

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

TESE

AVALIAÇÃO DO METARRIL WP[®] NO CONTROLE DE
Rhipicephalus microplus SOB CONDIÇÕES NATURAIS

Michel Ruan dos Santos Nogueira

2018



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

AVALIAÇÃO DO METARRIL WP[®] NO CONTROLE DE
Rhipicephalus microplus **SOB CONDIÇÕES NATURAIS**

MICHEL RUAN DOS SANTOS NOGUEIRA

Sob a Orientação da Professora Dra.
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

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

Seropédica, RJ
Agosto de 2018

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

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

N778a Nogueira, Michel Ruan dos Santos, 1989-
AVALIAÇÃO DO METARRIL WP® NO CONTROLE DE
Rhipicephalusmicroplus SOB CONDIÇÕES NATURAIS / Michel
Ruan dos Santos Nogueira. - Seropédica, 2018.
66 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2018.

1. controle biológico. 2. fungos
artropodopatogênicos. 3. formulações fúngicas. 4.
carrapatos. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro
, 1959-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias III. Título.



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



ATA Nº 3465/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.043059/2024-09

Seropédica-RJ, 16 de agosto de 2024.

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

MICHEL RUAN DOS SANTOS NOGUEIRA

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

TESE APROVADA EM 31/08/2018

(Assinado digitalmente em 27/08/2024 21:39)
ISABELE DA COSTA ANGELO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###602#7

(Assinado digitalmente em 28/08/2024 13:29)
PATRICIA SILVA GOLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
AI-UFRRJ (12.28.01.00.00.50)
Matricula: ###218#5

(Assinado digitalmente em 27/08/2024 18:57)
VANIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: ###79#2

(Assinado digitalmente em 28/08/2024 16:48)
GISELA LARA DA COSTA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.867-##

(Assinado digitalmente em 29/08/2024 10:50)
SIMONE QUINELATO BEZERRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.407-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3465, ano: 2024,
tipo: ATA, data de emissão: 16/08/2024 e o código de verificação: 9d5231a7df

Dedico este trabalho,

A Deus,

Aos meus pais, Rubens Tarcizio Nogueira e Zilda Ap^a Santos Nogueira,

A minha esposa Vanessa Cristina Souza Cortez Nogueira,

A minha filha Laura Cortez Nogueira,

Aos professores,

Aos colegas

E a todos que contribuíram para conclusão de mais uma etapa de minha vida.

“Não queira que a vida seja mais fácil.

Deseje que você seja ainda melhor.”

(Jim Rohn)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por estarem sempre presentes em minha vida, me dando força, saúde e sabedoria e por permitirem chegar até aqui, me guiando sempre.

Agradeço aos meus amados pais Rubens e Zilda, que sempre estiveram do meu lado, fazendo de tudo para o meu bem, sempre me apoiando e aconselhando, mostrando o melhor caminho, fazendo ser essa pessoa que sou hoje. Agradeço a eles pelo carinho incondicional e a educação que me deram, pois tudo do pouco que sou hoje devo a eles.

Agradeço a minha esposa Vanessa, por todo seu amor, carinho, cumplicidade e paciência. Por ser minha confidente estando firme e me apoiando em todas as horas de minha vida. Te amo!

Agradeço a minha filha Laurinha, que desde a descoberta de sua chegada, tornou-se benção em minha vida, mostrando realmente o valor da vida e do amor. Onde em um simples olhar, sabemos a mensagem que precisa ser transmitida. “Tumtum”, o papai Te ama muito!

Agradeço a todos os professores do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em especial agradeço minha orientadora Professora Dra.Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança permitindo meu crescimento acadêmico e pessoal. Obrigado Profª Vânia por tornar um sonho realidade.

Agradeço aos Professores Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto e Dr. Caio Monteiro pela paciência, disponibilidade em sempre ajudar, pela presença e conselhos tanto em minha vida acadêmica quanto pessoal.

Agradeço a CAPES, pelos recursos ofertados, permitindo o adequado desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todos os professores da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá. De maneira especial quero agradecer a Profª Dra. Regina Silva dos Santos, ao Profª MSc. Rodolfo Malagó, ao Profª Dr. Dêlcio Bueno e ao Profª MSc. Manoel Leite pelos incentivos, ensinamentos, oportunidades e confiança depositada em mim.

Agradeço aos membros que compuseram a banca examinadora, as sugestões e correções abordadas enriqueceram ainda mais este trabalho.

Agradeço a todos meus colegas pelo apoio, convívio, troca de conhecimentos. De maneira especial quero agradecer:

Agradeço de coração aos “irmãos” do Laboratório de Controle Microbiano: Caio Balduino, Didi, Allan, Fillipe, Caio Monteiro, Mariana, Simone, Patrícia, Maria, Jéssica, Isabele Ângelo e Adonis. Obrigado pessoal pelo apoio imensurável, nunca esquecerei o que cada um fez por mim durante esta jornada.

Aos colegas de Doutorado: pela paciência, compreensão e pela amizade construída.

Aos colegas de Alojamento: Gabriel, Rodrigo, Valmir, Gilsonley, David, Alan, Ivis, Diego, Hermes, Felipe, Elias, Samuel, Elcio, Davi, Paraná e Gideão. Obrigado gente pelo convívio, pela troca de conhecimentos e pela amizade construída.

Aos amigos do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores: Marquinhos, Claudinha, Dani, Renata, Maristela e Gabriela pela convivência e amizade construída.

Agradeço a todos os funcionários do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e da Estação Experimental W. O. Neitz, em especial ao Arthur, Ivan, Mauricio e Zecapela amizade e disponibilidade em sempre ajudar, em concretizar este sonho.

Agradeço a todos da equipe Fazenda São Bento, pela disponibilidade, atenção e apoio durante os experimentos. Agradeço ainda, pela confiança!

BIOGRAFIA

Michel Ruan dos Santos Nogueira, filho de Rubens Tarcizio Nogueira e Zilda Aparecida Santos Nogueira, nasceu na cidade de Itajubá-MG, no dia 13 de setembro de 1989. Cursou o Ensino Fundamental na Escola Estadual Marquês de Sapucaie Ensino Médio e Técnico na Fundação ROGE “Escola Técnica Limassis”, formando em Técnico em Pecuária no ano de 2007, ambos na cidade de Delfim Moreira-MG. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá (FEPI) em fevereiro de 2008. Durante toda graduação atuou participando de eventos locais e congressos, sendo no ano de 2011 selecionado como monitor do Laboratório de Parasitologia Animal, desenvolvendo estudos nas áreas de diagnóstico parasitológico e controle biológico de carrapatos com fitoterápicos. Em dezembro de 2012 obteve o título de Médico Veterinário. Em março de 2013 iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt e co-orientação do Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto. Em setembro de 2014, defendeu sua dissertação, recebendo o título de Mestre em Ciências. No mesmo ano, por meio de mudança de nível, ingressou no doutorado, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

RESUMO

NOGUEIRA, Michel Ruan dos Santos. **Avaliação do Metarril WP no controle de *Rhipicephalus microplus* sob condições naturais**. 2018.68p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é responsável por causar severos prejuízos ao agronegócio. Alternativas de controle são importantes para minimizar os efeitos causados pelo uso indiscriminado de acaricidas químicos. Assim, fungos artropodopatogênicos tornam-se promissores para a manutenção de níveis aceitáveis da população de carrapatos. Atualmente, existem no mercado produtos fúngicos com efeito inseticida reconhecido em pragas da agricultura, baseado nisso, o presente estudo avaliou a eficácia da apresentação comercial de Metarril WP[®] (Koppert Biological Systems) sob canteiros artificialmente infestados e baias naturalmente infestadas por espécimes de *R. microplus*. Os experimentos foram divididos em duas etapas: estudo em canteiros e em baias. Para os estudos em canteiros, foram preparados 45 canteiros de um metro quadrado, formados por *Brachiaria brizantha* cultivar Marandú. Foram formados nove grupos com diferentes tratamentos: Controle, Controle D0 400, Controle D15 400, Controle D0 800, Controle D15 800, Metarril D0 400, Metarril D15 400, Metarril D0 800 e Metarril D15 800. Os termos “D0 e D15”, referem-se ao número de pulverizações (única ou dupla respectivamente) e os termos “400 e 800” relacionados ao volume em mililitros por m². Com exceção do grupo Controle, os demais tratamentos foram acrescidos de 1% de Tween 80[®] e 10% de óleo mineral. Já aos grupos “Metarril”, foi incorporado conídios de *M. anisopliae*, na concentração de 1×10^9 conídios/mL. Cada grupo foi composto por cinco repetições. Cada canteiro recebeu tratamento por meio de pulverização manual e, em seguida foram alocadas 20 fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em cada. Ao final do experimento, foi efetuada a recuperação das larvas vivas, por meio da técnica da flanela, para a verificação da eficácia dos tratamentos. Os experimentos em baias naturalmente infestadas, desenvolveu-se no setor de cria da Fazenda São Bento, em Cachoeira Paulista, SP. Foram utilizadas 22 baias de 20 m², que alojavam de maneira individual bezerras Girolando. Formou-se dois grupos: Controle e Tratado, onde ambos continham 1% de Tween 80[®] e 10% de óleo vegetal. Exclusivamente ao grupo Tratado, foi incorporado Metarril WP[®], na concentração de 1×10^7 conídios/mL (1×10^9 conídios/m²). A alocação dos animais em cada grupo (11 controles e 11 tratados), ocorreu por meio do grau de infestação dos animais nos dias -3, -2 e -1, ao início dos tratamentos. Semanalmente, o ambiente das baias recebeu pulverizações manuais com quatro litros da respectiva formulação. Para a verificação da eficácia do produto Metarril WP[®] foram efetuadas contagens dos espécimes de *R. microplus* entre 4,5 e 8 mm de diâmetro presentes nos animais e também pesagens mensais, para acompanhamento do desempenho dos animais. Foram obtidos percentuais de eficácia variando entre 31,5% a 72,6% e de 23% a 88%, nos experimentos em canteiros e em baias, respectivamente. Os resultados revelaram que o produto Metarril WP[®] possui potencial para utilização no controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: controle biológico, fungos artropodopatogênicos, formulações fúngicas, carrapatos.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Michel Ruan dos Santos. **Metarril WP[®] effects on *Rhipicephalus microplus* tick control under natural conditions**. 2018. 68p. Thesis (Doctorate in Science, Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Rhipicephalus microplus tick is responsible for severe damages to livestock systems. In this scenario, complementary methods are valuable, minimizing the effects caused by the indiscriminate use of chemical acaricides. Arthropodopathogenic fungi have been considered a promising method for reducing tick infestation in cattle. Nowadays, there are some fungal products with recognized insecticidal effect that might also be used in tick control. Based on this, the present study evaluated the efficacy of Metarril WP[®] (Koppert Biological Systems) for artificially infested pasture-beds and naturally infested stables by *R. microplus*. For studies in beds, forty-five 1m² pasture-beds were prepared with *Brachiaria brizantha* cultivar Marandú. Nine groups with different treatments were performed: Control, Control D0 400, Control D15 400, Control D0 800, Control D15 800, Metarril D0 400, Metarril D15 400, Metarril D0 800 and, Metarril D15 800. The terms "D0 and D15" refer to the number of sprays (single on day 0 or twice on 0 and 15 days after) and "400 and 800" for the volume in milliliters used per bed. Each group had five replicates (beds). With the exception of the Control group, 1% Tween 80[®] and 10% mineral oil for were added for all treatments. At the Metarril groups, *M. anisopliae* conidia were incorporated at 1×10^9 conidia mL⁻¹. The beds received the respective treatment by manual spraying and 20 engorged *R. microplus* females were kept in each. Larvae were recovered by the drag-flag method and efficacy of treatments was accessed. The experiments in stables were carried out at Fazenda São Bento – Cachoeira Paulista SP. Twenty-two 20 m² stables with one Girolando heifer each were used. Two groups were formed: Control and Treated, both with 1% Tween 80[®] and 10% vegetable oil. For Metarril WP[®] group, the final concentration was 1×10^9 conidia m². The animals (11 controls and 11 treated) were kept in each group and infestation level were previously determined at -3, -2 and -1 days. Once a week, the stables were sprinkled with four liters of control solution or fungus formulation. The efficiency was determined by counting females with 4.5 and 8 mm in diameter and weighing the animals weekly. As results, in the pasture-beds, the efficacy ranged from 31.5% to 72.6% and, in stable tests, from 23% to 88%. In conclusion, these findings ensure that Metarril WP[®] has potential in *R. microplus* tick control and might be applied under the conditions tested.

Keywords: biological control, arthropodopathogenic fungi, fungal formulations, ticks.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação dos animais utilizados no experimento Fazenda São Bento.	28
Tabela 2	Percentual de eficácia calculado a partir da recuperação de larvas de <i>Rhipicephalusmicroplus</i> provenientes de fêmeas ingurgitadas expostas a formulação oleosa do produto Metarril WP [®] , na concentração 1×10^9 conídios/mL de <i>Metarhiziumanisopliae</i> , em condições naturais de pastagem.	34
Tabela 3	Número médio e desvio padrão de larvas de <i>Rhipicephalusmicroplus</i> provenientes de fêmeas ingurgitadas expostas a formulação oleosa do produto Metarril WP [®] , na concentração 1×10^9 conídios/mL de <i>Metarhiziumanisopliae</i> , em condições naturais de pastagem.	35
Tabela 4	Dados climáticos coletados a cada três dias por meio do equipamento HOBO, percentual médio da umidade relativa do ar mínima e máxima, temperatura ambiente mínima e máxima da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (EEPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.	36
Tabela 5	Peso médio (Kg) dos animais mantidos nas baias pulverizadas com a formulação oleosa de Metarril WP [®] (grupo Tratado) ou com óleo vegetal e Tween 80 (grupo Controle).	37
Tabela 6	Número médio de carrapatos <i>Rhipicephalusmicroplus</i> obtido após tratamentos das baias com formulação de Metarril WP [®] acrescida de 10% de óleo vegetal.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Início do preparo do solo, aração da área a ser implementada a pastagem experimental.	30
Figura 2	Preparação dos canteiros, para implementação da pastagem experimental.	30
Figura 3	Manejo diário da área experimental.	31
Figura 4	Área experimental preparada, apresentado 60 canteiros de um metro quadrado da forrageira <i>Brachiariabrizanthacultivar</i> Marandú.	31
Figura 5	Apresentação comercial testada de MetarrilWP [®] , composta por conídios do isolado ESALQ E9 do fungo <i>Metarhiziumanisopliae</i>	32
Figura 6	Fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> colocadas nos canteiros experimentais.	34
Figura 7	Pastagem experimental infestada com larvas infestantes de <i>R. microplus</i>	34
Figura 8	Flanelas dispostas sobre canteiros durante 15 minutos, para coleta das larvas vivas, segundo metodologia de Souza; Serra-Freira, (1994).	35
Figura 9	Entrada principal da Fazenda São Bento, localizada em Cachoeira Paulista – SP, destaque para a certificação “Certified Humane Brasil”.	36
Figura 10	Animais do experimento em aleitamento.	38
Figura 11	Abrigo central (casinha) no interior das baias.	38
Figura 12	Alojamento dos animais em experimentação (baia individual).	39
Figura 13	Preparo das formulações empregadas na experimentação.	39
Figura 14	Contagem do total de carrapatos com diâmetro entre 4,5 e 8 mm contados no corpo de cada animal, nos três dias anteriores ao tratamento.	40
Figura 15	Pulverização das formulações oleosas nas baias experimentais.	41
Figura 16	Conídios germinados de <i>Metarhiziumanisopliae</i> utilizados em formulação oleosa de Metarril WP [®] , 72 horas após inoculação.	42
Figura 17	Número médio de carrapatos <i>Rhipicephalusmicroplus</i> com diâmetro superior a 4,5 mm verificado nos animais após tratamentos das baias com formulação de Metarril WP [®] acrescida de 10% de óleo vegetal.	47
Figura 18	Figura 18: Eficácia (%) diária da formulação de Metarril WP [®] acrescida de 10% de óleo vegetal no controle do carrapato <i>Rhipicephalusmicroplus</i> após pulverizações das baias contendo bezerras naturalmente infestadas.	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.1	Importância do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	5
2.1.2	Estratégias para o controle de <i>Rhipicephalus microplus</i>	6
2.2	O fungo artropodopatogênico <i>Metarhiziumanisopliae</i>	9
2.3	Controle biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i> utilizando fungos com ação entomopatogênica	11
2.3.1	Desafios relacionados ao ambiente para a aplicabilidade dos fungos entomopatogênicos	12
2.3.2	Formulação de Fungos Entomopatogênicos	13
2.3.3	Seleção de isolados fúngicos e aplicabilidade	15
2.4	Apresentações comerciais com ingrediente ativo a base de fungos com ação biológica	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Ensaio Biológico em canteiros	18
3.1.1	Localização do experimento	18
3.1.2	Obtenção do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
3.1.3	Preparo dos canteiros	18
3.1.4	Preparo das formulações	20
3.1.5	Tratamento da pastagem artificialmente infestada	21
3.2	Ensaios biológicos em área naturalmente infestada (Experimento Fazenda São Bento)	25
3.2.1	Localização do experimento	25
3.2.2	Animais	25
3.2.3	Formulação fúngica	28
3.2.4	Delineamento experimental	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Viabilidade dos Conídios de <i>Metarhiziumanisopliae</i>	31
4.2	Eficácia de Metarril WP® em pastagem artificialmente infestada (Teste em Canteiros)	31
4.3	Eficácia de formulação oleosa de Metarril WP® em área naturalmente infestada (Experimento Fazenda São Bento)	35
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, pois apresenta como hospedeiro preferencial esta espécie animal. Originário do continente asiático, este parasita difundiu-se pelos países tropicais e subtropicais através da importação de animais provenientes desta região.

O Brasil apresenta um rebanho bovino de aproximadamente 217 milhões de cabeças, sendo considerado um dos maiores do mundo, constituído pelo cruzamento entre raças zebuínas, taurinas e mestiças. Desta forma, animais com grau de sangue europeu apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento das fases parasitárias do carrapato *R. microplus*. Além do mais, as condições climáticas brasileiras de características tropicais favorecem a sobrevivência e o desenvolvimento dos ínstares não parasitários.

O parasitismo por ecto e endoparasitos é responsável por grande impacto na produtividade agropecuária brasileira, as perdas econômicas anualmente ultrapassam os 13 bilhões de dólares. Destes, *R. microplus* é o responsável por um prejuízo de 3,24 bilhões de dólares anuais, representando 23,2% das perdas totais. Os prejuízos desta ectoparasitose estão relacionados principalmente com a diminuição na produção de leite, aumento da mortalidade de animais, redução da natalidade, aumento na compra e/ou consumo de carrapaticidas, perda de peso, gastos com mão de obra, perda na qualidade do couro e transmissão de agentes patogênicos, limitando assim o desenvolvimento da pecuária mundial.

As práticas de controle de carrapatos são baseadas principalmente na utilização de produtos químicos, tendo como objetivos a diminuição da infestação nos animais e nas pastagens e a manutenção da estabilidade das hemoparasitoses. Entretanto, devido à falta de controle estratégico, muitas vezes pela falta de conhecimento por parte dos produtores, são realizados tratamentos excessivos ao longo do ano, favorecendo a ocorrência de resistência aos carrapaticidas químicos. Diante disto, observa-se redução gradativa na eficácia destes produtos sintéticos e na tentativa de contornar esta situação, muitos pecuaristas substituem o princípio ativo e reduzem o intervalo entre tratamentos, tendo estas ações efeitos temporários, ocasionando em resíduos químicos nos produtos e subprodutos de origem animal e na contaminação do meio ambiente.

Diante da utilização inadequada de produtos químicos, mais precisamente a partir da década de 90, aumentaram as buscas por novas formas de controle, podendo se

destacar o uso de fitoterápicos e o uso de fungos artropodopatogênicos. Dentre a grande diversidade fúngica com ação sobre pragas destaca-se a espécie *Metarhiziumanisopliae*, que apresenta ação biológica comprovada sobre vários estágios de desenvolvimento de espécies de artrópodes.

O mecanismo de ação dos fungos sobre as pragas alvo são extremamente dependentes das condições ambientais, como umidade, temperatura, luz, radiação ultravioleta, condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. A utilização destes agentes a campo é prejudicada pela interferência de tais condições supracitadas, entretanto, em condições laboratoriais, a ação dos fungos artropodopatogênicos no controle do carrapato *R. microplus* tem demonstrado resultados satisfatórios.

Algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de minimizar e/ou dificultar a interferência das variáveis que acometem a ação biológica dos fungos artropodopatogênicos, dando um interesse especial às formulações, destacando assim a utilização de óleos vegetais e minerais. O uso de formulações oleosas permite uma melhor ação dos fungos artropodopatogênicos, propiciando maior adesão dos conídios à superfície cuticular dos carrapatos, além de promover maior proteção contra os fatores ambientais. Diante disso, diferentes óleos vêm sendo testados em formulações fúngicas no controle microbiano de artrópodes.

Algumas indústrias especializadas na produção comercial de biopesticidas, como a fabricante dos produtos da linha Metarril® e Boveril®, tem integrado o cenário do biocontrole no Brasil, sendo os conídios fúngicos o composto ativo destes inseticidas biológicos.

Desta forma, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a eficácia do produto comercial MetarrilWP® formulado em óleo mineral e vegetal sobre o carrapato *R. microplus* sob condições naturais. O mesmo, faz parte das linhas de pesquisa do Grupo Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica e Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e cadastrado no CNPq.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) é um ectoparasita de grande importância para a economia mundial atual. Popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, tem como hospedeiro preferencial o bovino. Entretanto, pode utilizar outros mamíferos selvagens e domésticos, incluindo o homem, para o hematofagismo (FORTES, 2004).

Este artrópode pertence ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). O carrapato dos bovinos foi inicialmente classificado como *Boophilus microplus*. Porém, Murrel e Baker (2003), por meio de estudos morfológicos e moleculares que constatarem semelhança filogenética entre dois diferentes gêneros da Família Ixodidae, sugeriram uma reclassificação, passando a espécie ser denominada de *Rhipicephalus microplus*, devido evidências de que algumas espécies do gênero *Rhipicephalus* são mais estreitamente relacionados ao gênero *Boophilus*.

Originário do continente asiático, mais especificamente da Índia e da Ilha de Java (WHARTON, 1974), foi disseminado por vários países tropicais e subtropicais pela importação de animais infestados, onde encontrou condições perfeitas para à sobrevivência (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002). Atualmente na região neotropical, este ectoparasita apresenta-se distribuído numa imensa região que abrange do norte argentino ao México, incluindo as ilhas do Caribe e Antilhas (PEREIRA et al., 2008). Acredita-se que, no Brasil, a introdução tenha sido feita a partir da importação de animais comprados do Chile no início do século XVIII (GONZALES, 1995).

Morfológicamente, o macho e a fêmea de *R. microplus* são caracterizados pelo escudo dorsal total e parcialmente de coloração castanho-avermelhada, respectivamente, palpos curtos, espessos e angulosos, hipostômio com quatro séries de dentes recorrentes de cada lado, peritremas arredondados e coxa I bífida. Além disso, machos ainda apresentam apêndice caudal e quatro placas adanais (FORTES, 2004). Antes do processo de ingurgitamento, machos e fêmeas podem apresentar dimensões de 2,5 mm de comprimento por 1,4 mm de largura. Posteriormente, fêmeas podem atingir até 13 mm de comprimento por 8 mm de largura (PEREIRA et al., 2008).

Em seu ciclo de vida, *R. microplus* necessita de apenas um hospedeiro, apresentando duas fases distintas denominadas de parasitária (ocorre sobre a superfície corporal do hospedeiro) e não parasitária (ocorre no ambiente e não envolve hematofagia). A partir da cópula entre machos e fêmeas sobre o hospedeiro, fêmeas fertilizadas e completamente ingurgitadas desprendem-se da pele do hospedeiro e sob a ação da gravidade caem no solo. Após um período variável de dois a seis dias, iniciam a postura de aproximadamente 2000 a 3000 ovos, que permanecem aglutinados (FORTES, 2004). A massa total de ovos pode chegar a representar em torno de 52% do peso da fêmea (FURLONG, 1993). Após o período de postura, de aproximadamente 15 a 20 dias, a fêmea morre e os ovos passam por um período de incubação que corresponde desde a postura do primeiro ovo até a eclosão da primeira larva. O desenvolvimento dos ovos no ambiente é fortemente influenciado pela temperatura e umidade relativa do ar (UR), no qual ambientes que apresentem UR inferior a 60% são capazes de comprometer a viabilidade da postura e eclodibilidade das larvas. Em longos períodos de estiagem é possível observar uma redução na infestação das pastagens, por destruição dos ovos (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002).

As larvas recém-eclodidas medem cerca de 0,5 mm de comprimento e não têm capacidade infestante. Após quatro a seis dias, se tornam larvas infestantes e sobem pelas hastes do capim e aguardam a passagem do hospedeiro. Ao encontrarem hospedeiros, as larvas transferem-se para a superfície corporal do animal, dando início a fase parasitária que durará em média 21 dias. As larvas infestantes fixam-se preferencialmente nas regiões de pele mais fina como períneo, barbela, úbere, orelha e bolsa escrotal no qual nutrem-se de linfa, crescem e se desenvolvem sendo denominadas ninfas (FORTES, 2004).

O estágio de ninfa dura em média oito dias, ocorrendo após este período, nova muda e surgindo assim machos e fêmeas impúberes (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002). O macho adulto é encontrado junto a fêmea, ocorrendo assim a cópula. Após a fertilização das fêmeas, estas continuam se alimentando até chegarem ao tamanho máximo de ingurgitamento, recebendo a denominação de teleóginas. As teleóginas desprendem-se da pele do hospedeiro, caem ao solo para a realização da postura de ovos e iniciam a fase não parasitária do ciclo evolutivo (FORTES, 2004).

Devido às condições climáticas favoráveis do nosso país, o desenvolvimento desteparasito ocorre ao longo de todo ano, exceto nos períodos de estiagem prolongada

e/ou baixas temperaturas, levando a ocorrência de três a quatro gerações de *R. microplus* anuais (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002).

A população do carrapato dos bovinos está distribuída de maneira não uniforme, na qual cerca de 95% dos parasitos estão no meio ambiente e apenas 5% estão sobre os animais (PEREIRA et al., 2008). O parasitismo realizado pode resultar em problemas como depreciação do couro, diminuição do escore corporal, transmissão de patógenos, predisposição a miíases secundárias e principalmente redução da quantidade e qualidade dos produtos de origem animal (HORN; ARTECHE, 1985).

2.1.1 Importância do carrapato *Rhipicephalus microplus*

O rebanho nacional bovino possui aproximadamente 217 milhões de animais, distribuídos ao longo de oito milhões de quilômetros quadrados (MAPA, 2018). De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2014), o Brasil apresenta o maior rebanho comercial do mundo, sendo exploradas tanto para a produção de carne como de leite e derivados. No ano de 2014 a agropecuária foi responsável por movimentar 43% do Produto Interno Bruto (PIB) agropecuário brasileiro, revelando sua grande importância para o país (SINDAN, 2014). Já no ano de 2017, todos os setores, indústrias e serviços contribuíram negativamente na formação do PIB, entretanto, o agronegócio cresceu 14,5%, compondo 24% do Produto Interno Bruto nacional (MAPA, 2018). O prejuízo total ocasionado por *R. microplus* pode ser relacionado à 40% por perdas na produção de leite, 27% pela mortalidade de bovinos, 11% sobre o desempenho reprodutivo, 9% em gastos com a compra de carrapaticidas, 5% pela diminuição do ganho de peso, 5% em juros bancários e 3% pela má qualidade do couro e despesas no controle e prevenção das hemoparasitoses (BRITO, 2008). Além desses prejuízos, estipula-se que os pecuaristas gastem anualmente R\$ 800 milhões com produtos químicos no controle dos parasitos (MARTINEZ et al., 2004). Grisi e colaboradores (2014), avaliaram o impacto econômico dos parasitos sobre os bovinos no Brasil, verificando que as perdas ocasionadas por endo e ectoparasitos podem chegar a 13,96 bilhões de dólares por ano. Destes, *R. microplus* é o responsável por um prejuízo de 3,24 bilhões de dólares, representando 23,2% das perdas totais.

Neste contexto, o controle de *R. microplus* torna-se imprescindível. Porém, é uma prática bastante complexa por apresentar limitações, como a falta de conhecimento

dos produtores (ROCHA et al., 2006; AMARAL et al., 2011), alto número de larvas infestantes nas pastagens (KETTLE, 1995), ocorrência de intoxicação de mamíferos e seleção de cepas resistentes devido ao uso indiscriminado de acaricidas químicos (SAMISH et al., 2004).

2.1.2 Estratégias para o controle de *Rhipicephalus microplus*

Em 1896, a utilização de acaricidas passou a ser realizada de forma sistemática, com o uso do arsênico no controle de carrapatos em bovinos. O uso foi liberado nos Estados Unidos a partir de 1910, criando um mercado internacional para este produto. Mas, devido à resistência dos carrapatos ao arsênico na Austrália, após o ano de 1937, o risco à saúde e às preocupações com resíduos motivou o desenvolvimento de novos produtos como os organoclorados em 1946, ciclodienos e toxafeno em 1947, formamidas em 1975, piretróides em 1977 e lactonasmacrocíclicas em 1981 (ANDREOTTI, 2010).

Em 1975 foram lançadas as amidinas, tendo como característica poder residual de 14 dias, permitindo um intervalo maior entre tratamentos. Esse fármaco penetra ativamente no carrapato e é metabolizada em metilformamidina, interferindo na postura de ovos das teleóginas e apresenta toxicidade para todas as fases de vida, além de inibir enzimas do metabolismo do carrapato (LI et al., 2004).

Com a ocorrência de resistência dos carrapatos dos bovinos aos organofosforados, estimulou-se o uso extensivo de piretróides, sendo existentes pelo menos três subgrupos dessa família: deltametrina, cipermetrina e alfa-metrina (GEORGE et al., 2008).

A grande revolução dos antiparasitários no mercado mundial surgiu no início da década de 1980, com o desenvolvimento das lactonasmacrocíclicas, apresentando poder residual maior que os piretróides, além de serem eficazes no tratamento de uma ampla variedade de endo e ectoparasitos. Este grupo é produzido pela fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis*, sendo existentes quatro subgrupos: ivermectina, moxidectina, doramectina e abamectina (FURLONG; MARTINS, 2000).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), no ano de 1987, o carrapato dos bovinos foi reportado em 80% da população mundial de bovinos, assim tornou-se como o ectoparasita de maior impacto

econômico em áreas tropicais e subtropicais. Assim, ao longo da história, têm-se buscado o controle deste artrópode de maneira sustentável, ambientalmente segura e com adequado custo – benefício (WILLADSEN, 2006).

Os métodos tradicionais para o controle químico do carrapato dos bovinos, apresentam acaricidas formulados em pó molhável, concentrado emulsionado e formulações fluídas. Desta forma, os acaricidas convencionais utilizados podem ser aplicados por meio de banho de imersão, pulverização, via parenteral, bolus intra ruminal, brincos impregnados e pour on.

No Brasil, as práticas de controle de carrapatos são baseadas principalmente na utilização de produtos químicos, tendo como objetivos a diminuição da infestação dos animais e das pastagens e a manutenção da estabilidade das hemoparasitoses. Entretanto, devido à falta de controle estratégico, muitas vezes pela falta de conhecimento por parte dos produtores, são realizados tratamentos em número excessivo ao ano, favorecendo a ocorrência de resistência aos carrapaticidas químicos (ROCHA et al., 2006).

O uso prolongado de um produto químico permite que uma parte da população de carrapatos sobreviva. Esta capacidade pode ser conferida a uma população de carrapatos mesmo antes do contato prévio com os produtos, visto que alguns indivíduos são considerados naturalmente resistentes (ROUSH, 1993; FREITAS et al., 2005; JANER et al., 2010; ABBAS et al., 2014). Furlong e colaboradores (2000), ressaltaram a existência do gene alelo resistente, devido ao uso frequente e indiscriminado de carrapaticidas causando mutações em alguns indivíduos da população.

O amitraz, acaricida classificado como formamidinas, é amplamente utilizado no controle de carrapatos. Entretanto, o processo de resistência do mesmo é considerado complexo, envolvendo herança recessiva de alelos multigênicos (LY AY et al., 2004). Segundo Ly Ay et al., (2004), o desenvolvimento de resistência ao amitraz, pode estar ligado à desintoxicação metabólica, variando entre diferentes cepas de *R. microplus*. Baron e colaboradores (2015), confirmaram que a resistência ao amitraz, de linhagens sul – africanas de *R. microplus*, estão associadas ao desequilíbrio gamético, gerando dois haplótipos recombinantes, tornando assim, preocupante a utilização deste acaricida.

Na tentativa de contornar esta realidade, a substituição do princípio ativo e a redução no intervalo entre tratamentos são as estratégias utilizadas com grande frequência pelos pecuaristas, tendo estas ações efeitos temporários (HEIMERDINGER, 2005), além do aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal e a

contaminação ambiental (CHAGAS et al., 2002). Assim, devemos nos atentar para a pressão da sociedade nos últimos anos, que tem se preocupado com a contaminação ambiental e também com a presença de resíduos químicos nos alimentos (CASTRO et al., 2009), além das questões de bem-estar animal.

O controle de *R. microplus*, é alcançado especialmente por acaricidas químicos. Contudo, há resistência mensurável à maioria dos compostos químicos comerciais disponíveis, havendo a necessidade de desenvolver e validar eficácia de métodos de controle aos carrapatos dos bovinos (RODRIGUES et al., 2018). Deste modo, é crescente o número de estudos buscando métodos alternativos para o controle de pragas e parasitos, inclusive *R. microplus* (MENDES, 2011). Diante disto, aumentaram as buscas por novas formas de controle, destacando o uso de vacinas (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002), produtos fitoterápicos (HERNANDEZ et al., 1987) e o uso de fungos artropodopatogênicos (BITTENCOURT et al., 1992).

A utilização de vacinas para o controle do carrapato dos bovinos encontra-se em fase experimental (SEQUEIRA; AMARANTE, 2002; PATARROYO et al., 2009; PARIZI et al., 2012; SEIXAS et al., 2012; LEW-TABOR et al., 2014). De la Fuente e colaboradores (2007), relatam que esta metodologia de controle apresentou intensificação em meados dos anos 90, principalmente da América do Norte e América do Sul, a partir da utilização de glicoproteínas provenientes do intestino médio do carrapato dos bovinos. No mesmo ano, segundo os pesquisadores, ficou comprovada a eficácia da vacinação em algumas regiões geográficas, onde reduziram-se assim, o número de aplicações de acaricidas químicos. Guerrero e colaboradores (2014), confirmaram a eficácia da vacina contra *R. microplus*, utilizando antígenos específicos à proteínas de membrana, tornando promissora no controle integrado do carrapato dos bovinos. Recentemente Garcia e colaboradores (2017), avaliaram a resposta humoral de bovinos resistentes e susceptíveis à proteínas salivares de *R. microplus*, ficando constatada que a neutralização por anticorpos dos hospedeiros de proteínas salivares envolvidas no parasitismo, é essencial no controle de infestações.

A flora brasileira é considerada a maior do mundo, possuindo aproximadamente 5.5000 espécies de plantas (DI STASI, 1996). Desta forma, tem-se estudado a ação de fitoterápicos no controle de muitas pragas e/ou doenças (HERNANDEZ et al., 1987; ARAÚJO, 2000; HEIMERDINGER, 2005; CASTRO et al., 2009; LAGE et al., 2013; LAGE et al., 2014; ARAUJO et al., 2015; CRUZ et al., 2016; FERREIRA et al., 2017).

Dentre a grande diversidade de fungos com ação artropodopatogênica destaca-se a espécie *Metarhiziumanisopliae*, que apresenta ação biológica comprovada sobre vários estágios de desenvolvimento de espécies de carrapatos (BITTENCOURT et al., 1994;QUINELATO et al., 2012;PERINOTTO et al., 2013; MARCIANO et al., 2015; FIOROTTI et al., 2016; CAMARGO et al., 2016; PERINOTTO et al., 2017).

2.2 O fungo artropodopatogênico *Metarhiziumanisopliae*

Existe uma grande variedade de espécies fúngicas patogênicas à insetos. Tais espécies evoluíram para combater as defesas naturais do hospedeiro, combinando a ação de enzimas para a penetrar e acessar a hemocel das pragas alvo. Fungos entomopatogênicos são considerados uma alternativa ambientalmente amigável, sendo identificadas diversas cepas com ação à pragas agrícolas e de importância médico – veterinário (LEEMON; JONSSON, 2008).

Dubovskiy e colaboradores (2013), relataram que a supressão de resposta sistêmicas permite a realocação de recursos para as defesas integrais do hospedeiro, após observarem melhora na cutícula de *Galleriamellonella* em infecção experimental pelo fungo *Beauveria bassiana*. Situação não constatada por *M. anisopliae*, segundo os pesquisadores citados anteriormente. Desta forma, *Metarhiziumanisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1883 é um fungo filamentosso de grande importância agroecológica mundial. Considerado de ocorrência cosmopolita, é amplamente utilizado para o controle de diversas pragas da agricultura, onde tem sido encontrado no solo, próximo às raízes das plantas, ou em cadáveres de artrópodes (ZIMMERMANN, 2007).

Este fungo é pertencente ao Reino Fungi, Subreino Dikarya, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Clavicipitaceae, Gênero *Metarhizium*, Espécie *Metarhiziumanisopliae* (HIBBETT et al., 2007; BISCHOFF et al., 2009), sendo considerado o responsável por causar uma doença denominada Muscardine Verde, uma enfermidade registrada em centenas de espécies de artrópodes (ALVES, 1998).

O primeiro relato de sua ocorrência foi verificado pelo pesquisador russo Metschnikoff em 1879. A partir de um estudo utilizando o referido fungo como agente controlador do besouro *Anisopliae austriaca*, foi denominado *Entomophora anisopliae*. No entanto, em 1883, Sorokin descreveu o fungo como o responsável pela ocorrência da

Muscardine Verde, renomeando-o assim como *Metarhiziumanisopliae*(TULLOCH, 1976).

Através de estudos morfológicos e moleculares, Bischoff e colaboradores (2009), promoveram uma nova classificação de *M. anisopliae*. Em tais abordagens foi proposto a formação do complexo *Metarhiziumanisopliae*, formado por nove diferentes espécies: *Metarhiziumanisopliae*, *Metarhiziumguizhouense*, *Metarhiziumpingshaense*, *Metarhiziumacridum*, *Metarhiziumlepidiotae*, *Metarhiziummajus* e *Metarhiziumbrunneum*, e duas novas espécies, *Metarhiziumglobosum* e *Metarhiziumrobertsii*. Além disto, foi sugerido que isolados que não estejam classificados segundo os estudos, devem ser referenciados como *Metarhiziumanisopliae* sensu lato (s.l.) (BISCHOFF et al., 2009).

Com relação à aplicabilidade, estudos desenvolvidos por Zimmermann(2007),demonstraram que *M. anisopliae*s.l. pode ser considerado seguro para diferentes espécies de animais, bem como ao homem e ao meio ambiente.

No Brasil,estudos de controle de pragas agrícolas envolvendo o uso de fungos artropodopatogênico foram desenvolvidos ao longo dos anos, nos quaispodem ser destacados: cigarrinhas das pastagens (*Deoisflavopictae* *Zulia entreriana*),cigarrinhasda cana-de-açúcar (*Mahanarvapistocatae* *M. fimbriolata*), broca-da-bananeira (*Cosmopolitessordidus*), broca-do-café (*Hypothenemushampeii*), cupim das pastagens (*Cornitermesscumulans*), cupim da cana-de-açúcar (*Heterotermessp.*), broca-dos-citros (*Diploschemarotundicollae*) e percevejo-do-colmo do arroz (*Tibracalimbativentris*) foram as espécies de maior ação e importância (ALVES, 1998;ONOFRE et al., 2002). Faria e Wraight (2007), relataram que há disponível no mercado diversos produtos micopesticidas destinados ao controle de artrópodes, sendo que 33,9% destes apresentam como ingrediente ativo*M. anisopliae*.

O modo de infecção dos fungos dos gêneros*Metarhizium*, pode ser distribuído em seis etapas: adesão, germinação, formação do apressório, penetração, extrusão e esporulação (ZIMMERMANN, 2007). De acordo com Alves (1998), omecânismo de ação de fungos artropodopatogênicos é um fator favorável nos programas de controle biológico, visto que o mesmo age a partir do contato dos conídios com o hospedeiro, dando-se início a fase de adesão sobre a superfície cuticular externa do artrópode. Nessa fase, diversos estímulos quimioestáticos e enzimáticos são realizados, permitindo assim a fixação e a ocorrência de uma fase germinativa, na qual se desenvolve uma estrutura diferenciada denominada de tubo germinativo. Em sequência, ocorre uma dilatação da

extremidade posterior do tubo germinativo com conseguinte formação do apressório (estrutura rica em enzimas de ação degradativa). A penetração se dá pela associação da pressão física exercida pela hifa com a ação enzimática sinérgica de proteases, lipases e quitinases na cutícula do hospedeiro. O fungo ao chegar à hemocel desenvolve uma estrutura adaptativa denominada de blastosporo. Ao encontrar condições adequadas de adaptação, estas estruturas diferenciam-se em hifas, que levam à morte do hospedeiro possivelmente por compressão dos órgãos internos, produção de metabólitos tóxicos e inanição. O processo finaliza-se com a exteriorização e produção de conídios na sua superfície corporal, levando à dispersão do agente para outros hospedeiros ou mesmo para o solo. A eficácia de todo o processo é dependente de condições favoráveis do ambiente como temperatura, umidade e pH ideais (ALVES, 1998; ZIMMERMAN, 2007).

2.3 Controle biológico de *Rhipicephalus microplus* utilizando fungos com ação entomopatogênica

De acordo com Alves (1998), os fungos foram os primeiros microrganismos estudados no controle microbiano de insetos. Sendo o primeiro registro do uso de um micoinseticida datado no ano de 1888 na Rússia. Naquela época, desconhecia-se o agente microbiano, mas através de estudos e observações, o espécime utilizado foi *M. anisopliae*, produzido em massa de cevada, que posteriormente foi pulverizado no campo controlando uma praga conhecida popularmente como bicudo da beterraba, *Cleonus punctiventris* (LORD, 2005). Tais agentes microbianos são considerados patógenos de largo espectro, devido à capacidade de atacar insetos aquáticos, fitófagos e terrestres, causando naturalmente enfermidades sobre o hospedeiro em suas diferentes fases de desenvolvimento (ALVES, 1998).

A grande variabilidade genética apresentada por esses microrganismos, possibilita a seleção de isolados fúngicos de alto potencial para serem utilizados em controle biológico (QUINELATO et al., 2012). A existência de uma grande diversidade de fungos com ação artropodopatogênica, sendo estes considerados potencialmente promissores por apresentarem capacidade de penetração pela cutícula de artrópodes, habilidade de matar a praga alvo em seus diferentes estágios de desenvolvimento e a relativa especificidade de virulência sobre um espécime ou pequeno grupo de pragas (GINSBERG et al., 2002).

Para o controle de carrapato *in vitro*, diferentes trabalhos têm demonstrado a eficácia de *M. anisopliae* para *Dermacentornitens*, *Amblyommavariegatum*, *Amblyommajennense*, *Rhipicephalussanguineus*, *Rhipicephalusappendiculatus* e *Rhipicephalusmicroplus* (BITTENCOURT et al., 1992; MONTEIRO et al., 1998; GARCIA et al., 2004; LOPES et al., 2007; PERINOTTO et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2014), sendo que no Brasil isolados de *M. anisopliae* l. já foram encontrados infectando naturalmente fêmeas de *R. microplus* (COSTA et al., 2002).

O processo e a dinâmica de infecção em *R. microplus* foi descrito e demonstrado por Bittencourt e colaboradores (1995; 1999), indicando que a penetração ocorria exclusivamente de forma ativa pela superfície cuticular externa e não por outras quaisquer vias de penetração como pelos espiráculos respiratórios, via vaginal e/ou via oral. Além disto, foi observada a capacidade proliferativa de *M. anisopliae* na hemocele e na superfície de órgãos do carrapato.

Como consequência da infecção, foi possível observar alterações nos períodos de postura, índice de produção de ovos, período de incubação, período e percentual de eclosão de ovos (BITTENCOURT et al., 1992; BITTENCOURT et al., 1994; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

O modo de infecção do fungo *M. anisopliae* pode ser organizado em seis etapas: adesão, germinação, formação do apressório, penetração, extrusão e esporulação. Assim, *M. anisopliae* é um potencial agente biocontrolador, no entanto, o modo de ação e os efeitos sobre microrganismos não alvos, devem ser considerados e superados para maximizar a eficácia à campo (ZIMMERMANN, 2007).

2.3.1 Desafios relacionados ao ambiente para a aplicabilidade dos fungos entomopatogênicos

Pelo fato dos fungos agirem sobre a cutícula da praga alvo, tornam-se mais expostos às intempéries ambientais (ROBERTS; YENDOL, 1971). A ação negativa conferida pelos fatores bióticos e abióticos sobre a patogenicidade destes microrganismos empregados no biocontrole de artrópodes pode ser superada com o método de preparo do produto, através de formulações (CAMARGO, 2012).

A temperatura considerada ideal para o desenvolvimento dos fungos com ação artropodopatogênica varia entre 25 e 35°C (COONEY; EMERSON, 1964). Segundo Fargues e colaboradores (1992), para o crescimento micelial de *M. anisopliae*, a

temperatura adequada varia entre 37 e 40°C, embora para a germinação dos conídios, a temperatura média deva estar entre $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (ALVES, 1998). Entretanto, no mesmo ano, Yip et al. (1992) verificaram uma considerável variação na germinação de conídios de *M. anisopliae* em diferentes temperaturas e entre distintos isolados da mesma espécie. Além disto, a temperatura média do microclima em que os biopesticidas serão utilizados interfere diretamente na eficácia do tratamento (POLAR et al., 2005). A umidade do ambiente pode alterar a germinação dos conídios, auxiliando ou dificultando a ação dos agentes microbianos (LAZZARINI et al., 2006). Em geral, fungos filamentosos necessitam de alta umidade relativa do ar para desenvolverem seu processo de infecção (ALVES, 1998). Entretanto, Zimmermann (2007), observou crescimento do fungo *Beauveria bassiana* em umidade atmosférica entre 60% e 70%, sendo estas consideravelmente baixas.

Dentre os principais fatores ambientais, a radiação solar é considerada um dos mais importantes para a aplicabilidade do controle microbiano. A luz solar formada por raios UV-A e UV-B apresenta variações de acordo com hora do dia, estação do ano, altitude e condições atmosféricas (ROBERTS; FLINT, 2002). Rangel e colaboradores (2004), retrataram que conídios de *M. anisopliae* produzidos sobre cadáveres de insetos foram mais sensíveis à radiação UV-B quando comparados àqueles produzidos em BDA (batata, dextrose e agar) acrescido de levedura.

Assim, a adição de substâncias protetoras na formulação fúngica como óleos de origem animal ou vegetal, bem como a seleção de isolados que apresentem melhor capacidade adaptativa aos diferentes fatores abióticos são medidas necessárias para que a implementação deste método alternativo seja considerada viável e eficaz no campo.

2.3.2 Formulação de Fungos Entomopatogênicos

A formulação de isolados fúngicos proporciona garantias de aplicabilidade através da proteção contra os fatores abióticos presentes no meio ambiente. Os conídios, quando adicionados em espalhantes adesivos, facilmente dispersam-se em água, porém apresentam eficiência comprometida em umidade e temperatura consideradas inadequadas (JAMES et al., 1998; CAMARGO et al., 2016; ANGELO et al., 2010).

A adição de óleo mineral e/ou vegetal à formulação tem como objetivo proteger e melhorar a ação conidial sobre a superfície da praga alvo (ALVES, 1998). Além disso, suspensões oleosas apresentam melhores resultados quando comparados com

tratamentos realizados com suspensões aquosas (PRIOR et al., 1988; MARANGA et al., 2005), por permitir maior adesão dos conídios à superfície dos carrapatos, além de promover proteção contra a radiação solar (SOUZA, 2003).

Deste modo, estudos com diferentes óleos vêm sendo desenvolvidos em formulações fúngicas de *M. anisopliae* no controle de artrópodes, como exemplos, o óleo de amendoim no controle de larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas das espécies *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* (KAAYA; HASSAN, 2000), óleo de coco em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (POLAR et al., 2005), óleo de girassol e óleo mineral sobre os estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (KAAYA et al., 2011; CAMARGO et al., 2012; CAMARGO et al., 2014) e óleo de soja no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos (PERINOTTO et al., 2017).

Angelo e colaboradores (2010), ao avaliarem a ação artropodopatogênica do fungo *Lecanicillium lecanii* sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, também obtiveram uma melhor eficiência com o emprego de formulação oleosa, ocasionando a morte das fêmeas ingurgitadas antes mesmo do início da postura de ovos.

Analizando sob condições laboratoriais a patogenicidade de *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre os estágios de desenvolvimento do carrapato dos bovinos, entre formulações oleosas contendo 10%, 15% e 20% de óleo mineral e suspensão aquosa, ambas na concentração 10^8 conídios/ml, ficou constatado que as formulações oleosas apresentaram uma melhor ação sobre as fases de desenvolvimento de *R. microplus*, quando comparadas com a suspensão fúngica aquosa (CAMARGO et al., 2012).

A eficiência de produtos comerciais no controle de ninfas do carrapato *A. cajennense* foi avaliada por Lopes et al. (2007) utilizando suspensões pó molhável do isolado ESALQ-PL63 de *B. bassiana* (Boveril WP) e formulação concentrada de óleo emulsionável do isolado ESALQ-1037 de *M. anisopliae* (Metarril SC). A formulação concentrada de óleo emulsionável mostrou uma maior patogenicidade sobre as larvas do carrapato *A. cajennense*, causando 100% de mortalidade no 6º dia após o tratamento, diferentemente, a suspensão de pó molhável de *B. bassiana* ocasionou uma mortalidade de 40% ao décimo dia após o tratamento.

Entretanto, Polaret al. (2005) ressaltaram que alguns óleos podem afetar o processo de germinação dos conídios, dificultando assim a ação dos agentes microbianos. Entretanto, experimentos utilizando óleo de coco, óleos comerciais e

parafina líquida demonstraram que o fungo *M. anisopliae* pode ter sua eficácia aumentada através das formulações empregadas.

Paixão e colaboradores (2017), reforçam a possibilidade de minimizar os efeitos deletérios provocados pelo estresse térmico, por meio da utilização de formulações oleosas.

Devido à intensa demanda da sociedade por alimentos e tratamentos sustentáveis, torna-se crescente o número de estudos indicando microrganismos com potencial efetivo no controle biológico dos principais parasitos que interferem nos índices zootécnicos, econômicos e sanitários, onde podemos destacar o carrapato dos bovinos (JENKINS, 1964; MWANGI et al., 1991; BITTENCOURT et al., 1992; SAMISH et al., 2004).

Como são agentes biológicos, a suapatogenicidade e a virulência podem variar entre hospedeiros do mesmo gênero e até da mesma espécie, sendo de extrema importância realizar testes de ensaio biológico na tentativa de se obter e/ou identificar isolados mais adaptados ao ambiente e hospedeiros que se deseja trabalhar (MENDES, 2011; PERINOTTO et al., 2017).

Correia e colaboradores (1998), avaliaram os efeitos de diferentes concentrações do isolado E9 de *M. anisopliae* s.l. sobre *R. microplus* de bovinos estabulados, demonstrando excelente eficiência e com percentual de fêmeas mortas de 97,7% um dia após o tratamento. Já Lubeck e colaboradores (2008), avaliaram o potencial de diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. para o controle biológico do carrapato *R. microplus*, no qual seis isolados foram considerados patogênicos e os isolados E6, CG 47 e CG 97 foram os mais virulentos.

A associação de fungos artropodopatogênicos com produtos químicos também é viável, apresentando resultados satisfatórios e elucidando o auxílio que estes microrganismos podem fornecer aos pesticidas sintéticos, uma vez que o desenvolvimento destes biopesticidas não é afetado (BAHIENSE et al., 2006; POSADAS; LECUONA, 2009; SCHUMACHER; POEHLING, 2012). Webster e colaboradores (2015), verificaram em testes *in vivo*, compatibilidade e potencialização do efeito da cipermetrina associada a *M. anisopliae*, onde a mesma alcançou 97,9% de eficácia.

Testes de estábulos utilizando o fungo artropodopatogênico *M. anisopliae* para o controle do carrapato *R. microplus* também vêm demonstrando bons resultados. Bahiense e colaboradores (2007), constataram mortalidade média de 33% de fêmeas

ingurgitadas do carrapato dos bovinos submetidas ao tratamento na concentração de 8×10^8 conídios/mL em suspensão aquosa. Já Camargo e colaboradores (2014), após avaliação do produto comercial Metarril SP Organic contendo 10% de óleo mineral verificaram uma eficácia de aproximadamente 47%.

O fungo *M. anisopliae* s.l tem evidenciado resultados interessantes a campo. Alonso-Diaz e colaboradores (2007), constataram eficácia média de 45% após tratamento com suspensão fúngica aquosa. Sahagúne colaboradores (2010), pulverizando pastagem naturalmente infestada por larvas do carrapato dos bovinos, obtiveram redução de 94,2% de redução da carga parasitária, duas semanas após o tratamento. Kaayae colaboradores(2011), observaram redução de 83% no número total de carrapatos *R. microplus* após tratamentos de bovinos por pulverização com este bio controlador formulado em 20% de óleo de girassol. Samish e colaboradores (2014), pulverizando o ambiente, verificaram a ação do fungo *M. brunneum* formulado em óleo mineral, onde o mesmo promoveu a morte das fêmeas de *R. microplus* antes mesmo da postura de ovos. Já Camargo e colaboradores (2016), constataram eficácia média de aproximadamente 75 e 46% quando comparado aos grupos controle e controle oleoso, respectivamente, utilizando óleo mineral incorporado a formulação fúngica de *M. anisopliae*.

2.4 Apresentações comerciais com ingrediente ativo a base de fungos com ação biológica

Segundo Mascarin e colaboradores (2018), os fungos com ação entomopatogênica apresentam-se como peça fundamental para a comercialização de biopesticidas no Brasil.

A produção de produtos comerciais a base de fungos, com ação sobre insetos e ácaros vem sendo desenvolvida mundialmente desde os anos 60 (FARIA et al., 2007). Neste mesmo estudo, os autores realizaram levantamento e listaram todos os produtos micoinseticidas e micoacaricidas comercializados em todo mundo e constataram a existência de 171 formulações comerciais de pelo menos 12 espécies de fungos inseticidas e/ou acaricidas. Quatro espécies mais utilizadas foram consideradas as mais importantes como ingredientes ativos, sendo *M. anisopliae* 33,9%, *B. bassiana* 33, 9%, *Isaria fumosorosea* 5,8% e *Beauveria brongniartii* 4,1% do total dos produtos comercializados.

Os países da América do Sul representam 42,7% de todos os produtos à base de fungos produzidos em todo mundo, seguido por países da América do Norte 20,5%, europeus 12,3%, asiáticos 12,3%, América Central 7,0%, África 2,9% e Oceania 2,3%, sendo que deste total apenas três produtos são indicados para a utilização em carrapatos (FERNANDES et al., 2012).

O controle biológico no Brasil conta com algumas indústrias especializadas na produção comercial de biopesticidas, como por exemplo, a empresa KoppertBiological Systems com os produtos da linha Metarril® e Boveril®. Estes inseticidas biológicos apresentam como ingrediente ativo esporos dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* respectivamente, sendo estes microrganismos encontrados na natureza causando doença e morte em alguns insetos. Segundo indicação dos fabricantes, os bioinseticidas são indicados principalmente para controle de pragas agrícolas, como por exemplo, cigarrinhas da cana de açúcar e das pastagens. Entretanto, em condições laboratoriais e de campo estes produtos vêm apresentando também ação acaricida (PERINOTTO et al., 2012; CAMARGO et al., 2012; CAMARGO et al., 2016; PERINOTTO et al., 2017).

A maioria das indústrias produtoras de biopesticidas a base de fungos tem sugerido que a aplicação dos produtos possa ser semelhante à utilização de pesticidas químicos, porém a produção em massa pode limitar a vida útil e encarecer o produto final (SHELTON; ROUSH, 2000). Nos últimos anos, muitas questões vêm sendo abordadas como, por exemplo, a eficácia, as tendências de mercado futuro e as normas para regulamentação dos pesticidas biológicos (FARIA et al., 2007).

O agronegócio brasileiro apresenta tradição na utilização de pesticidas biológicos no controle de pragas. Assim, o Brasil possui 82 biopesticidas registrados, onde 60% deste total são representados por fungos, especialmente *M. anisopliae* e *B. bassiana* (MASCARIN et al., 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaio Biológico em canteiros de *Brachiariabrizanthacultivar Marandú*

3.1.1 Localização do experimento

Os testes desenvolvidos para avaliar a eficácia da formulação oleosa do produto Metarril WP[®], em diferentes dosagens e tempos de aplicação, sobre o carrapato *Rhipicephalusmicroplus* foram desenvolvidos no Laboratório de Controle Microbiano (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EEPPWON), Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ (22° 45' 48.74" S, 43° 41' 19.01" O), situada em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

3.1.2 Obtenção do carrapato *Rhipicephalusmicroplus*

Os espécimes do carrapato *R. microplus* utilizadas no experimento foram oriundos de infestação artificial de bezerros mantidos em baias localizadas na EEPPWON. Bezerros foram infestados com larvas de terceiro estágio e, 21 dias após a infestação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e em seguida levadas ao Laboratório de Controle Microbiano para a desinfecção da cutícula, sendo imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos e, posteriormente, secas com papel toalha. Uma parcela destas fêmeas foram mantidas em placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ para a manutenção da colônia do carrapato, enquanto a outra foi pesada individualmente, para posterior divisão em grupos homogêneos quanto ao peso e submetidas aos tratamentos respectivos.

3.1.3Preparo dos canteiros

Uma área de aproximadamente dois hectares, localizada na EEPPWON, foi isolada, para que se pudesse obter um período de ausência de animais por aproximadamente 180 dias. Posterior ao isolamento da área, realizou-se coleta de amostra de solo para preparo, formação e implantação da pastagem, ao qual seguiu-se as recomendações de calagem e adubação conforme laudo técnico. Em seguida, iniciou-se a aração da área, utilizando-se trator modelo MasserFergusson 275, conforme figura 1.



Figura 1:A: Início do preparo do solo, aração da área a ser implementada a pastagem experimental. B: Preparação dos canteiros, para implementação da pastagem experimental.

Após a aração de toda a área, procedeu-se a elaboração dos canteiros, utilizando-se de trator e implemento agrícola denominado encanteirador, figura 2.

Ao término da elaboração dos canteiros, procedeu-se de maneira manual a organização de canteiros de um metro quadrado, onde posteriormente, efetuou-se o plantio de sementes de *Brachiariabrizanthacultivar* Marandú, sendo realizado manejo da pastagem diariamente (irrigação, capina, poda e acompanhamento do crescimento vegetativo da forrageira implantada).

Assim que todos os canteiros apresentaram-se com o mesmo crescimento vegetativo (60 cm de altura), a área experimental ficou preparada, onde foi possível implantar 60 canteiros de um metro quadrado da forrageira *Brachiariabrizanthacultivar* Marandú, conforme figura 2:



Figura 2: Área experimental preparada, apresentado 60 canteiros de um metro quadrado da forrageira *Brachiariabrizanthacultivar* Marandú.

3.1.4Preparo das formulações

A apresentação comercial avaliada foi MetarrilWP[®], composta por conídios do isolado ESALQ E9 do fungo *Metarhiziumanisopliae*, foi cedida pela empresa KoppertBiological Systems, (Figura 3).



Figura 5: Apresentação comercial testada de MetarrilWP[®], composta por conídios do isolado ESALQ E9 do fungo *Metarhiziumanisopliae*

O grupo “Controle oleoso”, continha água destilada estéril, 1% de tween 80 e 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As formulações utilizadas para o tratamento dos grupos Metarril WP[®] foram preparadas de forma semelhante aos respectivos controles, porém com a adição da apresentação comercial. As formulações foram quantificadas em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer, segundo Alves (1998), tendo as concentrações ajustadas à 1×10^9 conídios/mL. A viabilidade dos conídios foi verificada através da inoculação de uma alíquota de 20 µL da formulação em meio de cultura Batata Dextrose Agar e incubação a 25°C a cada 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta pelo microscópio óptico e o cálculo da germinação dos mesmos foi realizado segundo Alves (1998).

3.1.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. Foram formados nove grupos de tratamentos diferentes:

- Grupo Controle: não recebeu nenhum tratamento;
- Grupo Controle D0 400: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, única aplicação (D0) e na dosagem de 400 ml/canteiro (m^2);
- Grupo Controle D15 400: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, dupla pulverização (dia 0 e dia +15) e na dosagem de 400 ml/canteiro/pulverização;
- Grupo Controle D0 800: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, única aplicação (D0) e na dosagem de 800 ml/canteiro (m^2);
- Grupo Controle D15 800: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, dupla pulverização (dia 0 e dia +15) e na dosagem de 800 ml/canteiro/pulverização;
- Grupo Metarril D0 400: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, concentração de 1×10^9 conídios/ ml, única aplicação (D0) e na dosagem de 400 ml/canteiro (m^2);
- Grupo Metarril D15 400: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, concentração de 1×10^9 conídios/ ml, dupla pulverização (dia 0 e dia +15) e na dosagem de 400 ml/canteiro/pulverização;
- Grupo Metarril D0 800: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, concentração de 1×10^9 conídios/ ml, única aplicação (D0) e na dosagem de 800 ml/canteiro (m^2) e
- Grupo Metarril D15 800: água destilada estéril, 1% de Tween 80, 10% de óleo mineral, concentração de 1×10^9 conídios/ ml, dupla pulverização (dia 0 e dia +15) e na dosagem de 800 ml/canteiro/pulverização.

Cada grupo foi composto por cinco canteiros de um m^2 cada, totalizando 45 canteiros experimentais. Após a formação de cada grupo, iniciou-se os respectivos tratamentos. Após as primeiras pulverizações de toda a área dos canteiros, foram alocadas as fêmeas ingurgitadas previamente agrupadas. Cada canteiro alojou 20 fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, conforme figura 4.



Figura 4: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalusmicroplus* colocadas nos canteiros experimentais.

Passados 45 dias da colocação das fêmeas nos canteiros, procedeu-se metodologia descrita por Souza; Serra-Freire (1994), onde entre oito e nove horas da manhã, foi utilizada uma flanela de um m², colocada sobre cada canteiro durante 15 minutos, para coleta das larvas vivas, figura 5. Tal procedimento, fora realizado duas vezes, com intervalo de 15 dias entre coletas, conforme figura 5.



Figura 5: Flanelas dispostas sobre canteiros durante 15 minutos, para coleta das larvas vivas de *Rhipicephalusmicroplus*, segundo metodologia de Souza; Serra-Freire, (1994).

Em seguida, as flanelas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Controle Microbiano, onde foram mantidas em freezer. A retirada das larvas das flanelas foi realizada com o auxílio de uma pipeta de vidro, acoplada a uma bomba de vácuo, sendo a contagem das larvas coletadas efetuada com auxílio de um contador manual. Com estes dados, número de larvas coletadas em cada

canteiro, foi calculado o percentual de eficácia utilizando a seguinte fórmula recomendada por Bittencourt et al., (1993):

$$\text{PERCENTUAL DE EFICÁCIA} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde,

A = média de larvas vivas no grupo controle e

B = médias de larvas vivas no grupo tratado.

Em seguida, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para análise dos dados obtidos. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (SAMPAIO, 2002).

Foram coletados dados climáticos diários com o auxílio do equipamento HOBO durante o período de realização do experimento.

3.2 Ensaios biológicos em condições naturais (Experimento Fazenda São Bento)

3.2.1 Localização do experimento

Os testes a campo desenvolvidos para avaliar a eficácia da formulação oleosa do produto Metarril WP[®], sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus* foram desenvolvidos na Fazenda São Bento, localizada em Cachoeira Paulista – SP, (22° 42' 02''S 44° 59' 29''W), durante o período de junho a dezembro de 2016. A propriedade é uma empresa leiteira da região do Vale do Paraíba, apresenta sistema de pastejo rotativo com irrigação de outubro a abril e durante o período seco (maio até setembro) os animais de produção são confinados ao ar, no chão batido com árvores para sombreamento e espaço livre suficiente para o bem estar do rebanho. A propriedade é a primeira empresa leiteira da América Latina a receber a certificação de Bem-estar animal, pela “Certified Humane Brasil”, (Figura 6).



Figura 6: Entrada principal da Fazenda São Bento, localizada em Cachoeira Paulista – SP, destaque para a certificação “Certified Humane Brasil”.

3.2.2 Animais

Foram utilizados 22 bovinos lactentes mestiços das raças $\frac{3}{4}$ Holandesa e $\frac{1}{4}$ Gir, com idade entre 30 e 74 dias (idade média de 52 dias) e peso entre 30 e 79 Kg (peso médio 54,5 kg), todos do sexo feminino (Figura 7). Estes animais foram mantidos em baias individuais, de 20 metros quadrados, cercadas por telas de arame galvanizado, conforme figura 10. Os animais foram aleitados duas vezes ao dia (três litros de leite de manhã e três litros de leite a tarde), sendo feno de tifton 85, concentrado e água ofertados à vontade, para desenvolvimento das papilas ruminais. O projeto no qual está incluído o teste, referente ao presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no

Uso de Animais (CEUA) da UFRRJ, tendo o seguinte número de protocolo 39642106-17.



Figura 7: Animais lactentes utilizados no experimento.

De maneira individual os bezerros apresentaram-se dispostos em baias, compostas por um abrigo central (casinha), cama de feno e cobertura vegetal nativa, (Figura8).



Figura 8:A: Alojamento dos animais em experimentação (baia individual). B: Abrigo central (casinha) no interior das baias.

3.2.3 Formulação fúngica

A apresentação comercial avaliada foi MetarrilWP[®], composta por conídios do isolado ESALQ E9 do fungo *Metarhiziumanisopliae*, foi cedida pela empresa KoppertBiological Systems. Foi elaborada uma formulação contendo água destilada, 1% de Tween 80 e 10% de óleo vegetal (óleo de soja Soya,- BUNGE ALIMENTOS S/A) (formulação controle), além da formulação de Metarril WP[®] contendo 10% de óleo vegetal (óleo de soja Soya,- BUNGE ALIMENTOS S/A) e 1% de Tween 80 (formulação tratamento), figura 9. A formulação oleosa de Metarril WP[®] foi padronizada 2×10^9 conídios/m² (1×10^7 conídios/ml). A viabilidade dos conídios foi verificada como descrita no item 3.1.4.



Figura 9: Preparo das formulações empregadas na experimentação.

3.2.4 Delineamento experimental

Os procedimentos adotados na experimentação, seguiram critérios preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), para a comercialização de produtos antiparasitários de uso em medicina veterinária (Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997). Os grupos foram formados de acordo com o grau de infestação dos animais, determinado pela contagem do total de carrapatos com diâmetro entre 4,5 e 8 mm contados no corpo de cada animal, nos três dias anteriores ao tratamento (-3, -2 e -1).

Os tratamentos com as formulações “controle e tratamento” foram aplicadas a cada sete dias, totalizando 11 tratamentos, com o auxílio de pulverizador costal (JACTO XP 20) e equipamentos de proteção individual, por toda a área da baía, na dosagem de 2×10^9 conídios/m², diluídos em 4 litros de formulação (1×10^7 conídios/mL), (Figura 10).



Figura 10: Pulverização das formulações oleosas nas baias experimentais.

Os animais não foram banhados com as formulações, somente o ambiente no qual se encontravam. Foram realizadas três pesagens dos animais, por meio de fita barimétrica, para posterior verificação de ganho de peso. Após cada pulverização nas baias, foram realizadas contagens dos espécimes de *R. microplus* com 4,5 a 8,0 mm de diâmetro presentes no antímero direito dos animais, nos dias 0, +3 e +7, de cada tratamento. Para a avaliação da eficácia da formulação utilizou-se a fórmula descrita por Henderson; Tilton (1955):

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

onde:

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

C_a = número médio de carrapatos recuperados dos animais controle, após o dia do tratamento;

C_b = número médio de carrapatos recuperados dos animais controle nos 3 dias anteriores ao tratamento.

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

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade dos Conídios de *Metarhiziumanisopliae*

Em ambos os experimentos, os conídios do produto Metarril WP[®] formulados em 1% e Tween 80, 10% de óleo mineral ou vegetal e mantidos a 25 ± 1 °C e UR \geq 80% apresentaram 100% de germinação em até 72 horas. Este resultado indica que o óleo utilizado na formulação atrasou o processo de germinação dos conídios, entretanto, não afetou a viabilidade e a capacidade destes serem utilizados nos experimentos.

4.2 Eficácia de Metarril WP[®] em pastagem artificialmente infestada (Teste em Canteiros)

Após a coleta dos dados, ficou constatado que a formulação oleosa de Metarril D15 800 alcançou 72,6 % e 71,6% de eficácia quando comparada ao Controle e Controle D15 800, respectivamente. De modo geral, os tratamentos utilizando conídios de *M. anisopliae* apresentaram percentual de eficácia variando de 31,5 % a 72,6%, na recuperação de larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas submetidas as referidas apresentações, sob condições naturais, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Percentual de eficácia da formulação oleosa de Metarril WP[®], na concentração 1×10^9 conídios/mL de *Metarhiziumanisopliae*, em condições naturais de pastagem.

Grupos	Percentual de eficácia CTL ^a	Percentual de eficácia CTL D0 400 ^b	Percentual de eficácia CTL D15 400 ^c	Percentual de eficácia CTL D0 800 ^d	Percentual de eficácia CTL D15 800 ^e
Controle	--	--	--	--	--
Controle D0 400	3,6	--	--	--	--
Controle D15 400	- 6,0	--	--	--	--
Controle D0 800	- 15,1	--	--	--	--
Controle D15 800	- 43,7	--	--	--	--
Metarril D0 400	31,5	52,3	--	--	--
Metarril D15 400	40,2	--	43,6	--	--
Metarril D0 800	41,1	--	--	48,8	--
Metarril D15 800	72,7	--	--	--	71,6

^a Percentual de eficácia calculado em relação ao grupo controle.

^b Percentual de eficácia calculado em relação ao grupo controle oleoso D0 400.

^c Percentual de eficácia calculado em relação ao grupo controle oleoso D15 400.

^d Percentual de eficácia calculado em relação ao grupo controle oleoso D0 800.

^e Percentual de eficácia calculado em relação ao grupo controle oleoso D15 800.

Após análise estatística, a formulação oleosa de Metarril com dois tratamentos e utilizando um volume de 800 mL (Metarril D15 800) diminuiu significativamente o número médio de larvas recuperadas quando comparada a todos os grupos controle e tratados, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Número médio e desvio padrão de larvas recuperadas de *Rhipicephalus microplus* provenientes de fêmeas ingurgitadas expostas a formulação oleosa do produto Metarril WP[®], na concentração 1×10^9 conídios/mL de *Metarhiziumanisopliae*, em condições naturais de pastagem.

GRUPOS	MÉDIAS E DESVIO PADRÃO
CONTROLE	1593,6 ± 171,9 a
CONTROLE D0 400	1535,6 ± 195,8 a
CONTROLE D15 400	1689,0 ± 330,0 a
CONTROLE D0 800	1834,0 ± 493,0 a
CONTROLE D15 800	2290,0 ± 992,3 a
METARRIL D0 400	1091,8 ± 115,6 b
METARRIL D15 400	952,2 ± 145,2 b
METARRIL D0 800	938,8 ± 204,9 b
METARRIL D15 800	435,4 ± 244,1 c

Médias seguidas pela mesma letra numa mesma coluna não diferem entre si ($P < 0,05$), pelo Teste de Kruskal Wallis.

Para melhor visualização os dados climáticos, foram organizados a cada três dias como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3.Dados climáticos coletados a cada três dias por meio do equipamento HOBO, percentual médio da umidade relativa do ar mínima, percentual médio da umidade relativa do ar máxima, temperatura ambiente mínima e temperatura ambiente máxima da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (EEPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

DIAS EM EXPERIMENTO	% UR MIN.	% UR MÁX.	% UR MÉDIO	TEMP. °C MIN.	TEMP. °C MÁX.	TEMP. °C MÉDIA
0	57,4	90,3	73,8	23,1	29,1	26,1
+ 3	57,5	90,6	74,0	22,1	29,2	25,6
+ 6	85,3	89,0	87,1	22,6	25,1	23,8
+ 9	72,8	94,7	83,7	22,3	27,3	24,8
+ 12	82,7	96,4	89,5	20,7	23,9	22,3
+ 15	51,0	92,3	71,6	18,6	29,0	23,8
+ 18	37,9	80,5	59,2	23,4	35,1	29,2
+ 21	50,1	89,9	70,0	23,7	30,7	27,2
+ 24	32,8	86,0	59,4	25,1	36,8	30,9
+ 27	81,3	93,6	87,4	19,5	22,4	20,9
+ 30	60,0	94,9	77,4	22,9	26,2	24,5
+ 33	88,8	97,6	93,2	19,6	21,8	20,7
+ 36	77,7	95,6	86,6	22,6	26,8	24,7
+ 39	31,7	97,7	64,7	20,6	33,5	27,0
+ 42	80,0	97,3	88,6	23,7	26,6	25,1
+ 45	85,6	96,9	91,2	23,1	25,9	24,5
+ 48	71,5	98,5	85,0	22,4	28,0	25,2
+ 51	65,1	96,4	80,7	24,1	31,4	27,7
+ 54	74,6	95,5	85,0	23,0	27,2	25,1
+ 57	71,0	94,1	82,5	24,0	30,4	27,2
+ 60	89,6	96,1	92,8	20,3	24,2	22,2

4.3 Eficácia de formulação oleosa de Metarril WP[®] em área naturalmente infestada (Experimento Fazenda São Bento)

A Tabela 5, demonstra o peso médio dos animais utilizados na experimentação. Podemos constatar que, da primeira pesagem para a segunda o Grupo Controle ganhou em média 10,5 Kg de peso vivo, já o Grupo Tratado ganhou em média 14,7 Kg de peso vivo, ou seja, 4,2 Kg a mais, o que representa um ganho de peso de 40% no ganho de peso dos animais. Lembrando que os animais apresentavam-se no mesmo sistema de criação.

Tabela 5. Peso médio (Kg) dos animais mantidos nas baias pulverizadas com a formulação oleosa de Metarril WP[®] (grupo Tratado) ou com óleo vegetal e Tween 80 (grupo Controle).

1ª Pesagem		2ª Pesagem		3ª Pesagem	
Grupo Controle	Grupo Tratado	Grupo Controle	Grupo Tratado	Grupo Controle	Grupo Tratado
45,5	56,0	56,0	70,8	82,0	97,0

A Figura 11, representa a contagem média das fêmeas parcialmente ingurgitadas nos grupos avaliados. Podemos verificar que após a terceira avaliação, o grupo tratado com a formulação fúngica apresentou uma menor infestação, em relação ao grupo Controle.

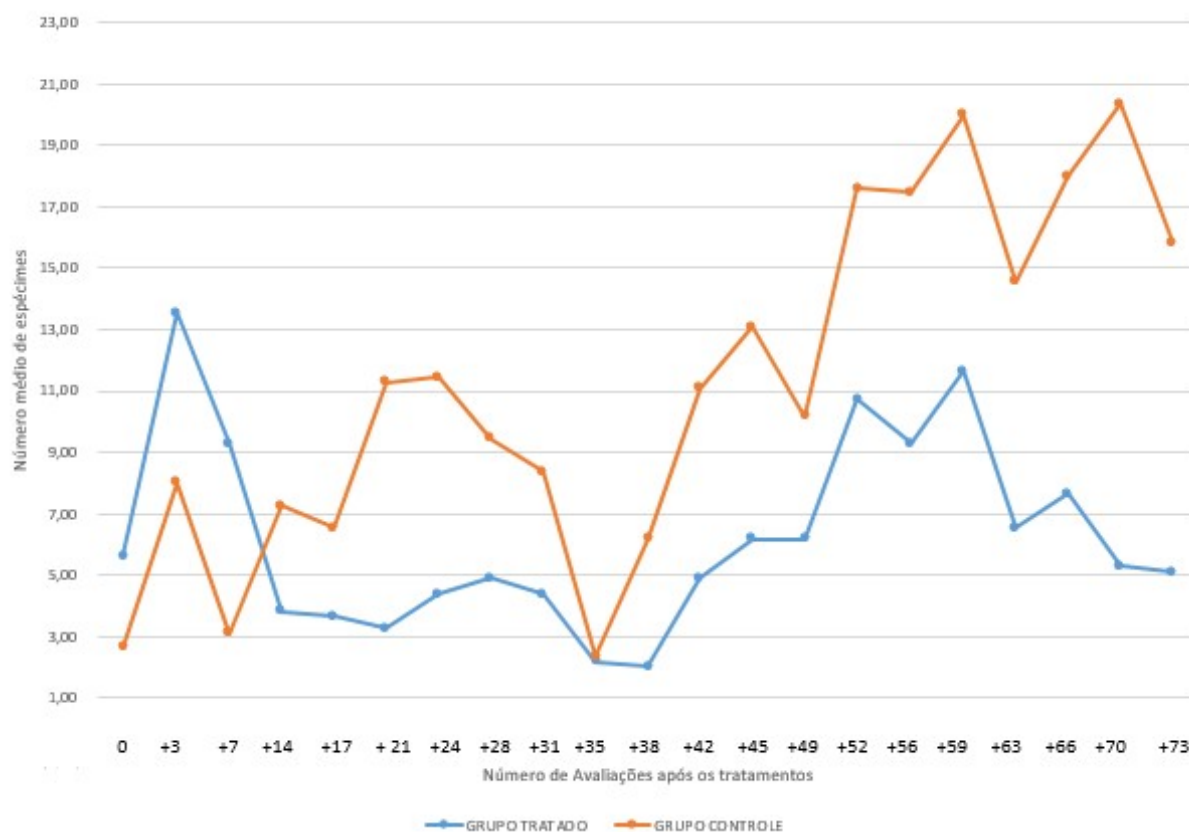


Figura 17: Número médio de carrapatos *Rhipicephalus microplus* com diâmetro superior a 4,5 mm verificado nos animais após tratamentos das baias com formulação de Metarril WP® acrescida de 10% de óleo vegetal.

Foi observada redução significativa no número médio de carrapatos no grupo tratado com a formulação oleosa de Metarril WP® em relação ao grupo controle a partir dos 35 dias do início das pulverizações semanais, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Número médio de carrapatos *Rhipicephalus microplus* obtido após tratamentos das baias com formulação de Metarril WP® acrescida de 10% de óleo vegetal.

Dias após início dos experimentos	Avaliações durante os experimentos	Grupo Controle	Grupo Tratado (Metarril WP® 10% óleo vegetal)
+3	01	2,63 a ± 3,62	3,20 a ± 3,61
+7	02	8,00 a ± 8,05	9,20 a ± 8,24
+10	03	3,09 a ± 4,76	5,40 a ± 5,42
+14	04	8,00 a ± 9,79	3,20 a ± 3,67
+17	05	7,20 a ± 15,20	3,40 a ± 3,53
+21	06	13,27 a ± 14,91	2,40 a ± 3,28
+24	07	11,45 a ± 14,00	2,40 a ± 5,14
+28	08	10,40 a ± 13,85	2,60 a ± 2,98
+31	09	9,20 a ± 8,80	3,60 a ± 6,45
+35	10	2,60 a ± 2,98	2,00 a ± 4,42
+38	11	6,80 a ± 5,82	1,40 b ± 2,50
+42	12	12,20 a ± 11,21	1,80 b ± 2,50
+45	13	14,20 a ± 8,86	3,00 b ± 3,68
+49	14	11,20 a ± 8,33	3,80 b ± 4,36
+52	15	19,40 a ± 13,30	6,60 b ± 8,16
+56	16	19,20 a ± 16,36	6,20 b ± 8,13
+59	17	22,00 a ± 13,56	9,00 b ± 7,31
+63	18	15,80 a ± 9,68	5,80 b ± 4,26
+66	19	19,60 a ± 13,72	6,40 b ± 6,24
+70	20	20,36 a ± 16,96	3,40 b ± 3,40
+73	21	17,40 a ± 12,29	4,40 b ± 2,21

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$) pelo teste de Kolmogorov and Smirnov.

Após o experimento, constatou-se que a apresentação comercial de Metarril WP® formulada em 10% de óleo vegetal, mostrou eficácia sobre a infestação de carrapatos *R. microplus* nos animais em estudo. Na primeira avaliação após a pulverização das baias, foi verificada eficácia de 23% da formulação oleosa de Metarril. Após o segundo tratamento semanal foi observada eficácia de 43%. Nas demais avaliações a eficácia mostrou -se superior aos 70%, chegando a 88% na 20ª avaliação, conforme

Figura 12.

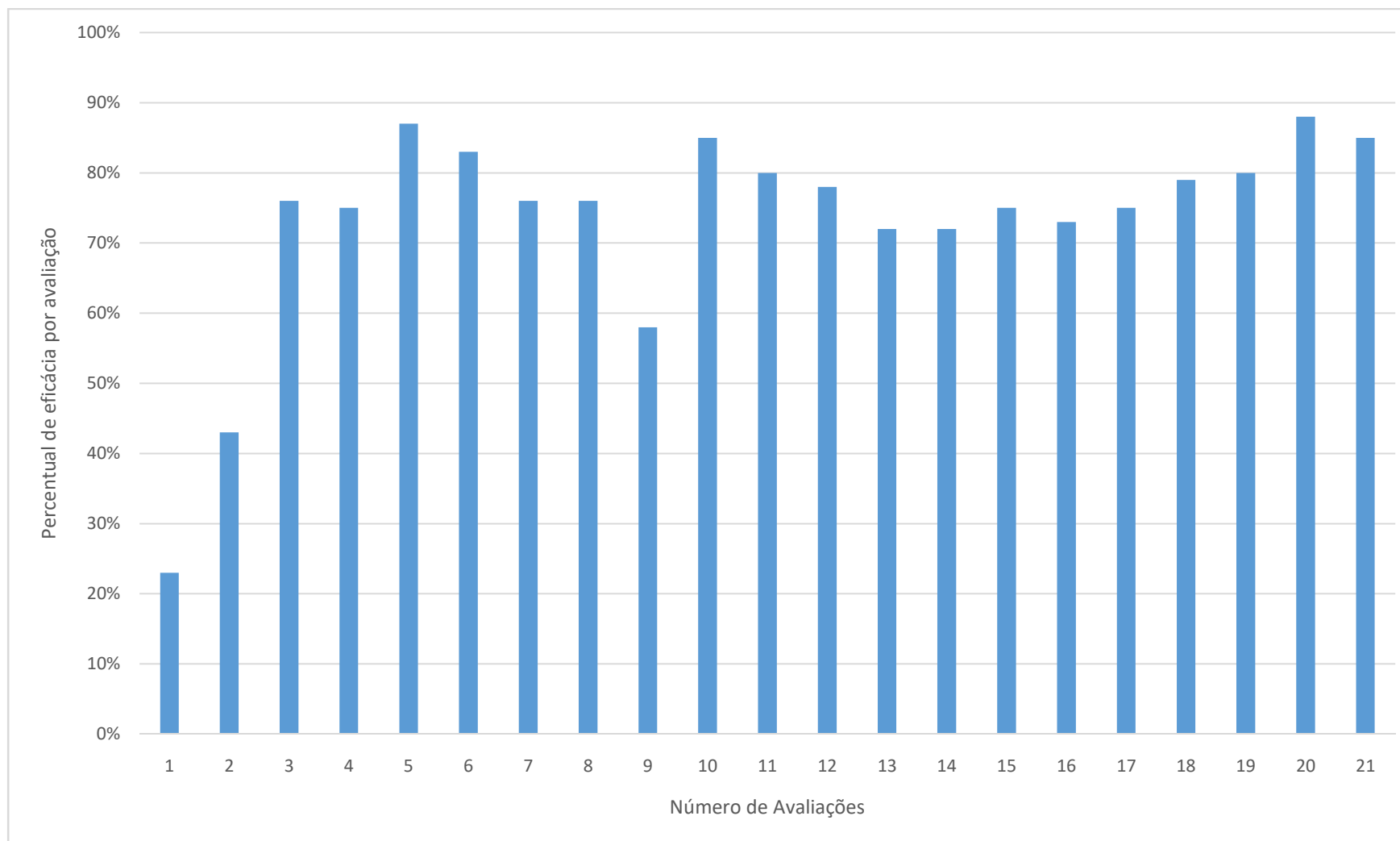


Figura 18: Eficácia (%) diária da formulação de Metarril WP® acrescida de 10% de óleo vegetal no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* após pulverizações das baias contendo bezerras naturalmente infestadas.

5 DISCUSSÃO

O processo de resistência dos carrapatos frente aos principais grupos químicos de acaricidas tem sido relatado ao longo dos anos (ROUSH, 1993; FREITAS et al., 2005; MENDES et al., 2012; SHARMA et al., 2012; CUTULLE et al., 2013, LOVIS et al., 2013; ABBAS et al., 2014; KLAFKE et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018). Desta forma, torna-se importante o emprego de meios alternativos para o controle de pragas. Samish et al., (2004) relataram que os carrapatos apresentam numerosos inimigos naturais, como bactérias, nematoides e fungos, sendo estes últimos considerados os mais promissores, destacando os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. O desenvolvimento de formulações eficazes é fundamental para o controle biológico do carrapato, visto que o processo de infecção fúngica nos artrópodes ocorre principalmente pela cutícula (BITTENCOURT et al., 1999) e assim, os fungos ficam expostos às condições ambientais adversas.

A partir da análise da viabilidade dos conídios, foi possível verificar que ambas as formulações de MetarrilWP[®] estavam aptas a serem utilizadas, pois apresentaram 100% de germinação. Entretanto, vale ressaltar que as formulações oleosas de Metarril WP[®] germinaram mais lentamente, alcançando 100% de germinação em até 72 horas. Camargo et al. (2012) ao estudarem a viabilidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em formulações oleosas e suspensões aquosas, verificaram que as formulações oleosas demoraram 48 horas para atingir 100% de germinação, enquanto que as suspensões aquosas demoraram 24 horas. De acordo com Polar et al. (2005), os conídios de *M. anisopliae* formulados em óleo de coco a 10% apresentaram germinação de 68% em 24 horas e de 100% após 48 horas de incubação. Provavelmente, o atraso na germinação ocorre devido aos componentes presentes na formulação oleosa, entretanto não interferem na viabilidade final dos conídios.

De acordo com Braga et al., (2001), os conídios podem sofrer danos diretos e indiretos reduzindo a capacidade entomopatogênica, onde pode-se destacar a radiação, como um dos principais agentes causadores, podendo ainda afetar o processo germinativo e estágios iniciais do tubo germinativo. Tais danos podem inviabilizar o uso destes biocontrolador, devido lesões no material genético e até mesmo mutações dos esporos fúngicos. De acordo com Francisco (2004), o fungo *M. anisopliae* apresenta sensibilidade à radiação UV-A e UV-B, interferindo na germinação dos esporos dos mesmos. Segundo Camargo (2012), os óleos atuam de diversas maneiras na proteção e

potencialização do desempenho dos fungos no controle de artrópodes. Podendo diminuir efeitos de dessecação e/ou evaporação, melhorando assim a eficácia da formulação a ser empregada (Alves et al., 2000).

A utilização de fungos artropodopatogênicos no controle de carrapatos vem sendo amplamente estudada, merecendo destaque quando os conídios são formulados (KAAYA et al., 2000; OJEDA-CHI et al., 2010; KAAYA et al., 2011). Diferentes constituintes já foram testados, dentre estes os óleos têm apresentado bons resultados (ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012). Peng e Xia (2011) analisaram os mecanismos de diferentes constituintes para a formulação de micoinseticidas sobre a eficácia de formulações oleosas do fungo *M. anisopliae*. Os autores concluíram que alguns constituintes das formulações fornecem condições que melhoram significativamente a ação dos conídios sobre a praga alvo. Neste contexto, o presente estudo não verificou nenhuma falha e/ou fator negativo, na utilização de óleos de diferentes origens (óleo mineral e óleo vegetal), destacamos a utilização do óleo de soja como promissor ao controle biológico, visto sua facilidade de aquisição, preço competitivo e eficácia junto ao Metarril WP®.

No presente estudo, desafiando os conídios de *M. anisopliae* em pastagem artificialmente infestada (Teste de canteiros), foi possível observar que a formulação do produto Metarril WP® acrescido de 10% de óleo mineral influenciou negativamente na recuperação de larvas de *R. microplus* provenientes de fêmeas ingurgitadas, alcançando 72,6% de percentual de eficácia. Bahiense et al., (2003), utilizando canteiros de *Brachiaria decumbens*, artificialmente infestados com larvas de *R. microplus*, constatou percentual de eficácia variando de 16,45% a 85,71%, após pulverização de suspensão de conídios de *M. anisopliae* na concentração 1×10^9 conídios/mL. Desta forma, fica retratado o efeito deletério que o agente biocontrolador possui na biologia do carrapato dos bovinos. Acreditamos que esta diferença no percentual de eficácia possa estar relacionada com a fase biológica utilizada nos experimentos, com a época do ano, com o isolado fúngico empregado ou até mesmo a espécie de forrageira, ao qual possa influenciar no microclima do ambiente. Garcia (2008), após pulverização de suspensão aquosa de conídios de *M. anisopliae*, não identificou redução na carga parasitária de larvas de *R. microplus*. Já Bahiense et al., (2003), constataram redução no número médio de larvas infestantes recuperadas. Fato este, também ocorrido no presente estudo, onde após análise estatística, a formulação oleosa de Metarril D15 800 diminuiu significativamente o número médio de larvas recuperadas quando comparada a todos os

grupos controle e tratados e especificamente reduziu em 3,6 vezes o número médio de larvas recuperadas, quando comparado ao grupo controle. De acordo com seus resultados, Bahiense et al., (2003), observaram efeito cumulativo de conídios de *M. anisopliae*, assim, sugerimos uma discreta ocorrência da mesma, devido resultados alcançados na presente experimentação.

Os dados coletados de umidade e temperatura médios, apresentaram em algumas situações discreta variação, ao qual acreditamos, não terem causado comprometimento no efeito dos tratamentos empregados no estudo. A temperatura considerada ideal para o desenvolvimento dos fungos com ação artropodopatogênica varia entre 25 e 35°C (COONEY; EMERSON, 1964). Segundo Fargues et al. (1992), para o crescimento micelial de *M. anisopliae*, a temperatura adequada varia entre 37 e 40°C, embora para a germinação dos conídios, a temperatura média deva estar entre $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (ALVES, 1998). A umidade do ambiente pode alterar a germinação dos conídios, auxiliando ou dificultando a ação dos agentes microbianos (LAZZARINI et al., 2006). Em geral, fungos filamentosos necessitam de alta umidade relativa do ar para desenvolverem seu processo de infecção (ALVES, 1998). Entretanto, Zimmermann (2007) observou crescimento do fungo *Beauveria bassiana* em umidade atmosférica entre 60% e 70%, sendo estas consideravelmente baixas.

Os experimentos realizados em condições naturalmente infestadas, demonstraram ganho de peso dos animais utilizados na experimentação, onde averigou-se ao final do estudo, ganho de 40% a mais de peso, dos animais alocados no grupo tratado com formulação oleosa de Metarril WP[®] acrescida de 10% de óleo vegetal, sendo importante ressaltar que todos os animais apresentavam-se no mesmo sistema de criação. Segundo Grisi et al., (2014), a rentabilidade da pecuária pode ser diminuída significativamente pelos efeitos dos parasitos que afetam o gado, onde no Brasil o artrópode *R. microplus* causa perdas econômicas próximas a 3,24 bilhões de dólares anualmente.

As pulverizações semanais de Metarril WP[®] acrescido de 10% de óleo vegetal sob área naturalmente infestada, foram capazes de reduzir o número médio de espécimes em animais em fase de cria, 35 dias após o início da experimentação. Sendo observado ainda, eficácia de 23% na primeira avaliação, após o segundo tratamento semanal foi observada eficácia de 43% e nas demais avaliações, a eficácia mostrou-se superior aos 70%, chegando aos 88%. Já Webster et al., (2015), avaliando suspensões aquosas de *M. anisopliae* na concentração de 1×10^8 conídios/mL, pulverizadas

diretamente em bovinos a cada 21 dias, constatarem percentual de eficácia de 56,3%. Camargo et al., (2016), ao avaliarem formulação de conídios de *M. anisopliae* formulados em 10% óleo mineral, pulverizadas diretamente em bovinos, alcançaram eficácia de até 90.5%. Apesar da diferença na metodologia de aplicação, ambos os trabalhos demonstram o efeito potencializando/adjuvante que a formulação oleosa oferece à patogenicidade do fungo *M. anisopliae*. Assim, o controle da infestação durante a fase não parasitária (infestação da pastagem) torna-se de suma importância, pois 95% dos carrapatos estão no ambiente e apenas 5% estão presentes no hospedeiro.

Além dos resultados promissores ao controle integrado do carrapato *R. microplus*, destacamos crescente procura por alimentos de origem animal sem resíduos químicos ao longo dos tempos, tornando o controle biológico atrativo, pois além de atender uma demanda da sociedade quanto ao fornecimento de produtos orgânicos, torna-se uma alternativa para melhorar as questões de ocorrência de resistência aos quimioterápicos (SAMISH et al., 2004). Camargo et al. (2014) destacaram a importância de avaliar biopesticidas produzidos por empresas especializadas sobre carrapatos, pois são ofertados prontos, facilitando assim o transporte, o armazenamento, a manipulação, a aplicabilidade além de serem produzidos em larga escala. As intempéries ambientais influenciam negativamente na ação dos agentes biocontroladores, limitando o emprego do controle biológico. Desta forma, mais pesquisas são necessárias para encontrar “pontos-chaves” e/ou regiões específicas para a utilização de fungos artropodopatogênicos.

6 CONCLUSÕES

A formulação do produto MetarrilWP[®] acrescida de 10% de óleo vegetal ou mineral é eficaz no controle biológico do carrapato *Rhipicephalus microplus*, após pulverização do ambiente, reduzindo a quantidade de larvas, podendo influenciar na carga parasitária animal.

A utilização de óleo vegetal na composição da formulação fúngica, torna-se mais atrativa, devido ao valor de mercado, facilidade de aquisição e eficácia.

A apresentação comercial Metarril WP[®] acrescida de 10% de óleo vegetal utilizadas em protocolos semanais de pulverizações ambientais, reduziu a carga parasitária animal.

O produto Metarril WP[®] acrescida de 10% de óleo mineral, apresentou maior eficácia, quando aplicado em duas pulverizações com 15 dias de intervalo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6-20, 2014.

ALONSO-DIAZ, M. A.; GARCIA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGUN, C. A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhiziumanisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilusmicroplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 336-340, 2007.

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

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

AMARAL, M. A. Z.; ROCHA, C. M. B. M.; FACCINI, J. L.; FURLONG, J.; MONTERIO, C. M. O.; PRATA, M. C. A. Strategic control of cattle ticks: milk producers' perceptions. **Revista Bras. Parasitol. Vet.** v. 20, p. 148-154, 2011.

ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato do boi *Rhipicephalusmicroplus* aos acaricidas no Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC180.pdf>>. Acesso em 18 de dezembro de 2017.

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

ARAÚJO, F. R. **Introdução à pecuária ecológica: a arte de criar animais sem drogas ou venenos**. Porto Alegre: Digital Store, 2000. 136p.

ARAÚJO, L. X. R.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R. S.; SENRA, T. O. S.; MATURANO, R.; PRATA, M. C. A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalusmicroplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. **Parasitology Research**. 2015.

BAHIANSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Compatibility of the fungus *Metarhiziumanisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilusmicroplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 319-324. 2006.

BARON, S.; VAN DER MERWE, N. A.; MADDER, M.; MARITIZ-OLIVIER, C. (2015) SNP Analysis Infers that Recombination Is Involved in the Evolution of Amitraz Resistance in *Rhipicephalusmicroplus*. **Plos One**. In Press. 2015

Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS. 2002. p. 295-317.

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

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

BITTENCOURT, V. R. E. P.; LIMA, F.; MASSARD, C. L. Uso do *Metarhiziumanisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilusmicroplus* (Canestrini, 1887). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 197-202, 1992

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

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

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, n.2, p.98-108. 2001

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

BRITO, L. G. **Carrapatograma: um aliado do produtor na exploração leiteira**. 2008. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/pdf.php/?node=103589>>. Acesso em: 07 de dezembro de 2017.

CAMARGO, M. G. **Uso do fungo *Metarhiziumanisopliae* no controle do carrapato *Rhipicephalusmicroplus*: testes em condições laboratoriais e a campo**. 2014. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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. *Metarhiziumanisopliae* for controlling *Rhipicephalusmicroplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 1, p. 38-42, 2016.

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

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

CASTRO, K.N.C.; ISHIKAWA, M.M.; CATTO, J.B. Avaliação *in vitro* do pinheiro brasileiro para controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4. 2575-2578, 2009.

CHAGAS, A. C.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Veterinária**. São Paulo, v. 39, p. 247-253, 2002.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi. An Account of their biology, activities and classification**. Londres: W.H. Freeman, 1964. 188p.

CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C.; VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.189-191, 1998.

COSTA, M.; SARQUIS, MIM.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro state, Brazil. **Mycopathologia**. v. 154, p. 207-209, 2002.

CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELO, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G.; SABAA-SRUR, A. U.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 228, p. 137-143, 2016

CUTULLÉ, C.; LOVIS, L.; D'AGOSTINO, B. I.; BALBIANI, G. G.; MORICI, G. CITRONI, D.; REGGI, J.; CARACOSTANTOGODA, J. L. *In vitro* diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. **Vet. Parasitology**, v. 192, p. 296-300, 2013.

DE LA FUERTE, J. ALMAZAN.; DE LA LASTRA, J. M. P.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal Health**. v. 8, p. 23-28, 2007.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230p.

DUBOVSKIY, I. M.; GRIZANOVA, E. V.; WHITTEN, M. M.; MUKHERJEE, K.; GREIG, C.; ALIKINA, T.; KABILOW, M.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V. V.; BUTT, T. M. Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Virulence**, v. 7, 860 – 870, 2013.

FARGUES, J.; MANIANIA, N. K.; DELMAS, J. C.; SMITS, N. Influence of temperature on *in vitro* growth of entomopathogenic hyphomycetes. **Agronomie**, v. 12, p. 557-564, 1992.

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

FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potencial of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, 300-305, 2012.

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

FERREIRA, F. M. ; DELMONTE, C. ; NOVATO, T. L. P. ; MONTEIRO, C. M. O. ; DAEMON, E. ; VILELA, F. M. P. ; AMARAL, M. P. H. . Acaricidal activity of essential oil of *Syzygiumaromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalusmicroplus*. **Medical and VeterinaryEntomology**. 2017

FIOROTTI J. P. ; FERREIRA, J. R. T. ; MARCIANO, A. F. ; FREITAS, M. C.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B. ; CAMARGO, M. G. ; ANGELO, I. C. ; BITTENCOURT, V. R. E. P.; GOLO, P. S. Associação de *Metarhiziumanisopliae* sensu lato e cipermetrina para o controle de *Rhipicephalusmicroplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 66-74, 2016.

FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância médico veterinária**. 3 Ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4ª Ed. São Paulo: Ícone, 2004. 608p.

FRANCISCO, E.A. **Tolerância de bioinseticidas comerciais à base de *Metarhiziumanisopliae* à radiação UV-A e UV-B e efeito do tempo de cultivo dos conídios**. 2004. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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

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

FURLONG, J; MARTINS, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. 2000.Disponívelem:<<http://www.cnpql.embrapa.br/nova/informacoes/pastprod/textos/34Instrucao.pdf>>. Acesso em 20 de dezembro 2017.

GARCIA, G. R.; MARUYAMA, S. R.; NELSON, K. T.; RIBEIRO, J. M. C.; GARDINASSI, L. G.; MAIA, A. A. M.; FERREIRA, B. R.; KOOYMAN, F. N.; SANTOS, I. K. F. M. Immunerecognition of salivaryproteins from the cattletick*Rhipicephalusmicroplus*differsaccording to the genotype of the bovine host. **Parasites & Vectors**. v. 10, p. 144-149, 2017

GARCIA, M. V. Aplicação do fungo *Metarhiziumanisopliae* em pastagem visando o controle do carrapato *Boophilusmicroplus* em bovinos. 2008. 58p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalussanguineus* causadas pelo fungo *Metarhiziumanisopliae*. **Ciência Rural**. v. 34, p. 1513-1518, 2004.

GEORGE, J. E; POUND, J. M; DAVEY, R. B. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: BOWMAN A. S.; NUTTALL P. A. **Ticks: Biology, Disease and Control**. U. K: Cambridge University Press, 2008, P. 408-423.

GINSBERG, H. S., LEBRUN, R. A., HEYER, K. & ZHIOUA, E. Potential nontarget effects of *Metarhiziumanisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). **EnvironmentalEntomology**, v. 31, p. 1191–1196, 2002.

GONZALES, J. C. **O controle dos carrapatos do boi**. 2. Ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 79p.

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

GUERRERO, F. D.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K. G.; CUNHA, R. C.; MILLER, R. J.; YEATER, K.; LEÓN, A. P. Rhipicephalus (Boophilus) microplusaquaporin as an effectivevaccineantigen to protectagainstcattletickinfestations. **Parasites & Vectors**. v. 7, p. 475-479, 2014.

HEIMERDINGER, A. **Extrato alcoólico de capim cidreira no controle do carrapato de bovinos**. 2005. 64 f. Dissertação (mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricidesagainst the brownwheat mite. **Journal EconomicEntomology**, v. 48, p. 157-161, 1955.

HERNANDEZ, L. E; PARRA, D. G; MARINI, A. C. Ação repelente e acaricida da *Melinisminutiflora* sobre o *Boophilusmicroplus*. **Revista de Ciências Químico Farmacêuticas**, v.16, p.17-21, 1987.

HIBBETT, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**. v. 111, p.509–547, 2007.

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

JAMES, R. R.; CROFT, B. A.; SHAFFER, B. T.; LIGHTHAT, B. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveriaabassiana* and a coccinellid. **Environmental Entomology**, v. 27, p. 1506–1513, 1998.

JANER, E. C.; RIFRAN, L.; GONZALEZ, P.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 172-177, 2010.

JENKINS, D.W. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 30, p. 1–150, 1964.

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

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

KETTLE, D.S. Ixodida-Ixodidae (Hard ticks). In: KETTLE, D.S. **Medical and Veterinary entomology**. 2. Ed. CAB International: Wellingford, 1995. p.423-450.

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B. D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; LA CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J. R. Multipleresistance to acaricides in fieldpopulations of *Rhipicephalusmicroplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borneDiseases**, IN PRESS, 2016.

LAGE, T. C. A. ; MONTANARI, R. M. ; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O. ; SENRA, T. O. S. ; ZERINGOTA, V.; MATOS, R. S.; DAEMON, E . Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharisdracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalusmicroplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**. 2014

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; Monteiro, C. M.O.; OLIVEIRA, S. S. T.; ZERINGOTA, V.; Calmon, F.; SILVA MATOS, R.; Daemon, E. Activity of essential oil of *Lippiatriplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalusmicroplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 112, p. 863-869, 2013.

LAZARINI, G. M. J.; ROCHA, L. F. N.; LUIZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhiziumanisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatomainfestans*. **Mycological Research**, v. 110, p. 1-11, 2006.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhiziumanisopliae* as a biopesticide for the cattletick *Boophilusmicroplus*. **Journal of InvertebratePathology**. v. 97, p. 40-49, 2008.

LEW-TABOR, A. E.; BRUYERES, A. G.; ZHANG, B.; VALLE, M. R. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and

vaccine candidate (antibody) screening. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 500-510, 2014.

LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J.; GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 193-200, 2004.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; PÉREZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* *Metarhiziumanisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 27-31, 2007.

LORD, J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, V.89, 19-29, 2005.

LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B. K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINE, C. R.; SCHARANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Evaluation of *Metarhiziumanisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 78-88, 2008.

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

MARCIANO, A. F.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; PERINOTTO, W. M. S.; CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; SÁ, F. A.; QUINELATO, S.; FREITAS, M. C.; ANGELO, I. C.; NOGUEIRA, M. R. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhiziumanisopliae*: Influencia do pH na atividade enzimática e no controle de *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 85-90, 2015

MARTINEZ, M.L.; DA SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, Pirassununga, SP, p. 1-3, 2004.

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

MENDES, E. C. **Resistência do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) a amitraz e alternativas de controle com extratos vegetais e fungos entomopatogênicos**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Bovinos e Bubalinos-Serviços Veterinários Estaduais**. Ministério da Agricultura. 2018. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidadeanimal/DadosderebanhobovinoebubalinodoBrasil_2017> Acesso em: 28 de maio de 2018.

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

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

MWANGI, E. N., DIPEOLU, O. O., NEWSON, R. M., KAAYA, G. P. & HASSAN, S.M. Predators, parasitoids and pathogens of ticks: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 1, 147–156, 1991.

NOGUEIRA, M. R. S. **Eficácia*in vitro* de diferentes formulações de *Metarhiziumanisopliae* s.l. no controle do carrapato *Rhipicephalusmicroplus***. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

OJEDA-CHI. M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. L.; GALINDO-VELOSO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhiziumanisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalusmicroplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Vet. Parasitol**, v. 170, p. 348–354, 2010.

ONOFRE, S.B.; VARGAS, L.R.B.; ROSSATO, M.; BARROS, N.M.; BOLDO, J.T.; NUNES, A.R.F.; AZEVEDO, J.L. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS. 2002. p. 295-317.

PAIXÃO, F.R.S. ; MUNIZ, E.R. ; BARRETO, L.P. ; BERNARDO, C.C. ; MASCARIN, G.M. ; LUZ, C. ; FERNANDES, É.K.K. Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhiziumanisopliae* and *M. robertsii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, p. 324-337, 2017.

PARIZI, L. F.; RECK Jr, J.; OLDIGES, D. P.; GUIZZO, M. G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J. R.; VAZ Jr, I. S. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. **Vaccine**, v. 30, p. 6912-6917, 2012.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; GONZALEZ, C. Z.; GUZMÁN, F.; MARTINS-FILHO, O. A.; AFONSO, L. C. C.; VALENTE, F. L.; PECONICK, A. P.; PATARROYO, A. M. V.; SOSSAI, S. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalusmicroplus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 333-339, 2009.

PENG, G.; XIA, Y. The mechanism of the mycoinsecticidediluent on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. **Bio Control**, v. 56, p. 893-902, 2011.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFFKE, G. M. ***Rhipicephalus(Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência***. 1 ed. São Paulo: Med Vet Livros, 2008, 192p.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GÔLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, SIMONE; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; BEYS DA SILVA, W. O.; SALLES, C.M.C; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhiziumanisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: Biochemical marker of fungal virulence in *Rhipicephalusmicroplus* (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 123-132, 2013.

PERINOTTO, W.M.S.1; ANGELO, I. C.; GOLO, P.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; RODRIGUES, C. J. B. C.; MARCIANO, A. F.; MONTEIRO, C. M. O.; BITTENCOURT, V. R. E. P. In vitro pathogenicity of different *Metarhiziumanisopliae* s.l. isolates in oil formulations against *Rhipicephalusmicroplus*. **Biocontrol Science and Technology**. 2017

POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. Comparison of water, oils and adjuvant oils as formulating agents for *Metarhiziumanisopliae* for use in control of *Boophilusmicroplus*. **Mycopathologia**, v. 16, p. 151-157, 2005.

POSADAS, J. B.; LECUONA, R. E. Selection of native isolates of *Beauveriaabassiana*(Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus(Boophilus) microplus*(Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.46, p.284-291, 2009.

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

QUINELATO, S.; GOLO, P. S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence potential of *Metarhiziumanisopliae* s.l isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

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

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

ROBERTS, D.W.; FLINT, S.D. Tools of the UV trade: Light sources, filtering, measuring irradiance, and selecting biological weighting factors (action spectra). **Proceedings of the International Colloquium on Insect Pathology and Microbial Control**. EMBRAPA/Soja, Londrina, PR, Brazil. p. 237-240, 2002.

ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, P. R.; LEITE, R. C.; CARDOSO, D. L.; CALIC, S. B.; FURLONG, J. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, M.G, sobre o carrapato *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**, v. 36, p.1235-1242, 2006.

RODRIGUES, V. S.; BONATTE, P.; GARCIA, M. V.; HIGA, L. O. S.; PIÑA, F. T. B.; ZIMMERMANN, N. P.; DUARTE, P. O.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Efficacy profile of Cypermethrin and Chlorpyrifos based acaricides on *Rhipicephalus microplus* control on cattle in the rearing phase, naturally infested and exposed to tick fever agents in central Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 12, p.43–48, 2018.

RODRIGUES, V. S.; BONATTE, P.; GARCIA, M. V.; HIGAA, L. O. S.; PINA, F. T. B.; ZIMMERMANN, N. P.; DUARTE, P. O.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Efficacy profile of Cypermethrin and Chlorpyrifos based acaricides on *Rhipicephalus microplus* control on cattle in the rearing phase, naturally infested and exposed to tick fever agents in central Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.12, p. 43–48, 2015.

ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. **Parasitology Today**, v.9, p. 174-179, 1993.

SAHAGUN, C. A. A.; GUTIERREZ, R. L.; OCHOA, J. M.; RUBIO, P. A.; SKODA, S. R.; VARQUEZ, C. C.; LORENZONI, A. G.; VELASCO, E. G.; SANCHEZ, H. F.; FOSTER, J. E. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hymenochaetales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus* = *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 278-286, 2010.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 389–403, 2004.

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

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

SCHUMACHER, V.; POEHLING, H. M. In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhiziumanisopliae*. **Fungal Biology**, v. 116, p. 121-132, 2012.

SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; VAZ Jr, I. S. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, p. 149-156, 2012.

SEQUEIRA, T. C. G. O.; AMARANTE, A. F. T. **Parasitologia animal. Animais de produção**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2002. 158p.

SHARMA, A. K.; KUMAR, R.; KUMAR, S.; NAGAR, G.; SINGH, N. K.; RAWAT, S. S.; DHAKAD, M. L.; RAWAT, A. K.; RAY, D. D.; GHOSH, S. Deltamethrin and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India. **Vet. Parasitology**, v. 188, p. 337–345, 2012.

SHELTON, A. M.; ROUSH, R. T. Resistance to insect pathogens and strategies to manage resistance. In: **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, p. 829–845, 2000.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal), Mercado Veterinário: classe terapêutica e espécie animais. 2014. **Disponível em:** <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. **Acesso em:** 24 de dezembro de 2017.

SOUZA, E. J. DE. **Avaliação da eficácia de bioacaricidas a base de fungos entomopatogênicos, em diferentes formulações, no controle dos carrapatos *Anocentornitens* e *Boophilus microplus***. 2003. 56 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SUNG, G. H.; HYVEL-JONES, N. L.; SUNG, J. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; SHERTHRA, B.; SPATAFORA, J. W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**. v. 57, p. 1-59, 2007.

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

WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; AGNOL, B. D.; KLAFKE, G. M.; BEYS DA SILVA, W.; MARTINS, J. R.; SCHRANKA, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhiziumanisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**. v. 207, p. 302–308, 2015.

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

WILLADSEN, P. Immunological approaches to the control of ticks. **Advances in Parasitology**, v. 18, p. 293-313, 2006.

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

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

