

**AÇÃO *IN VITRO* DOS FUNGOS *Beauveria bassiana* (BALSAMO)  
VUILLEMIN, 1912 E *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879)  
SOROKIN, 1883 SOBRE NINFAS E ADULTOS DE *Amblyomma cajennense*  
(FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

**ROSANA COLATINO SOARES REIS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**

**AÇÃO *IN VITRO* DOS FUNGOS *Beauveria bassiana* (BALSAMO)  
VUILLLEMIN, 1912 E *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879)  
SOROKIN, 1883 SOBRE NINFAS E ADULTOS DE *Amblyomma cajennense*  
(FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

**ROSANA COLATINO SOARES REIS**

**SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA:  
Dra. VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT**

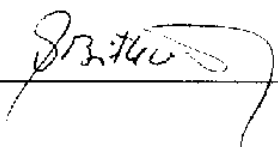
Tese submetida como requisito parcial  
do grau de *Magister Scientiae* em  
Medicina Veterinária – Parasitologia  
Veterinária.

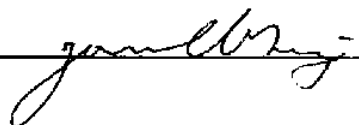
**SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO  
FEVEREIRO, 2001**

**AÇÃO *IN VITRO* DOS FUNGOS *Beauveria bassiana* (BALSAMO)  
VUILLLEMIN, 1912 E *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879)  
SOROKIN, 1883 SOBRE NINFAS E ADULTOS DE *Amblyomma cajennense*  
(FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

**ROSANA COLATINO SOARES REIS**

**APROVADA EM: 20/02/2001**

  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

*Dedico:*

*Aos meus pais pelo apoio incomensurável.  
Aos meus irmãos Roberta e Roberto Júnior.  
A Fabio pelo carinho e dedicação.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por conceder-me esta oportunidade, dando-me força e saúde dos momentos difíceis neste empreendimento.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho; em especial:

À Prof. Dra. VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT pela orientação, amizade e apoio durante a realização deste curso.

À amiga DENISE RIBEIRO DE MELO, pela ajuda e participação em todas as fases da minha vida pessoal e profissional vividas na UFRRJ.

À EDSON JESUS DE SOUZA pela importante orientação no início desta carreira.

À MÁRCIA CRISTINA DE AZEVEDO PRATA, primeiramente pelo companheirismo e amizade, e pela constante dedicação no auxílio ao manejo realizado com os animais experimentais a campo.

À GISELA LARA DA COSTA, pelo auxílio e ensinamentos, sempre acompanhados de muita dedicação.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária, pelos ensinamentos e convívio, em especial ao Professor ERIK DAEMON DE SOUZA PINTO, que contribuiu direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos colegas de curso SANDRA BORGES SILVA, ELZA MIKA SUZUKI, ÍSIS ABEL BEZERRA e os bolsistas de Iniciação Científica ÉVERTON KORT KAMP, THIAGO BAHIANSE E GRAZIELA SAVASTANO, pelo apoio obtido em todas as etapas deste curso.

Aos funcionários ELCY CARVALHO, LEY LOPES DA SILVA, WILSON MENDES DE ALMEIDA, pelos préstimos oferecidos durante o curso.

Ao Instituto de Zootecnia, em especial à Professora MARIA PAZ ABRAILA LOPES DE CRESPI, e ao funcionário do setor de Cunicultura PEDRO TIMÓTEO, sempre eficiente e disposto a ajudar.

À CAPES pelo auxílio financeiro desde o início do presente trabalho.

## BIOGRAFIA

Rosana Colatino Soares Reis, filha de Roberto dos Anjos Reis e Vilma Colatino Soares Reis, nascida no Município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro em 21 de Setembro de 1973.

Cursou o Primeiro Grau no Colégio Estadual Arthur Vargas e o Segundo grau no Colégio São José, em Angra dos Reis, concluindo-o em Dezembro de 1989.

Em 1994 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Seropédica, Rio de Janeiro, no Curso de Zootecnia, graduando-se em Outubro de 1999. Durante este curso foi Bolsista de Iniciação Científica Programa PIBIC / CNPq – UFRRJ, no período de Setembro de 1998 a Junho de 1999, sob a orientação da Professora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, sendo premiada em 1º lugar na IX Jornada de Iniciação Científica, Área Ciências da Vida, conferido pela apresentação do trabalho “Avaliação da Eficácia *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. 1. Ninfas alimentadas de *Amblyomma cajennense*.”

Em Setembro de 1999 iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Controle Microbiano de Artrópodes utilizando Fungos Entomopatogênicos...4</b>	
<b>2.2 Controle Microbiano de Carrapatos por Fungos Entomopatogênicos .....9</b>	
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Localização do Experimento.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Animais utilizados .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Obtenção dos Ínstares de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>14</b>
3.3.1 Ninfas não Ingurgitadas .....	14
3.3.2 Ninfas Ingurgitadas .....	15
3.3.3 Adultos não alimentados.....	16
3.3.4 Fêmeas Ingurgitadas .....	16
<b>3.4 Fungos Entomopatogênicos .....</b>	<b>17</b>

3.4.1	Obtenção das amostras de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .....	17
3.4.2	Elaboração das suspensões conidiais.....	18
3.4.3	Quantificação do inóculo .....	21
<b>3.5</b>	<b>Bioensaios .....</b>	<b>22</b>
3.5.1	Infecção <i>in vitro</i> de ninfas não ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	22
3.5.2	Infecção <i>in vitro</i> de ninfas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	23
3.5.3	Infecção <i>in vitro</i> de adultos não alimentados de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	24
3.5.4	Infecção <i>in vitro</i> de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	24
<b>3.6</b>	<b>Isolamento dos Fungos após bioensaios .....</b>	<b>27</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise Estatística e Próbites.....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Percentual de recuperação de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> utilizadas em infestações artificiais em equinos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Ninfas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Ninfas alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>Adultos não alimentados de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5</b>	<b>Fêmeas Ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>38</b>
4.5.1	Período médio de Pré-postura .....	38
4.5.2	Período médio de Postura.....	39
4.5.3	Período médio de Incubação .....	42
4.5.4	Peso médio da Postura.....	43
4.5.5	Período médio de Eclosão .....	46
4.5.6	Percentual médio de Eclosão.....	47

4.5.7	Peso médio Inicial das Fêmeas ingurgitadas .....	50
4.5.8	Peso médio das Quenóginas .....	51
4.5.9	Índice de Eficiência Nutricional, Índice de Eficiência Reprodutiva, Percentual de Controle e Eficiência Reprodutiva.....	52
<b>4.5.</b>	<b>Isolamento dos Fungos após Bioensaios.....</b>	<b>61</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Ninfas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2</b>	<b>Ninfas alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3</b>	<b>Adultos não alimentados de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>5.4</b>	<b>Fêmeas Ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....</b>	<b>68</b>
5.4.1	Período médio de pré-postura .....	68
5.4.2	Período médio de Postura.....	69
5.4.3	Período médio de Incubação .....	70
5.4.4	Peso médio da Postura.....	71
5.4.5	Período médio de Eclosão .....	72
5.4.6	Percentual médio de Eclosão .....	73
5.4.7	Peso Inicial médio das fêmeas ingurgitadas.....	74
5.4.8	Peso da quenógina, Índices de Eficiência Nutricional, Índice de Eficiência Reprodutiva. ....	75
5.4.9	Eficiência Reprodutiva e Percentual de Controle.....	76
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DAS TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Percentual de recuperação de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> utilizadas em infestações artificiais em equinos.....	29
<b>TABELA 2.</b> Percentual de viabilidade de ninfas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> infectadas com diferentes isolados dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	32
<b>TABELA 3.</b> Concentrações letais dos diversos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) sobre ninfas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	32

<b>TABELA 4.</b> Percentual de viabilidade de ninfas alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diferentes isolados dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	34
<b>TABELA 5.</b> Concentrações letais dos diversos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) sobre ninfas alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	34
<b>TABELA 6.</b> Percentual de viabilidade de adultos não alimentados de <i>Amblyomma cajennense</i> tratados com diferentes isolados dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	35
<b>TABELA 7.</b> Concentrações letais dos diversos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) sobre adultos não alimentados de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	34
<b>TABELA 8.</b> Período médio de Pré-postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb). .....	38
<b>TABELA 9.</b> Período médio de postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	42
<b>TABELA 10.</b> Período médio de incubação (dias) dos ovos de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	43

<b>TABELA 11.</b> Peso médio da postura (mg) de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	46
<b>TABELA 12.</b> Período médio de eclosão (dias) das larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb). .....	47
<b>TABELA 13.</b> Percentual de eclosão (%) de larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb). 50	
<b>TABELA 14.</b> Peso médio inicial de fêmeas ingurgitadas (mg) de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	51
<b>TABELA 15.</b> Peso médio das quenóginas (mg) de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	52
<b>TABELA 16.</b> Índice de eficiência nutricional de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	54
<b>TABELA 17.</b> Índice de eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> tratadas com diversas concentrações dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	55

- TABELA 18.** Eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....59
- TABELA 19.** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....59
- TABELA 20.** Concentração letal (CL 50 E 90) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* com diversas concentrações dos isolados *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (959, 319 e E9) cultivados em meio de cultura BDA e lâmina .....	19
<b>FIGURA 2.</b> Isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (986 e 747) cultivados em meio de cultura BDA e lâmina.....	20
<b>FIGURA 3.</b> Percentual de viabilidade (%) de ninfas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> infectadas com diferentes concentrações dos isolados dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	31
<b>FIGURA 4.</b> Percentual de viabilidade (%) de ninfas alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> infectados com diferentes isolados dos fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb).....	36



- FIGURA 5.** Percentual de viabilidade (%) de adultos não alimentados de *Amblyomma cajennense* infectados com diferentes isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana*.(Bb).....37
- FIGURA 6.** Período de Pré-postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....40
- FIGURA 7.** Período de postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....41
- FIGURA 8.** Período de incubação (dias) de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb)....44
- FIGURA 9.** Peso da postura (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....45
- FIGURA 10.** Período de eclosão (dias) de larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....48
- FIGURA 11.** Percentual de eclosão (%) de larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb)....49

- FIGURA 12.** Peso da quenógina (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....53
- FIGURA 13.** Índice de eficiência nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....56
- FIGURA 14.** Índice de eficiência reprodutiva (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....57
- FIGURA 15.** Eficiência reprodutiva (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....58
- FIGURA 16.** Percentual de controle (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratados com diferentes isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).....60
- FIGURA 17.** Reisolamento da cepa 319 do fungo *Metarhizium anisopliae* a partir de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*.....62
- FIGURA 18.** Reisolamento da cepa 986 do fungo *Beauveria bassiana* a partir de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*.....62

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo verificar a susceptibilidade *in vitro* de ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* a alguns isolados dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Foram avaliados três isolados de *M. anisopliae* (959, 319 e E9) e dois de *B. bassiana* (986 e 747). As suspensões de conídios foram preparadas a partir de fungos produzidos em meio de arroz, sendo que cada bioensaio foi constituído de quatro tratamentos nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/ml e um grupo controle. A análise foi realizada através da observação do percentual de viabilidade, 15 dias após o tratamento ou após a ecdise de adultos. Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para todos os isolados e todos os ínstares. Verificou-se que nos grupos tratados havia uma redução considerável na viabilidade, à medida que se aumentava a concentração de conídios na suspensão. Para o estágio de fêmea

ingurgitada foram observadas alterações no período de pré-postura, período de postura, peso da postura, período de eclosão, percentual de eclosão, peso da quenógina, índice de eficiência reprodutiva, índice de eficiência nutricional, eficiência reprodutiva e percentual de controle. Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que todos os isolados testados demonstraram causar efeito deletério em testes *in vitro* sobre estes estágios evolutivos, sugerindo seu potencial para utilização no controle microbiano desta espécie de carrapato.

## SUMMARY

This work was aimed at the evaluation of the in vitro susceptibility of *Amblyomma cajennense* nymph and adults to some isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Three isolates of *M. anisopliae* (959, 319 e E9) and two of *B. bassiana* (986 e 747). Conidia suspensions were made from fungi grown up in a rice culture medium. Each test consisted of four treated groups ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conidia/ml) plus a control group. Viability of individuals was assessed 15 days after treatment or after adult ecdysis. Significant differences were observed in the comparison between treatments for all isolates tested and for all evolutive stages. Viability was assessed 15 days after the treatment or after adult ecdysis. Significant differences were found for all treatments and for all stages studied. A huge reduction in the viability was found, and this response increased as conidia concentration used raised. For engorged

females were observed alterations in preoviposition period, oviposition period, weight of egg mass, eclosion period, percentage of eclosion, weight of females after oviposition, REI, NEI, reproductive efficiency and percentage of control. Based upon the results presented herein, one can conclude that all isolates tested presented a *in vitro* lethality for the biological stages evaluated, pointing so to their use in the biological control of this tick species.

## 1. INTRODUÇÃO

*Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), mais conhecido como carrapato estrela, é um carrapato heteroxeno, pertencente à família Ixodidae e subfamília Amblyomminae. É encontrado principalmente sobre o corpo dos equídeos, mas pode também alimentar-se em outros mamíferos, como bovinos, cão e o próprio homem (FLECHMAN, 1977). A espécie foi descrita por Fabricius em 1787, na cidade de Cayenne, localizada na Guiana Francesa.

A espécie possui ampla distribuição geográfica pelo continente Americano, ocorrendo desde o Texas, nos Estados Unidos até a América do Sul, concentrando-se ao longo da costa do Oceano Atlântico (ROBINSON, 1926). Além disso, segundo SERRA FREIRE (1982), o Brasil, em decorrência de suas variáveis climáticas, é uma região potencialmente favorável ao desenvolvimento de altas infestações de ixodídeos, onde

áreas de pastagens como as da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro possuem uma elevada incidência dos estágios não parasitários durante todo o ano.

Afora os danos diretos causados pela espoliação sanguínea, lesões cutâneas e alterações funcionais que afetam o desempenho zootécnico de seus hospedeiros, esta espécie é considerada como vetor de importantes agentes causadores de doenças infecciosas, como o Tifo Exantemático (MONTEIRO *et al.*, 1931) e Ehrlichiose Bovina (MASSARD, 1984).

As infestações com carrapatos em animais domésticos são controladas principalmente por acaricidas químicos, que, quando utilizados de forma indiscriminada podem causar impacto ambiental e desenvolvimento de resistência (BITTENCOURT *et al.*, 1997). Segundo BARROS & EVANS (1989), o uso exclusivo de carrapaticidas torna-se pouco viável em termos práticos e econômicos, tornando-se necessária a adição de métodos alternativos a serem empregados em sistemas de controle integrado. O conhecimento dos aspectos reprodutivos dos ixodídeos é de fundamental importância na elaboração de programas de controle eficientes.

Visando auxiliar o estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle, pesquisas têm sido realizadas objetivando o emprego de patógenos como controladores biológicos de parasitos.

Fungos entomopatogênicos são importantes inimigos naturais de artrópodes e podem ser utilizados no controle biológico (CHANDLER *et al.*, 2000). Aproximadamente 750 espécies e 56 gêneros são conhecidas por serem patógenos ou parasitos de artrópodes (HAWKSWORTH, 1977).



A patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* foi verificada em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* por BITTENCOURT (1992), onde foi constatado elevada mortalidade e um percentual de controle de 96,6% para o isolado 959. A ação *in vitro* do fungo *Beauveria bassiana* para ovos da mesma espécie de carrapato também foi avaliada por BITTENCOURT *et al.* (1996), onde observou-se que o percentual de eclosão verificado nos grupos tratados foi menor que o observado nos grupos controles.

SOUZA (1999), avaliando a eficácia *in vitro* de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre ovos e larvas de *A. cajennense*, verificou a ação patogênica influenciando a eclodibilidade, mortalidade larval e ecdise ninfal.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações ocorridas na biologia dos estágios ninfal e adulto de *A. cajennense* quando submetidos a tratamentos com os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* mantidos em condições laboratoriais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Controle Microbiano de Artrópodes utilizando Fungos Entomopatogênicos**

Os principais fungos entomopatogênicos citados na literatura internacional são as espécies *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 que pertencem à divisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Família Moniliaceae. Estes agentes são patogênicos para várias pragas de plantas cultivadas no Brasil e têm sido testados no controle microbiano de vários artrópodes de importância médica e veterinária (BITTENCOURT, 1992).

Fungos são considerados por vários pesquisadores como entomopatógenos de grande importância agrícola devido a seu grande potencial de dispersão, por abranger uma larga margem de hospedeiros e por possuir a habilidade de colonização via cutícula (ALVES, 1998).

Na Europa, por volta do século XVIII, foram identificados fungos entomopatogênicos acometendo abelhas (*Apis milifera*), bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e outros insetos. Este achado gerou um questionamento pelos pesquisadores daquela época se tais agentes microbianos poderiam ser usados contra insetos pragas. Nos últimos trinta anos, o interesse na pesquisa em controle biológico e manejo integrado tem aumentado e mais pesquisas foram surgindo com o intuito de regular ou suprimir as populações de insetos pragas. Além disso, os fungos entomopatogênicos estão sendo considerados inseticidas microbianos, sendo caracterizados também como causadores de mortalidade natural em muitas pragas de importância agrícola (McCOY *et al.*, 1988).

O Brasil possui climas favoráveis para o desenvolvimento de patógenos de forma endêmica, e em países de clima temperado várias espécies de fungos entomopatogênicos que causam infecções em carrapatos já foram estudados (BITTENCOURT *et al.*, 1999).

Segundo ALVES (1998), fatores abióticos como temperatura e umidade são importantes para a germinação dos esporos, crescimento vegetativo e esporulação, sendo adequadas ao crescimento fúngico temperaturas em torno de 24 a 28° C. A temperatura média de  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  pode ser usada para produção de diversas linhagens de *M. anisopliae*, e a espécie *B. bassiana* possui a temperatura favorável ao crescimento entre 22 a 26°C. A umidade também possui um papel importante para a produção, germinação e penetração dos fungos entomopatogênicos, sendo capaz de influenciar a espessura da camada de cera dos artrópodes, tornando-os mais ou menos resistentes aos patógenos. O processo de germinação dos fungos entomopatogênicos exige umidade relativa acima de 80%.

Em 1879, METSCHNIKOFF *apud* TULLOCH (1976) descreveu *Entomophthora anisopliae* e o utilizou para o controle das larvas do besouro *Anisopliae austriaca*, importante praga da beterraba. Este foi o primeiro trabalho a promover o controle microbiano de insetos. Posteriormente SOROKIN (1883) *apud* TULLOCH (1976) descreveu o novo gênero *Metarhizium*, que possuía esporos do mesmo tamanho dos descritos anteriormente. Este fungo entomopatogênico é denominado atualmente de *Metarhizium anisopliae*.

*Beauveria bassiana*, segundo SAMSINAKOVA (1957), foi diagnosticado pela primeira vez em carrapatos na espécie *Ixodes ricinus*, quando fêmeas ingurgitadas foram coletadas a campo e mantidas em laboratório sob observação. O autor relatou que não houve alterações na postura, sendo verificada a presença de hifas na abertura oral do carrapato após sua morte.

Segundo MWANGI *et al.* (1991), o uso de inimigos naturais como predadores, parasitóides e patógenos têm sido pesquisados visando seu uso em controle biológico. Os autores citaram a existência de fungos isolados naturalmente de carrapatos infectados e relataram que a presença de metabólitos produzidos por esses patógenos está intimamente relacionada com alterações biológicas dos organismos infectados. Estudos avaliando a presença de toxinas de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em artrópodes foram feitos, onde a produção e modo de ação foram correlacionados com a virulência das cepas (FERRON, 1981).

ALVES (1998) afirmou que a penetração normal dos fungos entomopatogênicos ocorre pela adesão dos conídios ao tegumento, estabelecendo desta forma o primeiro ciclo das relações existentes entre fungos e hospedeiros.

Muitos fungos como *M. anisopliae* infectam a cutícula dos hospedeiros via esporos, que se aderem e germinam formando uma série de estruturas durante a penetração. Sob condições favoráveis de temperatura, oxigenação, umidade, pH e na presença de nutrientes, o fungo germina sobre o inseto produzindo tubos germinativos na superfície cuticular do hospedeiro. Na extremidade deste tubo é formado um apressório que produz enzimas quitinolíticas, proteolíticas e lipolíticas. Logo após, ocorre a formação do grampo de penetração, que penetra na epicutícula do inseto através de pressão física; e a hifa penetra na hemocele estabelecendo uma relação nutricional com o hospedeiro. O fungo *M. anisopliae* produz uma variedade de enzimas degradantes de cutícula durante a penetração na cutícula do hospedeiro (St. LEGER *et al.*, 1991).

Segundo CHANDLER *et al.* (2000), os fungos entomopatogênicos infectam os hospedeiros susceptíveis através de esporos especializados que germinam na cutícula e penetram no tegumento, onde entram em contato com a hemocele e tecidos do artrópode, provocando sua morte entre três a dez dias após a infecção. Em condições favoráveis, os esporos fúngicos disseminam-se no cadáver facilitando futuras infecções nas populações de hospedeiros susceptíveis, dando continuidade ao ciclo biológico destes microorganismos.

Observações feitas sobre as rotas de invasão e histopatologia de *M. anisopliae* em larvas de *Culex quinquefasciatus* levaram LACEY *et al.* (1998) a constatarem a existência de duas diferentes rotas de invasão do fungo ao hospedeiro. A rota inicial foi observada pelo crescimento de micélio na hemocele, e a segunda por toxinas liberadas

no trato digestivo após a ingestão de esporos, a ingestão provocou a mortalidade no período de 6 a 24h.

MOREIRA *et al.* (1996) relataram a ocorrência de *M. flavoviridae* proveniente de isolamento de cadáveres de *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) no Rio Grande do Norte, ressaltando que o desenvolvimento deste patógeno como um bioinseticida necessita de estudos mais aprofundados, de forma que o produto final possa oferecer alta virulência, estabilidade, e persistência sob condições de campo.

BIDOCHKA & KHACHATOURIANS (1992), avaliando o crescimento de *B. bassiana* nos componentes cuticulares de *Melanoplus sanguinipes*, relataram que estruturas encontradas no tegumento deste artrópode como proteínas, quitina e lipídeos poderiam ser utilizadas pelo fungo para realizar seu crescimento. Os autores afirmaram que proteínas presentes na cutícula apresentam-se como uma barreira física à penetração do fungo, mas são nutrientes importantes para o desenvolvimento de *B. bassiana*.

O estudo da patogenicidade de *B. bassiana* também foi avaliado por TAMAI *et al.* (1999), utilizando fêmeas recém-emergidas de ácaros da espécie *Tetranychus urticae*. Os ácaros foram inoculados com *B. bassiana* isolado 447, nas concentrações  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/ml, onde o fungo mostrou-se patogênico ao ácaro que apresentou um aumento nos valores das mortalidades acumuladas à medida que a suspensão de conídios se tornou mais concentrada.

Observações feitas por HAJEK & LEGER (1994) levam a crer que a ocorrência natural de doenças fúngicas em insetos demonstram o potencial destes patógenos para o uso no controle microbiano.

## 2.2. Controle Microbiano de Carrapatos por Fungos Entomopatogênicos.

A eficácia do isolado 959 do fungo *M. anisopliae* em teste de estábulo realizado com o carrapato *B. microplus* foi verificada por CASTRO (1997), no qual os autores relataram que a eficácia total média para as concentrações  $10^8$  para a fase adulta e ninfal foram de 41% e 69,4%, respectivamente, e na concentração  $10^7$  para os mesmos instares descritos foram de 39,4% e 57,4%. Tal pesquisador relatou que existe uma maior atividade fúngica nos estágios evolutivos logo após o processo de muda, portanto acredita-se que a principal forma de penetração dos fungos ao hospedeiro seja pela cutícula.

KAAYA *et al.* (1996), observaram a redução da fecundidade de 85 a 99% de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus appendiculatus* tratadas com os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Os autores afirmam que tais fungos possuem elevada atividade acaricida e persistência de uma a três semanas após a aplicação, dentro do pavilhão auditivo de bovinos naturalmente infestados e tratados com os respectivos fungos. Esta mesma espécie de carrapato foi avaliada por MWANGI *et al.* (1995), no qual os autores observaram uma redução em 30% na fecundidade de fêmeas ingurgitadas de *R. appendiculatus*, e mortalidade de 70% e 67% para ninfas e adultos, respectivamente.

ESTRADA-PEÑA *et al.* (1990) avaliando a atividade do fungo *Aspergillus ochraceus* em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* naturalmente infectadas, observaram que o fungo foi capaz de impedir a oviposição. Os autores relataram que o fungo colonizou o carrapato via ânus e, posteriormente, intestino e tubos de Malpighi.

Pesquisas iniciadas por BITTENCOURT *et al.* (1995) relataram que a principal forma de penetração do fungo *M. anisopliae* em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* é através do tegumento, pois segundo os autores não foi verificada a presença do fungo em qualquer corte histológico dos órgãos dos carrapatos. Porém, a partir do segundo dia após o tratamento, o exame da hemolinfa apresentou-se positivo, com a presença de fragmentos de hifas de *M. anisopliae*. Tais observações descritas neste trabalho evidenciam que outras vias de penetração que podem ocorrer para fungos entomopatogênicos não ocorrem na espécie *B. microplus*. BITTENCOURT *et al.* (1999) verificaram a hipótese de que *M. anisopliae* penetre no artrópode pela cutícula quando observaram através de exame em microscópio eletrônico de varredura de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* infectadas com o isolado 959. Os autores observaram a fixação dos conídios na cutícula dos carrapatos, a germinação dos conídios, a formação do tubo germinativo a partir de conídios germinados e o início da dilatação da extremidade deste tubo formando o apressório.

ZHIOUA *et al.* (1997), em testes *in vitro* utilizando *M. anisopliae* em fêmeas ingurgitadas de *Ixodes scapularis*, observaram a mortalidade de 100% duas semanas após a infecção, utilizando a concentração  $10^7$  conídios/ml.

BITTENCOURT *et al.* (1994a) verificando a ação de dois isolados de *M. anisopliae* em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* citaram que o período de pré-postura médio nos grupos controle foi maior nos grupos tratados. Os autores constataram que a duração do período de postura está relacionada com a morte das fêmeas provocada pela ação do fungo, e observaram uma diminuição na duração do período de postura à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml, e que o



aumento do período de postura ocorrido no experimento foi inversamente proporcional à concentração fúngica. Tais autores verificaram também que os períodos de incubação e eclosão dos ovos oriundos de fêmeas tratadas foram maiores nos grupos tratados do que no controle e que a concentração  $10^8$  apresentou maior diferença em relação as demais concentrações, não diferindo da concentração  $10^7$ .

A influência de *B. bassiana* em fêmeas ingurgitadas de *Ixodes ricinus* foi observada por GORSKOVA (1966), no qual os autores relataram que o fungo não afetou o parâmetro duração da ovoposição, mas interferiu consideravelmente na duração do período de incubação.

BARBOSA *et al.* (1997) ao avaliar a ação de dois isolados da espécie *B. bassiana* sobre larvas ingurgitadas de *R. sanguineus* constataram um percentual de mortalidade larval de 67, 94 e 100% para os tratamentos  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$ , respectivamente com o isolado 747. O isolado 986 apresentou a variação de 35% na concentração  $10^4$  a 100% nas concentrações  $10^6$  e  $10^8$ . Os autores relataram que o percentual de ecdise diminuía conforme aumentava-se a concentração da suspensão.

A espécie *A. cajennense* também foi utilizada em estudos biológicos correlacionados a ensaios *in vitro* utilizando isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. SOUZA *et al.* (1999a) observaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos realizados com ovos e larvas submetidos a diferentes suspensões fúngicas. Os autores citam em seu trabalho que o percentual de eclosão foi inversamente proporcional a concentração de conídios/ml de suspensão, e que as larvas utilizadas nos bioensaios apresentaram índices de mortalidade superiores aos encontrados nos grupos controle.

Estudos similares foram realizados na observação de variações biológicas na ecdise ninfal da mesma espécie de ixodídeo, onde os autores supracitados constataram uma redução do percentual de ecdise à medida que se aumentava a concentração conidial, evidenciando desta forma o efeito deletério *in vitro* dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (SOUZA *et al.*, 1999b).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localização do Experimento**

O experimento foi realizado no período de setembro de 1999 a abril de 2000 no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (E.P.P.W.O.N)<sup>1</sup> do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) situada no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

---

<sup>1</sup> Localizada no Município de Seropédica, Rio de Janeiro, 22±45' de latitude sul, 43±41' de longitude oeste e com altitude de 33m.

### 3.2. Animais utilizados

Foram utilizados coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus* (L., 1758), mestiços Califórnia x Nova Zelândia com idade média de 75 dias, de ambos os sexos, peso médio de 2,3 kg, cedidos pelo Setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ sem contato prévio com carrapatos, para a manutenção de colônias de *A. cajennense*. Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas e alimentados com ração comercial<sup>2</sup> para coelhos e água à vontade.

Equinos (*Equus caballus* L., 1758) adultos, mestiços originados do Curral de Apreensão da UFRRJ, foram utilizados na manutenção de colônias de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*. Os mesmos foram mantidos em baias individualizadas, onde receberam ração comercial para equinos<sup>2</sup>, capim elefante (*Penisetum purpureum*) picado no cocho e água à vontade.

### 3.3. Obtenção dos Ínstares de *Amblyomma cajennense*

#### 3.3.1. Ninfas não Ingurgitadas

A colônia inicial de *A. cajennense* foi obtida a partir de fêmeas ingurgitadas provenientes de equinos naturalmente infestados mantidos no setor de apreensão da UFRRJ. As amostras colhidas foram lavadas em água corrente, secas, identificadas segundo ARAGÃO & FONSECA (1961) no Laboratório de Ixodologia da Estação

---

<sup>2</sup> Cargil®

Parasitológica W. O. NEITZ em Câmara climatizada tipo B.O.D. a  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com umidade relativa superior a 80% com o objetivo de obter-se ovos. As posturas foram pesadas e acondicionadas em seringas descartáveis, adaptadas para o experimento, quando foram cortadas próximo ao êmbolo, vedadas em uma das extremidades com o próprio êmbolo e a outra com tampa feita de algodão.

Foi colocado um grama de ovos em cada seringa. Aproximadamente quinze dias após a eclosão das larvas, as mesmas foram utilizadas para infestações artificiais em coelhos, seguindo a técnica descrita por CUNHA (1986), que se baseia na colocação de um capuz confeccionado em tecido de algodão aderido ao pavilhão auricular dos coelhos e fixados com o auxílio de pasta Una (água destilada, gelatina em folha, glicerina e óxido de zinco) e protegidos com esparadrapo.

As larvas ingurgitadas desprendidas foram retiradas do capuz após o período de cinco dias de alimentação e levadas ao laboratório, sendo separadas em grupos de dez indivíduos por tubo de ensaio e as amostras destinadas à manutenção de colônia foram armazenadas em seringas plásticas contendo alíquotas de 300mg e levadas à câmara climatizada do tipo B.O.D. nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras contidas no tubo de ensaio foram utilizadas nos bioensaios 25 dias após ecdise larval, segundo ROHR (1909).

### **3.3.2. Ninfas Ingurgitadas**

Ninfas obtidas a partir de larvas ingurgitadas com aproximadamente 20 dias de idade, foram utilizadas para infestações artificiais em coelhos sendo preconizada a

mesma metodologia utilizada para larvas. Foram utilizados quatro animais contendo cada um deles uma alíquota de 600mg de ninfas de *A. cajennense*. As ninfas ingurgitadas foram coletadas aproximadamente no 5º dia após a infestação, lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, enxaguadas em água destilada, secas em papel filtro e separadas em alíquotas de dez indivíduos por tubos de ensaio estéreis para a realização dos bioensaios. Outras amostras contendo alíquotas de 50 ninfas ingurgitadas foram acondicionadas em seringas plásticas estéreis com capacidade de 10ml para continuidade da manutenção da colônia de *A. cajennense*. Todo o material foi mantido nas condições controladas já mencionadas.

### **3.3.3. Adultos não alimentados**

Adultos de *A. cajennense* foram obtidos a partir de amostras provenientes de coelhos infestados artificialmente com ninfas. Após a ecdise, os adultos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 1%, enxaguados em água destilada, secos em papel filtro, devidamente quantificados e acondicionados em tubos de ensaio, em alíquotas de dez indivíduos por tubo.

### **3.3.4. Fêmeas Ingurgitadas**

Foi necessário a utilização de infestações artificiais com o objetivo de obter os ixodídeos para a realização do experimento, e ao contrário de larvas e ninfas, que

ingurgitam satisfatoriamente em coelhos, fêmeas adultas não atingem peso adequado para a realização do estudo, fazendo-se necessária a infestação em equinos.

Casais de *A. cajennense* com aproximadamente 20 dias em jejum foram utilizados em infestações experimentais em áreas delimitadas em equinos, segundo a técnica de PRATA *et al.* (1995); que consiste no uso de uma peça em tecido de algodão no formato retangular aderida à pele do pescoço dos equídeos por meio de cola de sapateiro<sup>3</sup> e esparadrapo, dotada de uma espécie de janela, mantida fechada com velcro e aberta sempre que fosse necessária a visualização dos carrapatos, até a obtenção de fêmeas ingurgitadas. Foram utilizados dois cavalos com 80 casais por antímero do animal.

### **3.4. Fungos Entomopatogênicos**

#### **3.4.1. Obtenção das amostras de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana***

Os isolados iniciais de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP).

As amostras utilizadas foram de *Metarhizium anisopliae*, denominados Ma 319 (isolado de formiga), Ma 959 (isolado de cigarrinha no Estado do Rio de Janeiro e mantido em carrapato) e Ma E9 (isolado padrão), e os isolados de *B. bassiana*, descritos como Bb 747 (isolado de formiga) e Bb 986 (isolado de carrapato) (Figuras 1 e 2).

---

<sup>3</sup> Cuvulfix®

Tais isolados foram mantidos e reproduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária da UFRRJ.

#### **3.4.2. Elaboração das suspensões conidiais**

Os fungos foram produzidos a partir de meio de arroz acondicionados em sacos de polipropileno, no qual originaram-se as suspensões conidiais. Cada saco continha 60 gramas de arroz e 30 ml de água destilada, previamente autoclavados durante 20 minutos a 120°C.



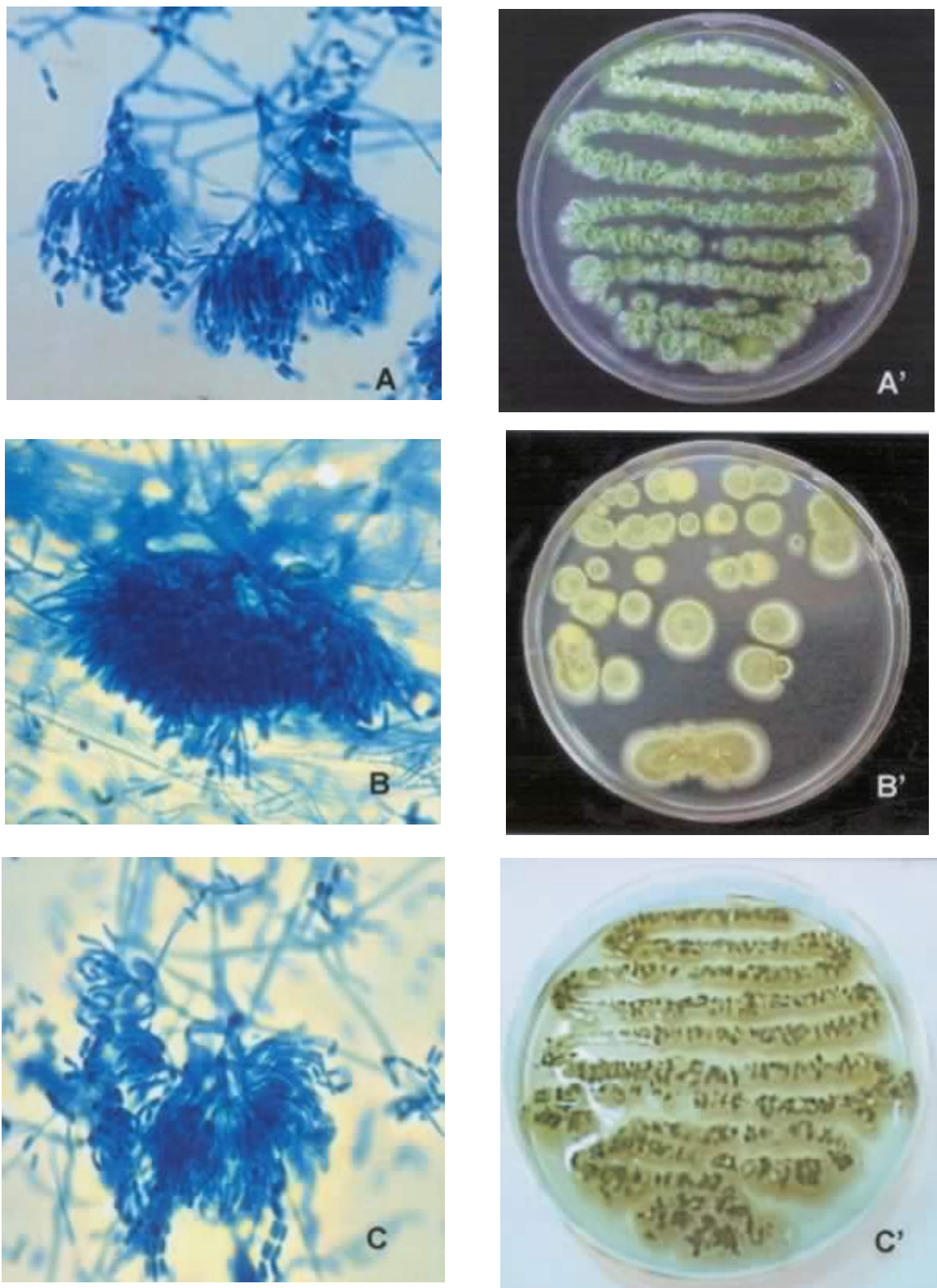


Figura 1. Isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* A-Isolado 959, B-Isolado 319, C-Isolado E9 (provenientes de cultura em lâmina), A'- Isolado 959, B'- Isolado 319, C'- Isolado E9 (mantidos em meio de cultura tipo BDA)

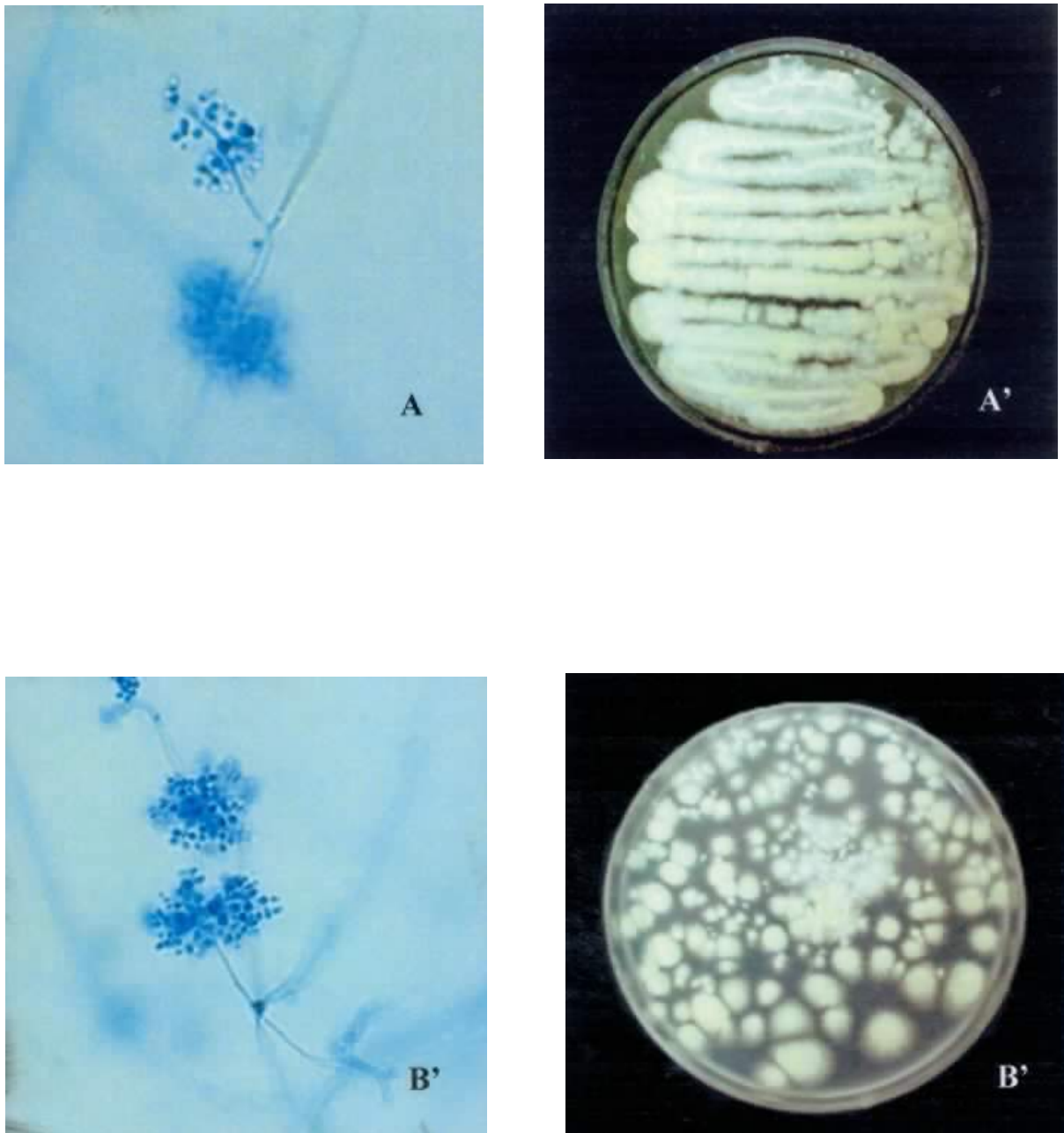


Figura 2. Isolados do fungo *Beauveria bassiana*: A - Isolado 747, B - Isolado 986 (provenientes de cultivo em lâmina); A'- Isolado 747, B'- Isolado 986 (mantidos em meio de cultura tipo BDA).

Posteriormente à inoculação fúngica, estes foram levados à câmara climatizada regulada a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 16 horas e após o período compreendido entre 15 e 20 dias, os sacos contendo arroz foram selecionados, identificados e utilizados na preparação das diferentes concentrações utilizadas. Foram realizadas homogeneizações diárias do meio de arroz com o objetivo de distribuir a umidade contida no saco, que é um dos fatores imprescindíveis para a conidiogênese. Os meios de cultura inoculados que apresentaram contaminações foram separados e devidamente descartados.

### 3.4.3. Quantificação do inóculo

A quantificação conidial foi feita através de contagem direta ao microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer (ALVES & MORAES, 1998).

Uma porção de arroz contendo o fungo foi homogeneizada em Becker graduado de 100 ml contendo água destilada com 0,1% de espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup>. Após homogeneização, uma amostra da suspensão foi colocada na câmara de Neubauer e quantificada ao microscópio para avaliação do número de conídios encontrados. O campo da câmara utilizando a área de  $0,0025 \text{ mm}^2$  proporcionou o volume correspondente a concentração  $10^8$ . A média de contagem por campo (n) foi multiplicada por um fator fixo ( $n \times 4 \times 10^6$ ), o que determinou o número de conídios existentes na suspensão (ALVES & MORAES, 1998).

Através desta metodologia, preparou-se suspensões nas concentrações  $2,80 \times 10^8$ ,  $1,17 \times 10^8$ ,  $1,30 \times 10^8$ ,  $1,41 \times 10^8$ ,  $1,22 \times 10^8$ , para *M. anisopliae* (isolados 959, 319, E9)

e *B. bassiana* (isolados 986, 747). A suspensão  $10^7$  de cada isolado foi preparada a partir da concentração  $10^8$ , adicionando uma alíquota da suspensão (10 ml) em 90 ml de água destilada. A concentração  $10^6$  foi obtida a partir da  $10^7$ , e a  $10^5$  a partir da  $10^6$ , seguindo o mesmo procedimento de diluição seriada descrito acima. O grupo controle foi composto de 100ml de água destilada e 0,1% de espalhante adesivo.

### **3.5. Bioensaios**

Os bioensaios foram elaborados para avaliar a patogenicidade dos entomopatógenos *M. anisopliae* e *B. bassiana* nas diversas fases do ciclo biológico do carrapato *A. cajennense* em condições laboratoriais.

#### **3.5.1. Infecção *in vitro* de ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma cajennense***

Cada bioensaio com ninfas não alimentadas foi realizado em condições controladas de temperatura e umidade (27°C e 80%UR), com quatro diferentes tratamentos nas concentrações ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/ml), e um grupo controle para cada isolado. As amostras foram coletadas, levadas a laboratório e lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, enxaguadas em água estéril pelo período de um minuto, secas em papel filtro para a retirada de excesso de água, identificadas, pesadas e separadas em tubos de ensaios individualizados estéreis para a infecção com os isolados fúngicos. Foram realizadas dez repetições por tratamento com utilização de dez ninfas

para cada repetição, resultando num total de 50 tubos de ensaio por isolado. Os tubos foram devidamente vedados com algodão hidrófilo e identificados de acordo com a concentração e isolado do fungo utilizado.

Cada grupo de ninfas recebeu um mililitro de suspensão conidial, onde foram mantidas imersas durante o período de cinco minutos. Após esse tempo, o excesso da suspensão foi eliminado através da inversão do tubo de ensaio, e o material mantido em condições de temperatura e umidade já descritas. A análise da ação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre ninfas não alimentadas de *A. cajennense* foi realizada através da observação do percentual de sobrevivência das ninfas, 15 dias após o tratamento com os fungos.

### **3.5.2. Infecção *in vitro* de ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense***

Os bioensaios com ninfas ingurgitadas foram constituídos de um grupo realizado em condições controladas de temperatura e umidade (27°C e 80%UR), com quatro diferentes tratamentos nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/ml, e um grupo controle para cada isolado; sendo que, para cada tratamento, foram feitas dez repetições e utilizadas dez ninfas alimentadas em cada repetição. A mesma metodologia preconizada para ninfas não alimentadas foi utilizada neste bioensaio.

A avaliação da eficácia dos fungos utilizados neste experimento foi realizada através da observação visual da viabilidade das ninfas tratadas, 15 dias após a exposição aos fungos.

### **3.5.3. Infecção *in vitro* de adultos não alimentados de *Amblyomma cajennense***

Cada bioensaio com adultos foi realizado em condições controladas de temperatura e umidade (27°C e 80% UR), com quatro diferentes tratamentos nas concentrações ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml) e um grupo controle para cada isolado, sendo que para cada tratamento foram feitas dez repetições e utilizados dez adultos em cada repetição. A mesma metodologia preconizada para ninfas não alimentadas foi utilizada neste experimento.

Quinze dias após o tratamento foram feitas avaliações sobre a viabilidade dos adultos tratados com os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

### **3.5.4. Infecção *in vitro* de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense***

As fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* utilizadas para os bioensaios foram coletadas dez a 15 dias após a infestação artificial e a mesma metodologia relativa a esterilização e separação de alíquotas de ninfas não ingurgitadas foi utilizada. Para a realização dos tratamentos a coleta dos carrapatos foi homogeneizada e os indivíduos foram selecionados visualmente por tamanho, buscando a padronização das amostras.

Foram preparadas quatro suspensões nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml de suspensão (BITTENCOURT, 1992), na qual foram utilizadas para a imersão das fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense*, baseada nas técnicas de avaliação de carrapaticidas descritas por TORRADO & GUTIERREZ (1969) e STENDEL (1980). Após a imersão durante o período de cinco minutos, as fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri, em alíquotas de dez indivíduos por placa, além do grupo controle, que foi banhado por cinco minutos por água destilada acrescido de espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 1%. Foram realizadas dez repetições por tratamento resultando no total de 210 fêmeas ingurgitadas utilizadas neste experimento. As fêmeas foram fixadas em decúbito dorsal na placa de Petri conforme metodologia preconizada no laboratório Ixodologia da UFRRJ, com o auxílio de uma fita adesiva dupla face, para manter individualizada a coleta diária das massas de ovos e facilitar a identificação de cada fêmea através de números. As massas de ovos eram recolhidas diariamente, pesadas e colocadas individualmente em tubos de ensaios estéreis.

Com isso foi possível a observação e a coleta de dados para avaliação de características biológicas, de acordo com os seguintes parâmetros:

- Peso Inicial da fêmea representado pelo valor obtido através da pesagem feita com o auxílio de balança analítica.
- Peso da Postura obtido através da coleta das massas de ovos e pesagens diárias, com posterior acondicionamento em tubos de ensaio estéreis e individualizados devidamente identificados. Sendo este parâmetro representado pelo somatório das posturas, foi efetuado ao término da ovoposição das fêmeas ingurgitadas.

- Peso da Quenógina, obtido após a morte da fêmea.
- Índice de Eficiência Reprodutiva (IER), que tem como objetivo analisar o potencial biótico das fêmeas ao produzirem ovos. Trata-se de uma relação entre o peso inicial e final da fêmea e o peso dos ovos, sendo obtido com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\text{IER} = \frac{\text{Peso massa ovos (g)} \times 100}{\text{Peso inicial da fêmea (g)}}$$

- Índice de Eficiência Nutricional (IEN) que descreve o potencial da fêmea em converter nutrientes nos diversos processos metabólicos, como sudorese, salivagem, respiração, locomoção, etc.

$$\text{IEN} = \frac{\text{Peso massa ovos (g)} \times 100}{\text{Peso inicial fem.} - \text{Peso final fem. (g)}}$$

- Período de Pré-postura (PPP) representado pelo período em dias obtido desde o desprendimento da fêmea no hospedeiro até o primeiro dia de postura.
- Período de Postura (PP), representado em dias, é o período compreendido entre o início e o final da postura.
- Período de Incubação (PI) equivalente ao período em dias entre o início da postura até o início da eclosão das larvas.
- Período de Eclosão (PE), compreendido entre o início e o final da eclosão larval.



- Percentual de Eclosão larval (%), obtido por avaliação visual em método comparativo a um padrão pré-estabelecido.
- Percentual de Controle, obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\%C = \frac{ER(\text{Controle}) - \bar{x} \text{ ER}(\text{Tratado})}{\bar{x} \text{ ER}(\text{Controle})}$$

- Eficiência reprodutiva, obtida a partir da seguinte fórmula:

$$ER = \frac{\text{Peso massa ovos (g)} \times \% \text{ eclosão}}{\text{Peso da fêmea}}$$

### 3.6. Isolamento dos Fungos após bioensaios

Após os bioensaios e infecção dos carrapatos, os fungos foram reisolados em meio de cultura BDA, onde através da identificação taxonômica confirmou-se as espécies fúngicas que foram utilizadas no presente trabalho.

### 3.7. Análise Estatística e Próbites

Foram usadas análises de Próbites<sup>4</sup> para calcular as concentrações letais, CL 50 e CL 90, segundo LITCHFIELD & WILCOXON (1949).

---

<sup>4</sup> Os testes foram realizados utilizando-se os programas estatísticos Probit or Logit Analysis e Instat 2.

Para verificar se houveram variações dentro de um mesmo tratamento e entre outros tratamentos com os diferentes isolados e concentrações, foram realizadas análises de variância (ANOVA), seguida pela aplicação do teste de TUKEY, para comparação entre as médias calculando-se o coeficiente de variação, informação importante para a verificação da precisão dos dados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Percentual de recuperação de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* utilizadas em infestações artificiais em equinos

O percentual médio de recuperação obtido foi 54,06%, calculado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{N.º fêmeas recuperadas} \times 100}{\text{N.º fêmeas infestantes}}$$

O número total de fêmeas recuperadas foi de 173 indivíduos, como pode ser observado na tabela 1.

**Tabela 1** . Percentual de recuperação de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* utilizadas em infestações artificiais em equinos.

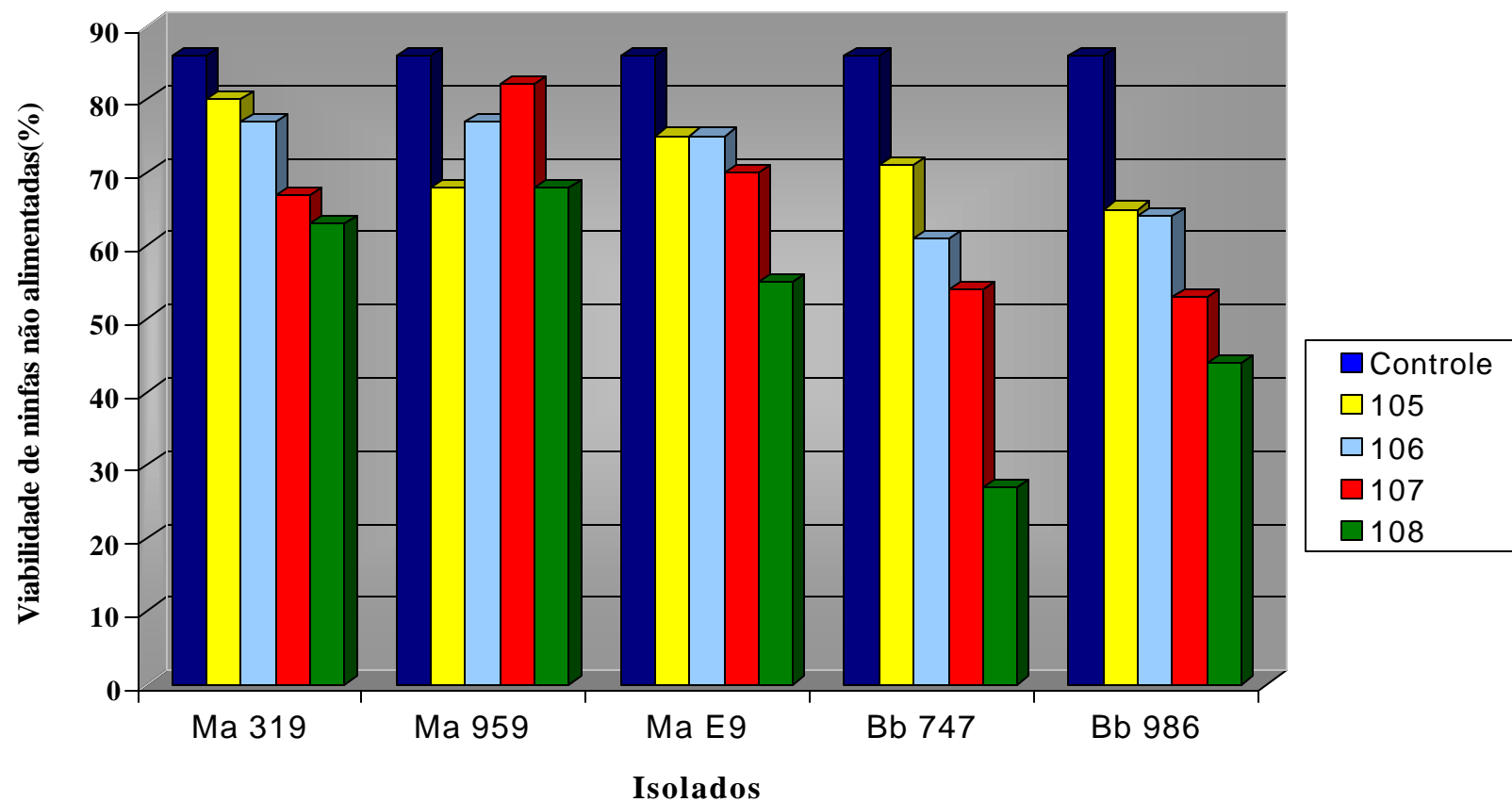
Equino	Nº de casais infestantes	Nº de fêmeas recuperadas	Percentual de recuperação (%)	Peso médio das fêmeas recuperadas (mg)
1	160	119	74,37	602,7
2	160	54	33,75	497,3
Média	160	86,5	54,06	550,0

#### 4.2. Ninfas não alimentadas de *Amblyomma cajennense*

O percentual médio de viabilidade dos grupos controle foi  $86 \pm 10,0\%$ , enquanto que no isolado *M. anisopliae* (denominado Ma 959) este parâmetro foi  $68 \pm 17,5\%$ ,  $77,0 \pm 13,4\%$ ,  $82,0 \pm 10,3\%$  e  $68,0 \pm 10,0\%$ , para as concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$ , respectivamente. Para os isolados Ma 319 e Ma E9 somente foram observadas diferenças significativas nos tratamentos  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml, que apresentaram um percentual de viabilidade ninfal de  $67 \pm 10,6\%$  e  $63 \pm 10,5\%$ ,  $70 \pm 9,4\%$  e  $55,0 \pm 16,4\%$ , respectivamente. (Tabela 2).

Os isolados de *B. bassiana* (denominados Bb 747 e Bb 986) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e/ou quando comparados com os grupos controle. Os percentuais de viabilidade do isolados 986 foram de  $44,0 \pm 8,4$  a  $65,0 \pm 12,7\%$ , enquanto que o isolado 747 apresentou os valores de  $27,0 \pm 9,5$  a  $71,0 \pm 11,0\%$ . Tais resultados estão descritos na Tabela 2.

Verificou-se que nos grupos tratados havia uma redução considerável na viabilidade de ninfas à medida que se aumentou a concentração de conídios na suspensão, com exceção do isolado Ma 959 onde as concentrações  $10^6$  e  $10^7$  conídios/ml apresentaram maiores percentuais de viabilidade do que a concentração  $10^5$  conídios/ml. As CL 50 e 90 verificadas para os isolados testados podem ser vistas na Tabela 3. A viabilidade das ninfas não alimentadas está representada na Figura 3.



**Figura 3.** Percentual de viabilidade (%) de ninfas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma).

**Tabela 2.** Percentual de viabilidade de ninfas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 959	Ma 319	Ma E9	Bb 986	Bb 747
Controle	86 ± 10,0 <sup>a</sup>	86 ± 10,0 <sup>a</sup>	86 ± 10,0 <sup>a</sup>	86 ± 10,0 <sup>a</sup>	86 ± 10,0 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	68 ± 17,5 <sup>b</sup>	80 ± 13,7 <sup>a</sup>	75 ± 15,1 <sup>ab</sup>	65 ± 12,7 <sup>b</sup>	71 ± 11,0 <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup>	77 ± 13,4 <sup>ab</sup>	77 ± 11,6 <sup>ab</sup>	75 ± 12,6 <sup>ab</sup>	64 ± 8,7 <sup>bc</sup>	61 ± 12,6 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>	82 ± 10,3 <sup>ab</sup>	67 ± 10,6 <sup>b</sup>	70 ± 9,4 <sup>b</sup>	53 ± 10,7 <sup>bc</sup>	54 ± 16,4 <sup>bc</sup>
10 <sup>8</sup>	68 ± 10,0 <sup>b</sup>	63 ± 10,5 <sup>b</sup>	55 ± 16,4 <sup>b</sup>	44 ± 8,4 <sup>c</sup>	27 ± 9,5 <sup>d</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

**Tabela 3.** Concentrações letais dos diversos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb) sobre ninfas não alimentadas de *Amblyomma cajennense*.

Isolados	Concentrações	
	CL 50	CL 90
Ma 959	2,89 x 10 <sup>11</sup>	9,72 x 10 <sup>15</sup>
Ma E9	5,38 x 10 <sup>10</sup>	3,30 x 10 <sup>15</sup>
Ma 319	7,86 x 10 <sup>10</sup>	1,37 x 10 <sup>15</sup>
Bb 747	1,77 x 10 <sup>8</sup>	1,18 x 10 <sup>11</sup>
Bb 986	1,81 x 10 <sup>9</sup>	4,49 x 10 <sup>14</sup>

#### **4.3. Ninfas alimentadas de *Amblyomma cajennense***

O percentual médio de viabilidade encontrado nos grupos controle foi de  $83 \pm 24,6\%$ , sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos em todos os isolados, havendo uma redução no percentual de ecdise à medida que se aumentava a concentração de conídios na suspensão. O isolado Ma 959 apresentou-se de forma diferenciada, onde a concentração  $10^6$  con/ml apresentou um percentual de viabilidade superior a concentração  $10^5$  conídios/ml, demonstrando uma exceção a afirmação acima. (Tabela 4 e Figura 4).

As concentrações letais (CL50 E CL 90) obtidas dos isolados podem ser verificadas na Tabela 5.

#### **4.4. Adultos não alimentados de *Amblyomma cajennense***

Nos resultados obtidos no presente experimento foi observado em todos os isolados de *M. anisopliae* testados que os tratamentos  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml reduziram significativamente o percentual de sobrevivência dos adultos não alimentados, como pode ser observado na Tabela 6.

Com relação aos isolados 986 e 747 do fungo *B. bassiana* observou-se diferenças significativas nas concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$ , sendo este parâmetro inversamente proporcional às concentrações utilizadas nos bioensaios (Tabela 6). Tais resultados estão demonstrados na Figura 5. As CL50 e CL90 verificadas para os isolados Ma 959, Ma 319, Ma E9, Bb 986 e Bb747 podem ser analisadas na Tabela 7.

**Tabela 4.** Percentual de viabilidade de ninfas alimentadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diferentes isolados dos fungos *Metarhizium anisopliaei* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 986	Bb 747
Controle	83 ± 24,6 <sup>a</sup>	83 ± 24,6 <sup>a</sup>	83 ± 24,6 <sup>a</sup>	83 ± 24,6 <sup>a</sup>	83 ± 24,6 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	64 ± 20,7 <sup>b</sup>	68 ± 13,2 <sup>a</sup>	67 ± 20,1 <sup>a</sup>	69 ± 10,0 <sup>b</sup>	60 ± 8,2 <sup>ab</sup>
10 <sup>6</sup>	62 ± 23,0 <sup>b</sup>	69 ± 16,6 <sup>a</sup>	63 ± 17,7 <sup>a</sup>	69 ± 11,3 <sup>b</sup>	56 ± 12,0 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>	59 ± 16,5 <sup>a</sup>	52 ± 13,2 <sup>ab</sup>	59 ± 20,0 <sup>b</sup>	68 ± 10,8 <sup>b</sup>	56 ± 13,5 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup>	55 ± 10,0 <sup>a</sup>	35 ± 13,5 <sup>b</sup>	49 ± 19,1 <sup>b</sup>	35 ± 10,1 <sup>b</sup>	49 ± 12,6 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

**Tabela 5.** Concentrações letais dos diversos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb) sobre ninfas alimentadas de *Amblyomma cajennense*.

Isolados	Concentrações	
	CL 50	CL 90
Ma 959	5,19 x 10 <sup>8</sup>	5,95 x 10 <sup>11</sup>
Ma 319	1,0 x 10 <sup>13</sup>	7,13 x 10 <sup>24</sup>
Ma E9	2,05 x 10 <sup>10</sup>	2,75 x 10 <sup>16</sup>
Bb 986	7,64 x 10 <sup>22</sup>	1,7 x 10 <sup>38</sup>
Bb 747	2,72 x 10 <sup>11</sup>	1,41 x 10 <sup>23</sup>



**Tabela 6.** Percentual de viabilidade de adultos não alimentados de *Amblyomma cajennense* tratados com diferentes isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

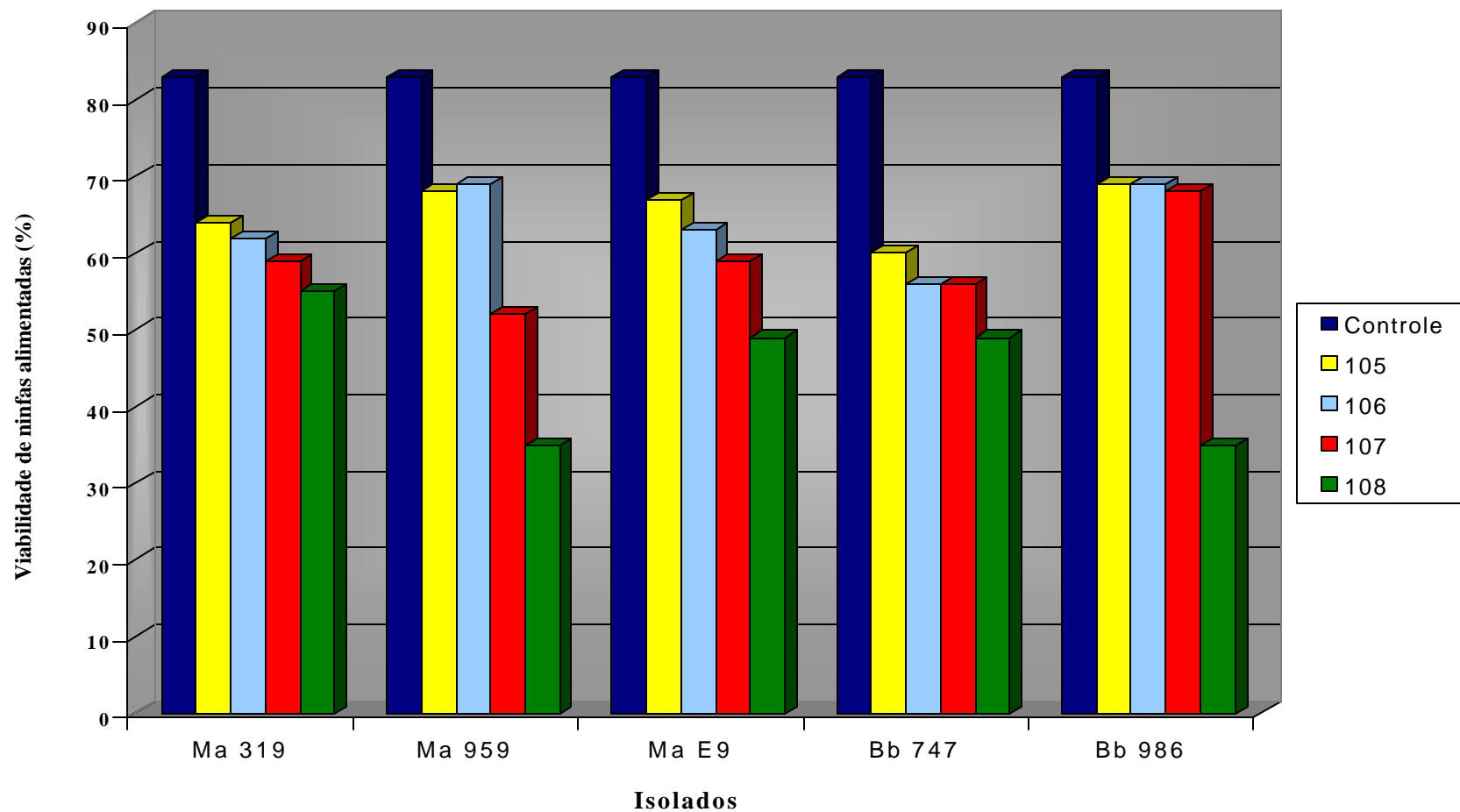
Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 959	Ma 319	Ma E9	Bb 986	Bb747
Controle	77 ± 13,4 <sup>a</sup>	77 ± 13,4 <sup>a</sup>	77 ± 13,4 <sup>a</sup>	77 ± 13,4 <sup>a</sup>	77 ± 13,4 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	84 ± 17,2 <sup>a</sup>	77 ± 11,6 <sup>a</sup>	78 ± 16,2 <sup>a</sup>	81 ± 10,0 <sup>a</sup>	83 ± 9,5 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	54 ± 14,3 <sup>ab</sup>	66 ± 11,7 <sup>a</sup>	70 ± 13,3 <sup>a</sup>	53 ± 15,0 <sup>b</sup>	50 ± 11,5 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>	51 ± 13,5 <sup>b</sup>	38 ± 14,8 <sup>b</sup>	46 ± 13,5 <sup>b</sup>	48 ± 14,8 <sup>b</sup>	52 ± 18,7 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup>	30 ± 12,0 <sup>b</sup>	24 ± 20,0 <sup>b</sup>	37 ± 20,5 <sup>b</sup>	21 ± 12,0 <sup>c</sup>	35 ± 15,8 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

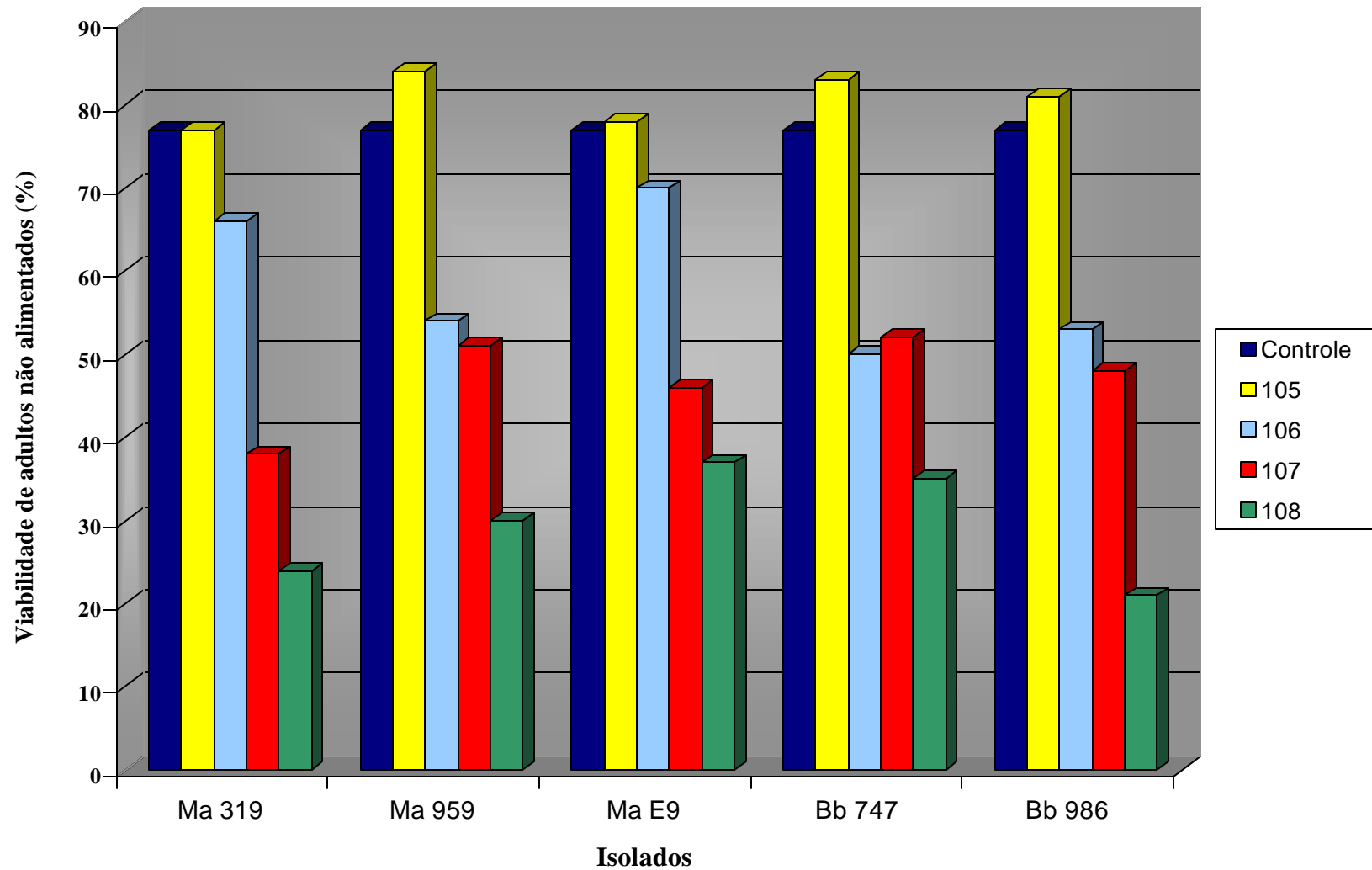
\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

**Tabela 7.** Concentrações letais dos diversos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb) sobre adultos não alimentados de *Amblyomma cajennense*.

Isolados	Concentrações	
	CL 50	CL 90
Ma 959	1,88 x 10 <sup>8</sup>	6,7 x 10 <sup>10</sup>
Ma 319	1,43 x 10 <sup>8</sup>	6,69 x 10 <sup>9</sup>
Ma E9	4,39 x 10 <sup>8</sup>	3,77 x 10 <sup>10</sup>
Bb 986	1,13 x 10 <sup>8</sup>	1,02 x 10 <sup>10</sup>
Bb 747	3,36 x 10 <sup>8</sup>	1,32 x 10 <sup>11</sup>



**Figura 4.** Percentual de viabilidade (%) de ninfas alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma).



**Figura 5.** Percentual de viabilidade (%) de adultos não alimentados de *Amblyomma cajennense* infectados com diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma).

## 4.5. Fêmeas Ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*

### 4.5.1. Período médio de pré-postura

O período médio de pré-postura encontrado nos grupos controle foi de  $5,8 \pm 0,4$  dias, enquanto que nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  da espécie *M. anisopliae*, isolado E9 este parâmetro variou entre  $6,9 \pm 1,7$  a  $10,4 \pm 4,4$  dias, não apresentando diferenças estatísticas entre as concentrações e quando comparados com os grupos controle. Resultados similares também foram observados com a cepa Ma 319 que demonstrou uma variação de  $7,3 \pm 0,5$  a  $10,8 \pm 8,1$  dias. Para o isolado Ma 959 somente foram observadas diferenças significativas quando comparados com os grupos controle, nas concentrações  $10^7$  e  $10^8$  ( $8,8 \pm 4,0$  e  $9,6 \pm 2,2$  dias), respectivamente. Estes resultados podem ser observados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Período médio de pré-postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	$5,8 \pm 0,4^a$	$5,8 \pm 0,4^a$	$5,8 \pm 0,4^a$	$5,8 \pm 0,4^a$	$5,8 \pm 0,4^a$
$10^5$	$7,3 \pm 0,5^a$	$7,1 \pm 0,9^{ab}$	$6,9 \pm 1,7^a$	$5,3 \pm 0,4^a$	$7,8 \pm 0,6^{ab}$
$10^6$	$6,0 \pm 3,2^a$	$7,6 \pm 0,8^{ab}$	$7,0 \pm 2,6^a$	$6,8 \pm 0,8^b$	$7,6 \pm 2,3^{ab}$
$10^7$	$7,5 \pm 4,1^a$	$8,8 \pm 4,0^b$	$7,0 \pm 6,5^a$	$7,3 \pm 0,5^b$	$8,4 \pm 1,6^{bc}$
$10^8$	$10,8 \pm 8,1^a$	$9,6 \pm 2,2^b$	$10,4 \pm 4,5^a$	$7,5 \pm 0,8^b$	$8,6 \pm 3,3^{bc}$

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

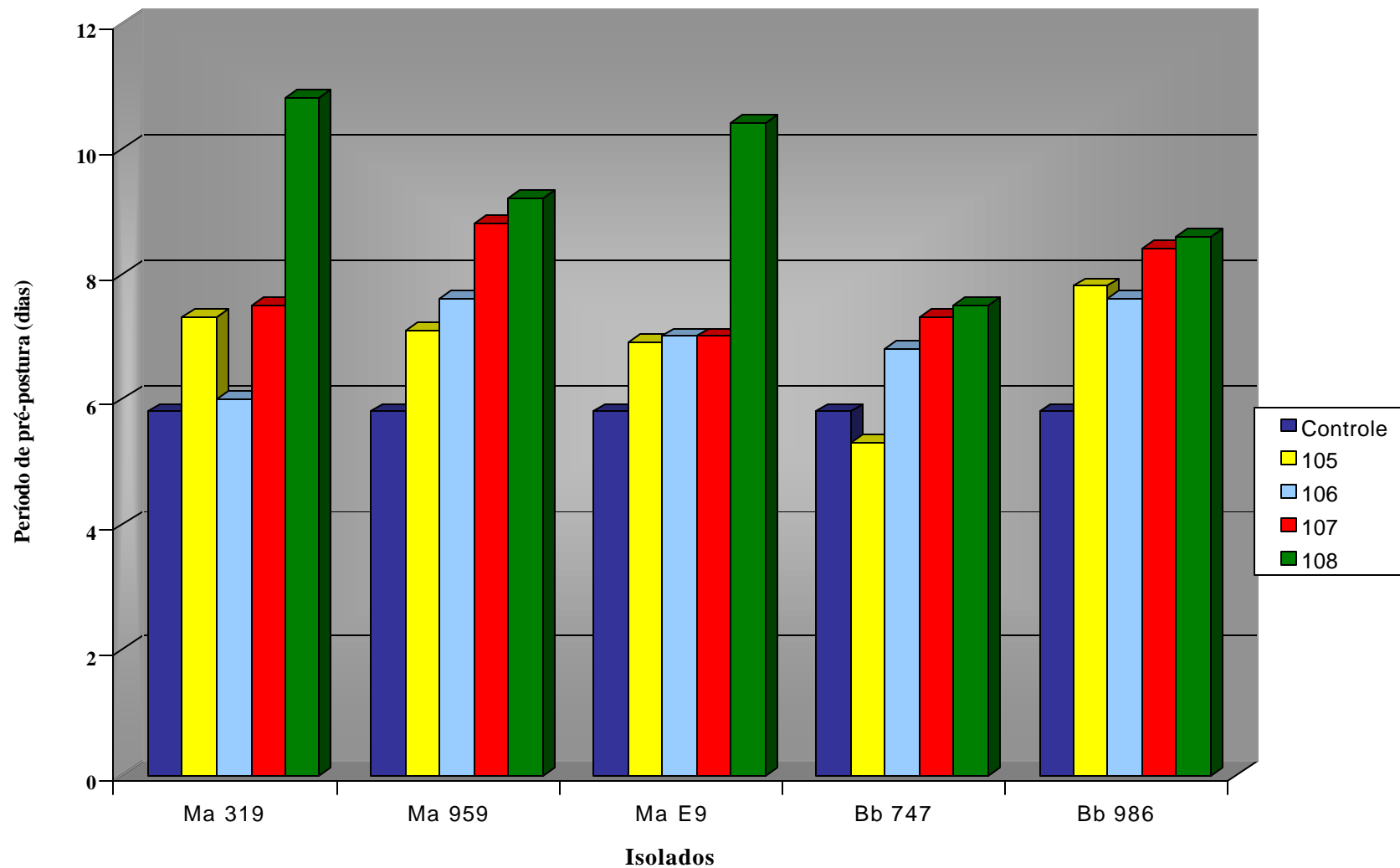
\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

Os isolados de *B. bassiana* quando analisados estatisticamente apresentaram diferenças significativas nas concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  no isolado 747, e somente às concentrações  $10^7$  e  $10^8$  referentes ao isolado 986 (Tabela 8). Estes resultados são demonstrados na Figura 6.

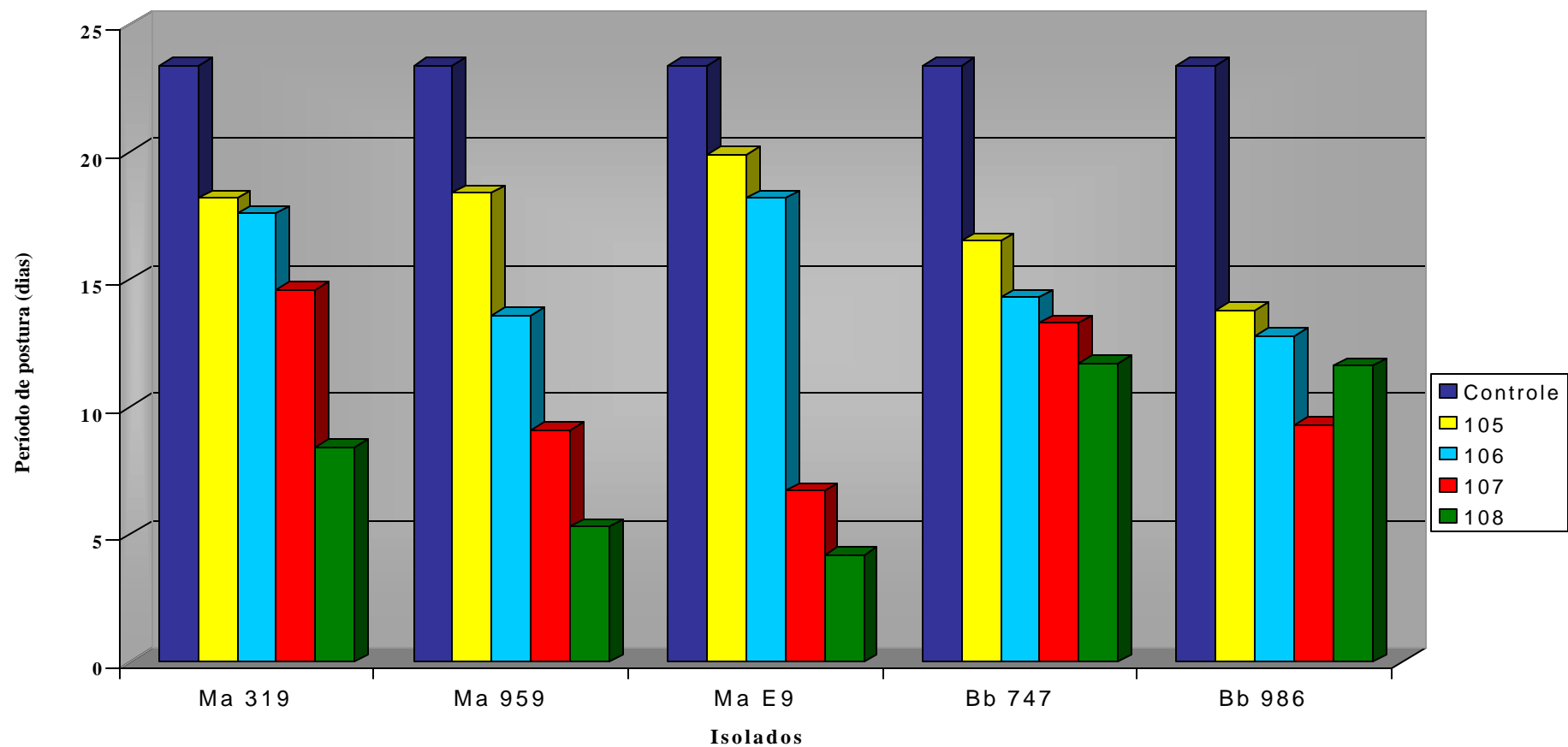
#### 4.5.2. Período médio de postura

O período médio de postura dos grupos controle foi de  $23,4 \pm 3,5$  dias, e nas concentrações  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  do isolado Ma 959 não houve diferença significativa entre os tratamentos e/ou quando comparados com os grupos controle; resultados diferentes aos obtidos na concentração  $10^8$  que apresentou o período de pré-postura de  $5,3 \pm 2,7$  dias. Os resultados obtidos com o isolado Ma 319 apresentaram diferenças significativas nas concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$ , e o isolado Ma E9 onde as concentrações  $10^7$  e  $10^8$  demonstraram tal característica, apresentando os períodos de  $6,7 \pm 2,6$  e  $4,2 \pm 1,5$  dias, respectivamente (Figura 7 e Tabela 9).

Nos grupos tratados com diferentes isolados de *B. bassiana* observou-se diferenças significativas em relação ao controle em todas as concentrações utilizadas, variando de  $11,7 \pm 4,0$  a  $16,5 \pm 4,4$  dias para o isolado Bb 747 e  $11,6 \pm 8,2$  a  $9,3 \pm 1,6$  dias para o isolado Bb 986 (Tabela 9).



**Figura 6.** Período de Pré-postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).



**Figura 7.** Período de postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

**Tabela 9** Período médio de postura (dias) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	23,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	23,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	23,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	23,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	23,4 ± 3,5 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	18,2 ± 8,4 <sup>ab</sup>	18,4 ± 8,0 <sup>a</sup>	19,9 ± 3,0 <sup>ab</sup>	16,5 ± 4,4 <sup>b</sup>	13,8 ± 5,7 <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup>	17,6 ± 6,9 <sup>bc</sup>	13,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	18,2 ± 6,6 <sup>ab</sup>	14,3 ± 2,5 <sup>bc</sup>	12,8 ± 5,9 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>	14,6 ± 9,8 <sup>bc</sup>	9,1 ± 7,1 <sup>a</sup>	6,7 ± 2,6 <sup>c</sup>	13,3 ± 3,0 <sup>bc</sup>	9,3 ± 1,6 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup>	8,4 ± 6,5 <sup>c</sup>	5,3 ± 2,7 <sup>b</sup>	4,2 ± 1,5 <sup>bc</sup>	11,7 ± 4,0 <sup>c</sup>	11,6 ± 8,2 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

#### 4.5.3. Período médio de incubação

O período médio de incubação dos ovos observado nos grupos controle foi de 35,6 ± 2,5 dias. Nos grupos tratados não houve diferença significativa entre os demais tratamentos e o grupo controle, com exceção do isolado Ma 319 onde somente a concentração 10<sup>8</sup> conídios/ml (40,0 ± 12,6 dias) e também no isolado Bb 747 com a mesma concentração (37,0 ± 3,4 dias), apresentaram diferenças significativas quando comparados com os demais tratamentos. Tais resultados podem ser vistos na Tabela 10 e Figura 8.



**Tabela 10.** Período médio de incubação (dias) dos ovos de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

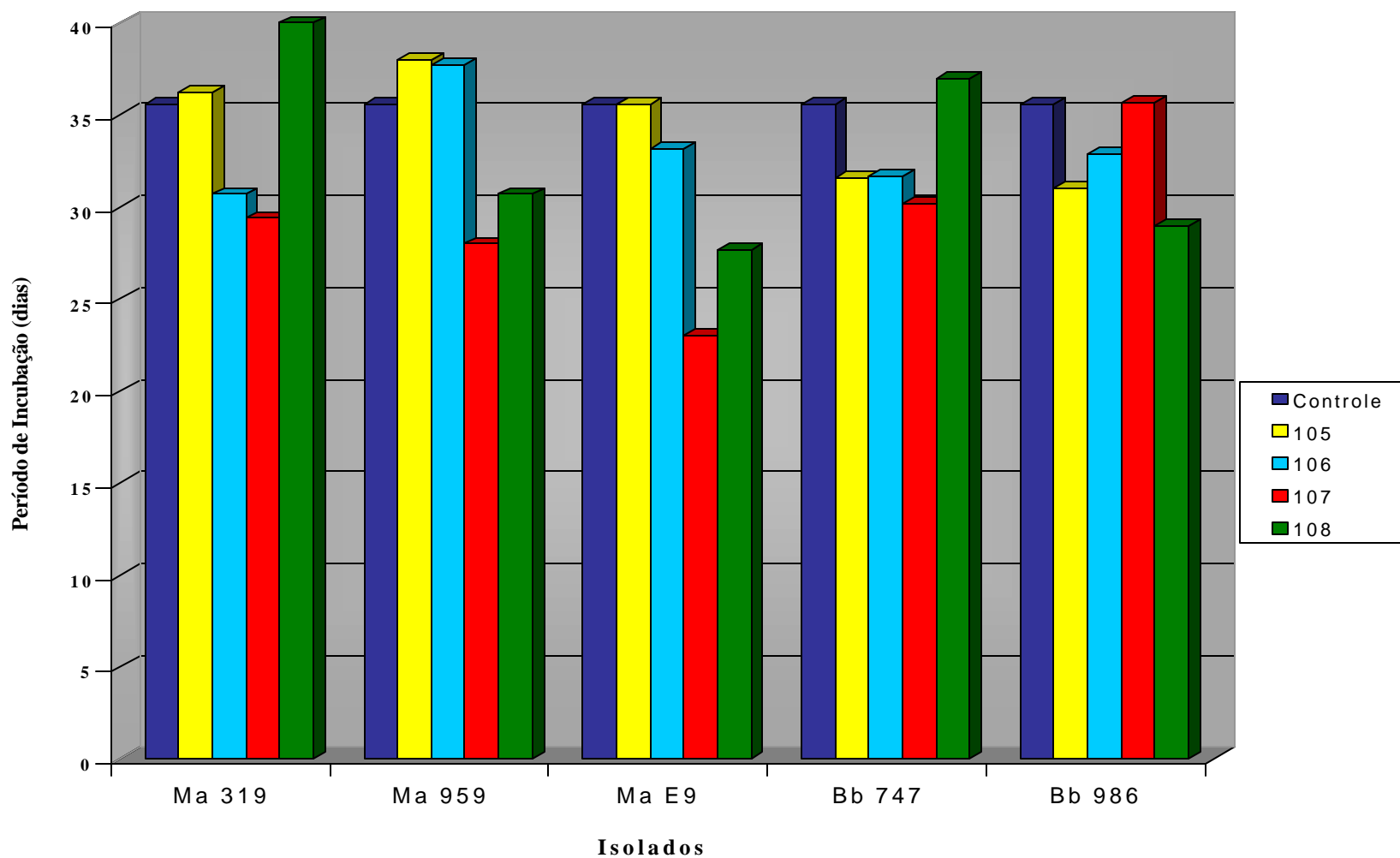
Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	35,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	35,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	35,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	35,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	35,6 ± 2,5 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	36,2 ± 3,0 <sup>a</sup>	38,0 ± 2,7 <sup>a</sup>	35,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	31,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	31,0 ± 9,9 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	30,7 ± 6,3 <sup>a</sup>	37,7 ± 3,0 <sup>a</sup>	33,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	31,7 ± 2,2 <sup>a</sup>	32,9 ± 8,9 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	29,4 ± 7,2 <sup>a</sup>	28,0 ± 9,4 <sup>a</sup>	23,0 ± 9,0 <sup>a</sup>	30,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	35,7 ± 7,6 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	40,0 ± 12,6 <sup>b</sup>	30,7 ± 11,4 <sup>a</sup>	27,7 ± 9,3 <sup>a</sup>	37,0 ± 3,4 <sup>b</sup>	29,0 ± 5,4 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

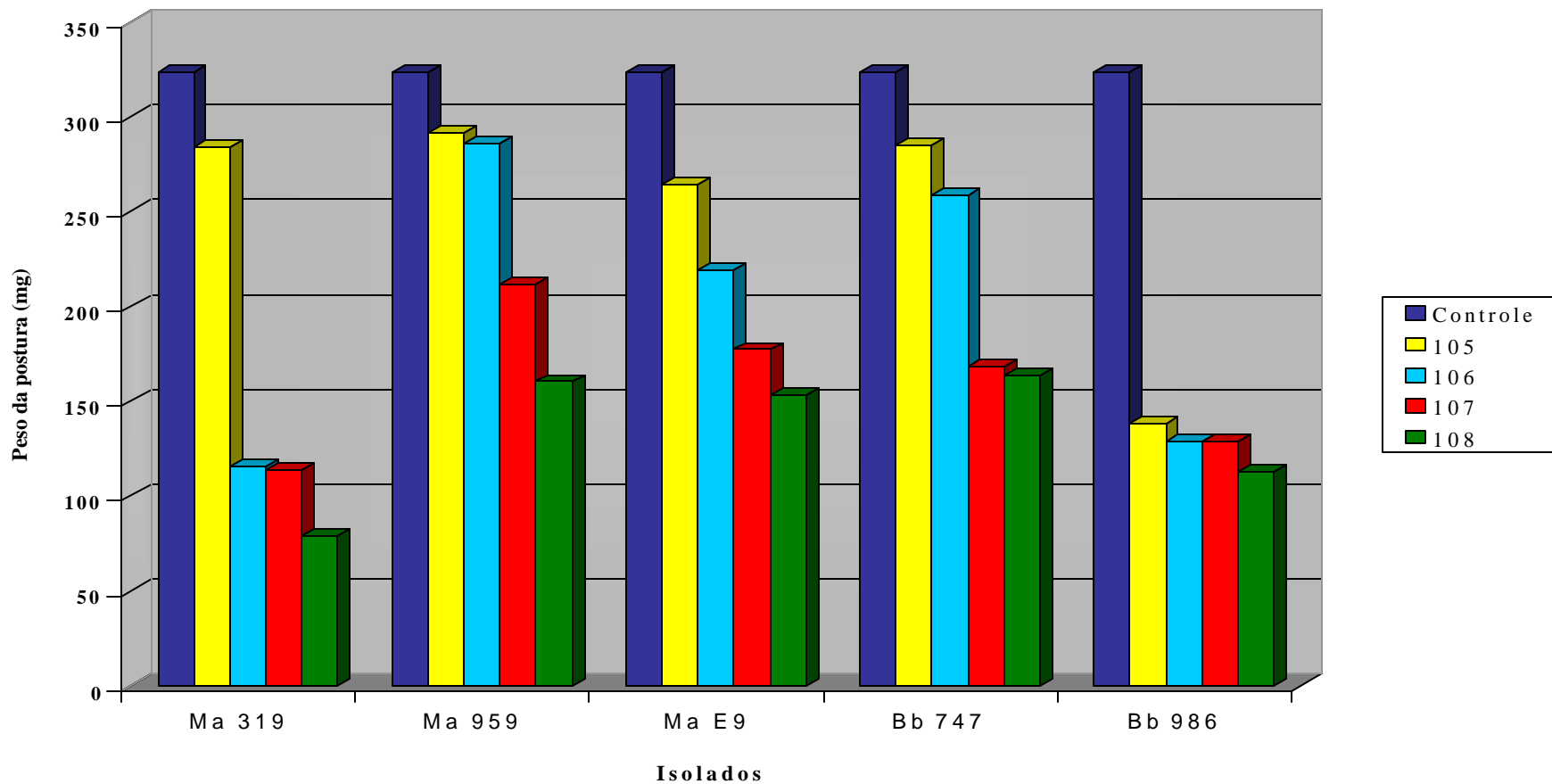
\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

#### 4.5.4. Peso médio da postura

O peso médio de postura das fêmeas ingurgitadas dos grupos controle foi 323, 8 ± 75,6mg, enquanto em todos os tratamentos utilizados observou-se uma diminuição do peso da massa de ovos à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml de suspensão. O isolado Ma 319 demonstrou a mais acentuada diminuição, obtida a partir da concentração 10<sup>8</sup> conídios/ml (79,1 ± 7,3mg); estes resultados podem ser observados na Tabela 11, e demonstrados na Figura 9.



**Figura 8.** Período de incubação (dias) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae*(Ma) e *Beauveria bassiana*(Bb).



**Figura 9.** Peso da postura (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

**Tabela 11.** Peso médio da postura (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos	Isolados					
	Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle		323,8 ± 75,6 <sup>a</sup>	323,8 ± 75,6 <sup>a</sup>	323,8 ± 75,6 <sup>a</sup>	323,8 ± 75,6 <sup>a</sup>	323,8±75,6 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>		283,7 ± 89,4 <sup>a</sup>	291,8 ± 68,5 <sup>a</sup>	264,2 ± 60,0 <sup>ab</sup>	285,4 ± 63,5 <sup>a</sup>	137,9±76,3 <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup>		115,5 ± 82,5 <sup>b</sup>	286,1 ± 59,3 <sup>a</sup>	219,0 ± 71,6 <sup>b</sup>	258,9 ± 50,8 <sup>b</sup>	128,4±64,6 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>		114,0 ± 54,6 <sup>b</sup>	211,6 ± 91,5 <sup>a</sup>	177,2 ± 84,3 <sup>c</sup>	168,0 ± 57,6 <sup>b</sup>	129,0±75,6 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup>		79,1 ± 33,6 <sup>c</sup>	160,4 ± 67,3 <sup>b</sup>	153,1 ± 80,9 <sup>c</sup>	163,9 ± 49,0 <sup>b</sup>	113,2±48,3 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\*Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

#### 4.5.5. Período médio de eclosão

O período médio de eclosão das larvas oriundas dos grupos controle foi de  $9,2 \pm 1,1$  dias, enquanto nos tratamentos utilizando os diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* observou-se que tal parâmetro foi inversamente proporcional às concentrações fúngicas utilizadas.

Nos resultados obtidos no presente trabalho foram observadas diferenças significativas em alguns tratamentos dos isolados testados (Tabela 12 e Figura 10).

**Tabela 12.** Período médio de eclosão (dias) de larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

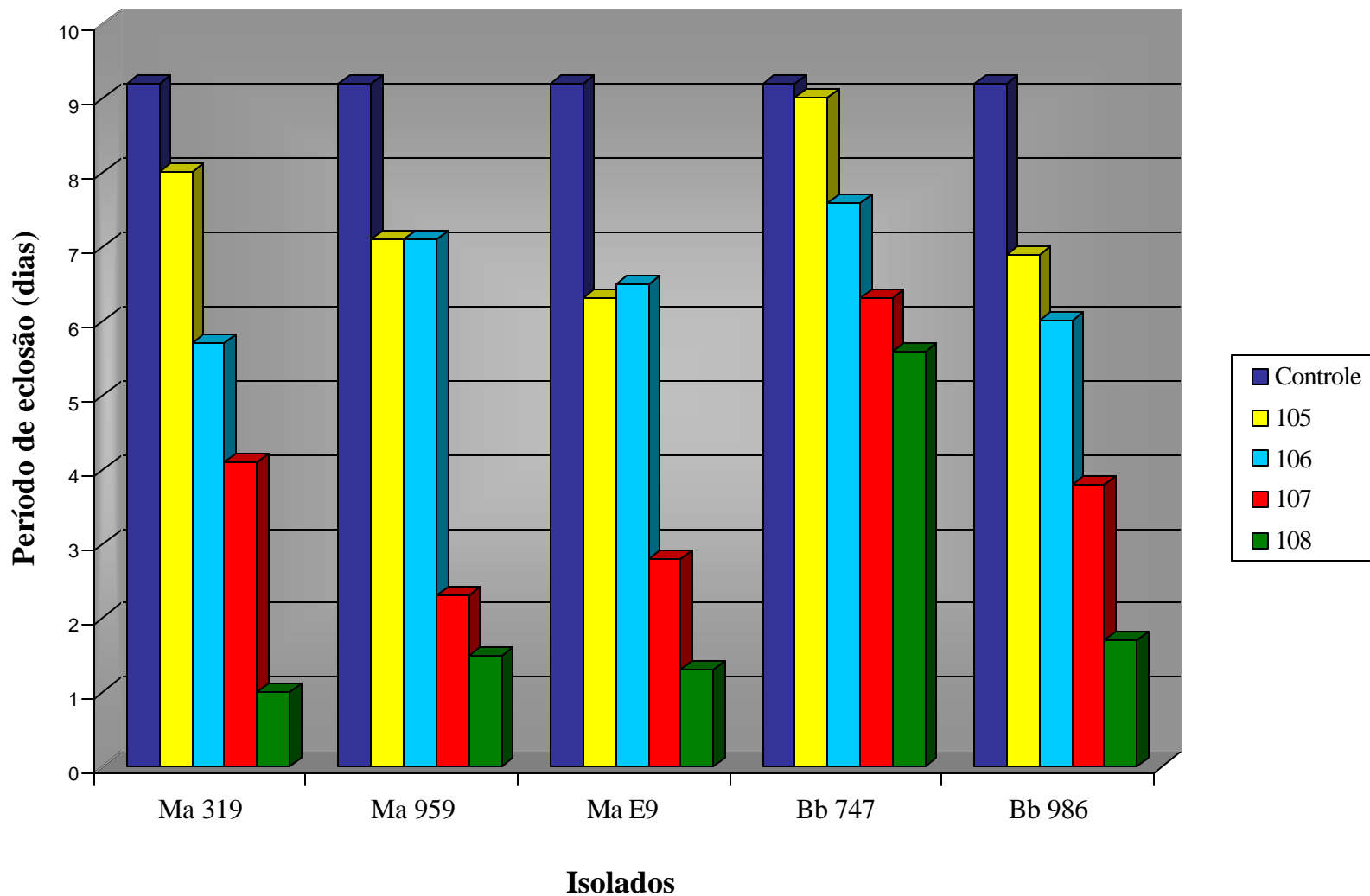
Tratamentos		Isolados			
Conc. con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	9,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	9,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	9,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	9,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	9,2 ± 1,1 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	8,0 ± 3,0 <sup>ac</sup>	7,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	6,3 ± 3,2 <sup>a</sup>	9,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	6,9 ± 3,2 <sup>ac</sup>
10 <sup>6</sup>	5,7 ± 3,8 <sup>bc</sup>	7,1 ± 2,9 <sup>a</sup>	6,5 ± 3,4 <sup>a</sup>	7,6 ± 1,3 <sup>ab</sup>	6,0 ± 3,4 <sup>bc</sup>
10 <sup>7</sup>	4,1 ± 3,0 <sup>b</sup>	2,3 ± 1,8 <sup>b</sup>	2,8 ± 3,3 <sup>b</sup>	6,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	3,8 ± 1,8 <sup>bd</sup>
10 <sup>8</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>d</sup>	1,5 ± 1,0 <sup>b</sup>	1,3 ± 1,0 <sup>b</sup>	5,6 ± 2,5 <sup>b</sup>	1,7 ± 1,4 <sup>d</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

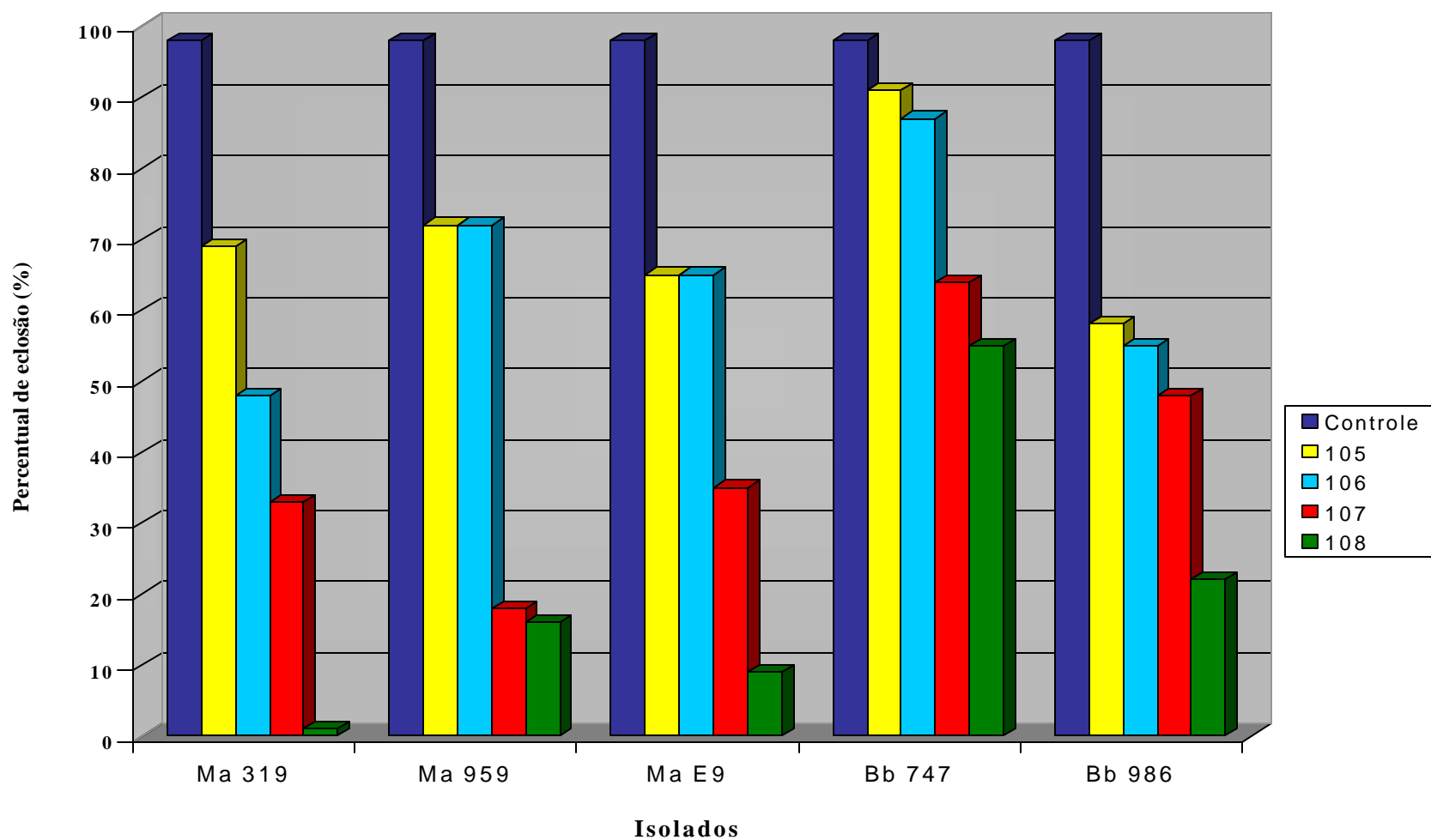
\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

#### 4.5.6. Percentual médio de eclosão

O percentual médio de eclosão de larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas dos grupos controle foi de  $98,0 \pm 4,2\%$ , enquanto observou-se nos diferentes isolados que todas as concentrações utilizadas nos bioensaios apresentaram diferenças significativas quando submetidos a comparações estatísticas com os grupos controle, com exceção dos isolados Ma 959, Ma E9 e Bb 747, onde somente observou-se tal diferença nas concentrações 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> (Figura 11 e Tabela 13).



**Figura 10.** Período de eclosão (dias) de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).



**Figura 11.** Percentual de eclosão (%) de larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

**Tabela 13.** Percentual médio de eclosão (%) de larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	98 ± 4,2 <sup>a</sup>	98 ± 4,2 <sup>a</sup>	98 ± 4,2 <sup>a</sup>	98 ± 4,2 <sup>a</sup>	98 ± 4,2 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	69 ± 26,0 <sup>b</sup>	72 ± 26,2 <sup>a</sup>	65 ± 30,2 <sup>ac</sup>	91 ± 5,7 <sup>a</sup>	58 ± 29,4 <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup>	48 ± 35,2 <sup>bc</sup>	72 ± 28,2 <sup>a</sup>	65 ± 37,2 <sup>ac</sup>	87 ± 10,6 <sup>a</sup>	55 ± 34,7 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>	33 ± 23,1 <sup>c</sup>	18 ± 20,4 <sup>b</sup>	35 ± 42,0 <sup>bc</sup>	64 ± 20,1 <sup>b</sup>	48 ± 22,5 <sup>bc</sup>
10 <sup>8</sup>	1,0 ± 1,2 <sup>d</sup>	16 ± 17,8 <sup>b</sup>	9,0 ± 7,4 <sup>b</sup>	55 ± 26,3 <sup>b</sup>	22 ± 27,0 <sup>c</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

#### 4.5.7. Peso médio inicial das fêmeas ingurgitadas

O peso médio inicial das fêmeas observados nos grupos controle foi de 612,9 ± 97,6 mg, enquanto nos grupos tratados com diferentes isolados de *B. bassiana* nas diversas concentrações foram de 657,3 ± 165,5 a 418,7 ± 132,1, e nos grupos em que foram utilizados os diferentes isolados de *M. anisopliae* houve a variação de 688,8 ± 210,3 a 517,3 ± 97,6 mg. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos e/ou controle (Tabela 14).



#### 4.5.8. Peso médio das quenóginas

Com relação ao peso médio final das fêmeas (quenóginas) observou-se uma média de  $137,1 \pm 77,5$ mg nos grupos controle.

As fêmeas ingurgitadas tratadas com os isolados da espécie *M. anisopliae* apresentaram melhores resultados quando comparados aos apresentados pelos isolados de *B. bassiana*, que não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos e/ou grupos controle. O isolado Ma 959 apresentou o menor peso final da fêmea, com média de  $142,19 \pm 73,7$ mg (concentração  $10^8$  con/ml). Tais resultados são observados na Tabela 15, e demonstrados na Figura 12.

**Tabela 14.** Peso médio inicial de fêmeas ingurgitadas (mg) de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	$612,9 \pm 97,6^a$	$612,9 \pm 97,6^a$	$612,9 \pm 97,6^a$	$612,9 \pm 97,6^a$	$612,9 \pm 97,6^a$
$10^5$	$618,9 \pm 97,5^a$	$615,6 \pm 210,3^a$	$589,4 \pm 132,1^a$	$569,9 \pm 116,0^a$	$560,7 \pm 160,0^a$
$10^6$	$632,0 \pm 175,8^a$	$633,0 \pm 86,9^a$	$619,5 \pm 112,9^a$	$657,3 \pm 181,0^a$	$418,7 \pm 140,0^a$
$10^7$	$641,0 \pm 104,1^a$	$627,5 \pm 103,3^a$	$517,3 \pm 165,5^a$	$545,7 \pm 205,7^a$	$447,8 \pm 93,0^a$
$10^8$	$592,4 \pm 132,0^a$	$688,8 \pm 112,4^a$	$592,4 \pm 132,0^a$	$488,9 \pm 137,0^a$	$489,0 \pm 137,0^a$

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

**Tabela 15.** Peso médio das quenóginas (mg) provenientes de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

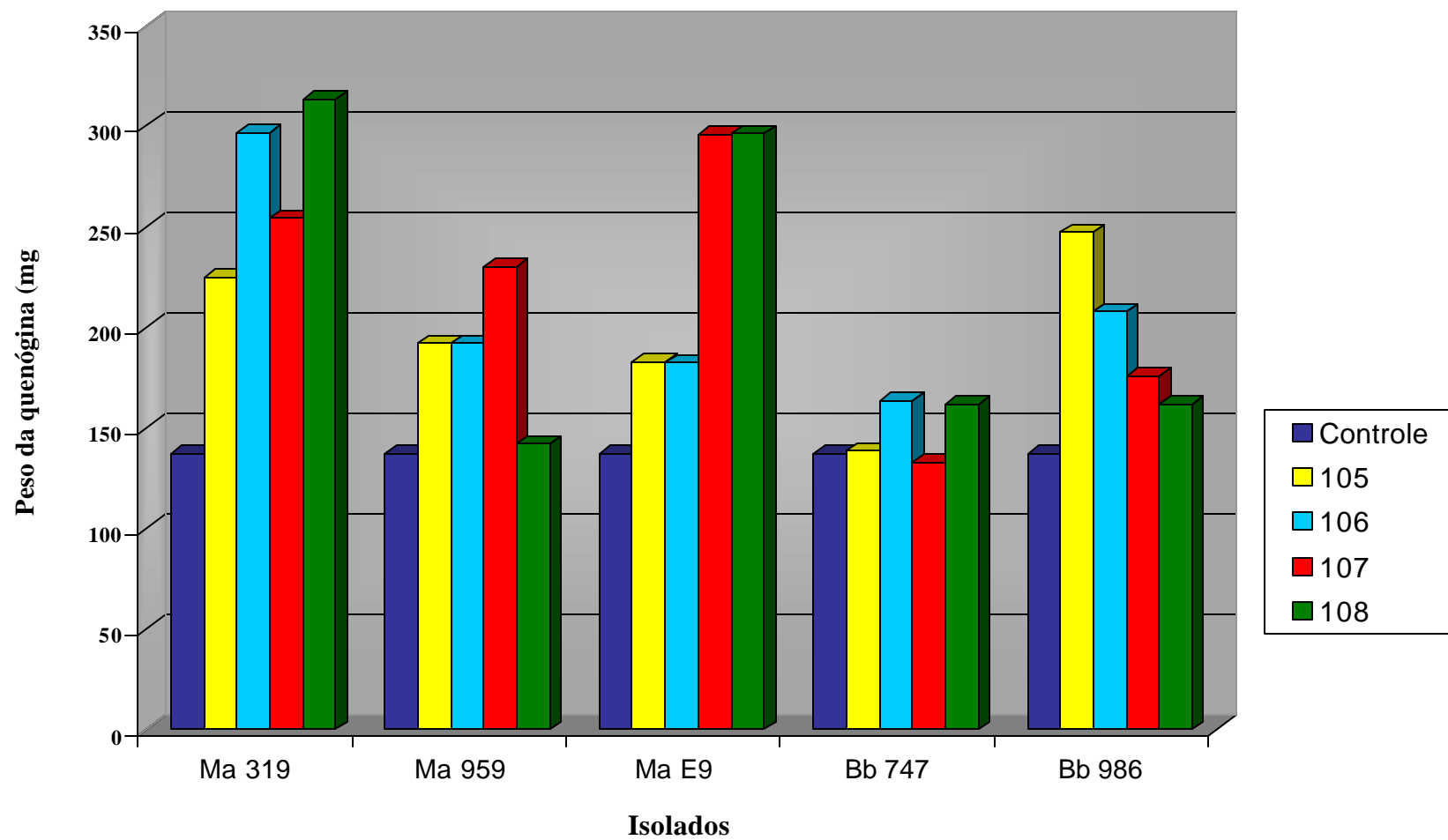
Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	137,1±77,5 <sup>a</sup>	137,1±77,5 <sup>a</sup>	137,1±77,5 <sup>a</sup>	137,1±77,5 <sup>a</sup>	137,1±77,5 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	225,0±113,5 <sup>ab</sup>	192,0±65,0 <sup>a</sup>	182,9 ±50,3 <sup>ab</sup>	138,6 ±99,5 <sup>a</sup>	247,3±89,1 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	296,8±98,0 <sup>b</sup>	192,1±29,5 <sup>a</sup>	182,4 ±35,5 <sup>ab</sup>	163,4 ±87,2 <sup>a</sup>	207,7±82,7 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	254,2±89,1 <sup>b</sup>	230,3±62,8 <sup>a</sup>	296,0 ±91,0 <sup>b</sup>	132,8 ±48,7 <sup>a</sup>	175,9±61,6 <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	313,6 ±97,3 <sup>b</sup>	142,19±73,7 <sup>b</sup>	296,2 ±97,3 <sup>b</sup>	161,8 ±60,5 <sup>a</sup>	161,8±60,5 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

#### 4.5.9. Índice de Eficiência Nutricional, Índice de Eficiência Reprodutiva, Percentual de Controle e Eficiência Reprodutiva.

O Índice de Eficiência Nutricional (IEN) médio dos grupos controle foi  $68,05 \pm 27,13\%$ , enquanto nos grupos tratados com os diferentes isolados de *M. anisopliae* nas diversas concentrações foram de  $20,60 \pm 12,6$  a  $59,35 \pm 6,4\%$ . Os isolados de *B. bassiana* apresentaram uma variação de  $23,80 \pm 14,1$  a  $57,71 \pm 15,8\%$  e/ou quando comparados aos grupos controle (Tabela 16).



**Figura 12.** Peso da quenógina (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

**Tabela 16.** Índice de eficiência nutricional de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	68,05±27,1 <sup>a</sup>	68,05±27,1 <sup>a</sup>	68,05±27,1 <sup>a</sup>	68,05±27,1 <sup>a</sup>	68,05±27,1 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	59,35±6,4 <sup>a</sup>	50,77±18,3 <sup>a</sup>	66,61±12,7 <sup>a</sup>	49,54±21,9 <sup>a</sup>	57,71±15,8 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	44,24±29,5 <sup>b</sup>	54,56±16,1 <sup>a</sup>	66,73±16,4 <sup>a</sup>	39,36±17,0 <sup>b</sup>	44,28±19,1 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	42,57±26,6 <sup>b</sup>	49,71±20,3 <sup>b</sup>	31,64±10,81 <sup>c</sup>	34,18±11,9 <sup>b</sup>	38,96±12,7 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup>	18,12±13,7 <sup>c</sup>	20,60±12,6 <sup>c</sup>	28,00±13,9 <sup>c</sup>	23,80±14,1 <sup>c</sup>	26,80±14,1 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

\*Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

Foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e/ou quando comparados aos grupos controle (Figura 13).

O Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) dos grupos controle foi  $52,83 \pm 17,2\%$ , enquanto nos grupos tratados com os diversos isolados de *M. anisopliae* foram de  $8,68 \pm 1,8$  a  $51,92 \pm 11,3\%$ . Para os grupos tratados com os diferentes isolados de *B. bassiana* nas diversas concentrações este parâmetro variou de  $15,83 \pm 10,2$  a  $45,53 \pm 22,2\%$ .

O parâmetro em questão mostrou-se inversamente proporcional às concentrações fúngicas, havendo diferenças significativas entre os tratamentos e/ou quando comparados aos grupos controle. (Tabela 17). Tais resultados são demonstrados na Figura 14.

**Tabela 17.** Índice de eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

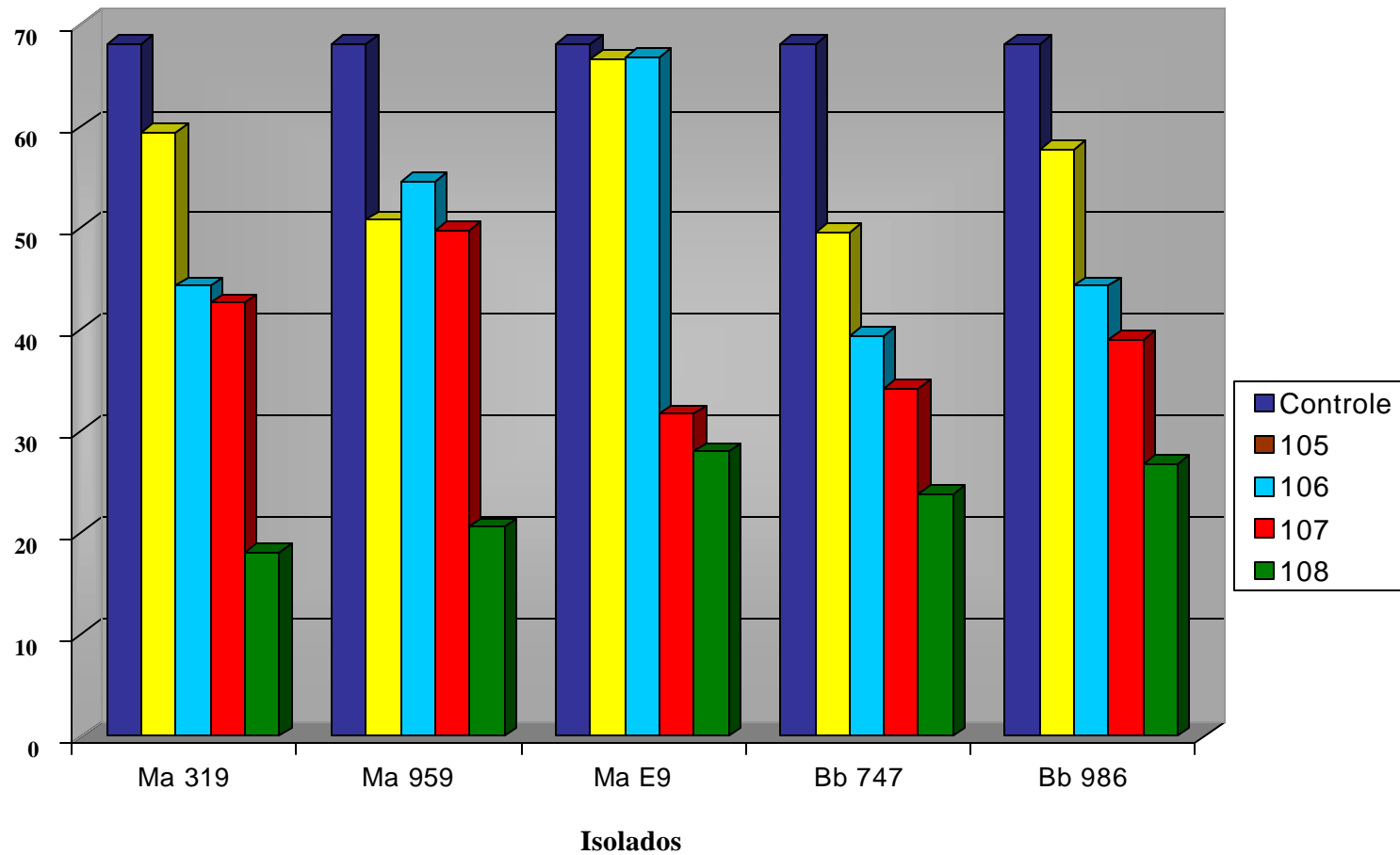
Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	52,83 ± 17,2 <sup>a</sup>	52,83 ± 17,2 <sup>a</sup>	52,83 ± 17,2 <sup>a</sup>	52,83 ± 17,2 <sup>a</sup>	52,83 ± 17,2 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	41,93 ± 12,4 <sup>a</sup>	51,92 ± 11,3 <sup>ab</sup>	45,56 ± 19,2 <sup>ab</sup>	45,53 ± 22,2 <sup>a</sup>	28,55 ± 12,0 <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup>	27,47 ± 17,4 <sup>b</sup>	42,01 ± 12,3 <sup>b</sup>	40,17 ± 15,6 <sup>ab</sup>	44,16 ± 17,3 <sup>a</sup>	25,14 ± 15,0 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>	24,25 ± 10,1 <sup>bc</sup>	35,37 ± 15,8 <sup>b</sup>	35,37 ± 15,3 <sup>b</sup>	38,24 ± 19,7 <sup>b</sup>	19,03 ± 11,3 <sup>c</sup>
10 <sup>8</sup>	13,22 ± 7,2 <sup>c</sup>	18,68 ± 7,2 <sup>c</sup>	8,68 ± 1,8 <sup>c</sup>	20,76 ± 11,4 <sup>c</sup>	15,83 ± 10,2 <sup>c</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

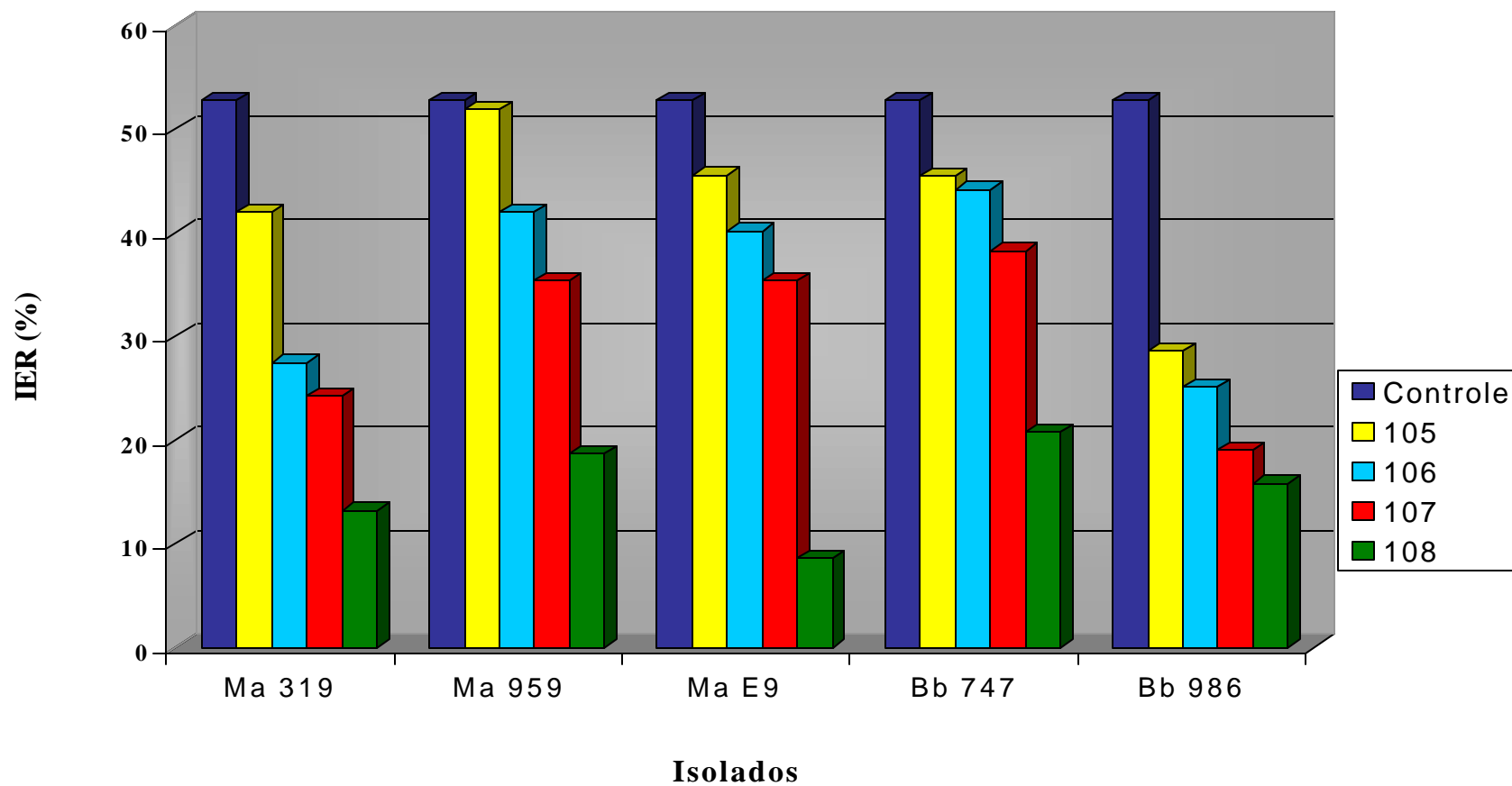
\* Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

A média de eficiência reprodutiva (ER) encontrada nos grupos controle foi de  $51,77 \pm 13,21$  sendo observadas através da Análise de Variância e Teste de Tukey a presença de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os diversos tratamentos e suas respectivas concentrações e quando comparados com os grupos controle.

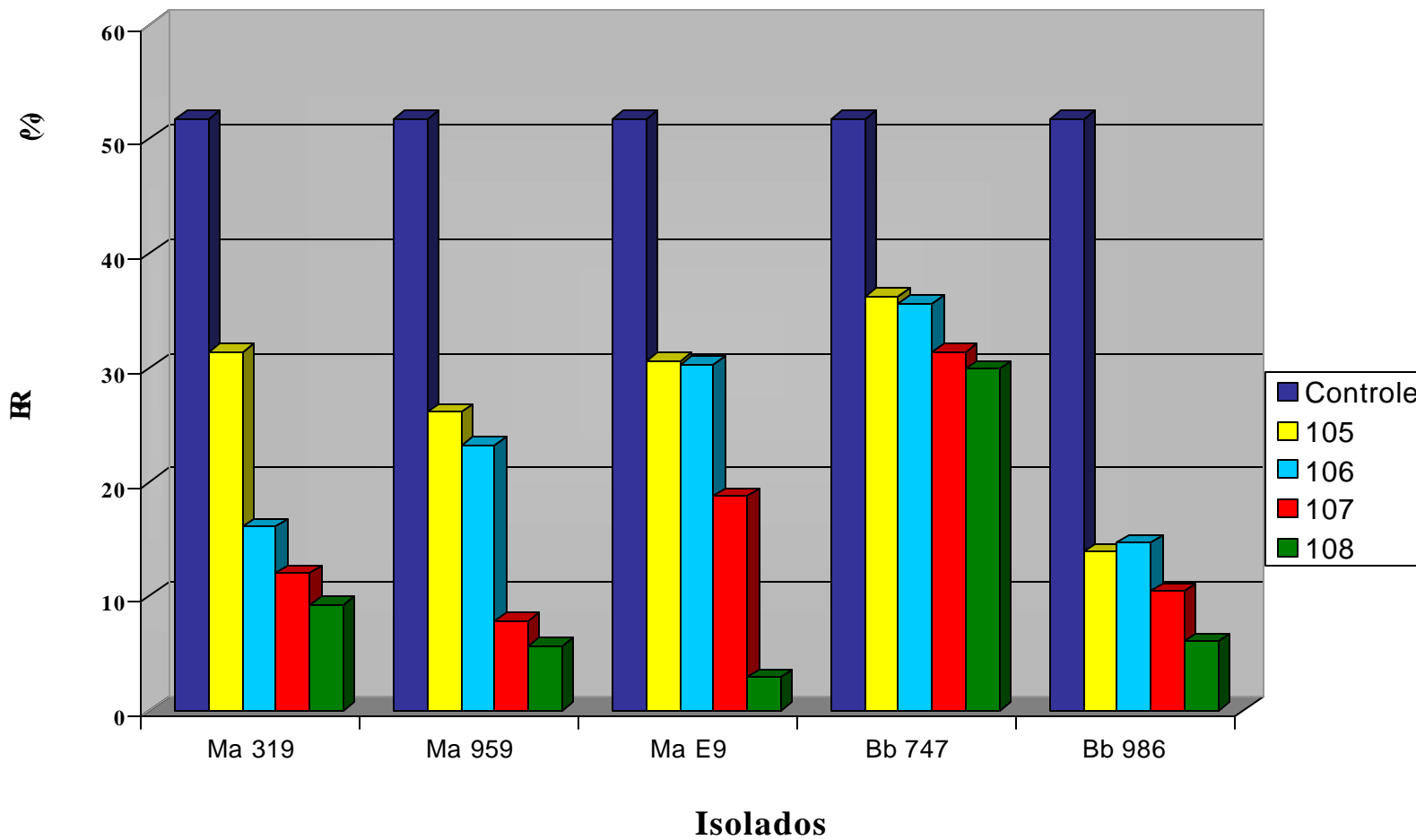
Houve uma diminuição deste parâmetro biológico à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml de suspensão, sendo o isolado Ma 319 o tratamento que apresentou os valores mais reduzidos de eficiência reprodutiva, encontrado na concentração  $10^8$  con/ml. Tais resultados são descritos na Tabela 18, e demonstrados na Figura 15.



**Figura 13.** Índice de eficiência nutricional (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb.)



**Figura 14.** Índice de eficiência reprodutiva (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).



**Figura 15.** Eficiência reprodutiva (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).



**Tabela 18.** Eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
Controle	51,77 ± 13,2 <sup>a</sup>	51,77 ± 13,2 <sup>a</sup>	51,77 ± 13,2 <sup>a</sup>	51,77 ± 13,2 <sup>a</sup>	51,77 ± 13,2 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	31,35 ± 11,8 <sup>b</sup>	26,16 ± 11,6 <sup>b</sup>	30,62 ± 16,8 <sup>b</sup>	36,25 ± 19,0 <sup>bc</sup>	13,87 ± 9,6 <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup>	16,08 ± 10,0 <sup>c</sup>	23,26 ± 14,6 <sup>b</sup>	30,29 ± 15,1 <sup>b</sup>	35,59 ± 16,0 <sup>b</sup>	14,67 ± 6,7 <sup>b</sup>
10 <sup>7</sup>	12,02 ± 8,0 <sup>cd</sup>	7,82 ± 1,5 <sup>c</sup>	18,75 ± 9,7 <sup>bc</sup>	31,38 ± 13,4 <sup>bc</sup>	10,42 ± 6,2 <sup>c</sup>
10 <sup>8</sup>	9,26 ± 1,9 <sup>d</sup>	5,69 ± 1,8 <sup>c</sup>	2,92 ± 1,3 <sup>c</sup>	29,90 ± 12,5 <sup>c</sup>	6,06 ± 1,0 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra, em mesma coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

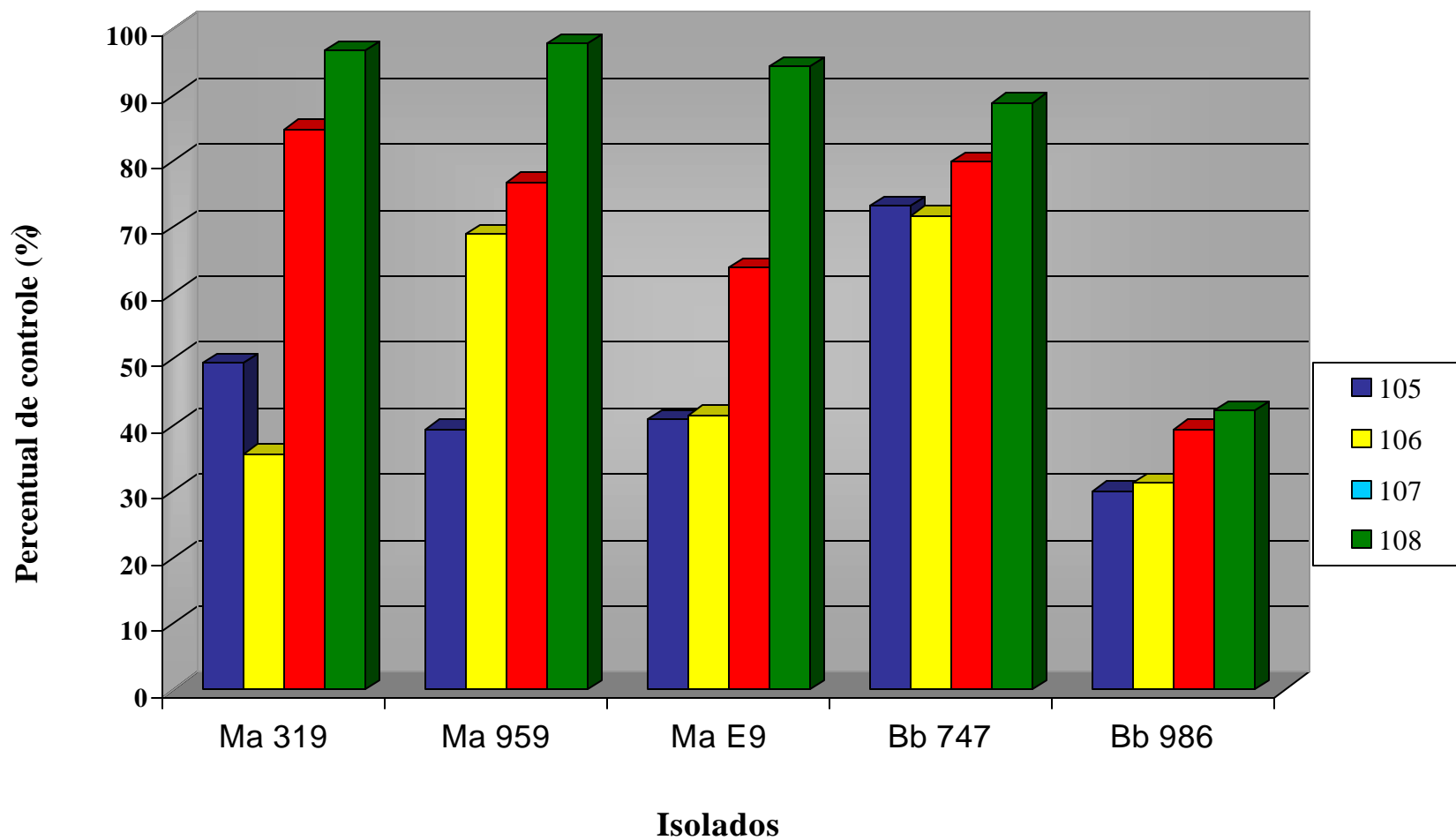
\*Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.

Analisando estatisticamente o Percentual de Controle, observou-se que este parâmetro demonstrou-se inversamente proporcional às concentrações fúngicas utilizadas neste bioensaio, sendo o isolado Ma 319 o tratamento que apresentou o maior percentual de controle, com média de 97,76%, na concentração 10<sup>8</sup> conídios/ml (Tabela 19 e Figura 16).

**Tabela 19.** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb)

Tratamentos		Isolados			
Conc. Con/ml*	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb 747	Bb 986
10 <sup>5</sup>	49,47	39,44	40,85	73,21	29,98
10 <sup>6</sup>	35,75	68,94	41,49	71,66	31,25
10 <sup>7</sup>	84,91	76,78	63,92	79,87	39,38
10 <sup>8</sup>	96,73	97,76	94,35	88,83	42,24

\*Concentração de conídios/ml de suspensão conidial.



**Figura 16.** Percentual de controle (%) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

As concentrações letais CL 50 e CL 90 de ambas espécies de fungos entomopatogênicos com seus respectivos isolados estão descritos na Tabela 20.

**Tabela 20.** Concentração letal (CL50 e 90) de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com diversas concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

Conc. Letal	Ma 319	Ma 959	Ma E9	Bb747	Bb 986
<b>CL50</b>	$1,7 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$5,9 \times 10^7$
<b>CL90</b>	$1,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{16}$	$1,7 \times 10^9$

#### 4.5. Isolamento dos fungos após bioensaios

Em todos os estágios evolutivos avaliados foi observado o crescimento dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* após inoculação em meio de cultura como pode ser visto nas Figuras 17 e 18.



Figura 17. Reisolamento da cepa **319** do fungo *Metarhizium anisopliae* a partir de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*.

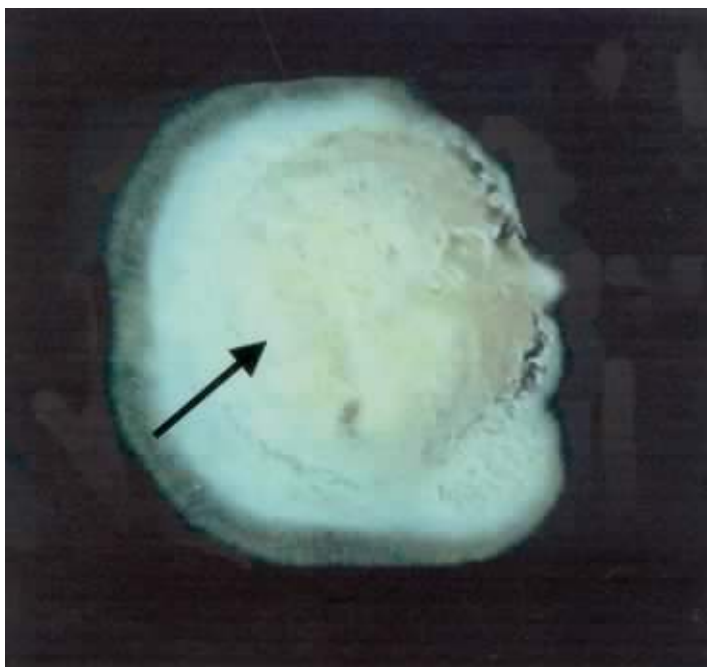


Figura 18. Reisolamento da cepa **986** do fungo *Beauveria bassiana* a partir de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Ninfas não alimentadas de *Amblyomma cajennense*

As considerações feitas sobre o efeito deletério *in vitro* causado por fungos entomopatogênicos a carrapatos estão presentes nas citações de KAAYA *et al.* (1996), que avaliaram a ação patogênica dos mesmos isolados de *B. bassiana* utilizados no presente trabalho. Os autores verificaram que o percentual de viabilidade do carrapato *R. appendiculatus* foi muito baixa, apresentando 100% de mortalidade nos grupos tratados com suspensões conidiais nas concentrações  $10^6$  e  $10^8$  conídios/ml. Tal característica também foi observada no presente estudo, onde a viabilidade de ninfas não alimentadas não foi superior a 65% e 71% para os isolados Bb 747 e Bb 986, respectivamente.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores (BITTENCOURT *et al.*, 1997, MONTEIRO *et al.*, 1998a e 1998b), que mesmo trabalhando com outras espécies de ixodídeos e outros estágios parasitários, verificaram que estes fungos exerciam efeito deletério sobre as espécies de carrapato avaliadas, reduzindo o percentual de viabilidade dos carrapatos testados.

Os mesmos isolados de *B. bassiana* (747 e 986) foram testados por BARBOSA *et al.*, (1997), no qual os autores, avaliando a ecdise larval e a sobrevivência de ninfas de *R. sanguineus*, observaram um percentual de mortalidade de 94% e 100% para os tratamentos  $10^6$  e  $10^8$  conídios/ml utilizando o isolado 747. Ao utilizar a cepa Bb 986 a mortalidade larval variou de 35% na concentração  $10^4$  conídios/ml a 100% nas concentrações  $10^6$  e  $10^8$  conídios/ml.

Tais resultados demonstraram uma porcentagem de viabilidade inversamente proporcional à concentração de conídios da suspensão, como também pode ser observado no presente trabalho onde os isolados de *B. bassiana* testados apresentaram os menores valores percentuais de viabilidade com a concentração  $10^8$  conídios/ml (44% para o isolado 986 e 27% para o isolado 747). Esta mesma característica foi observada nos isolados de *M. anisopliae*, no qual todos os tratamentos demonstraram diferenças significativas no percentual de viabilidade de ninfas não alimentadas. Assim, pela Tabela 2, constata-se a afirmação acima.

Foi obtida, a partir da Análise de Próbitos deste experimento, a variação na CL 50 dos isolados de *M. anisopliae* de  $2,89 \times 10^{11}$  a  $7,86 \times 10^{10}$  conídios/ml, e para os isolados de *B. bassiana* este mesmo parâmetro oscilou entre  $1,77 \times 10^8$  a  $1,81 \times 10^9$

conídios/ml (Tabela 3). Segundo SOUZA (1999) este parâmetro, verificado a partir de larvas não alimentadas de *A. cajennense*, variou entre  $1,8 \times 10^8$  a  $6,5 \times 10^5$  conídios/ml para os mesmos isolados de *M. anisopliae* utilizados neste trabalho, e para os isolados 986 e 747 do fungo *B. bassiana* o referido autor constatou os valores de  $3,9 \times 10^7$  e  $7,9 \times 10^5$  conídios/ml, respectivamente.

Estes resultados demonstram ocorrência de diferenças com relação a susceptibilidade aos entomopatógenos em diferentes espécies e ínstares de carrapatos.

## **5.2. Ninfas alimentadas de *Amblyomma cajennense***

Segundo CASTRO (1997), os ínstares alimentados da espécie *B. microplus* foram menos susceptíveis à ação do isolado 959 do fungo *M. anisopliae*, devido a perda da cutícula durante os processos de ecdise, visto que já foi comprovado por BITTENCOURT *et al.* (1999), que estes entomopatógenos penetram nos carrapatos através do tegumento.

ZHIOUA *et al.* (1997) ao avaliarem as alterações biológicas causadas em larvas alimentadas de *I. scapularis* tratadas com o fungo *M. anisopliae* observaram alta mortalidade das larvas duas semanas após a infecção com a concentração  $10^8$  conídios/ml de suspensão.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram diferenças significativas entre os tratamentos em todos os isolados, reduzindo o percentual de ecdise à medida que se aumentava a concentração de conídios na suspensão, com exceção dos resultados



obtidos a partir do isolado Ma 319, que apresentaram diferenças significativas quando comparados com outros tratamentos apenas entre as suspensões  $10^5$ ,  $10^6$  conídios/ml e os grupos controle, demonstrando uma possível falha na metodologia utilizada.

BARBOSA (1997) ao avaliar os isolados 986 e 747 de *B. bassiana* em ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* verificou que os grupos tratados com as suspensões fúngicas apresentaram uma maior mortalidade quando comparados com os grupos controle, e que o isolado Bb 986 agiu de maneira mais acentuada sobre o percentual de mortalidade.

As concentrações letais responsáveis pela mortalidade de 50% das ninfas alimentadas dos resultados obtidos deste trabalho variaram em  $5,19 \times 10^8$  a  $1,0 \times 10^{13}$  conídios/ml para os isolados de *M. anisopliae*, e  $2,72 \times 10^{11}$  a  $7,64 \times 10^{22}$  conídios/ml para as cepas do fungo *B. bassiana*. Nas citações feitas por MONTEIRO *et al.* (1998a), a CL 50 para eclosão de larval de *R. sanguineus* tratadas com as mesmas espécies de fungos utilizadas no presente estudo, apresentou uma pequena diferença quando os bioensaios foram realizados em diferentes temperaturas; já as CL 90 mais elevadas foram obtidas em ovos mantidos em temperaturas controladas, sugerindo assim que os ínstaros mantidos em condições variáveis de temperatura e umidade mostram-se mais susceptíveis à infecção fúngica do que os mantidos em condições controladas.

### **5.3. Adultos não alimentados de *Amblyomma cajennense***

De acordo com KAAYA *et al.* (1996), tanto *B. bassiana* quanto *M. anisopliae* induziram uma mortalidade de aproximadamente 100%, 76-95% e 36-64% para larvas,

ninfas e adultos, respectivamente do carrapato *R. appendiculatus*, cinco semanas após inoculação fúngica. Infecções experimentais e naturais utilizando os mesmos isolados descritos acima foram realizadas por MWANGI *et al.* (1994) onde as mesmas espécies fúngicas induziram a mortalidade de 35 a 73%, respectivamente em adultos não alimentados de *R. appendiculatus*.

Segundo BARBOSA (1997), adultos não ingurgitados de *R. sanguineus* apresentaram um aumento de mortalidade conforme o aumento da concentração do fungo, chegando até 40% na concentração  $10^8$  conídios/ml, comparado a uma baixa mortalidade no controle.

Observou-se no presente estudo que a maioria dos isolados testados em adultos não alimentados demonstraram uma diminuição na viabilidade à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml das suspensões, comprovando o efeito *in vitro* destes isolados fúngicos aos carrapatos, descritos anteriormente por outros autores, mesmo quando tratavam-se de outras espécies e/ou outros ínstares de ixodídeos.

Na Análise Estatística de Próbits que determinou a CL 50 de *M. anisopliae*, pode-se observar que os dados variaram entre  $1,43 \times 10^8$  a  $4,39 \times 10^8$  conídios/ml e para os isolados 986 e 747 de *B. bassiana* foram  $1,13 \times 10^8$  e  $3,36 \times 10^8$  conídios/ml respectivamente, dados próximos aos citados por SOUZA *et al.* (1999b), onde os autores analisaram a ecdise ninfal de *A. cajennense* utilizando os mesmos isolados citados neste trabalho.

## 5.4. Fêmeas Ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*

### 5.4.1. Período médio de pré-postura

O período de pré-postura médio obtido dos grupos controle foi  $5,8 \pm 0,42$  dias, valor próximo ao período médio de 6,3 dias encontrado em fêmeas de *A. cajennense* por DRUMMOND & WHETSTONE (1975) e também pelas citações feitas por SERRA-FREIRE & OLIVIERI (1992), indicando que os dados obtidos no experimento controle estão dentro da normalidade. BITTENCOURT *et al.* (1994b) encontraram um período de pré-postura nos grupos controle inferior aos observados nos grupos tratados com dois isolados de *M. anisopliae*, denominados de Isolado Mãe e Isolado Bm. Resultados similares foram observados no presente estudo somente no isolado Ma 959 e nos isolados de *B. bassiana* utilizados, onde houve um aumento deste parâmetro biológico à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml de suspensão. Estes resultados são semelhantes aos descritos por CORREIA *et al.* (1998), que ao exporem fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* ao isolado Ma E9, citaram que a concentração  $7,5 \times 10^8$  conídios/ml foi capaz de provocar alterações estatisticamente significativas no período médio de pré-postura.

Segundo BITTENCOURT *et al.* (1996), ao avaliarem a ação *in vitro* dos isolados 747 e 986 de *B. bassiana* sobre fêmeas de *B. microplus* observaram que o fungo não afetou significativamente o período em questão.

Este parâmetro contribui para as análises sobre o efeito do fungo na biologia do carrapato testado no presente estudo, porém vale salientar que ele somente foi averiguado em fêmeas que efetuaram postura, e não deve ser considerado como um dado isolado na biologia de *A. cajennense*.

#### 5.4.2. Período médio de postura

O período médio de postura dos grupos controle foi de  $23,4 \pm 3,5$  dias, sendo este valor incluído no período médio de 7 a 33 dias encontrados por SERRA-FREIRE & OLIVIERI (1992) e próximos aos valores relatados por ROHR (1909), com uma duração média de 25 a 26 dias.

BITTENCOURT *et al.* (1992, 1994) avaliando o efeito do fungo *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus* observaram uma diminuição no período de postura de fêmeas ingurgitadas tratadas, no qual os autores atribuíram estes resultados ao fato de que o aumento deste parâmetro foi inversamente proporcional à concentração fúngica. A diminuição do período de pré-postura também foi observada por MONTEIRO (2000) ao avaliar fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* expostas ao isolado 986 do fungo *B. bassiana*.

Os dados apresentados neste trabalho assemelham-se a tal raciocínio, onde foram observadas diferenças significativas em todos os isolados testados no qual as fêmeas apresentaram os menores períodos de postura com a concentração  $10^8$  conídios/ml do isolado Ma 959 ( $5,3 \pm 2,7$  dias).

### 5.4.3. Período médio de incubação

O período médio de incubação dos ovos obtidos nos grupos controle foi de 35,6  $\pm$  2,5 dias, dado esse, próximo ao período de 32 dias de fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* citado por DRUMMOND & WHETSTONE (1975) e de 35,7 dias citados por SERRA-FREIRE & OLIVIERI (1992).

O período de incubação dos ovos de *Ixodes ricinus* foi avaliado por BOYCEV & RIZVANOV (1960), no qual, os autores trabalhando com o fungo *Botrytis cinera* obtiveram um acréscimo de até 40 dias.

BITTENCOURT *et al.* (1996) também observaram um aumento significativo deste parâmetro à medida que se aumentava a concentração de conídios/ml do isolado Bb 986 em ensaios *in vitro* com fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. Este fato também foi citado por GORSKOVA (1966) que trabalhou com o fungo *B. bassiana* em carrapatos da espécie *I. ricinus*. MONTEIRO (2000) avaliando o processo de desenvolvimento dos ovos e sobrevivência larval de fêmeas ingurgitadas de *A. nitens* tratadas com várias concentrações de Bb 986, constataram o encurtamento dos períodos médios de incubação, porém os autores não observaram diferenças significativas sobre os percentuais de eclosão das larvas oriundas de fêmeas previamente infectadas.

Apesar do isolado Ma 319 e Bb 747, nas concentrações  $10^8$  conídios/ml, terem apresentado diferenças significativas no estudo aqui relatado, a maioria dos isolados não demonstraram-se significativamente diferentes quando comparados com os grupos controle.

Segundo SOUZA (1999), as diferenças anátomo-fisiológicas entre as espécies de carrapatos e as diferenças entre a virulência das cepas entomopatogênicas são capazes de justificar os resultados diferenciados encontrados por diversos autores, o que foi verificado no presente estudo onde apenas duas cepas fúngicas demonstraram-se agressivas ao estágio evolutivo citado, e que tal fator só pode ser observado na maior concentração de conídios/ml de suspensão usada, fundamentando a hipótese do autor supracitado.

#### **5.4.4. Peso médio da postura**

As fêmeas dos grupos controle realizaram postura com média de  $323,8 \pm 89,86$  mg, valores próximos aos encontrados por PRATA & DAEMON (1997) a partir de fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* ( $388,77 \pm 94,37$  mg).

Através da análise de variância foi observado que ocorreram diferenças entre as cepas utilizadas na maioria dos bioensaios quando comparados com o grupo controle, constatando que a infecção com as diversas concentrações foi capaz de diminuir o número de ovos depositados.

Resultados similares foram obtidos através de pesquisas desenvolvidas por CONNOLE (1969) que trabalhando com *B. microplus* constatou que *Aspergillus niger* foi capaz de inibir parcialmente a postura deste ixodídeo.

GORSKOVA (1966) ao estudar a infecção de fêmeas ingurgitadas de *I. ricinus* infectadas com *M. anisopliae* observou que a ação do fungo diminuiu

significativamente o peso da massa de ovos oriundos destes indivíduos. Tal fato também foi observado por KAAYA *et al.* (1996) ao avaliarem *M. anisopliae* e *B. bassiana* aos carrapatos *R. appediculatus* e *A. variegatum*, corroborando os resultados obtidos neste experimento.

MONTEIRO *et al.* (1998b) ao trabalharem com o isolado Bb 986 em fêmeas ingurgitadas de *A. nitens*, notaram que a exposição ao fungo provocou uma redução do peso médio da massa de ovos, onde a concentração  $10^8$  conídios/ml apresentou o menor peso ( $71,12 \pm 24,74$  mg) em relação ao controle ( $196 \pm 48,07$  mg).

Para *A. cajennense*, no entanto, com o isolado Ma 319, obteve-se o menor peso médio em massa de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas tratadas ( $79,1 \pm 33,6$ mg), em relação ao controle ( $323,8 \pm 75,6$ mg), o que nos leva a crer que o isolado em questão demonstrou-se mais patogênico para fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* do que os outros isolados.

#### **5.4.5. Período médio de eclosão**

BITTENCOURT *et al.* (1993), ao avaliar a ação dos isolados mãe e Bm da espécie *M. anisopliae*, observaram uma redução no período médio de eclosão de larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml. O isolado Bm demonstrou-se mais agressivo, apresentando diferenças significativas nas concentrações  $10^6$  (9,87dias)  $10^7$  (10,70dias) e  $10^8$  (13,17 dias)conídios/ml, respectivamente. Já o isolado denominado mãe apresentou significância apenas nas concentrações  $10^8$  e  $10^7$ conídios/ml (13,27 e 11,50

dias, respectivamente). Os mesmos autores em 1994 confirmam tais resultados trabalhando com os mesmos isolados e carrapato, onde observaram o período médio de 6,8 dias para os grupos controle e 13,83 dias para o isolado mãe e 15 dias para o isolado Bm, ambos observados na concentração  $10^8$  conídios/ml.

BITTENCOURT *et al.*, (1996), avaliando variações biológicas de *B. microplus* infectados com *B. bassiana*, observou que o período de eclosão foi maior que o grupo controle, ocorrendo uma média de 8,6 dias a 9,6 dias para a suspensão  $10^8$  conídios/ml e 5,3 dias a 5,6 dias para o controle.

O período médio de eclosão das larvas provenientes das fêmeas tratadas no presente experimento apresentou períodos mais curtos do que os grupos controle, sendo acentuados à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml de suspensão. Tal diminuição também foi observada por MONTEIRO *et al.* (1998b) ao avaliarem o efeito do isolado Bb 986 sobre de fêmeas ingurgitadas do carrapato *A. nitens*.

#### **5.4.6. Percentual médio de eclosão**

O percentual médio de eclosão larval proveniente dos grupos controle foi  $98 \pm 4,2$  %, valor este próximo ao encontrado em condições controladas de temperatura e umidade ( $27^\circ \text{Ce}$  UR  $\geq 80$  %) por PRATA (1998).

Todos os dados obtidos nos grupos tratados foram similares aos encontrados por BITTENCOURT *et al.* (1996) que trabalharam com carrapatos da espécie *B. microplus* tratados com os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, no qual também observaram que o



percentual de eclosão das larvas foi inversamente proporcional à concentração de conídios/ml de suspensão, sendo significativo quando submetido a comparações estatísticas com o controle pelo Teste de Tukey a 5 %.

MONTEIRO (2000) observou que o percentual de eclosão de larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas do carrapato *A. nitens* tratado com o isolado Bb 986 foi 62,37 % para a concentração  $10^8$  conídios/ml, e 67% para a concentração  $10^5$  conídios/ml. Os autores observaram que os valores percentuais dos tratamentos efetuados não demonstraram-se estatisticamente diferentes do grupo controle, diferentemente dos resultados apresentados no presente estudo onde somente as concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml dos isolados Ma 959, Ma E9 e Bb 747 influenciaram o parâmetro citado. Por outro lado, os isolados Ma 319 e Bb 986 mostraram-se significativamente eficientes, afetando o percentual de eclosão a partir da concentração  $10^5$  conídios/ml, sugerindo que os processos embrionários são afetados pelas diferentes concentrações fúngicas dos isolados utilizados.

#### **5.4.7. Peso inicial médio das fêmeas ingurgitadas**

Os grupos controle foram constituídos por fêmeas de peso médio de  $612,9 \pm 97,6$  mg, valor este próximo aos citados por DRUMMOND & WHETSTONE (1975), onde os autores avaliaram a ovoposição do carrapato *A. cajennense*, mantidos sob condições controladas.

Segundo pesquisas realizadas por PRATA & DAEMON (1997), o peso de *A. cajennense* variou de 646 a 1077 mg com média de  $816,28 \pm 152,76$  mg havendo proximidade com os valores relatados no presente estudo, caracterizando-se dessa forma a normalidade encontrada nos espécimens utilizados nos bioensaios.

#### **5.4.8. Peso da quenógina, Índices de Eficiência Nutricional, Índice de Eficiência Reprodutiva**

MONTEIRO (2000) observou uma redução no peso das quenóginas provenientes de bioensaios *in vitro* conforme aumentava-se a concentração fúngica do isolado Bb 986, havendo diferença significativa em todos os tratamentos quando comparados ao grupo controle. Estes resultados diferem dos obtidos no presente estudo, onde somente os isolados do fungo *M. anisopliae* apresentaram diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) ao comparar-se com os grupos controle, com uma variação de peso de 42,19 a 313,6 mg.

Os índices médios de eficiência nutricional e reprodutiva encontrados nos grupos controle foram  $68,05 \pm 6,9\%$  e  $52,83 \pm 17,21\%$ , respectivamente, sendo tais valores próximos aos resultados citados por PRATA & DAEMON (1997). Estes autores, trabalhando com a mesma espécie de carrapato, mantidos a  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  e umidade superior a 70%, obtiveram 64,6% e 47,6 % para IEN e IER, respectivamente.

Segundo BITTENCOURT *et al.* (1996), os índices de eficiência reprodutiva e nutricional de *B. microplus* tratados com os isolados 747 e 986 de *B. bassiana* variaram

de 52,03 a 18,49 % e 53,15 a 20,63 %, 61,14 a 22,93 % e 64,38 a 26,26 %, respectivamente.

Os autores evidenciaram que houve uma tendência à diminuição de acordo com o aumento na concentração de conídios/ml utilizada de ambos os isolados.

De acordo com as citações feitas por MONTEIRO (2000) sobre a biologia de *A. nitens*, as concentrações  $10^8$  conídios/ml do isolado Bb 986 apresentaram os menores índices de eficiência nutricional e reprodutiva ( $44,42 \pm 12,34$  e  $21,46 \pm 7,24$ , respectivamente) quando comparados com os grupos controle ( $72,43 \pm 16,12$ ).

O IER estima a capacidade do carrapato de transformar nutrientes em ovos, e quando este índice é baixo significa que a fêmea realizou uma postura menor que o seu potencial é capaz de fazer. Dados apresentados neste trabalho mostram que tais índices sofreram uma diminuição à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml de suspensão.

#### **5.4.9. Eficiência Reprodutiva e Percentual de Controle**

A eficiência reprodutiva das fêmeas ingurgitadas tratadas com os isolados testados apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparados com os grupos controle, apresentando uma redução inversamente proporcional à concentração fúngica.

Segundo citações feitas por BITTENCOURT *et al.* (1997), os isolados 986 e 747 do fungo *B. bassiana* apresentaram o percentual de controle de *B. microplus* de 59,91% a 88,3% e 63,7% a 83,39%, respectivamente, próximos aos dados obtidos por

BITTENCOURT (1992), que verificou o percentual de controle de *B. microplus* ao isolado Ma 959 (96,6%) na concentração  $10^8$  conídios/ml. Tais resultados assemelham-se aos obtidos no presente trabalho, onde observou-se um aumento do índice à medida que se aumentava a concentração de conídios/ml, sendo a concentração  $10^8$  conídios/ml do isolado Ma 319 o maior índice apresentado (97,76%).

Tais dados reforçam a hipótese de que o patógeno é capaz de promover efeitos deletérios à biologia desta espécie de ixodídeo, em ensaios *in vitro*.

Estes resultados possuem grande importância no possível direcionamento para o controle de *A. cajennense*, pois demonstram a possibilidade do seu uso na redução da taxa de crescimento deste carrapato no campo.

## 6. CONCLUSÕES

Após a realização de bioensaios com os isolados 319, 959 e E9 da espécie *M. anisopliae* e 747 e 986 de *B. bassiana* sobre os estádios de ninfa não alimentada, ninfa alimentada, adulto não alimentado e fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* podemos concluir que:

- 1) Todos os isolados dos fungos utilizados foram capazes de promover infecção nos ínstares testados, o que foi comprovado através do reisolamento dos fungos em meio de cultura BDA.
- 2) A eficácia *in vitro* dos fungos entomopatogênicos testados foi comprovada através da diminuição da viabilidade de ninfas, adultos e em decorrência de alterações ocorridas no percentual de controle de fêmeas ingurgitadas.

- 3) Os parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas que se apresentaram alterados foram: Período de pré-postura, Período de postura, Peso da postura, Período de Eclosão, Percentual de Eclosão, Peso da quenógina, Índice de Eficiência Nutricional e Reprodutiva.
- 4) Conclui-se que os isolados que foram mais eficazes nos diversos instares de *A. cajennense* tratados no presente trabalho foram: Bb 747 para ninfas não alimentadas, Ma 959 para ninfas alimentadas, Bb 986 para adultos não alimentados e Ma 319 para fêmeas ingurgitadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. & MORAES, S. A. 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. *In*: ALVES, S.B. coord. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed., FEALQ, Piracicaba, 765-777.
- ALVES, S. B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed., FEALQ, Piracicaba, 1163p.
- ARAGÃO, H. & FONSECA, F. 1961. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **59**(2):115-130.
- BARBOSA, J. V. 1997. Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre os estágios do desenvolvimento biológico de *Rhipicephalus*

- sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro.
- BARBOSA, J. V.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. & FACCINI, J. L. H. 1997. Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre a muda larval e a sobrevivência de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari : Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, **6**(1):53–56.
- BARROS, T. A. M. & EVANS, D. E. 1989. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesq. Vet. Bras.**, **9**(1):17-21.
- BIDOCHKA, M. J. & KHACHATOURIANS, G. G. 1992. Growth of the entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **J. Invert. Pathol.** **59**: 165-173.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. 1992. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 105p.
- BITTENCOURT, V. R. E. P., MASSARD, C. L. & LIMA, A. F. 1994. Ação do *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural - Série Ciências da Vida**, **16**: 39-45.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A. F. 1995. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883,



- sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Rev. Univ. Rural Série Ciênc. da Vida**, 17(1):83-88.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S.L.F.S.; VIEGAS, E. C. & ALVES, S. B. 1996. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, 5(2):81-84.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S.; MASCARENHAS, A. G. & ALVES, S. B. 1997. Avaliação da eficácia *in vitro* do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, 6(1):49-52.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A .G. & FACCINI, J. L. H. 1999. Mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus*, em condições experimentais. **Rev. Ciênc. Rural**, 29(2): 351-354.
- BOICEV, D. & RIZVANOV, K. 1960. Relation of *Botrytis cinerea* to Ixodid ticks. **Zool. Zh. Uh**, 39: 460.
- CASTRO, A. B. A. 1997. Avaliação “in vivo” do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 55p.

- CHANDLER, D.; DAVIDSON,G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW,K. and SUNDERLAND, K.D. 2000. Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Sc. Technol.*, **10**: 357-384.
- CONNOLE, M.D. 1969. Effect of fungal extracts on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* **45**: 207.
- CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C. & VERÍSSIMO, C. J. 1998. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Stabled Cattle. *J. Invert. Pathol*, **71**: 189-191.
- CUNHA, D. W. 1986. Aspectos do ciclo biológico (Fase Parasitária),variação estacional e efeito de diferentes graus de sangue sobre o parasitismo por *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em bovinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Seropédica, Rio de Janeiro.
- DRUMMOND, R. O. & WHETSTONE, T.M. 1975. Oviposition of the cayenne tick, *Amblyomma cajennense* (F.), in the laboratory. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **68**(2):214-216.
- ESTRADA-PEÑA, A.; GONZALEZ, J. & CASOLAS, A. 1990. The activity of *Aspergillus ochraceus* (Fungi) on replete females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in natural and experimental conditions. *Folia Parasitol*, **37**:331-336.
- FERRON, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. In BURGESS, H. D., Ed. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, Academic Press, London, pp. 1970-1980.

- GORSKOVA, G. J. 1966. Reduction of fecundity of ixodid ticks females induced by fungal infection. *Vetsnik Leningraskogo Universitk*, **21**: 13-16.
- HAJEK, A. E. & St LEGER, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.*, **39**: 293-322.
- HAWKSWORTH, D.L. 1977. Mycologist's handbook. 2 ed. Kew Surrey, England. CAB Press. 231p.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N. & OUNA, E. A. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol*, **67**:15-20.
- LACEY, C. M.; LACEY, L. A.; ROBERTS, D. R. 1998. Route of invasion and histopatology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *J.. Invert. Pathol.*, **52**: 108-118.
- LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F. 1949. Simple method of fitting dose effect curve. *J. Pharm. Exp. Ther*, **95**:99-113.
- MASSARD, C. A. 1984. *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936) diagnóstico, cultivo *in vitro* e aspectos epidemiológicos em bovinos no Brasil. Tese de Doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 113p.
- McCOY, C. W.; SAMSON, R. A. & BOUCIAS, D. G. 1988. Entomogenous Fungi. In : IGNIFFO, C. M., Ed CRC Handbook of Natural Pesticides, Volume V Microbial Inseticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi, CRC Press, Florida, USA, 51-236.

- MONTEIRO, J.L.; FONSECA, F. & PRADO, A . 1931. Pesquisas epidemiológicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. *Mem. Inst. Butantã*, **6**:139-173.
- MONTEIRO, S.G. 2000. Ação do isolado 986 do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, sobre o carrapato *Anocentor nitens* (Neumann) Schulze, 1937. Tese de Doutorado. UFRRJ. 75p.
- MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E. & FACCINI, J.L.H. 1998 a. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Ciênc. Rural*, **28**(3): 461-466.
- MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E. & FACCINI, J.L.H. 1998 b. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **7**(2):113-116.
- MOREIRA, M. A. B.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES, M. C. C.; CHAGAS, M. C. M. 1996. Occurrence of *Metarhizium flavoviridae* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) on *Shistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brazil. *Ann. Soc. Entomol. Brasil*. **25**(2): 359-361.
- MWANGI, E. N.; DIPEOLU, O. O.; NEWSON, R. M.; KAAYA, G. P. & HASSAN, S. M. 1991. Predators, parasitoids and pathogens of ticks: A review. *Bioc. Sci. Technol*, **1**: 147-156.

- MWANGI, E. N.; KAAYA, G. P.; ESSUMAN, S. & KIMONDO, M. G. 1994. Parasitism of *Amblyomma variegatum* by a hymenopteran parasitoid in the laboratory and some aspects of its basic biology. **Biol. Cont.**, **4**: 101-104.
- MWANGI, E.N.; KAAYA, G.P. & ESSUMAN, S. 1995. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. **J. Afric. Zool.**, **109**: 151- 160.
- PRATA, M. C. A. 1998. Efeitos de diferentes temperaturas sobre os processos de postura, eclosão e mortalidade de larvas de *Amblyomma cajennense*( Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae). Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 75p.
- PRATA, M. C. A. & DAEMON, E. 1997. Determinação do número de ovos por grama de postura de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae). **Rev. Bras. de Ciên. Vet.**, **4**(2):81-82.
- PRATA, M.C.A.; MORAIS, M.C.; ALONSO, L.S. & SANAVRIA, A. 1995. Determinação de alguns parâmetros biológicos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em infestações artificiais de eqüinos. **Rev. Bras. Parasit. Vet.**, **4**(2)supl. 1:49.
- RHOR, C. J. 1909. Estudos sobre Ixodidas do Brasil. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, RJ, 220p.
- ROBINSON, L.E. 1926. **The genus Amblyomma**. Cambridge Univ. Press, Grã Bretanha, 301 p.

- SAMSINAKOVA, A. 1957. *Beauveria globulifera* (Speg) Pic. Iako Parasit. Klistete *Ixodes ricinus*. **L. Zool. Listy**, **6**(4): 329-330.
- SERRA FREIRE, N. M. 1982. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Univ. Fed. Rural. Rio de Janeiro**, **5**:187-193.
- SERRA FREIRE, N.M. & OLIVIERI, J.A. 1992. Estádio adulto do ciclo de *Amblyomma cajennense*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, **20**: 224-234.
- SOUZA, E. J. 1999. Avaliação da eficácia *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 sobre ovos e larvas do carrapato *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 71p.
- SOUZA, E. J., REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 1999a. Avaliação do efeito *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre ovos e larvas de *Amblyomma cajennense*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, **8**.
- SOUZA, E. J., REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. 1999b. Efeito do contato dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na ecdise ninfal de *Amblyomma cajennense*. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, **6**: 84-87.
- St LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. 1991. Penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **J. of Invert. Pathol.**, **58**: 168-170.

- STENDEL, W. 1980. The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *J. South Africa Vet. Assoc.*, **51**: 147-152.
- TAMAI, M. A.; ALVES, S. B.; NEVES, P. J. 1999. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. ao ácaro *Tetranychus urticae* Koch. *Sci. Agricola*, **56**:.2.
- TORRADO, J. M. G & GUTHIERREZ, R. O. 1969. Metodo para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata. Evolucion de sensibilidad. *Rev Inst. Agr. Patol. An*, **6**: 135-158.
- FLECHTMANN, C.H.W. 1985. *Ácaros de Importância Médico-Veterinária*. 3<sup>a</sup> ed., Editora Nobel, São Paulo, 192 p.
- TULLOCH, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **66**(3): 407-11.
- ZHIOUA, E., BROWNING, M., JOHNSON, P. W., GINSBERG, H. S. and LEBRUN, R. A. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae). *J. Parasitol.*, **83**(5): 815-818.