dispensam a necessidade de agentes molhantes ou adesivos, reduzindo custos e tornando o processo mais prático (Samish et al., 2014).

As formulações oleosas com fungos entomopatogênicos destacam-se como uma abordagem inovadora e eficaz no controle biológico de carrapatos, oferecendo uma alternativa com menor impacto ambiental em relação aos acaricidas químicos convencionais. A incorporação dessas formulações no controle de pragas tem o potencial de contribuir de forma significativa para a redução das infestações por carrapatos. No entanto, estudos com uso de *Cordyceps* spp. e ou *Isaria* ainda são escassos quando utilizados em formulações específicas para o controle de carrapatos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de Realização dos Experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária (LCM). O laboratório fica localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Daniel Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), situada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro, com as coordenadas geográficas de aproximadamente 22°46'31" S de latitude e 43°39'33" W de longitude.

#### 3.2 Obtenção do isolado fúngico de *C. javanica* e preparo da formulação

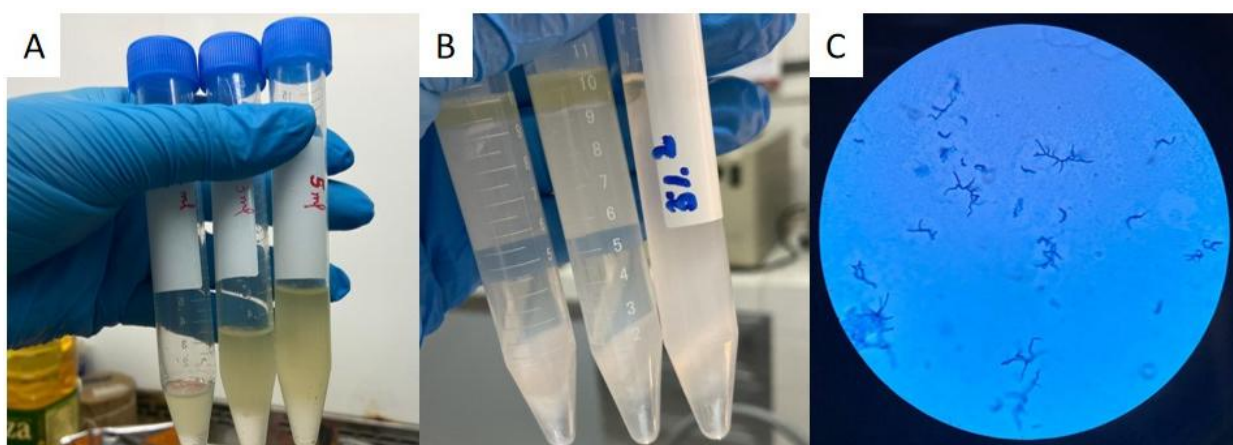
Os conídios utilizados neste estudo f A suspensão fúngica (controle) foi preparada adicionando  $1 \times 10^5$  conídios/mL a 1% de suspensão aquosa de monoleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80®, Vetec Fine Chemicals Ltda). As emulsões foram preparadas adicionando os componentes na seguinte ordem: solução aquosa de Tween 80® a 1%, óleo vegetal de milho (Cargill Agrícola S.A. Liza) a 1%, 3% ou 5%, óleo de silicone Polidimetilsiloxano CAS 63148-62-9 (Synth®) 0,01% e conídios fúngicos. As emulsões de controle foram preparadas de maneira semelhante, mas sem o fungo (Figura 1-A).

#### 3.3 Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* pertencentes a cepa brasileira Porto alegre (POA), suscetível a acaricidas, foram coletadas do piso das baias de bovinos artificialmente infestados (Comitê de Ética no Uso de Animais/IV/UFRRJ, protocolo no 9714220419) na EPPWON, IV, UFRRJ. As fêmeas foram lavadas em água corrente e imersas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% para assepsia da cutícula. Posteriormente, foram secas com o auxílio de papel toalha e armazenadas em placas de Petri (temperatura 27°C e umidade relativa igual ou maior a 80%) até a utilização nos experimentos. As fêmeas de carrapato foram pesadas e subdivididas em grupos com pesos homogêneos em 0,080g de diferença, de acordo com o tratamento realizado.

### 3.4 Teste de compatibilidade dos conídios de *Cordyceps javanica* com óleo de milho e óleo de silicone

Para os testes de compatibilidade, emulsões, suspensões fúngicas e formulações, preparadas conforme mencionado no tópico 3.2, foram incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 1h. O óleo vegetal foi removido das emulsões em água antes da inoculação em BDA usando 100uL de Solub'Oil (General Chemicals) de acordo com Paixão et al. (2017). Os conídios foram lavados com solução aquosa de Solub'Oil® e então transferidos para um tubo de centrifuga de 15 mL (Figura 1-B). As amostras foram agitadas vagarosamente por dois minutos e centrifugadas por 5 minutos a 4.200 rpm. O sobrenadante foi descartado e os conídios foram ressuspensos em solução aquosa de Tween 80® a 1% (vol/vol). Para a avaliação da germinação fúngica, uma alíquota de 20 µL de suspensão ou formulação fúngica ( $1 \times 10^5$  conídios/mL) foi inoculada na superfície do meio de cultura ágar dextrose de batata (BDA) acrescido de benomyl a 0,002% (p/v) (50% de ingrediente ativo; Benlate®, DuPont) (Milner; Huppertz; Swaris, 1991), seguido de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa (UR)  $\geq 80\%$  por 24h. A germinação fúngica foi avaliada em microscópio óptico (Nikon; ECLIPSE E200MV R) ( $\times 40$ ) após coloração com azul de metila. Foram contados pelo menos 300 conídios, identificando os germinados e não germinados, por placa e o valor percentual de germinação fúngica foi estipulado (Lopes et al., 2013) (Figura 1-C).



**Figura 1:** Formulações de *Cordyceps javanica* em 1%, 3% e 5% de óleo de milho e 0,01% de óleo de silicone (A), formulações após remoção do óleo, com o auxílio de Solub'Oil®, e processo de centrifugação (B), avaliação da germinação de conídios do grupo formulado com

3% de óleo de milho, após remoção do óleo e 24 horas de incubação (C). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025.

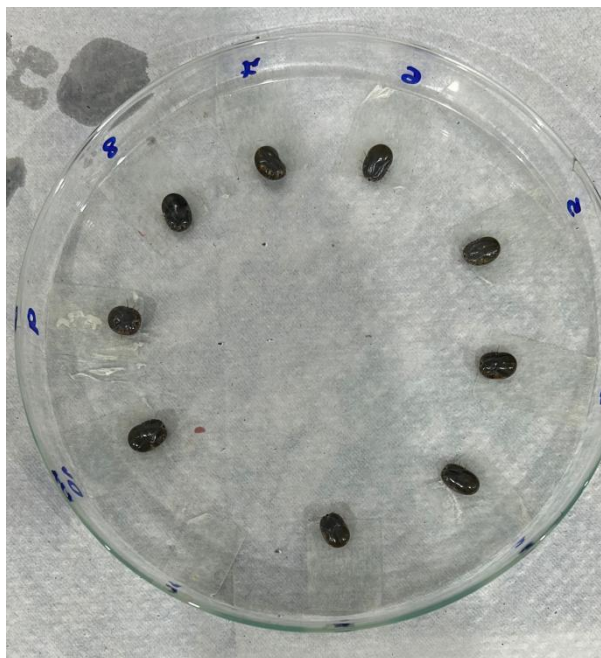
### **3.5 Ensaio biológico *in vitro* com larvas de *Rhipicephalus microplus***

A virulência contra larvas de carrapatos foi realizada conforme Camargo et al., (2012). Foram utilizados dez tubos de ensaio por grupo, com 50 mg de ovos de *R. microplus* (aproximadamente 1000 larvas) em cada tubo. Os ovos foram previamente incubados a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com  $\text{UR} \geq 80\%$  por 15 dias até a eclosão das larvas. Os tubos com eclodibilidade menor que 95% foram descartados. No total, 13 grupos foram formados, sendo organizados da seguinte forma: I) Controle aquoso (suspensão aquosa de Tween 80<sup>®</sup> 1%), II) Controle silicone (emulsão de 0,01% de óleo de silicone e Tween 80<sup>®</sup> 1%), III) Controle de óleo a 1%, 3% ou 5% (emulsão de óleo de milho, Tween 80<sup>®</sup> 1% e óleo de silicone a 0,01%), III) Suspensão fúngica (suspensões aquosas de Tween 80<sup>®</sup> contendo  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL) e IV) Formulações fúngicas [emulsão de conídios em óleo de milho (1%, 3% ou 5%) e óleo de silicone (0,01%) em Tween 80<sup>®</sup> a 1%]. Para o tratamento, as larvas foram imersas em 1 mL de suspensão ou emulsão de conídios por 3 min, logo após o preparo dos tratamentos. Os tubos de ensaio foram invertidos para remoção do excesso de suspensão/formulação, através de absorção pelo tampão de algodão. Os tubos contendo as larvas foram incubados a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ . A mortalidade larval foi avaliada a cada cinco dias durante 15 dias. O bioensaio foi realizado três vezes, usando novas preparações de conídios a cada vez.

### **3.6 Ensaio biológico *in vitro* com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus***

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram pesadas individualmente e divididas em classes de peso homogêneas. Para cada tratamento, foram formados grupos de 10 carrapatos, seguindo os mesmos grupos descritos no item 2.3, exceto o controle de óleo de silicone. Os carrapatos foram submersos individualmente por três minutos em 1 mL do tratamento correspondente. Posteriormente as fêmeas foram fixadas, com o auxílio de fita dupla face, em placas de Petri em condições de temperatura  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$  (Figura 2). A massa de ovos de cada fêmea foi coletada, pesada, armazenada individualmente e incubada a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ . Os parâmetros biológicos analisados incluíram o peso da postura, porcentagem de eclosão larval, o índice de produção de ovos, o índice nutricional, eficiência reprodutiva

(Bennett, 1974) e a porcentagem de controle de carrapatos (Drummond et al., 1971). A sobrevivência das fêmeas foi registrada diariamente por 20 dias. O bioensaio foi realizado três vezes, utilizando-se novas preparações de conídios a cada vez.



**Figura 2:** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* após tratamento fixadas em placa de petri em decúbito dorsal. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025.

### 3.7 Ensaio biológico com fêmeas de *Rhipicephalus microplus* em condições de semi-campo

Cinquenta vasos plásticos (22 cm de altura e 24 cm de largura) foram preenchidos com 1/3 de areia e pedra para drenagem de água e 2/3 de condicionador de solo não estéril (Natussolos do Brasil Ltda, Taubaté, SP, Brasil). Os vasos foram previamente cultivados com *Urochloa decumbens* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf (Poales: Poaceae) cv. Marandu (capim forrageiro) (Wolf® seeds do Brasil, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por três meses (de maio a setembro de 2024). As sementes foram semeadas diretamente nos vasos, que foram colocados em uma área externa da Estação Experimental W.O. Neitz (Seropédica, Brasil). Os vasos permaneceram expostos à luz solar direta até as 15h, recebendo sombra parcial pelo resto do dia com 40 cm de distância entre cada fileira de tratamento (Figura 3).

Para monitorar a precipitação ocorrida na cidade onde se conduziu o experimento, foram utilizados os dados da Estação Meteorológica da Fazendinha Agroecológica situada na mesma área do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, utilizando o banco de dados de registros meteorológicos do Instituto Nacional de Meteorologia, do Ministério de Agricultura e Pecuária. Os dados foram avaliados em um período de 24h no momento do tratamento ao último dia de coleta de solo para análise de persistência de *C. javanica*. As plantas foram cultivadas por um período de 110 dias, com irrigação diária e monitoramento regular para garantir crescimento uniforme durante todo o experimento, as plantas foram ajustadas para uma altura de 35 cm, igualando-se à estatura das demais, com 10 vasos por fileira, antes da aplicação do tratamento.

Com base nos melhores resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, a concentração da emulsão de óleo de milho a 3% foi selecionada para o teste de semi-campo. Para o tratamento, 100 mL da respectiva emulsão foram aplicados sobre toda a superfície do solo usando um pequeno pulverizador manual de baixo volume. A concentração fúngica usada foi de  $1 \times 10^8$  conídios/mL, equivalente a  $2,21 \times 10^7$  conídios/cm<sup>2</sup>. Foram formados cinco grupos com dez vasos cada: I) Controle aquoso (suspensão aquosa de Tween 80® 1%), II) Controle de silicone (emulsão de óleo de silicone 0,01% mais Tween 80® 1%), III) Controle de óleo 3% (emulsão de óleo de milho 3% e Tween 80® 1%), IV) Controle de óleo 3% e óleo de silicone (emulsão de óleo de milho, Tween 80® 1% e óleo de silicone 0,01%), V) Fungo formulado [emulsão de  $10^8$  conídios/mL em óleo de milho 3% e óleo de silicone (0,01%) em Tween 80® 1%]. No mesmo dia, após o tratamento fúngico, um grupo de três fêmeas completamente ingurgitadas do mesmo peso, seguindo a faixa de diferença em 0,080g foram colocadas em cada um dos 50 vasos de capim. Os vasos foram inspecionados para observação da oviposição das fêmeas em um período de 38 dias e eclosão das larvas. As larvas foram coletadas por um corte do ápice das folhas de *U. decumbens* e contadas a partir de 38 dias após o tratamento fúngico. Os vasos foram então inspecionados todos os dias até que nenhuma larva fosse observada em período de 25 dias após a primeira coleta de larvas. As larvas coletadas foram congeladas para posterior contagem.





**Figura 3:** Vasos com *Urochloa decumbens* oriundos a partir do plantio de sementes, na área externa da Estação Experimental W.O. Neitz (Seropédica, Brasil). Os vasos foram tratados, sendo os grupos controle aquoso, controle silicone, controle de óleo 3%, controle de óleo 3% + óleo de silicone e fungo formulado, onde ficaram expostos à luz solar, chuva e variações de temperatura. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025.

### 3.8 Persistência de *Cordyceps javanica* no solo tratado

Amostras de solo foram coletadas de cada vaso (grupos tratados ou controles) e inoculadas em meio seletivo Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida (CTC) segundo (Fernandes et al., 2010) em três momentos sendo, D-1, D+1 e D+30. O solo superficial de três locais diferentes de cada vaso foi coletado com uma espátula, homogeneizado e então pesado. Uma alíquota de 0,35 g do solo foi transferida para um microtubo de 1,5 mL com 1 mL de solução de água destilada estéril acrescida de Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. Cinquenta microlitros dessa suspensão homogeneizada foram semeados em meio seletivo CTC utilizando alça de Drigalski (duas placas por vaso em cada coleta), segundo Fernandes et al. (2010). O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *C. javanica*, de cada coleta de solo, foi calculado por grama de solo tratado com fungo com base no número de colônias de *C. javanica* observadas em cada placa de Petri, considerando a análise



dos dez vasos. As colônias de *C. javanica* reisoladas de cada coleta foram transferidas para BDA e identificadas com base no aspecto da colônia, coloração da colônia e do reverso e formato conidial (Humber, 2012).

### 3.9 Análise estatística

Os dados foram verificados quanto à normalidade usando um teste de Shapiro–Wilk. O teste de compatibilidade, o bioensaio *in vitro* com larvas e fêmeas ingurgitadas e a análise da sobrevivência de carrapatos adultos tiveram distribuições não normais e foram analisados usando Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn. A recuperação larval do bioensaio sob condições de semi-campo e a persistência de *C. javanica* no solo tiveram distribuições normais. Os dados de persistência do solo foram analisados usando teste t pareado com correção de Welch's e a recuperação larval foi acessada por One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Todos os resultados normais e não normais foram obtidos através do GraphPad Prism 8.4.2. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os efeitos das misturas designadas como antagônicas, aditivas ou sinérgicas foram obtidos por meio de uma análise utilizando o teste qui-quadrado de comparações ( $\chi^2$ ) = 3,84. Em uma combinação de valores onde  $\chi^2 > 3,84$  e a mortalidade observada foi maior que a mortalidade esperada, o efeito foi considerado sinérgico ou antagônico. O efeito aditivo foi definido quando o valor de  $\chi^2 < 3,84$  (Robertson; Preisler, 1992).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste de compatibilidade de suspensão de *Cordyceps javanica* emulsionada com óleo de milho e óleo de silicone

Os grupos testados foram comparados entre si no mesmo tempo de incubação (ou seja, 24h ou 48h). A germinação de *Cordyceps* exibiu viabilidade significativa entre os grupos. A maior média foi observada no grupo controle [ $99,85\% \pm 0,24\%$  ( $\chi^2 = 30$ ;  $df = 3$ ;  $P < 0,0001$ )] 24h após a incubação. Neste mesmo tempo, nenhuma diferença foi observada quando o grupo controle foram comparados com emulsão de óleo de milho a 1% ( $99,26\% \pm 0,22\%$ ;  $P = 0,458$ ). Entretanto, as taxas de germinação foram reduzidas significativamente nas emulsões de óleo de milho a 3% e 5% ( $98,41\% \pm 0,22\%$   $P < 0,0001$ ;  $98,82\% \pm 0,17\%$ ,  $P = 0,0018$ , respectivamente) em comparação ao controle, 24h após a incubação. Quarenta e oito horas após a incubação, as taxas de germinação atingiram níveis próximos ao máximo. Todos os grupos apresentaram germinação mais de 99% de germinação absoluta, não diferindo estatisticamente. Os conídios dos grupos controle e 1% de óleo de milho apresentaram a mesma média de germinação, sendo  $99,96 \pm 0,11\%$  ( $\chi^2 = 10$ ;  $df = 3$ ;  $P = 0,999$ ). As emulsões com 3% e 5% de óleo de milho apresentaram taxas de germinação ligeiramente menores em comparação ao grupo controle ( $99,59\% \pm 0,54\%$ ,  $P = 0,18$ ;  $99,67\% \pm 0,28\%$ ,  $P = 0,104$  respectivamente).

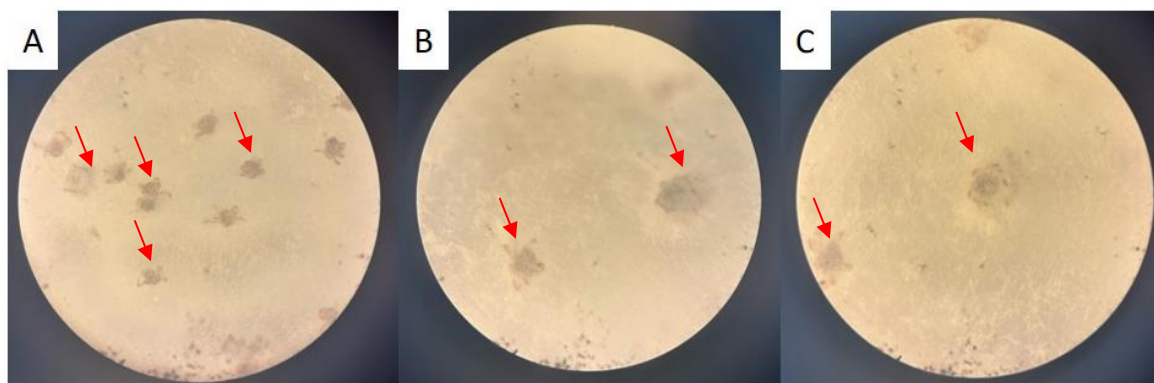
### 4.2 Ensaio biológico *in vitro* com larvas de *Rhipicephalus microplus*

Os grupos foram comparados entre si na mesma concentração fúngica (ou seja,  $1 \times 10^7$  conídios/mL ou  $10^8$  conídios/mL) e em cada tempo (Figura 4). Em geral, as emulsões fúngicas exibiram maior eficácia do que o controle de óleo ou as suspensões fúngicas, com 5 dias ( $\chi^2 = 240$ ;  $df = 8$ ;  $P < 0,0001$ ), 10 dias ( $\chi^2 = 237,9$ ;  $df = 8$ ;  $P < 0,0001$ ) ou 15 dias após o tratamento ( $\chi^2 = 244,6$ ;  $df = 8$ ;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 1). Quando analisada a maior concentração,  $10^8$  conídios/mL, as emulsões fúngicas apresentaram mortalidades maiores em comparação aos outros grupos, cinco ( $\chi^2 = 240,8$ ;  $df = 8$ ;  $P < 0,0001$ ), dez ( $\chi^2 = 241,5$ ;  $df = 8$ ;  $P < 0,0001$ ) e 15 dias após o tratamento ( $\chi^2 = 246,3$ ;  $df = 8$ ;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Mortalidade média (%)  $\pm$  desvio padrão de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão ou formulações de *Cordyceps javanica* em diferentes concentrações conidiais e avaliadas em diferentes tempos após o tratamento

Tratamento	5 dias		10 dias		15 dias	
	10 <sup>7</sup> .con/mL	10 <sup>8</sup> .con/mL	10 <sup>7</sup> .con/mL	10 <sup>8</sup> .con/mL	10 <sup>7</sup> .con/mL	10 <sup>8</sup> .con/mL
Controle aquoso	0,67 $\pm$ 1,72 e		1,16 $\pm$ 3,13% e		1,16 $\pm$ 3,13% e	
Controle silicone	0,5 $\pm$ 1,52 e		0,83 $\pm$ 2,65% e		1,0 $\pm$ 2,75% e	
Controle oleoso 1%	2,83 $\pm$ 4,08 de		4,5 $\pm$ 5,92% de		4,83 $\pm$ 6,36% de	
Controle oleoso 3%	10,5 $\pm$ 6,2% cd		13,17 $\pm$ 6,62% cd		4,17 $\pm$ 6,95% cd	
Controle oleoso 5%	14 $\pm$ 5,78% bc		16,83 $\pm$ 5,16% bc		20,17 $\pm$ 4,25% bc	
Suspensão fúngica	9,0 $\pm$ 3,57% d	12,83 $\pm$ 4,48% c	12,33 $\pm$ 3,65% d	16 $\pm$ 3,8% c	16,67 $\pm$ 2,73% c	18,83 $\pm$ 3,86% c
Formulação fúngica 1%	64,17 $\pm$ 7,88 ab	72,17 $\pm$ 8,27% ab	74,83 $\pm$ 6,75% ab	87,17 $\pm$ 7,27% ab	95,33 $\pm$ 7,42% a	98,5 $\pm$ 4,18% a
Formulação fúngica 3%	88,17 $\pm$ 9,69% a	89,33 $\pm$ 9,16% a	94,67 $\pm$ 6,81% a	98 $\pm$ 3,85% a	99,17 $\pm$ 3,73% a	100 % a
Formulação fúngica 5%	81,33 $\pm$ 14,14% a	95,17 $\pm$ 6,22% a	92,5 $\pm$ 9,89% a	99,5 $\pm$ 2,73% a	100% a	100% a

Controle aquoso (suspensão aquosa de Tween 80<sup>®</sup> a 1%); controle silicone (emulsão de 0,01% de óleo de silicone mais Tween 80<sup>®</sup> a 1%); controle de óleo a 1%, 3% ou 5% (emulsão de óleo de milho, Tween 80<sup>®</sup> a 1% e óleo de silicone a 0,01%); suspensão fúngica (suspensões aquosas de Tween 80<sup>®</sup> a 1% a 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL; e formulado por fungos [emulsão de conídios em óleo de milho (1%, 3% ou 5%) e óleo de silicone (0,01%) em Tween 80<sup>®</sup> a 1%]. O bioensaio foi conduzido em condições controladas (27  $\pm$  1 °C e UR  $\geq$  80%). Médias com a mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente considerando P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).



**Figura 4:** Larvas de *Rhipicephalus microplus* 5 dias após tratamento formulado por fungos (emulsão de conídios em óleo de milho 1% (A), 3% (B) ou 5% (C) e óleo de silicone (0,01%) em Tween 80® a 1%). Setas vermelhas indicam larvas de *R. microplus* colonizadas por *Cordyceps javanica*. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025.

#### 4.3 Ensaio biológico *in vitro* com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Os efeitos sinérgicos com maior percentual foram observados com  $10^8$  conídios/mL de suspensão combinados com 1%, 3% ou 5% de óleo de milho, produzindo valores de  $\chi^2$  de 23,18%, 22,90%, obtendo-se, respectivamente, o mesmo percentual em 3% e 5%. Os valores de  $10^7$  conídios/mL combinados com 1%, 3% ou 5% de óleo de milho apresentaram 15,48%, 19,35% e 19,57%. As maiores concentrações de óleo (ou seja, 3% e 5%) combinadas com  $10^8$  conídios/mL produziram o maior  $\chi^2$  médio, excedendo o valor crítico de 3,84.

Os parâmetros biológicos das fêmeas de carrapatos nos grupos testados foram comparados entre si considerando a mesma concentração fúngica (ou seja,  $1 \times 10^7$  conídios/mL ou  $10^8$  conídios/mL) (Tabelas 2 e 3). Na menor concentração, as formulações fúngicas com 3% ou 5% de óleo de milho apresentaram maior eficácia do que o controle de óleo ou a suspensão aquosa fúngica a  $10^7$  conídios/mL, o que foi comprovado pela redução significativa do peso da postura ( $\chi^2 = 100,7$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ), índice de produção de ovos ( $\chi^2 = 103,6$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ), índice nutricional ( $\chi^2 = 103$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ), eficiência reprodutiva ( $\chi^2 = 116,7$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ) e porcentagem de eclosão de larvas ( $\chi^2 = 135,2$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ). Quando a concentração mais alta foi analisada (ou seja,  $10^8$  conídios/mL), os parâmetros biológicos das fêmeas do carrapato [peso da postura ( $\chi^2 = 99,6$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ), índice de produção de ovos ( $\chi^2 = 102,8$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ), índice nutricional ( $\chi^2 =$

98,19;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ), eficiência reprodutiva ( $\chi^2 = 119,6$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ) e a porcentagem de eclosão de larvas ( $\chi^2 = 139,9$ ;  $df = 7$ ;  $P < 0,0001$ ) também foram diferentes quando os grupos controle foram comparados ao fungo formulado com as maiores porcentagens de óleo (3% e 5%).

**Tabela 2:** Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* imersas em suspensão ou formulações oleosas de *Cordyceps javanica* a 10<sup>7</sup> conídios/mL em condições in vitro

Tratamento	Índice de produção de ovos	Índice nutricional	Percentual de eclosão (%)	Peso da postura (g)	Eficiência reprodutiva (%)	Percentual de Controle (%)
Controle aquoso	45,88 ± 16,83 <sup>a</sup>	74,48 ± 16,07 <sup>a</sup>	92,31 ± 27,17 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,02 <sup>a</sup>	45,56 ± 17,28 <sup>a</sup>	-
Controle oleoso 1%	39,23 ± 17,07 <sup>a</sup>	66,64 ± 27,81 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	0,073 ± 0,03 <sup>a</sup>	39,23 ± 17,07 <sup>a</sup>	20,50%
Controle oleoso 3%	30,29 ± 25,43 <sup>a, b</sup>	49,57 ± 42,35 <sup>a</sup>	64,42 ± 47,9 <sup>a, b</sup>	0,057 ± 0,05 <sup>a, c</sup>	29,7 ± 24,72 <sup>a, c</sup>	39,82%
Controle oleoso 5%	26,09 ± 21,27 <sup>a, b</sup>	48,06 ± 35,9 <sup>a, b</sup>	37,69 ± 38,99 <sup>b, c</sup>	0,048 ± 0,04 <sup>a, c</sup>	13,19 ± 16,43 <sup>b, c</sup>	73,27%
Suspensão fúngica	43,66 ± 16,52 <sup>a</sup>	70,44 ± 22,24 <sup>a</sup>	75,00 ± 33,23 <sup>a, b</sup>	0,081 ± 0,03 <sup>a</sup>	35,41 ± 20,43 <sup>a</sup>	28,25%
Formulação fúngica 1%	14,22 ± 15,96 <sup>b, c</sup>	22,72 ± 26,04 <sup>b, c</sup>	14,81 ± 30,35 <sup>c</sup>	0,026 ± 0,02 <sup>b, c</sup>	4,95 ± 10,68 <sup>b</sup>	89,96%
Formulação fúngica 3%	1,56 ± 7,58 <sup>c</sup>	1,74 ± 7,64 <sup>c</sup>	1,53 ± 7,84 <sup>c</sup>	0,002 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,59 ± 3,03 <sup>b</sup>	98,79%
Formulação fúngica 5%	1,71 ± 8,73 <sup>c</sup>	3,48 ± 17,77 <sup>c</sup>	3,84 ± 19,61 <sup>c</sup>	0,003 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,71 ± 8,73 <sup>b</sup>	96,53%

Controle aquoso (suspensão aquosa de Tween 80<sup>®</sup> a 1%); controle oleoso a 1%, 3% ou 5% (emulsão de óleo de milho, Tween 80<sup>®</sup> a 1% e silicone a 0,01%); suspensão fúngica (suspensões aquosas de Tween 80<sup>®</sup> a 1% a 10<sup>7</sup> conídios/mL; e formulado por fungos [emulsão de conídios em óleo de milho (1%, 3% ou 5%) e óleo de silicone (0,01%) em Tween 80<sup>®</sup> a 1%]). O bioensaio foi conduzido em condições controladas (27 ± 1°C e UR ≥ 80%). Médias com a mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente considerando  $P < 0,05$  (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

**Tabela 3:** Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* imersas em suspensão ou formulações oleosas de *Cordyceps javanica* a  $10^8$  conídios/mL em condições in vitro

Tratamento	Índice de produção de ovos	Índice nutricional	Percentual de eclosão (%)	Peso da postura (g)	Eficiência reprodutiva (%)	Percentual de Controle (%)
Controle aquoso	45,88 ± 16,83 <sup>a</sup>	74,48 ± 16,07 <sup>a</sup>	92,31 ± 27,17 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,02 <sup>a</sup>	45,56 ± 17,28 <sup>a</sup>	-
Controle oleoso 1%	39,23 ± 17,07 <sup>a</sup>	66,64 ± 27,81 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	0,073 ± 0,03 <sup>a, c</sup>	39,23 ± 17,07 <sup>a</sup>	20,50%
Controle oleoso 3%	30,29 ± 25,43 <sup>a, b</sup>	49,57 ± 42,35 <sup>a</sup>	64,42 ± 47,9 <sup>a, b</sup>	0,057 ± 0,05 <sup>a, c</sup>	29,7 ± 24,72 <sup>a, c</sup>	39,82%
Controle oleoso 5%	26,09 ± 21,27 <sup>a, b</sup>	48,06 ± 35,9 <sup>a, b</sup>	37,69 ± 38,99 <sup>b, c</sup>	0,048 ± 0,04 <sup>a, c</sup>	13,19 ± 16,43 <sup>b, c</sup>	73,27%
Suspensão fúngica	43,11 ± 17,28 <sup>a</sup>	66,23 ± 22,99 <sup>a</sup>	97,31 ± 11,77 <sup>a</sup>	0,079 ± 0,03 <sup>a</sup>	41,99 ± 17,97 <sup>a</sup>	14,92%
Formulação fúngica 1%	15,94 ± 15,36 <sup>b, c</sup>	30,88 ± 29,11 <sup>b, c</sup>	20,19 ± 37,05 <sup>b, c</sup>	0,030 ± 0,03 <sup>b, c</sup>	5,03 ± 12,3 <sup>b</sup>	89,79%
Formulação fúngica 3%	3,35 ± 10,04 <sup>c</sup>	6,67 ± 20,09 <sup>c</sup>	2,69 ± 9,6 <sup>c</sup>	0,0065 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,89 ± 3,60 <sup>b</sup>	98,18%
Formulação fúngica 5%	0,13 ± 0,68 <sup>c</sup>	0,44 ± 2,25 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0,0002 ± 0,001 <sub>b</sub>	0 ± 0 <sup>b</sup>	100%

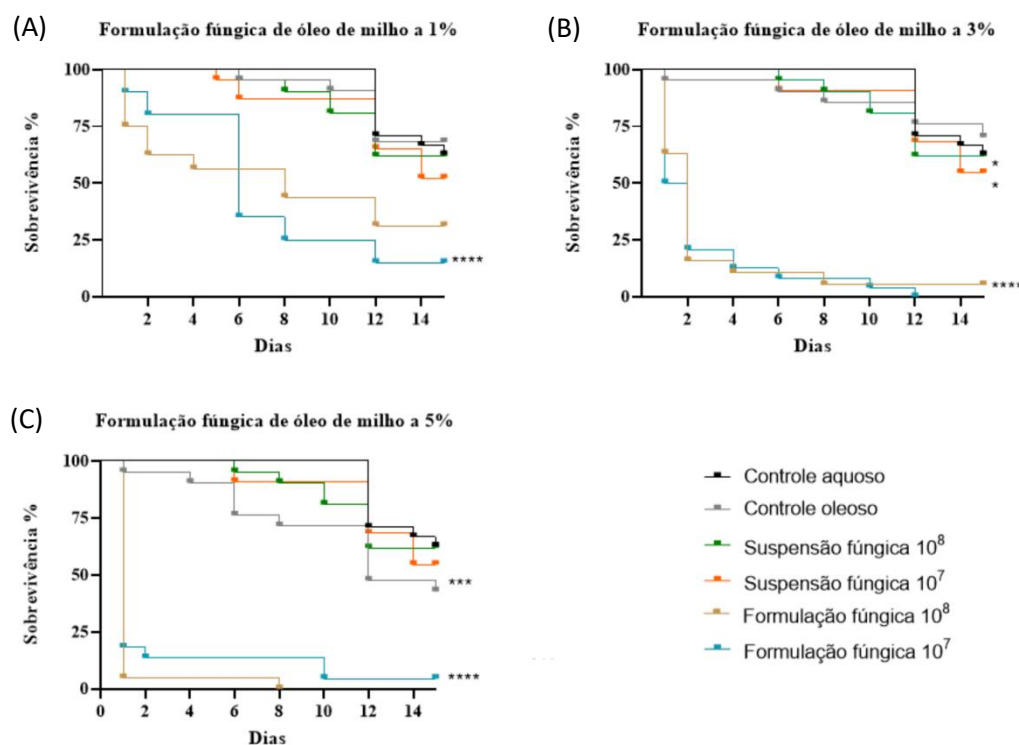
Controle aquoso (suspensão aquosa de Tween 80<sup>®</sup> a 1%); controle oleoso a 1%, 3% ou 5% (emulsão de óleo de milho, Tween 80<sup>®</sup> a 1% e silicone a 0,01%); suspensão fúngica (suspensões aquosas de Tween 80<sup>®</sup> a 1% a  $10^8$  conídios/mL; e formulado por fungos [emulsão de conídios em óleo de milho (1%, 3% ou 5%) e óleo de silicone (0,01%) em Tween 80<sup>®</sup> a 1%]). O bioensaio foi conduzido em condições controladas ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $\geq 80\%$ ). Médias com a mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente considerando  $P < 0,05$  (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

A sobrevivência do carrapato foi comparada entre concentrações do fungo, considerando a mesma concentração de óleo de milho (ou seja, 1%, 3% ou 5%) (Figura 5). A sobrevivência das fêmeas do controle aquoso não foi diferente daquelas no controle de óleo 1% ( $\chi^2 = 0,50$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,477$ ) 15 dias após o tratamento (Figura 5-A). Por outro lado, a sobrevivência do carrapato no tratamento com fungo formulado 1% a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 31$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,0001$ ) ou  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2 = 25,6$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,0001$ ) foi menor do que no controle aquoso. Não foram observadas diferenças na sobrevivência do carrapato entre o controle aquoso e a suspensão fúngica a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 2,57$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,108$ ) ou  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2 = 2,62$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,105$ ).

Para a concentração de 3% de óleo de milho, os carrapatos do controle aquoso tiveram maior sobrevivência do que o controle de óleo 3% ( $\chi^2 = 4,86$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,027$ ), fungo formulado a 3% a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 55,3$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,0001$ ) ou  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2 = 47,4$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,0001$ ) (Figura 5-B). Não houve diferença significativa na sobrevivência do carrapato do controle aquoso e da suspensão fúngica a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 2,47$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,108$ ) ou  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2 = 2,62$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,105$ ). Assim como o fungo formulado a 3% a  $10^8$  conídios/mL e o fungo formulado a 3% a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 0,81$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,366$ ).

Quanto à análise com 5% de óleo de milho, o controle aquoso apresentou maior sobrevivência que o controle com óleo 5% ( $\chi^2 = 9,08$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,0026$ ), fungo formulado a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 48,9$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,0001$ ) ou  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2 = 55,6$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,0001$ ). Não foram observadas diferenças na sobrevivência entre o controle aquoso e a suspensão fúngica a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 2,57$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,11$ ) ou  $10^8$  conídios/mL ( $\chi^2 = 2,62$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,105$ ) (Figura 5-C). Da mesma forma, a sobrevivência do fungo formulado a 5% a  $10^8$  conídios/mL não foi diferente do fungo formulado a 5% a  $10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 0,61$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,431$ ).



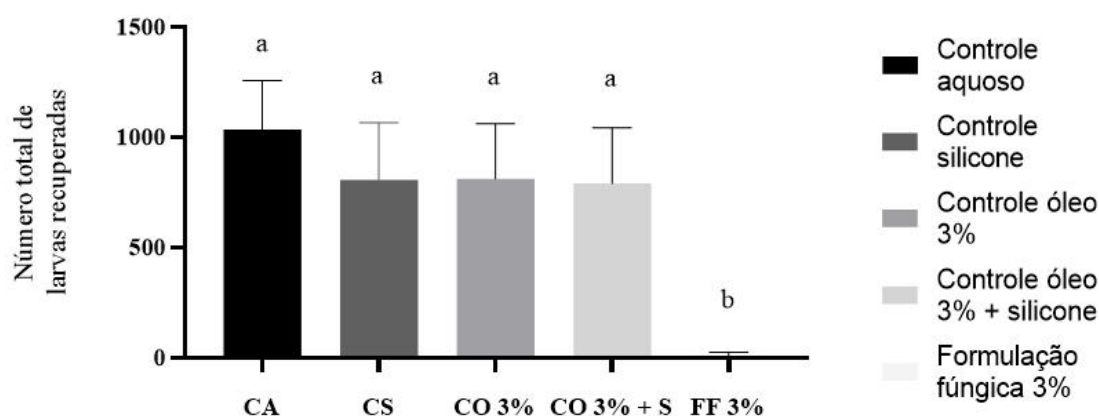


**Figura 5:** Efeito do *Cordyceps javanica* formulado na sobrevivência de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas topicamente. (A) Formulação fúngica de óleo de milho a 1%; (B) Formulação fúngica de óleo de milho a 3%; e (C) Formulação fúngica de óleo de milho a 5%. Sobrevivência percentual média e desvio padrão, de acordo com Log-rank ( $P < 0,05$ ). Experimentos representativos de três repetições independentes são mostrados, onde (\*\*) representa uma diferença estatística entre o controle aquoso e o controle de óleo da formulação fúngica de óleo de milho a 3% ( $P = 0,027$ ), (\*\*\*) representa uma diferença estatística entre o controle aquoso e o controle de óleo da formulação fúngica de óleo de milho a 5% ( $P = 0,0026$ ), (\*\*\*\*) representa uma diferença estatística entre o controle aquoso e o fungo formulado com  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL de formulação fúngica de óleo de milho a 1%, 3% e 5% ( $P < 0,0001$ ).

#### 4.4 Ensaio biológico usando fêmeas de *Rhipicephalus microplus* em condições de semi-campo

A umidade relativa do ar (UR) e a temperatura média foram verificadas diariamente no portal do Instituto Nacional de Meteorologia de acordo com as coletas de solo. As médias

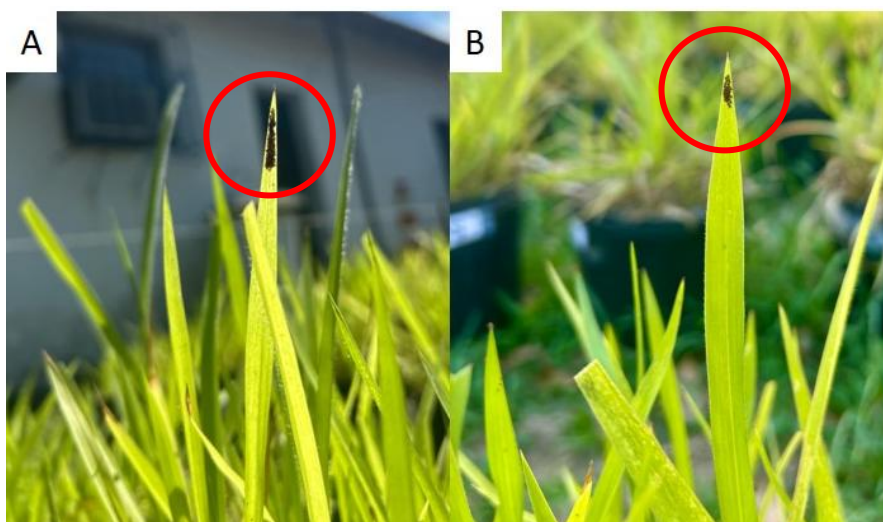
de acordo com cada semana foram agrupadas sendo, 1ª 57% e 27,33 °C, 2ª semana 74% e 24,10 °C, 3ª semana 67% e 25,98 °C, 4ª semana 66% e 24,92 °C e 5ª semana 75% e 24,08 °C, respectivamente. O número médio de larvas recuperadas e o erro padrão demonstram diferenças significativas entre os tratamentos ( $F_{92,48} = 4,49$  e  $P < 0,0001$ ) (Figura 6). Fêmeas de *R. microplus* apresentaram mortalidade com 5 dias de tratamento em relação ao grupo controle aquoso (Figura 7-A), (Figura 7-B) e em 15 dias estavam totalmente colonizadas (Figura 7-C). O grupo controle aquoso apresentou a maior recuperação larval ( $1035 \pm 221,9$ ) (Figura 8-A), seguido pelo grupo controle silicone ( $807,2 \pm 258,8$ ).  $811,3 \pm 251$  larvas foram recuperadas do controle óleo de milho 3% + óleo de silicone 3%, enquanto  $790 \pm 253$  larvas foram recuperadas do controle com óleo 3%. Os vasos tratados com fungo formulado exibiram o menor número de larvas recuperadas ( $10,8 \pm 15,22$ ) (Figura 8-B).



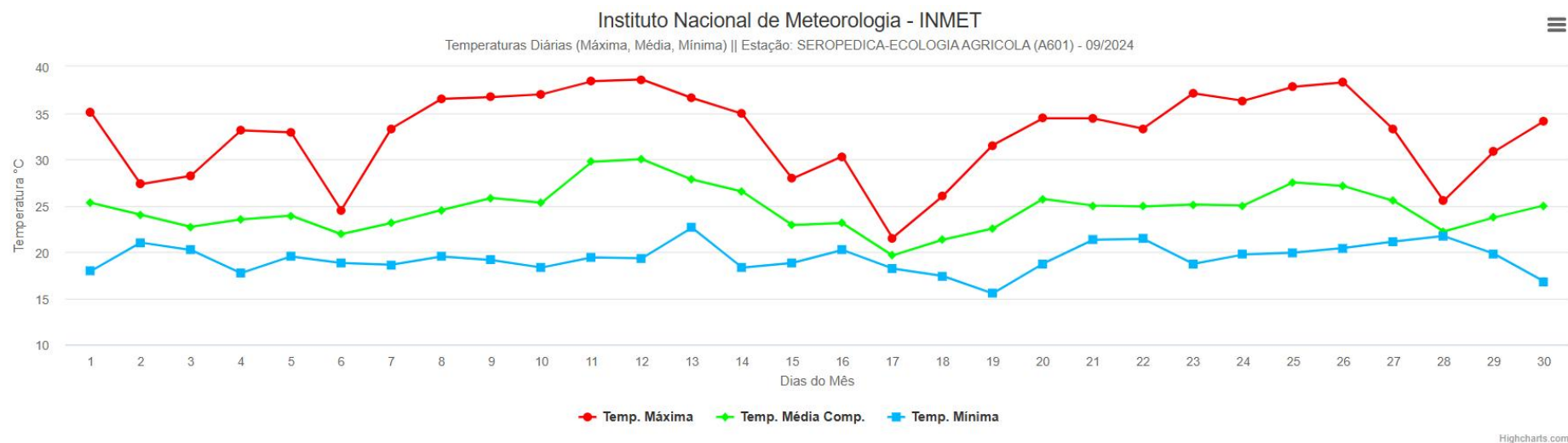
**Figura 6:** Média e desvio padrão do número de larvas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas de vasos de *Urochloa decumbens* 35 dias após tratamento fúngico. Controle aquoso: vasos tratados com suspensão aquosa de Tween 80® a 1%); Controle silicone: vasos tratados com emulsão de 0,01% de silicone mais 1% de Tween 80®; Controle óleo 3%: vasos tratados com emulsão de óleo de milho e Tween 80® a 1%; Controle óleo 3% e silicone: vasos tratados com emulsão de óleo de milho, 1% de Tween 80® e 0,01% de silicone; Fungo formulado 3%: emulsão de  $10^8$  conídios/mL em óleo de milho 3% e silicone (0,01%) em Tween 80® a 1%. Cada grupo teve dez vasos, que receberam três fêmeas totalmente ingurgitadas de peso homogêneo. A mesma letra não difere significativamente considerando  $P < 0,05$  (One Way ANOVA seguida de teste de Tukey).



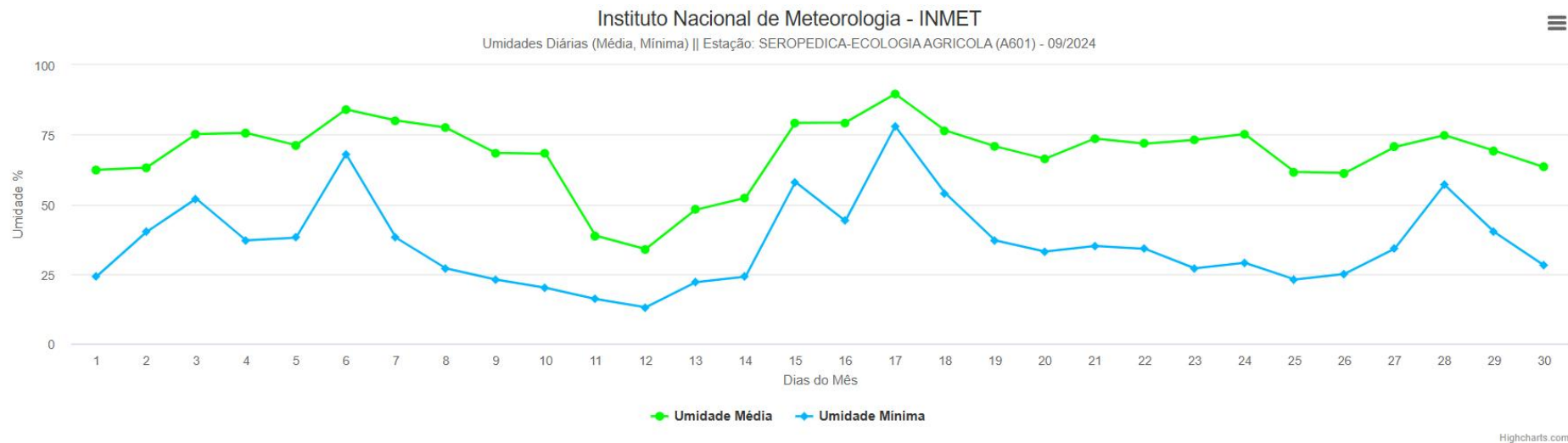
**Figura 7:** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (indicada pelo círculo) em vasos cultivados com *Urochloa decumbens*. (A) Fêmea do grupo controle aquoso; (B) Fêmea do grupo fungo formulado após 5 dias de tratamento; (C) Fêmeas do grupo fungo formulado após 15 dias de tratamento colonizadas por *Cordyceps javanica*. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025.



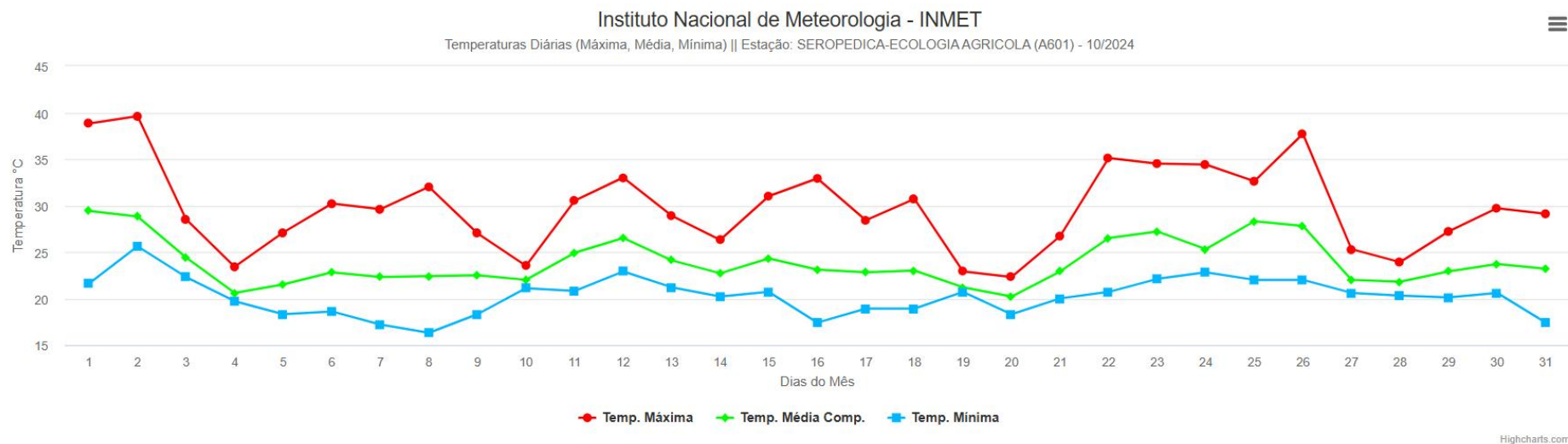
**Figura 8:** Larvas de *Rhipicephalus microplus* no ápice das folhas de *Urochloa decumbens* (indicada pelo círculo). (A) grupo controle aquoso; (B) grupo fungo formulado. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2025.



**Figura 9:** Temperatura máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em setembro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha vermelha indica a temperatura máxima; linha verde a temperatura média; linha azul temperatura mínima.

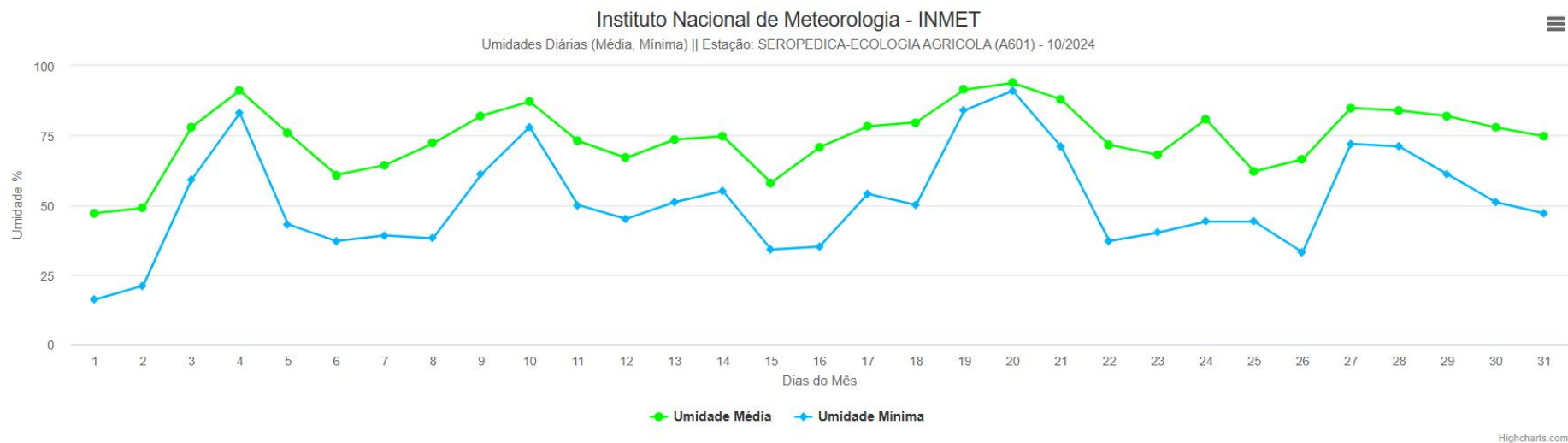


**Figura 10:** Valores de umidade relativa máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em setembro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha verde indica a umidade máxima e a linha azul umidade mínima.



**Figura 11:** Temperatura máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em outubro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha vermelha indica a temperatura máxima; linha verde a temperatura média; linha azul temperatura mínima.

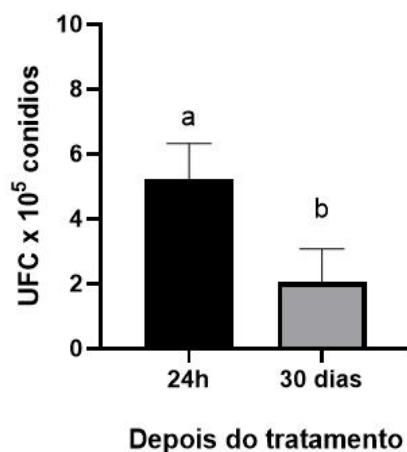




**Figura 12:** Valores de umidade relativa máxima, média e mínima de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia em outubro de 2024. As medições são realizadas de hora em hora. A linha verde indica a umidade máxima e a linha azul umidade mínima.

#### 4.5 Persistência de *Cordyceps javanica* em solo tratado

Nenhuma colônia de *Cordyceps* foi detectada nas amostras de solo dos vasos de controle (ou seja, controle aquoso, controle de silicone, controle de óleo 3% e controle de óleo 3% mais silicone). Colônias de *C. javanica* foram abundantes em todas as amostras de solo coletadas do grupo tratado com fungo (fungo formulado com 3% de óleo vegetal de milho e óleo de silicone). Os vasos tratados com fungo tiveram  $5,23 \pm 1,09 \times 10^5$  conídios/g e  $2,06 \pm 0,32 \times 10^5$  conídios/g UFC por grama de solo 24h após o tratamento e 30 dias após o tratamento, respectivamente ( $t = 3,36$ ;  $df = 19$ ;  $P = 0,0083$ ).



**Figura 13:** Unidade formadora de colônia (UFC) de *Cordyceps javanica* reisoladas dos vasos tratados com emulsão fúngica 24 horas e 30 dias após o tratamento. A análise estatística foi realizada com teste t pareado com correção de Welch's.



## 5 DISCUSSÃO

As etapas iniciais no desenvolvimento de uma formulação à base de óleo para um fungo entomopatogênico envolvem várias avaliações e otimizações críticas, incluindo a seleção de óleos compatíveis para validar que os adjuvantes da formulação não inibem o crescimento fúngico ou a germinação de esporos. Uma segunda etapa inclui ensaios preliminares de eficácia para garantir que a formulação à base de óleo mantenha a patogenicidade e virulência do isolado fúngico contra a praga alvo. Ao começar com essas etapas fundamentais, é possível identificar problemas iniciais e construir uma linha de base robusta para testes de campo subsequentes e desenvolver formulações que sejam eficazes para o controle de carrapatos (Samish et al., 2014).

Normalmente, os adjuvantes são adicionados para aumentar a estabilidade, adesão ou eficácia da formulação (Rosado-Aguilar et al., 2017). No presente estudo, a germinação de conídios de *C. javanica* foi avaliada após incubação com adjuvantes (1%, 3% e 5% de óleo de milho e óleo de silicone a 0,01%) por 1 hora e inoculados em placas de meio artificial por 24h e 48h. A avaliação da germinação fúngica garante que essas substâncias não inibiram ou afetaram a viabilidade dos conídios de *C. javanica*, que é o propágulo responsável por iniciar a infecção do carrapato no campo. Além disso, a utilização dos óleos como adjuvantes não afetou a estabilidade da formulação, mantendo a capacidade de liberação do fungo, estudos como o de Barbieri et al. (2023) relatam a não utilização do teste de compatibilidade o que impactou diretamente em resultados medianos para a aplicação dos tratamentos em campo resultando em faixas de 50% de controle. Quanto à adesão, os óleos de milho e de silicone apresentaram características favoráveis, melhorando a fixação do isolado na superfície do carrapato, o que potencializa o contato com o agente biológico e aumenta a eficácia do controle. Portanto, os resultados sugerem que os adjuvantes escolhidos são desejáveis, pois mantiveram a alta viabilidade fúngica, indicaram boa estabilidade e favoreceram a adesão. A aceitabilidade desses adjuvantes é respaldada pela manutenção da germinação e pela compatibilidade com os parâmetros de eficácia, estabilidade e adesão, essenciais para o sucesso da formulação.

Embora a germinação de conídios tenha sido maior que 98% em 24h e de 99% em 48h para todos os grupos, a análise estatística ainda indicou que, após 48h de incubação, o óleo de

milho não influencia a germinação de conídios mesmo nas concentrações mais altas testadas. Com base nesse resultado, a formulação pode ser preparada para posterior aplicação até 48h depois, confirmando que neste período de incubação, particularmente em concentrações mais altas, podem não afetar negativamente a viabilidade fúngica, além de não reduzir a eficácia do agente de biocontrole.

Após obtenção dos resultados positivos do óleo de milho, óleo de silicone e biocompatibilidade de *C. javanica*, o estudo avançou para os bioensaios *in vitro* com fêmeas e larvas de carrapatos. Muitos estudos já testaram a eficácia de fungos entomopatogênicos contra larvas de *R. microplus* e fêmeas ingurgitadas (Camargo et al., 2012; Quinelato et al., 2012; Angelo et al., 2012; Nogueira et al., 2020) relatando alta patogenicidade de diferentes espécies e isolados de fungos. No presente estudo, a suspensão fúngica (sem óleo adicionado) resultou em baixa mortalidade de carrapatos, indicando a virulência limitada deste isolado fúngico não formulado sob as condições testadas, assim como em demais estudos (Meirelles et al., 2023; Barbieri et al., 2023) (Tabelas 2 e 3). Além disso, a formulação contendo óleo de milho combinado com óleo de silicone, sem a presença de fungo, resultou em mortalidade de carrapatos, porém, os níveis de mortalidade não foram elevados o suficiente. Em contraste, a formulação oleosa contendo 5% de óleo de milho alcançou um controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* de 73%, demonstrando uma eficácia mais pronunciada em comparação às outras formulações testadas.

Os resultados do bioensaio *in vitro* com larvas e fêmeas destacaram a eficácia superior das emulsões fúngicas em comparação aos grupos controle e suspensões fúngicas não formuladas, independentemente da concentração de conídios. Em ambos os grupos,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL, as emulsões fúngicas demonstraram mortalidade significativamente maior de larvas de *R. microplus* e fêmeas ingurgitadas, com eficácia aumentando ao longo do tempo. Como esperado, entre os tratamentos testados, as emulsões fúngicas formuladas com maiores concentrações de óleo (3% e 5%) superaram consistentemente as concentrações mais baixas (1%) e as suspensões não formuladas, atingindo taxas de mortalidade larval de 95% em 5 dias após o tratamento no grupo de  $10^8$  conídios/mL. Nossa hipótese foi confirmada porque a adição de óleos minerais ou vegetais em formulações fúngicas pode aumentar a eficácia fúngica, o que pode ser explicado pela maior aderência dos conídios na cutícula proporcionada pelos adjuvantes oleosos presentes nas emulsões, que possuem propriedade lipofílica semelhante à parte mais externa da cutícula do carrapato (Angelo et al., 2010; Camargo et al., 2012, 2014; 2016; Kaaya; Hassan, 2000).

Aqui, a porcentagem de óleo nas emulsões testadas foi semelhante (Barbieri et al., 2023 -2,5%) ou muito menor do que em estudos anteriores [Angelo et al., 2010 (15% de óleo mineral), Camargo et al., 2012 (10% de óleo mineral), Kaaya; Hassan 2000 (15% de óleo de amendoim)]. Além da menor concentração de óleo, o óleo de milho foi escolhido porque os óleos vegetais são mais facilmente biodegradáveis, reduzindo seu impacto ambiental e o risco de contaminação do solo ou da água a longo prazo (Siniawski et al., 2007; Rosado-Aguilar et al., 2017; Lee et al., 2022). Curiosamente, efeitos sinérgicos foram observados nos testes *in vitro* com suspensões de  $10^8$  conídios/mL combinadas com 1%, 3% ou 5% de óleo de milho, com o maior  $\chi^2$  médio na concentração de 5% exibindo o poder micoacaricida da formulação. Além disso, as menores taxas de eclosão e índices de produção de ovos observados em laboratório com as formulações fúngicas (3% ou 5%) sugeriram que esses tratamentos interferem nos parâmetros reprodutivos das fêmeas, reduzindo a quantidade de ovos e a viabilidade das larvas, além de determinar a morte das fêmeas em um menor período de tempo.

A emulsão de 3% de óleo de milho, 0,01% de óleo de silicone, 1% de Tween 80® e  $10^8$  conídios/mL foi utilizada nos testes de semi-campo porque apresentou, nos testes de laboratório, os melhores resultados (estatisticamente não diferente de 5%). Dessa forma, foi possível utilizar um menor percentual de óleo, permitindo um uso mais racional e econômico dos insumos sem comprometer o desempenho do controle do carrapato. Os valores para utilização em campo, são o equivalente de 22 kg/ha de fungo, de acordo com as aplicações nos vasos do teste semi-campo, o que resulta em utilizar um maior percentual de óleo e menor quantidade isolado fúngico, evidenciando uma melhor viabilidade econômica dos tratamentos. *U. decumbens* foi escolhida como forragem neste ensaio para simular as condições de pastagem brasileira, uma vez que é uma forragem amplamente utilizada na pecuária brasileira devido à sua adaptabilidade a vários biomas (Ferreira et al., 2021). No ensaio de semi-campo, o grupo tratado com a emulsão fúngica reduziu drasticamente a recuperação de larvas em comparação aos grupos controle (Figura 2). Resultados parecidos com *R. microplus* em gramíneas infestadas artificialmente também foram relatadas com outras formulações a base de fungo entomopatogênico (Mesquita et al., 2020; Marciano et al., 2020). Aqui, as suspensões fúngicas não foram testadas no ensaio de semi-campo devido à sua baixa eficácia nos testes de laboratório. A redução significativa na recuperação larval no presente estudo sugere um impacto direto nos parâmetros biológicos e na mortalidade de fêmeas ingurgitadas, reforçando o potencial acaricida desta formulação de *Cordyceps* mesmo sob o efeito de

estressores abióticos, como altas temperaturas e radiação solar UV, prejudiciais ao fungo. Durante o experimento, observou-se variação na umidade relativa do ar, que oscilou entre 57% e 75%, e na temperatura média, entre aproximadamente 24 °C e 27 °C, condições que podem ter influenciado a dinâmica da infecção fúngica e a mortalidade. Estudos anteriores avaliaram a tolerância a radiação UV de conídios fúngicos em emulsões de óleo em água, indicando maiores tolerâncias de fungos formulados em comparação aos não formulados (Paixão et al., 2017; Corval et al., 2020; Arévalo-Rojas et al., 2023), sugerindo o papel fundamental do óleo na proteção da viabilidade dos conídios contra fatores abióticos em condições de campo (Mesquita et al., 2020; Marciano et al., 2020).

Conforme descrito na literatura, a sobrevivência dos conídios sob estresses abióticos pode ser aumentada pelo óleo, contribuindo para uma maior persistência dos fungos no solo (Marciano et al., 2020; Mesquita et al., 2020). No entanto, os resultados do presente estudo sugerem que a persistência dos fungos no solo pode não ser sempre consistente ao longo do tempo (Figura 2), indicando variabilidade devido às condições ambientais ou mesmo à espécie/isolado do fungo. Aqui, a análise do solo de vasos tratados com fungos 24 horas após o tratamento exibiu uma alta quantidade de UFCs de *C. javanica*, enquanto 30 dias após o tratamento houve uma redução significativa, ao contrário de estudos anteriores (Marciano et al., 2020; Mesquita et al., 2020). Essa diminuição pode ser atribuída à influência de fatores abióticos, como influência da temperatura, baixa umidade e alta radiação UV, que frequentemente impactam a viabilidade de fungos entomopatogênicos no solo, mas também pode ser atribuída à pouca adaptabilidade do fungo no ambiente do solo (Mesquita et al., 2023). Apesar disso, aqui o número total de UFC por grama de solo, 30 dias após o tratamento, foi maior (ou seja, 206.000 UFC/g de solo) do que em outros estudos com condições semelhantes [Mesquita et al. (2020) ~ 50.000 UFC/g de solo], sugerindo que, embora a persistência dos conídios de *C. javanica* tenha reduzido com o tempo, o número de conídios ainda foi suficiente para impactar na quantidade de larvas de *R. microplus* recém-eclodidas.

Os achados do presente estudo se alinham com pesquisas anteriores enfatizando a importância de explorar combinações entre fungos entomopatogênicos e óleos (Camargo et al., 2012; Marciano et al., 2020; Mesquita et al., 2020; Barbieri et al., 2023). A seleção do óleo de milho como adjuvante na formulação é sugerida para aumentar a adesão conidial à cutícula do carrapato, enquanto o óleo de silicone melhorou a espalhabilidade do produto final. Dado que

o uso de *C. javanica* permanece pouco explorado, este estudo representa uma contribuição significativa para o estado da arte no controle biológico de carrapatos usando bioinsumos.

## 6 CONCLUSÕES

A formulação de conídios de *Cordyceps javanica* associada a diferentes concentrações de óleo vegetal e óleo de silicone foi eficaz no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais e semi-campo.

O teste de compatibilidade evidenciou que a formulação manteve a germinação dos conídios acima de 98% após 24 e 48 horas de incubação, indicando a viabilidade do isolado fúngico para uso prático mesmo na maior concentração de óleo testado

Nos testes laboratoriais, a aplicação das formulações fúngicas demonstraram eficácia no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, com uma mortalidade significativa após 10 dias de tratamento, impactando nos parâmetros biológicos.

Em relação às larvas de *R. microplus*, as formulações também mostraram boa eficácia, com mortalidade observada após 5 dias de tratamento.

No teste semi-campo, a formulação selecionada de acordo com os testes *in vitro* sendo  $10^8$  conídios/ml com 3% de óleo vegetal de milho e 0,01% de óleo de silicone, obteve a menor recuperação larval, sugerindo que a formulação mantém a sua eficácia na presença de fatores abióticos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/>
- ALONSO-DÍAZ, M. A.; FERNÁNDEZ-SALAS, A. Entomopathogenic Fungi for Tick Control in Cattle Livestock From Mexico. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, p. 657694, 2021.
- ALVES-BRANCO, F. de P. J.; SAPPER, M. de F. M.; PINHEIRO, A. da C.; ALVES-BRANCO, L. R. F. Carrapato dos bovinos (*Boophilus microplus*): controle e resistência a carrapaticidas no Rio Grande do Sul. **EMBRAPA**, Circular Técnica 14, 2008.
- ALVES, F. M.; BERNARDO, C. C.; PAIXÃO, F. R. S.; BARRETO, L. P.; LUZ, C.; HUMBER, R. A.; FERNANDES, E. K. K. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: Viability (in vitro) and virulence (in vivo) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v. 115, p. 1-11, 2016.
- ALVES, R. T.; FARIA, M. R. de. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2010.
- ANDERSON, J. A.; COATS, J. R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 124-128, 2012.
- ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 2010.
- ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. **Embrapa**, 2019.
- ANGELO, I. C.; GÔLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; KLUCK, G. E.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V. R. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 1-2, p. 79-83, 2010

ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIANSE, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; GOLO, P. S.; MORAES, A. P. R.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. **Parasite Research**, v. 111, n. 4, p. 1473-1480, out. 2012.

ANGELO, I. C.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; PERINOTTO, W. M. S.; GÔLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; PINHEIRO, J.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Physiological changes in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) experimentally infected with entomopathogenic fungi. **Parasite Research**, v. 114, n. 1, p. 219-225, jan. 2015.

ARÉVALO ROJAS, V. M.; IWANICKI, N. S. A.; D'ALESSANDRO, C. P.; FATORETTO, M. B.; DEMÉTRIO, C. G. B.; DELALIBERA JR., I. Caracterização de isolados brasileiros de *Cordyceps fumosorosea*: produção de conídios, tolerância à radiação ultravioleta-B e temperatura elevada. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 197, p. 107888, mar. 2023.

ARREGUIN-PEREZ, C. A.; MIRANDA-MIRANDA, E.; FOLCH-MALLOL, J. L.; COSSÍO-BAYÚGAR, R. Identification of virulence factors in entomopathogenic *Aspergillus flavus* isolated from naturally infected *Rhipicephalus microplus*. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 2107, 2023.

BARBIERI, A.; RICO, I. B.; SILVEIRA, C.; FELTRIN, C.; DALL'AGNOL, B.; SCHRANK, A.; LOZINA, L.; KLAFKE, G. M.; RECK, J. Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 3, 102147, maio 2023.

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

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



BAXTER, G. D.; GREEN, P.; STUTTGEN, M.; BARKER, S. C. Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 907-914, 1999.

BEHLE, R. W.; WU, S.; TOEWS, M. D.; DUFFIELD, K. R.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Comparando a produção e eficácia de *Cordyceps javanica* com *Cordyceps fumosorosea*. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 2, p. 455-461, 2022.

BENNETT, G. F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (Acari: Ixodidae): influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, p. 52–61, 1974.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; ROSA, R. G.; 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* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, p. 1-29, 2020.

BOAVENTURA, H. A.; QUEIRÓS, L. A.; SILVA, J. F. A. E.; QUINTELA, E. D. Previsão de regiões agrícolas adequadas para o uso de *Cordyceps javanica* (Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Embrapa Arroz e Feijão**, 2022

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 89–96, 2011

BÓRIO, V. S.; CORRÊA, T. A.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; MEIRELLES, L. N.; CAMARGO, M. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; GOLO, P. S. Inhibition of dopamine activity and response of *Rhipicephalus microplus* challenged with *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 1312, 17 set. 2022.

BUNSAP, P.; SENARAT, S.; NIYOMDECHA, S.; PORNSURIYA, C.; KANEKO, G.; THAOCHAN, N. Alterações histopatológicas em *Nilaparvata lugens* após exposição a *Cordyceps javanica*. **Insetos**, v. 15, n. 8, p. 565, 2024.

BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Fungi as Biological Control Agents: progress, problems and potential. Wallingford: **CAB International**, 2001.

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.; 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.

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

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

CARNEIRO, A. S.; MESQUITA, E.; MEIRELLES, L. N.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; GOLO, P. S. Compatibility of different *Metarhizium* spp. propagules with synthetic acaricides for controlling *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, p. e018221, 2022.

CAROLINO, A. T. Formulação em óleo aumenta a persistência do fungo entomopatogênico para uso no controle do mosquito *Aedes aegypti* (díptera: culicidae). **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) — Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012

CASTRO-SAINES, E.; LAGUNES-QUINTANILLA, R.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, R. Microbial agents for the control of ticks *Rhipicephalus microplus*. **Parasite**, v. 31, n. 1, p. 12-23, 2024.

CHEN, J.; LING, M.; WAN, L.; CHEN, C.; LIU, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, B. The construction of molybdenum disulfide/cobalt selenide heterostructures @ N-doped carbon for stable and high-rate sodium storage. **Journal of Energy Chemistry**, v. 71, p. 1-11, ago. 2022.

CORRÊA, T. A.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; MEIRELLES, L. N.; CAMARGO, M. G.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCIANO, A. F.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; GOLO, P. S. How dopamine influences survival and cellular immune response of *Rhipicephalus microplus* inoculated with *Metarhizium anisopliae*. **Fungi (Basel)**, v. 7, n. 11, p. 950, 2021.

CORVAL, A. R. C.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; SILVA, C. S. R.; BITTENCOURT, R. O. B.; FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W.; GÔLO, P. S. Tolerâncias UV-B de conídios, blastosporos e microescleródios de fungos entomopatogênicos *Metarhizium* spp. **Journal of Basic Microbiology**, 2020.

COWLES, R. S.; COWLES, E. A.; MCDERMOTT, A. M.; RAMOUTAR, A. D. Inert formulation ingredients with activity: toxicity of trisiloxane surfactant solutions to twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 180-188, 2000.

D'Alessandro, W. B. (2012). Potencial de fungos para combate de carrapatos vetores da febre maculosa. [manuscrito]/ Walmirton Bezerra D'Alessandro. 141p

DA SILVA, J. B.; RANGEL, C. P.; BAÊTA, B. A.; FONSECA, A. H. Influence of the physiological state on infestation by *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 52-56, 2013.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. Uma revisão de dez anos do desempenho de vacinas comerciais para controle de infestações de carrapatos em gado. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 23-28, jun. 2007.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4313-4318, 2009.

DOMINGUES, M. M.; SANTOS, P. L.; GÊA, B. C. C.; CARVALHO, V. R.; OLIVEIRA, F. N.; SOLIMAN, E. P.; PEREIRA, F. F.; ZANUNCIO, J. C.; WILCKEN, C. F. *Cordyceps cateniannulata* e *Cordyceps javanica*: primeiro relato de patogenicidade para *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, Suppl. 3, e20211566, 2022.

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.

DZEMO, W. D.; THEKISOE, O.; VUDRIKO, P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. **Heliyon**, v. 8, n. 1, 2022

FANTATTO, R. R.; GAINZA, Y. A.; FIGUEIREDO, A.; SORRECHIA, R.; CHAGAS, A. C. S.; PIETRO, R. C. L. R. A associação de extratos de *Achyrocline satureioides* e do fungo *Beauveria bassiana* contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 87, n. 4, p. 351-363, ago. 2022.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001

FARIA, M.; MASCARIN, G. M.; SOUZA, D. A.; LOPES, R. B. Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para o manejo de invertebrados (insetos, ácaros, nematoides) em sistemas agropecuários. **Embrapa**, 2022.

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

FERREIRA, R. C. U.; MORAES, A. C. L.; CHIARI, L.; SIMEÃO, R. M.; VIGNA, B. B. Z.; SOUZA, A. P. Uma visão geral da genética e genômica das espécies de *Urochloa* mais comumente usadas em pastagens. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, e770461, 2021.

FOIL, L. D.; COLEMAN, P.; EISLER, M.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GUERRERO, F. D.; JONSSON, N. N.; LANGSTAFF, I. G.; LI, A. Y.;

MACHILA, N.; MILLER, R. J.; MORTON, J.; PRUETT, J. H.; TORR, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 163-181, 28 out. 2004.

FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ, I. S. Caracterização da resistência aos acaricidas em *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 109-117, 2005.

GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G. A.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G. J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, supl. S1, p. S427–S442, 2004.

GREWAL, P. S.; EHLERS, R.-U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Nematodes as biocontrol agents. Wallingford: **CABI Publishing**, 2005. 505 p.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; DE BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; DE LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

HUMBER. Preservation of entomopathogenic fungal cultures. **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, p. 317–327, 2012.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1-10, 2006.

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

KEPLER, R. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; QUANDT, C. A.; SUNG, G. H.; REHNER, S. A.; AIME, M. C.; HENKEL, T. W.; SANJUAN, T.; ZARE, R.; CHEN, M.; LI, Z.; ROSSMAN, A. Y.; SPATAFORA, J. W.; SHRESTHA, B. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). **IMA Fungus**, v. 8, n. 2, p. 335–353, 2017.

KIM, J. S.; JE, Y. H.; WOO, E. O.; PARK, J. S. Persistência de conídios SFP-198 de *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) em suspensão à base de óleo de milho. **Mycopathologia**, v. 171, n. 1, p. 67-75, jan. 2011.

KLAFKE, G. M.; GOLO, P. S.; MONTEIRO, C. M. O.; COSTA-JUNIOR, L. M.; RECK, J. Brazil's battle against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks: current strategies and future directions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, p. e001423, 2024.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; DE ALBUQUERQUE, T. A.; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 386-390, 2006.

LEE, CHIEW TIN; LEE, MEI BAO; MONG, GUO REN; CHONG, WILLIAM WOEI FONG. A bibliometric analysis on the tribological and physicochemical properties of vegetable oil-based bio-lubricants (2010-2021). **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 29, n. 37, p. 56215-56248, ago. 2022.

LOPES, R. B.; MARTINS, I.; SOUZA, D.; FARIA, M. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. 3, p. 236–242, 2013.

LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; INGLIS, P. W.; FARIA, M. Diversidade de *Cordyceps* anamórficos (anteriormente *Isaria*) isolados de sítios agrícolas brasileiros. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 200, p. 107956, 2023.

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

MARCIANO, A. F.; GOLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; CAMARGO, M. G.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) oil-in-water emulsions drastically reduced

*Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 1, p. 1, 15 abr. 2020.

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. **Scientific Reports**, v. 11, p. 4972, 2 mar. 2021.

MARQUES, C. B.; RAMOS, F.; FERNANDES, F.; SANGIONI, L. A.; KOMMERS, G.; UNTERLEIDER, C. E.; FLORES VOGEL, F. S. Avaliação da atividade acaricida in vitro e in vivo de siloxanos organo-modificados em populações de *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & Vectors**, v. 269, p. 53-56, maio 2019.

MARTHE, E. D. B.; BITTENCOURTE, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, p. 1389-1393, 2010.

MASCARIN, G. M.; GOLO, P. S.; RIBEIRO-SILVA, C. de S.; MUNIZ, E. R.; FRANCO, A. de O.; KOBORI, N. N.; FERNANDES, É. K. K. Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, p. 451, 2024.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Org.). Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica. 1. ed. Viçosa: U.R. **EPAMIG ZM**, 2010. v. 4, p. 169-195.

MEIRELLES, L. N.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; BITENCOURT, R. O. B.; OLIVEIRA, J. L.; FRACETO, L. F.; CAMARGO, M. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Encapsulation of entomopathogenic fungal conidia: evaluation of stability and control potential of *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 14, n. 4, p. 102184, jul. 2023.

MESQUITA, E.; HU, S.; LIMA, T. B.; GOLO, P. S.; BIDOCHKA, M. J. Utilization of *Metarhizium* as an insect biocontrol agent and a plant bioinoculant with special reference to Brazil. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 4, p. 1, 2023.

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**, v. 65, p. 353-362, 2 mar. 2020.

MILER-DA-SILVA, L. L.; GARRIDO, R. G. Organofosforados e organoclorados: toxicologia médica e reflexos ambientais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, 2021.

MONTEIRO, C. M.; MATOS, R. da S.; ARAÚJO, L. X.; CAMPOS, R.; BITTENCOURT, V. R.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J.; PRATA, M. C. Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 3-4, p. 310-317, 14 jul. 2014.

MUNIZ, E. R.; PAIXÃO, F. R. S.; BARRETO, L. P.; LUZ, C.; ARRUDA, W.; ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* conidia in oil-in-water emulsion against the tick *Rhipicephalus microplus* under heat and dry conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 65, p. 339-351, 2020.

MURILLO-ALONSO, K. T.; TORIELLO, C.; SALAZAR-MAGALLÓN, J. A.; HERNÁNDEZ-BALTAZAR, E. Evaluation of *Isaria javanica* (Hypocreales: Cordycipitaceae) oil dispersion formulations for the control of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Journal of Applied Entomology**, out. 2023.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169-172, 2003.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. Acesso em: 06 jun. 2024.



NOGUEIRA, M. R. D. S.; CAMARGO, M. G.; RODRIGUES, C. J. B. C.; MARCIANO, A. F.; QUINELATO, S.; FREITAS, M. C.; FIOROTTI, J.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Eficácia in vitro de dois produtos comerciais de *Metarhizium anisopliae* s.l para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 2, e000220, 2020.

OJEDA-CHI, M. M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 348-354, 2010.

OU, D.; REN, L. M.; LIU, Y.; ALI, S.; WANG, X. M.; AHMED, M. Z.; QIU, B. L. Identificação, patogenicidade e condições de cultivo de um novo isolado de *Cordyceps javanica* do solo. **Insetos**, v. 10, n. 12, p. 425, 2019.

PAIXÃO, F.R.S.; MUNIZ, E.R.; BARRETO, L.P.; BERNARDO, C.C.; MASCARIN, G.M.; LUZ, C.; FERNANDES, E.K.K. Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii*. **Biocontrol Science and Technology**, DOI: 10.1080/09583157.2017.1281380, 2017

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

QUINELATO, S. B.; 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, n. 3-4, p. 556-565, 2012.

RECK, J.; COSTA-JUNIOR, L. M.; MONTEIRO, C. M. O.; GOLO, P. S.; KLAFKE, G. M. A múltipla resistência dos carrapatos a diferentes classes de acaricidas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 408-414, 2014.

ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H. K. Pesticide bioassays with arthropods. **Boca Raton: CRC Press**, 1992.

- 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. **Parasitology Research**, v. 117, p. 3-29, 2018.
- ROSADO-AGUILAR, J. A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M. E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ALZINA-LÓPEZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E. J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66-76, 30 abr. 2017
- SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 206, p. 258–266, 2014.
- SANTOS, G. B.; GOMES, I. M. M.; SILVEIRA, J. A. G.; PIRES, L. C. S. R.; AZEVEDO, S. S.; ANTONELLI, A. C.; RIBEIRO, M. F. B.; HORTA, M. C. Tristeza Parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2017.
- SILVA, J. P.; BORGES, L. M. F.; MARTINS, J. R. Óleos essenciais como alternativa ao controle de carrapatos em bovinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 12, p. 21-31, 2018.
- SINIAWSKI, MATTHEW T.; SANIEL, NADER; ADHIKARI, BIGYAN; DOEZEMA, LAMBERT A. Influence of fatty acid composition on the tribological performance of two vegetable-based lubricants. **Lubrication Science**, 19 mar. 2007.
- SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 89–131, 1989
- SUMERA, N. S.; IQBAL, S. S.; KHAN, S. T.; REHMAN, Z. U. *Fusarium oxysporum* and its entomopathogenic activity enhanced with acidic silver nanoparticles against *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2023.
- SUNG, Gi-Ho; HYWEL-JONES, Nigel L.; SUNG, Jae-Mo; LUANGSA-ARD, J. Jennifer; SHRESTHA, Bhushan; SPATAFORA, Joseph W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, p. 5-59, 2007.

- SUNGUIRAI, M.; BARON, S.; MOYO, D. Z.; DE CLERCQ, P.; MARITZ-OLIVIER, C.; MADDER, M. Genotyping acaricide resistance profiles of *Rhipicephalus microplus* tick populations from communal land areas of Zimbabwe. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, p. 2–9, 2018.
- SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; LOBO DE SOUZA, M. Baculoviruses - Re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 143–160, 2006.
- TEMEYER, K. B.; PRUETT, J. H.; OLAFSON, P. U. Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 114-121, 2010.
- VERÍSSIMO, C. J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 1, 2013.
- WANG, L.; LAI, Y.; CHEN, J. J.; CAO, X.; ZHENG, W.; LING-DONG, P.; ZHENG, Y.; LI, F.; WEI, G.; WANG, S. A via regulatória ASH1-PEX16 controla a biogênese do peroxissomo para infecção de insetos mediada por apressório por um patógeno fúngico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 120, e2217145120, 2023.
- WEI, T.; ZENG, J.; OWATWORK, KA; CHAMYUANG, S. *Cordyceps militaris*: uma fábrica de células microbianas para a produção de cordicepina . In: **Cordyceps e espécies aliadas**. pág. 337-359, 23 jan. 2025
- WU, X.; WU, T.; HUANG, A.; SHEN, Y.; ZHANG, X.; SONG, W.; WANG, S.; RUAN, H. New insights into the biosynthesis of typical bioactive components in the traditional Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 801721, 17 dez. 2021.
- ZEINA, G. W.; AHMED, M.; SAEED, M.; ZIENA, L.; LAING, M. Field evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for the biocontrol of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) ticks on cattle. **Experimental Parasitology**, v. 235, p. 108215, 2022.