

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)
(ACARI: IXODIDAE).

EDSON JESUS DE SOUZA

1999

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

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)
(ACARI: IXODIDAE).

EDSON JESUS DE SOUZA

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

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Magister*
Scientiae em Medicina Veterinária -
Parasitologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

MARÇO, 1999

TÍTULO DA TESE

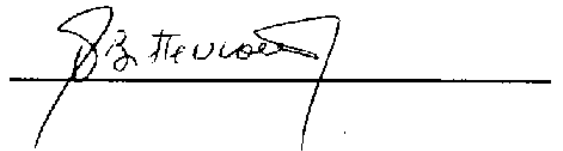
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *in vitro* DOS FUNGOS *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN, 1912 E *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 SOBRE OVOS E LARVAS DO CARRAPATO *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE).

AUTOR

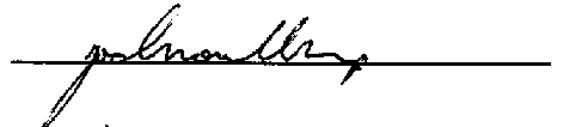
EDSON JESUS DE SOUZA

APROVADA EM: 23/03/1999

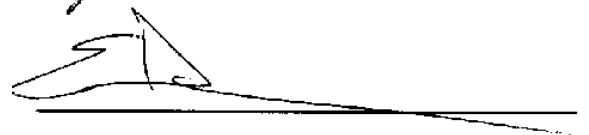
VÂNIA RITA E. P. BITTENCOURT



JACKSON VICTOR DE ARAÚJO



ERIK DAEMON DE SOUZA PINTO



“Há quem quer saber com o único fim de saber,
e isto é torpe curiosidade...
Há quem quer saber para ser conhecido,
e isto é glória vã...
Há quem quer saber para vender sua ciência,
e isto é vergonhoso...
Mas há também aqueles que querem saber para edificar à
outros,
e isto é amor.”

São Bernardo

Pelo apoio, acima de tudo; pelo amor sem medida, e principalmente pela
confiança sempre em mim depositada; dedico esta tese:

*Aos meus pais,
Jordão e Cecília,*

*aos meus irmãos
Helena, Sônia e Gledson*

*e a minha namorada
Maria Helena*

AGRADECIMENTOS

Primeiro, a DEUS, pela saúde e paz, e consequentemente, ter me dado condições de chegar até aqui.

A Professora e orientadora VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT que no decorrer da realização do curso sempre me estimulou à pesquisa envolvendo Controle Microbiano, pela amizade e dedicação conquistada e fortalecida no decorrer de nossa convivência.

Aos Professores ERIK DAEMON DE SOUZA PINTO e GONZALO EFRAIM MOYA BORJA, pelas sugestões, amizade e boa vontade em ajudar sempre que solicitados.

Aos Professores RITA DE CÁSSIA ALVES ALCÂNTARA DE MENEZES, JOÃO LUIZ HORÁCIO FACCINI e MARIA DE LURDES DE AZEVEDO RODRIGUES pelas sugestões e auxílio no decorrer da confecção de minha tese.

Aos colegas, AFONSO AURÉLIO DE CARVALHO PERES e SÉRGIO LUIZ FEIJÓ DA SILVA PERALVA pela amizade constante, e pelo estímulo diário à pesquisa e formação profissional.

A amiga GISELA LARA DA COSTA pelas boas idéias e apoio constante no decorrer de nossa convivência, principalmente, por ter partilhado seus conhecimentos sobre fungos e técnicas laboratoriais, além de seu tempo precioso.

Em especial, ao meu amigo e cunhado LUIZ KAZUIUKE SEIKE, por ter me mostrado a dimensão e o valor de uma realização profissional ampla.

Aos bolsistas de Iniciação Científica e estagiários, ROSANA COLATINO SOARES REIS, DENISE RIBEIRO MELO, ANDRÉA GEMAL MASCARENHAS e THIAGO CAMPANHARO BAHIENSE não só pela ajuda durante o desenvolvimento da fase experimental, mas também pelas inúmeras idéias e críticas formuladas no decorrer de nossa convivência.

Em especial a amiga MÁRCIA CRISTINA DE AZEVEDO PRATA, por sua primorosa ajuda no decorrer da fase experimental, afora os valiosos conselhos no dia a dia.

A Professora MARIA PAZ ABRAIRA LÓPEZ DE CRESPI pelo empréstimo dos coelhos utilizados na fase experimental.

Ao Professor ELSON DE CARVALHO VIEGAS pela colaboração e estímulo à pesquisa científica.

Ao Professor SÉRGIO BATISTA ALVES do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, pela doação de alguns isolados utilizados na Tese.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que ajudou na execução do experimento.

A todos os professores, funcionários e alunos do Curso de Pós graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária que se tornaram primorosos amigos, contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

EDSON JESUS DE SOUZA, filho de Jordão Justino de Souza e Cecília Simão de Souza, nasceu em 01 de março de 1972, na cidade de Itobi, estado de São Paulo.

Cursou o primeiro grau na escola estadual de 1^o e 2^o Grau “Prof^a . Rita de Macedo Barreto” concluindo-o em dezembro de 1986; o 2^o grau foi concluído em dezembro de 1989 na Escola Técnica Agrícola Estadual Dr. Carolino da Motta e Silva; situadas em Itobi e Espírito Santo do Pinhal, respectivamente.

Em 1993 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Seropédica, RJ, graduando-se em dezembro de 1997. Durante o curso foi monitor da disciplina de Bioestatística e Estatística Experimental, no Departamento de Matemática da UFRRJ, no período de 13 de dezembro de 1994 à 31 de julho de 1995; foi também Bolsista de Iniciação Científica Programa PIBIC / CNPq - UFRRJ, no período de 1 de agosto de 1995 à 31 de Dezembro de 1997. Durante este período apresentou 12 trabalhos científicos

em congressos ou simpósios nacionais e publicou dois trabalhos científicos em periódico indexado.

Em 1998 iniciou o curso de Pós - Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, a nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

SUMÁRIO

	Págs.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Controle microbiano de carrapatos	5
2.1.1. Microorganismos utilizados	5
a. Riquetsias.....	5
b. Vírus	6
c. Nematóides	7
d. Bactérias	9
e. Fungos	11
2.1.2. Metabólitos produzidos por microorganismos utilizados.....	16

3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Localização do experimento	18
3.2. Hospedeiros	19
3.3. Carrapato <i>Amblyomma cajennense</i>	19
3.3.1. Obtenção dos ovos	19
3.3.2. Obtenção de larvas não alimentadas.....	20
3.3.3. Obtenção de larvas alimentadas.....	20
3.4. Obtenção e utilização das amostras de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	21
3.4.1. Elaboração das suspensões	24
3.4.2. Quantificação do inóculo	24
3.5. Bioensaios	26
3.5.1. Infecção dos ovos de <i>Amblyomma cajennense</i>	26
3.5.2. Infecção de larvas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i>	27
3.5.3. Infecção de larvas alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i>	28
3.6. Isolamento dos fungos	30
3.7. Análise estatística e próbites	31

Págs.

4. RESULTADOS	32
4.1. Bioensaios	32
4.1.1. Infecção de ovos de <i>Amblyomma cajennense</i>	32
4.1.2. Infecção de larvas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i>	39
4.1.3. Infecção de larvas alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i>	49
5. DISCUSSÃO	53
5.1. Período de incubação e eclosão	53
5.2. Percentual de eclosão	54
5.3. Percentual de mortalidade de larvas não alimentadas	56
5.4. Percentual de ecdise ninfal de larvas alimentadas tratadas	58
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DAS TABELAS

Págs.

TABELA 1. Período médio de incubação de larvas, observados nos ovos de <i>Amblyomma cajennense</i> tratados com diferentes concentrações dos diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas)	33
TABELA 2. Período médio de eclosão de larvas, provenientes de ovos de <i>Amblyomma cajennense</i> tratados com diferentes concentrações dos diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas)	34

TABELA 3. Percentual de eclosão de larvas de <i>Amblyomma cajennense</i> , oriundas de ovos infectados com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb); (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas).....	36
TABELA 4. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas em ovos de <i>Amblyomma cajennense</i> tratados com os diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma), (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas).....	39
TABELA 5. Percentual de sobrevivência de larvas não alimentadas de <i>Amblyomma cajennense</i> infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) e <i>Beauveria bassiana</i> (Bb), (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas).....	42

Págs.

TABELA 6. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas em larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com os diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma), (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10horas) 43

TABELA 7. Percentual de ecdise ninfal de larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb), (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas)..... 51

TABELA 8. Concentrações letais (CL 50 e CL 90) visando a inibição da ecdise ninfal, observadas em larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com os diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) em condições controladas (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas).... 52

ÍNDICE DAS FIGURAS

Págs.

- FIGURA 1.** Isolados de *Metarhizium anisopliae* (959, 319 e E9) utilizados nos bioensaios com ovos, larvas não alimentadas e alimentadas de *Amblyomma cajennense*, desenvolvidos em placa de Petri com meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA). 22
- FIGURA 2.** Isolados de *Beauveria bassiana* (986 e 747) utilizados nos bioensaios com ovos, larvas não alimentadas e alimentadas de *Amblyomma cajennense*, desenvolvidos em placa de Petri com meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA). 23

- FIGURA 3.** Percentual de eclosão de larvas de *Amblyomma cajennense*, oriundas de ovos infectados com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb); (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas)... 35
- FIGURA 4.** Percentual de sobrevivência de larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb), (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas)..... 41
- FIGURA 5.** Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado 959 sobre a cutícula (150X)..... 44
- FIGURA 6.** Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado 319 sobre a cutícula (150X) 45

- FIGURA 7.** Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado E9 sobre a cutícula (150X)..... 46
- FIGURA 8.** Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Beauveria bassiana* isolado 986 sobre a cutícula (150X)..... 47
- FIGURA 9.** Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Beauveria bassiana* isolado 747 sobre a cutícula (150X) 48
- FIGURA 10.** Percentual de ecdise ninfal de larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb), (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas)..... 50

RESUMO

O presente experimento foi realizado com o objetivo de se estudar os efeitos causados em ovos e larvas de *Amblyomma cajennense* imersos em suspensões com diferentes concentrações dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* mantidos em condições de temperatura e umidade constantes ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$ e $\geq 80\%$).

Ovos e larvas não alimentadas e alimentadas de *A. cajennense* foram imersos em quatro concentrações (10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/ml) e um grupo controle para cada um dos três isolados do fungo *M. anisopliae* (Isolados Ma 959, Ma 319 e Ma E9) e dos dois isolados de *B. bassiana* (Isolados Bb 986 e Bb 747), para avaliação dos períodos de incubação e eclosão; percentual de eclosão e mortalidade de larvas.

Para os parâmetros períodos de incubação e eclosão de todos os ovos tratados com as suspensões, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações dos isolados e/ou controles.

A porcentagem de eclosão de larvas oriundas de ovos tratados foi inversamente proporcional a concentração utilizada; ou seja, quanto maior a concentração utilizada, menor o percentual de eclosão, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

O resultado da porcentagem de mortalidade das larvas não alimentadas e alimentadas tratadas com as diferentes suspensões mostrou-se semelhante ao resultado de percentual de eclosão das larvas, ou seja, quanto maior a concentração utilizada, menor o percentual de viabilidade de larvas, também apresentando diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

SUMMARY

The present experiment was realized with the objective to know the effects caused in eggs and larvae of *Amblyomma cajennense* immersed in suspension with different concentrations of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* maintained in constant temperature and humidity conditions ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$ and $\geq 80\%$).

A. cajennense eggs and larvae unfed and fed were immersed in four concentrations of three *M. anisopliae* fungus isolates (isolates Ma 959, Ma 319 and Ma E9) and of two *B. bassiana* isolates (isolates Bb 986 and Bb 747) for incubation and eclosion periods evaluation, eclosion percentage and larvae mortality percentage.

For the parameters incubation and eclosion periods of all eggs treated with the suspensions, didn't demonstrate significant difference between the different concentrations of the isolates and/or controls.

The eclosion percentage of larvae originating from the treated eggs was inversely proportional to the concentration utilized; that is to say, as bigger the used concentration, smaller the eclosion percentage, presenting significant differences between the treatments.

The result of the larvae unfed and fed mortality percentage treated with the different suspensions it was similar to the result of eclosion percentage, as bigger the used concentration, smaller the larvae viability percentage, also presenting significant differences between the treatments.

1. INTRODUÇÃO

Carrapatos são vetores de bactérias, protozoários, rickettsias e vírus para o homem, animais domésticos e silvestres em quase todo o mundo. Doenças como as de Lyme em humanos e as babesioses em animais domésticos são exclusivamente transmitidas por carrapatos (KALSBEEK *et al.*, 1995).

Especificamente, *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), conhecido como carrapato estrela, é considerado como vetor de importantes agentes infecciosos, como os causadores da Ehrlichiose Bovina (MASSARD, 1984) e do Tifo Exantemático (MONTEIRO *et al.*, 1931), afora os danos diretos causados pela espoliação sangüínea e lesões cutâneas.

O Brasil, em decorrência de suas condições 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 apresentam elevada prevalência dos estágios não parasitários de *A. cajennense*, durante todo o ano (SERRA FREIRE, 1982).

Até o presente momento, infestações de carrapatos em animais domésticos são principalmente controladas por acaricidas químicos e quando este controle é realizado de forma indiscriminada pode acarretar sérios problemas no que se refere a poluição do ambiente e ao desenvolvimento de resistência (BITTENCOURT *et al.*, 1997). Portanto, a utilização exclusiva dos carrapaticidas é cada dia menos viável em termos práticos e econômicos, tornando necessária a adição de métodos alternativos a serem empregados em sistemas integrados de controle (BARROS & EVANS, 1989).

Estudos sobre a ocorrência natural de patógenos de carrapatos têm sido realizados visando estabelecer sua importância na regulação natural das populações (MWANGI *et al.*, 1995). O controle microbiano de carrapatos envolve a utilização de vírus, rickettsias, protozoários, bactérias e fungos ou seus metabólitos, tendo como alvo as pestes ou vetores (CALBERG, 1986). Estes organismos causadores de doenças são referidos como patógenos, e seus efeitos sobre pestes e vetores de importância agrícola, médica e veterinária têm sido pesquisados, visando seu emprego como controladores biológicos (MWANGI *et al.*, 1991).

Quanto ao controle microbiano de carrapatos, a espécie alvo mais estudada é o *Boophilus microplus*, onde temos citações de infecções artificiais de ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* pelo fungo *Metarhizium anisopliae*, quando foi observada uma elevada mortalidade, o desenvolvimento deste fungo na hemolinfa do carrapato e alterações nas seguintes etapas da fase não parasitária: período de pré-postura, período de postura, índice de produção de ovos, período de incubação,

período e percentual de eclosão (BITTENCOURT *et al.*, 1994 a).

O fungo *M. anisopliae* testado experimentalmente apresentou sucesso no controle de outras espécies de carrapato como: *Rhipicephalus appendiculatus* (MWANGI *et al.*, 1995 e KAAYA *et al.*, 1996), *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997) e *A. variegatum* (KAAYA *et al.*, 1996)

O fungo *Beauveria bassiana* já foi encontrado provocando infecções naturais em carrapatos das espécies *Hyalomma anatolicum* e *Ixodes ricinus*, segundo (SAMSINAKOVA, 1957); também foi utilizado em infecções artificiais nesta última espécie (BOYCEV & RIZVANOV, 1960), em *R. appendiculatus* (MWANGI *et al.*, 1995 e KAAYA *et al.*, 1996), em *A. variegatum* (KAAYA *et al.*, 1996), em *B. microplus* (BITTENCOURT *et al.*, 1996 e BITTENCOURT *et al.*, 1997) e em *R. sanguineus* (MONTEIRO, 1997 ; BARBOSA *et al.*, 1997), o que demonstra seu potencial patogênico para carrapatos.

A proposição da utilização do controle microbiano, visa integrar um conjunto de medidas que, quando aplicadas, resultem na manutenção da população do artrópode em níveis que não causem danos econômicos (BITTENCOURT *et al.*, 1997).

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos causados nas fases de ovos e larvas de *Amblyomma cajennense* imersos em suspensões com diferentes

concentrações dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* mantidos em condições de temperatura e umidade constantes ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$ e $\geq 80\%$).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Controle Microbiano de carrapatos

2.1.1. Microrganismos utilizados

a. Riquetsias

BURGDORFER *et al.* (1973) isolaram e caracterizaram simbioses de *Dermacentor andersoni*; os simbioses supra citados foram identificados como uma nova espécie, pertencente à tribo Wolbachiae da família Rickettsiaceae. Os tecidos ovarianos deste carrapato foram injetados em ovos embrionados e uma suspensão destes ovos foi inoculada em carrapatos saudáveis a fim de observar o mecanismo de ação deste microrganismo. Foi observado o desenvolvimento rápido e a produção massiva deste microrganismo em hemócitos, tecido hipodérmico, glândulas

salivares, tecidos conectivos do epitélio intestinal, tubos de Malpighi e ovário; por conseguinte, a invasão massiva do simbiote provocou a morte dos carrapatos.

Wolbachia persicus, foi encontrada no interior do trato intestinal de *Ornithodoros moubata*; os carrapatos morreram após algumas semanas com a multiplicação da riquetsia na hemolinfa. Estes microorganismos foram excretados com o líquido coxal e também encontrados em ovos destes carrapatos (WEYER, 1973).

b. Vírus

MEGAW (1978), estudando a estrutura das glândulas salivares de carrapatos, constatou que partículas virais produziam danos no citoplasma de células infectadas e em casos extremos afetavam a competência das glândulas salivares do carrapato *Boophilus microplus*, chegando até a obstrução do canal excretor desta glândula. Os estudos foram iniciados com base no conhecimento de que doenças virais podiam ser transmitidas por carrapatos através de sua secreção salivar.

c. Nematóides

SAMISH & GLAZER (1991) realizaram uma infestação de 1000 nematóides pertencentes à espécie *Steinernema carpocapsae* em teleóginas de *B. annulatus* observando uma mortalidade de 100% após três dias do início do tratamento. Eles sugeriram que nematóides possam ser úteis no controle de carrapatos pois o estágio infectante é móvel, possui capacidade de sobrevivência por longos períodos na natureza na ausência de hospedeiro e facilidade de disseminação em locais com umidade constante; entretanto, não sobrevivem por longos períodos em climas tropicais.

GLAZER & SAMISH (1993) infectaram fêmeas de *B. annulatus* com 2500 formas infectantes juvenis de *Steinernema carpocapsae* e revelaram que quanto maior o tempo de exposição ao nematóide, maior era a mortalidade dos carrapatos; entretanto a quantidade de nematóides encontrada nos carrapatos mortos não foi proporcional ao tempo decorrido entre a morte e o dia da dissecação, e também não havia relação entre a taxa de mortalidade e o número de nematóides por cadáver, o que correlaciona o potencial de controle não somente ao processo de penetração e presença dos nematóides no interior do carrapato, mas principalmente à ação da bactéria simbiótica pertencente ao gênero *Xenorhabdus*. A alta susceptibilidade de fêmeas de *B. annulatus* à infecções por *S. carpocapsae* e a avaliação da presença da

bactéria simbiótica *Xenorhabdus sp* nos cadáveres dos carrapatos, foram bases de estudo para estes pesquisadores.

MAULEON *et al.* (1993) utilizando 17 espécies de nematóides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* em infecção experimental em *B. annulatus*, *B. microplus* e *A. variegatum*, observaram resistência das duas últimas espécies de carrapatos à todas as cepas de nematóides testadas, o que demonstra a resistência de determinadas espécies de carrapatos ao parasitismo por nematódeos.

Os nematóides *S. carpocapsae* e *S. glaseri* são patogênicos para fêmeas ingurgitadas de *Ixodes scapularis* e mostraram potencial bioinseticida, mas somente em condições ideais de ambiente. A mortalidade de fêmeas ingurgitadas infectadas é maior entre 20°C e 30°C, e esta mortalidade se reduz abaixo de 15°C; seu potencial se limita ao estágio de desenvolvimento anteriormente citado, já que estes nematóides aparentemente penetram no interior do carrapato via abertura genital, e quando as fêmeas caem ao solo para realizarem a postura esta abertura está mais evidenciada, tornando o carrapato mais exposto à ação dos nematódeos (ZHIOUA *et al.*, 1995).

d. Bactérias

BROWN *et al.* (1970) observaram mortalidade elevada em todos os estágios de *Dermacentor andersoni* em colônias de laboratório. Testes específicos foram realizados com estes carrapatos revelando que se tratava da bactéria *Proteus mirabilis*. Em ensaio laboratorial através da inoculação de um mililitro de suspensão em ninfas (150 bactérias/ninfa) observou-se mortalidade de 100% das ninfas tratadas.

Em trabalho experimental, HENDRY & REHAV (1981), injetaram cinco mililitros de suspensão, obtidas de exemplares que apresentavam quadro de doença bacteriana, em fêmeas de *Boophilus microplus*, *Amblyomma hebraeum*, *Hyalomma marginatum rufipes* e *Rhipicephalus evertsi evertsi*, e verificaram que cerca de 90% dos carrapatos reproduziram a doença. As bactérias isoladas foram *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas sp.* (gram negativos) e *Staphilococcus sp.* (gram positivos).

Testes específicos foram realizados por BRUM (1989), utilizando a bactéria *Cedecea lapagei* (Enterobacteriaceae) presente em secreção vaginal de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. Estas foram imersas em solução contendo aproximadamente 20×10^8 bactérias/ml, e outro grupo foi inoculado com um microlitro da mesma suspensão. O autor observou infecção e/ou mortalidade das fêmeas e os ovos de fêmeas ingurgitadas que conseguiram realizar a postura apresentaram eclosão de 60 a 70% contra 90 a 100% do grupo controle. Fêmeas

ingurgitadas inoculadas apresentaram 100% de mortalidade 48 horas após a inoculação.

BRUM *et al.* (1991) revelaram através da dissecação e cortes histológicos da porção final do aparelho genital de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* que o epitélio vaginal das mesmas estava destruído e que ocorreu uma redução de 47,4% na postura, quando estas foram imersas em uma suspensão de *C. lapagei*. O mesmo autor testou a eficácia de *C. lapagei* no controle biológico de *B. microplus* em laboratório, e obteve mortalidade de 98,1%.

MWANGI *et al.* (1995) revelaram a presença de *Serratia marcescens*, *P. mirabilis* e *Escherichia coli* em fêmeas ingurgitadas de *R. appendiculattus* mantidas à campo durante oito dias e que morreram mais tarde no laboratório. As infecções bacterianas foram as responsáveis pela mortalidade de 10,1% de 423 fêmeas ingurgitadas de *R. appendiculattus* mantidas a campo e depois trazidas para o laboratório; estas infecções foram seis vezes mais abundante que infecções por fungos.

e. Fungos

ESTRADA-PENÃ *et al.* (1990) encontraram em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* infecção natural com o fungo *Aspergillus ochraceus*, que impediu a ovoposição, levando este carrapato a mumificação e morte. O autor deduziu que *A. ochraceus* colonizou o carrapato via ânus e posteriormente intestino e tubos de Malpighi.

BITTENCOURT (1992), verificou a patogenicidade de dois isolados do fungo *M. anisopliae* em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, sendo observado o mecanismo de infecção do fungo em algumas etapas da fase não parasitária, através do exame de hemolinfa, quando foram detectadas hifas a partir do segundo dia de infecção.

BITTENCOURT *et al.* (1994a, 1994b, 1996) testaram a eficácia do fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana* em ovos e larvas de *B. microplus* e observaram que estes patógenos reduzem o percentual de eclosão e aumentam o percentual de mortalidade desse carrapato se comparados ao grupo controle, assim como ocorreu um incremento na duração dos períodos de pré-postura, postura, incubação e eclosão a medida que se aumenta a concentração das suspensões. Os autores também observaram redução nos percentuais de eclosão larval em todos os grupos de ovos tratados com os diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando comparados aos grupos controle, observando ainda um percentual de mortalidade de

larvas de *B. microplus* variando entre 29,3% a 97,3% quando tratadas com *M. anisopliae* e variando entre 17% a 78% quando tratadas com *B. bassiana* dependendo da concentração utilizada, enquanto no grupo controle este índice ficou em torno de 6,7% a 7,3%.

CAMACHO & MARTINEZ (1995) avaliaram o uso de suspensões de conídios de *Verticillium lecanii*, *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre os estágios parasitários de *B. microplus*. Os fungos mencionados foram aplicados sozinhos ou com uma mistura de melado sobre o corpo de bovinos por meio de aspersão uma vez por semana durante dois meses. Os melhores resultados foram obtidos com o uso somente do fungo *V. lecanii*.

KALSBECK *et al.* (1995), avaliando a presença de fungos entomopatogênicos em *I. ricinus* coletados na vegetação, em pequenos roedores e cervídeos, concluíram que uma alta proporção de carrapatos coletados no outono estavam infectados e que os fungos entomopatogênicos isolados teriam um impacto significativo no controle da população de *I. ricinus*, já que o estágio de fêmea ingurgitada era o mais frequentemente afetado. *Paecilomyces farinosus* e *V. lecanii* foram as espécies mais predominantes entre os fungos isolados e presentes em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato. Outras espécies de fungos foram encontradas somente em fêmeas ingurgitadas, como é o caso de *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus* e *V. araneorum*.

MWANGI *et al.* (1995) trabalharam com esporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato *R. appendiculatus* em condições laboratoriais, através da imersão em uma suspensão de 10^6 conídios /ml do patógeno por três segundos. Os resultados obtidos demonstraram que os isolados de *B. bassiana* foram mais patogênicos para os estágios não alimentados que os de *M. anisopliae*; especificamente para larvas não alimentadas encontraram percentuais de mortalidade variando entre 39,9% a 81,1% para *B. bassiana* e 4,2% a 26,9% para *M. anisopliae*; já para larvas alimentadas os valores são de 2,7% a 5,1% para *B. bassiana* e entre 3,1% a 8,2% para *M. anisopliae*.

KAAYA *et al.* (1996) observaram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* induziram mortalidade de 30% em adultos de *R. appendiculatus* que alimentavam-se em coelhos. Os autores colocaram sacos fixados na base da orelha dos coelhos e introduziram no seu interior 50 carrapatos adultos; dois dias após a infestação, quando os carrapatos já estavam fixados e alimentando-se, foi borrifada cinco ml de uma suspensão contendo 10^8 conídios/ml; os carrapatos que se desprendiam foram coletados e levados ao laboratório para observação da mortalidade, peso e viabilidade da massa de ovos; esses índices, no entanto, não apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo controle. Os autores ainda testaram esses fungos em bovinos infestados com *R. appendiculatus* seguindo a mesma metodologia descrita acima, porém na concentração de 10^9 conídios/ml, o que ocasionou 77 a 83% de mortalidade das fêmeas e redução na produção e viabilidade dos ovos. Ambos os

fungos reduziram o ingurgitamento, a fecundidade e a postura em *Amblyomma variegatum* alimentados em coelhos. Os mesmos autores também incubaram os fungos citados com acaricida organofosforado por até 120 horas e constataram que tanto *B. bassiana* quanto *M. anisopliae* mantiveram seu crescimento e características morfológicas normais.

BARBOSA *et al.* (1997) utilizando larvas alimentadas de *R. sanguineus*, tratadas com suspensões de dois isolados do fungo entomopatogênico *B. bassiana*, observaram que o tratamento diminuía o percentual de ecdise conforme aumentava-se a concentração da suspensão, chegando a percentuais de 100% de mortalidade de larvas alimentadas, nas concentrações mais elevadas. Em relação às ninfas oriundas da ecdise ninfal dos grupos testados, o percentual de sobrevivência variou entre 93% a 11% nas concentrações 10^4 e 10^6 , porém para a concentração mais elevada (10^8) não houve a presença de ninfas.

MONTEIRO (1997) avaliou a eficácia dos fungos *B. bassiana* (isolados 747 e 986) e *M. anisopliae* (isolados 959, E9 e 319) sobre ovos do carrapato *R. sanguineus* e observou que os períodos de incubação e eclosão não apresentavam diferença significativa entre os tratamentos e/ou quando comparados ao grupo controle. Porém, após 20 dias da infecção, constatou que 95% das larvas não eclodiram quando a concentração utilizada foi de 10^8 conídios/ml. Testando a ação dos entomopatógenos sobre larvas de *R. sanguineus*, a autora observou que todos os grupos tratados apresentavam percentual de mortalidade significativamente maior, que

aquele encontrado no grupo controle, observando ainda que algumas horas após a imersão no fungo as larvas apresentavam-se lentas e desequilibradas. Muitas larvas morreram após 10 dias da imersão nas diferentes suspensões dos isolados e em torno dos seus idiossomas e gnatossomas evidenciou-se formações hifais.

ZHIOUA *et al.* (1997) avaliaram a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* para *Ixodes scapularis*; os autores utilizaram concentrações de conídios de 10^8 / ml para larvas ingurgitadas e 10^7 / ml para fêmeas ingurgitadas, gerando 100% de mortalidade duas semanas após a exposição, sendo observado que todas as larvas e fêmeas se encontravam recobertas por micélios e conídios. O valor da CL 50 calculado para larvas ingurgitadas foi de 10^7 conídios / ml.

CASTRO (1997) e CORREIA *et al.* (1998) avaliaram a patogenicidade de diferentes isolados do fungo *M. anisopliae*, (isolado E9 e isolado 959, respectivamente) para o carrapato *B. microplus* em testes de estábulo. CASTRO (1997) constatou a redução de 64,8% dos carrapatos após sete dias do tratamento quando a concentração utilizada foi de 10^8 conídios/ml; já CORREIA *et al.* (1998) observaram redução da capacidade de ovipostura, aumento do período de pré-postura e 91,1% de mortalidade das fêmeas ingurgitadas levadas ao laboratório.

2.1.2. Metabólitos produzidos por microrganismos utilizados

KRYLOVA (1977) usou toxinas produzidas por *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus*, sobre o carrapato *Argas persicus*, que foram imersos por 15 segundos em toxinas de extratos fúngicos; constatou-se apenas 10% de mortalidade após 96 horas do tratamento.

Segundo MWANGI *et al.* (1991) a exotoxina do *Bacillus thuringiensis* apresenta segurança para o homem e atualmente já são utilizadas no controle de Hymenoptera, Coleoptera e Orthoptera, sendo também testadas em Acarina, no ácaro *Dermanisus gallinae*, outros pesquisadores buscaram a potencialização de seu implemento dentro de um conjunto de medidas de controle.

Os fungos agem penetrando através da cutícula de seu hospedeiro, invadem rapidamente os órgãos internos, e por fim, causam a morte do hospedeiro (KAAYA *et al.*, 1991). Estes fungos também produzem micotoxinas que muitas vezes contribuem para a mortalidade do hospedeiro, reduções do peso de ingurgitamento, fecundidade e percentual de eclosão dos ovos. A mortalidade de carrapatos parece estar relacionada a concentração de conídios, ou seja, existe uma relação entre mortalidade e o número de conídios que recobre a cutícula (KAAYA *et al.*, 1996).

HASSANAIN *et al.* (1997) testaram a atividade potencial de três variedades de *B. thuringiensis* (*kurstaki*, *israelensis*, e *thuringiensis*) em *Argas persicus* e *Hyalomma dromedarii*, onde os autores utilizaram o processo de pulverização de suspensões de *B. thuringiensis*, com concentrações variando entre 5,000 µg/ml a 0,156 µg/ml. O tempo letal encontrado foi de 36 horas a cinco dias para *A. persicus* e entre 48 horas a dez dias para *H. dromedarii*. *A. persicus* foi mais afetado que *H. dromedarii* pelas variedades de *B. thuringiensis*. Sendo que as variedades que apresentaram concentrações letais mais potentes para se controlar 50% da população de carrapatos (CL50) foram variedade *kurstaki*, *israelensis* e *thuringiensis*, respectivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização do experimento

O experimento foi desenvolvido na Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no período de março a novembro de 1998. O estudo foi realizado sob condições de temperatura e umidade relativa controladas ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$ e $\geq 80\%$) no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, localizado na EPPWON.

3.2. Hospedeiros

Para manutenção da colônia de *Amblyomma cajennense* foram utilizados coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus* (L., 1758), mestiços Califórnia x Nova Zelândia com idade entre 60 e 90 dias, de ambos os sexos, com peso inicial entre 1,5 e 2,1 kg, cedidos pelo Setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, sem utilização de produtos acaricidas e infestações anteriores com carrapatos. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, onde receberam ração comercial¹ para coelhos e água *ad libitum*.

3.3. Carrapato *Amblyomma cajennense*

3.3.1. Obtenção dos ovos

Fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* foram coletadas de equídeos, naturalmente infestados e sem contato recente com carrapaticidas, nas proximidades da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Após a coleta, as fêmeas foram lavadas em água corrente, secas, identificadas segundo ARAGÃO & FONSECA (1961), pesadas e acondicionadas

¹ Cargill®

em placas de Petri por meio de fita adesiva. Foram colocadas em câmara climatizada regulada a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de aproximadamente 80% para realização da postura. Após o término da postura os ovos foram pesados, divididos em alíquotas de 100 mg e colocados em tubos de ensaio devidamente identificados.

Uma porcentagem da postura foi utilizada na formação de colônia para posterior desenvolvimento do estudo com larvas.

3.3.2. Obtenção de larvas não alimentadas

Para obtenção de larvas não alimentadas, após a postura das fêmeas uma parte da massa de ovos foi separada e acondicionada em tubos de ensaio, contendo 25 mg cada, para eclosão das larvas a serem testadas. A massa de ovos contida em cada tubo de ensaio originou em média 390 larvas, após a eclosão (PRATA & DAEMON, 1997).

3.3.3. Obtenção de larvas alimentadas

As larvas alimentadas utilizadas no experimento foram obtidas através de infestações artificiais em coelhos seguindo a técnica de NEITZ *et al.* (1971), que se baseia na colocação de um saco feito de tecido fixado ao redor da base das orelhas dos coelhos, onde foram colocadas as larvas para alimentação. Após três a cinco dias de

ingurgitamento, as larvas naturalmente desprendidas foram retiradas do saco de tecido, levadas ao laboratório, contadas e acondicionadas em tubos de ensaio, em número de 30 larvas alimentadas por tubo.

3.4. Obtenção e utilização das amostras de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Alguns dos isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* utilizados no experimento (Ma 319, Ma E9, Bb 747 e Bb 986) foram cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP). Foram avaliados três isolados de *M. anisopliae*, denominados Ma 959 (isolado de carrapato no Rio de Janeiro), Ma 319 (isolado de formiga), e Ma E9 (isolado padrão), apresentados na Figura 1, e dois isolados de *B. bassiana*, denominados Bb 986 (isolado de carrapato) e Bb 747 (isolado de formiga), apresentados na Figura 2.

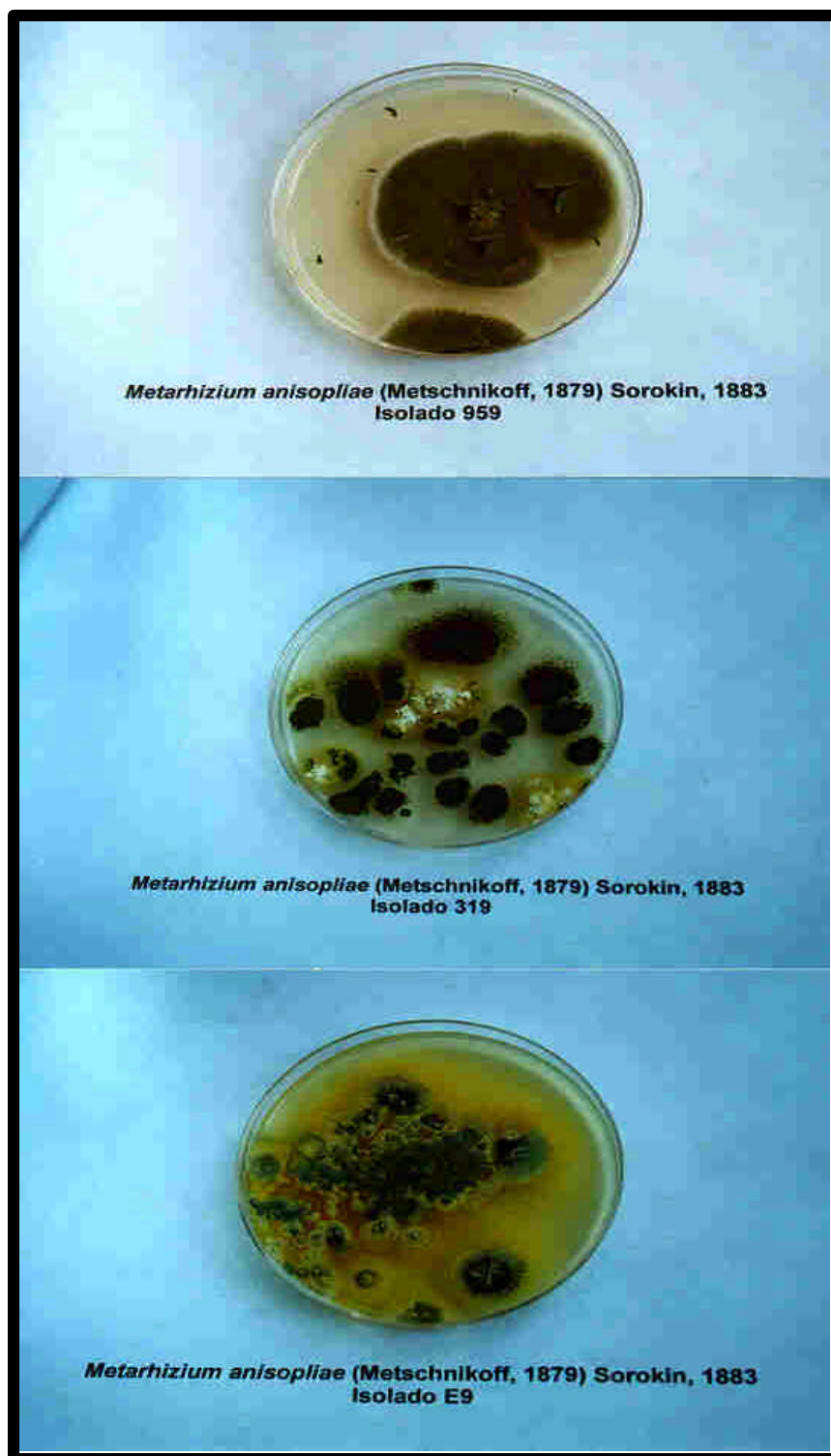


FIGURA 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae* (959, 319 e E9) utilizados nos bioensaios com ovos, larvas não alimentadas e alimentadas de *Amblyomma cajennense*, desenvolvidos em placa de Petri com meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA com agar a 2%).

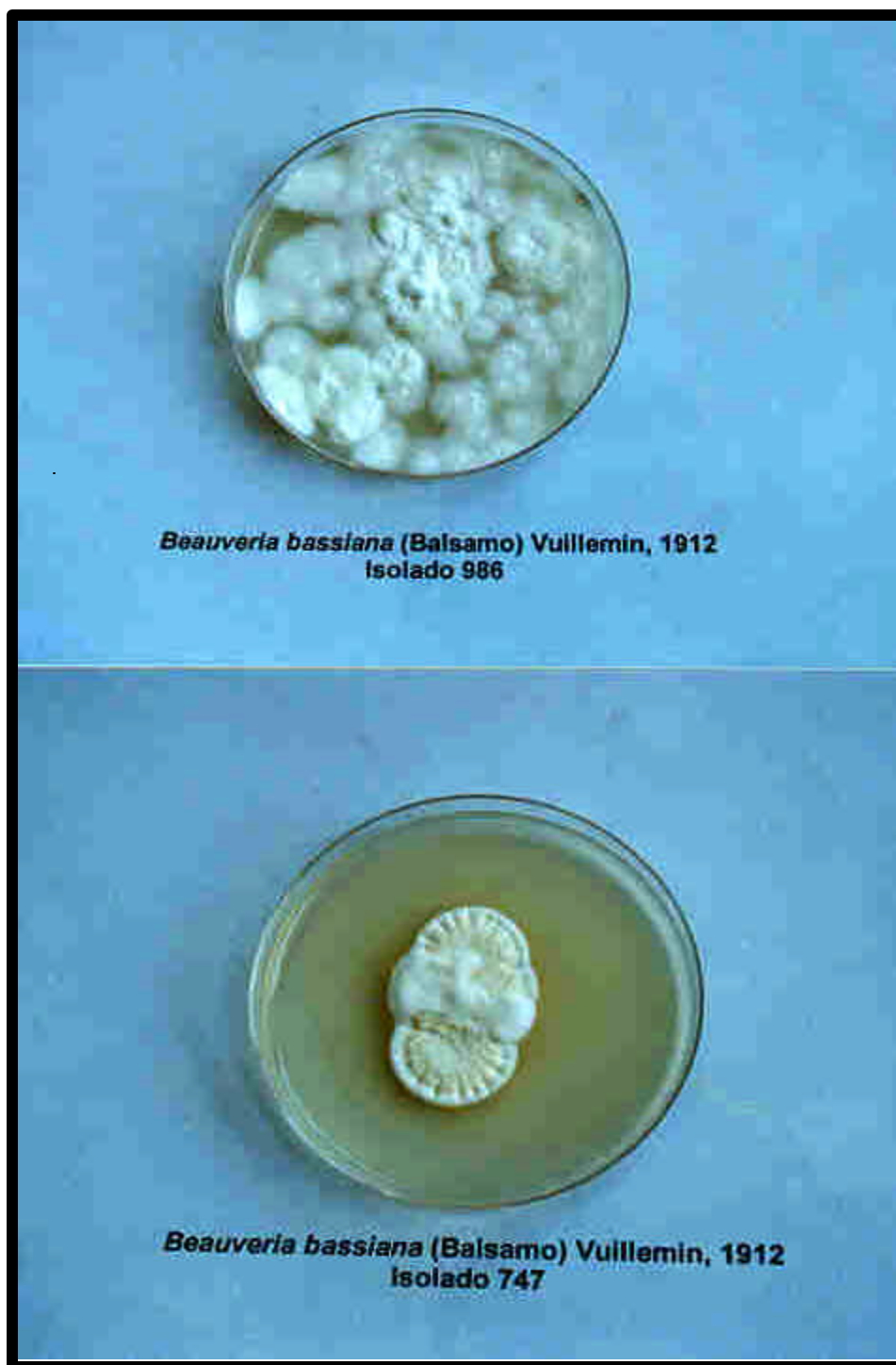


FIGURA 2. Isolados de *Beauveria bassiana* (986 e 747) utilizados nos bioensaios com ovos, larvas não alimentadas e alimentadas de *Amblyomma cajennense*, desenvolvidos em placa de Petri com meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA com agar a 2%).

3.4.1. Elaboração das suspensões

As suspensões de conídios de cada isolado foram preparadas a partir de fungos produzidos em meio de arroz em sacos de polipropileno.

Placas de Petri contendo o isolado puro em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar a 2%) foram utilizadas para preparação de uma suspensão contendo 3×10^8 conídios/ml para logo em seguida promover a inoculação de 10 ml da suspensão no saco contendo arroz (60 gramas) e água destilada (30 ml), previamente autoclavado durante 20 minutos a 120°C e já resfriado.

Depois da inoculação do fungo, foi realizada a homogeneização do arroz contido nos sacos, e estes foram levados à câmara climatizada regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 16 horas.

Quinze dias após a inoculação, os sacos contendo arroz foram examinados e os contaminados foram eliminados. Os selecionados foram utilizados para elaboração das diferentes suspensões utilizadas.

3.4.2. Quantificação do inóculo

As contagens de conídios foram feitas através de contagem direta ao microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer (ALVES, 1986).

Uma porção de arroz contendo o fungo foi homogeneizada em Becker graduado de 100 ml contendo água deionizada e três gotas de espalhante adesivo Tween 80[®]. Após agitação, uma amostra da suspensão foi colocada na câmara de Neubauer e levada ao microscópio para avaliação do número de conídios encontrados.

O campo da câmara utilizado com área de 0,0025 mm² proporcionou o volume de $2,5 \times 10^{-7}$ ml. 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, 1986). Utilizando esta metodologia, preparou-se uma suspensão na concentração de aproximadamente $2,18 \times 10^8$ conídios/ml, para cada isolado. No momento do preparo das suspensões e quantificação do inóculo procurou-se trabalhar com valores aproximados de $2,18 \times 10^8$ conídios/ml, para tal, concentrava-se ou diluía-se as suspensões, de forma a chegar em valores aproximados da concentração de conídios/ml desejada, o que gerou homogeneidade entre as concentrações dos diferentes isolados.

A suspensão 10^7 de cada isolado, foi preparada a partir da concentração 10^8 , adicionando uma parte da suspensão (10 ml) em 90 ml de água deionizada; a 10^6 foi elaborada a partir da 10^7 , e a 10^5 a partir da 10^6 seguindo o mesmo procedimento descrito acima. No grupo controle foi utilizado apenas 100 ml de água deionizada e três gotas de espalhante adesivo Tween 80[®].

3.5. Bioensaios

Os bioensaios foram elaborados para avaliar a potencialidade dos entomopatógenos *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle das fases de desenvolvimento já descritas do carrapato *A. cajennense*, em condições controladas de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($\geq 80\%$).

3.5.1. Infecção de ovos de *Amblyomma cajennense*

Foi realizado um bioensaio com ovos para cada isolado a ser avaliado (Ma 959, Ma 319, Ma E9, Bb 986 e Bb 747) e cada bioensaio foi constituído de quatro diferentes tratamentos com as suspensões de 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/ml e um grupo controle (água + espalhante adesivo), sendo que para cada tratamento foram feitas três repetições e cada repetição foi constituída de 100 mg de ovos por tubo, perfazendo um total de 75 tubos de ensaio, que foram vedados na extremidade com algodão hidrófilo, identificados com a concentração e o isolado do fungo utilizado.

Após agitação da suspensão a ser testada, cada grupo de ovos recebeu um mililitro da suspensão, sendo mantidos imersos durante cinco minutos. Após esse período, o excesso da suspensão foi eliminado, através da inversão do tubo de ensaio, sendo mantidos nas condições de temperatura e umidade já descritas.

Na avaliação dos efeitos das diferentes amostras dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre os ovos de *A. cajennense* foram observados os seguintes parâmetros: a) período de incubação dos ovos, compreendido entre o primeiro dia de postura e o início de eclosão dos ovos (PEREIRA, 1980); b) período de eclosão, compreendido entre o primeiro e o último dia de eclosão das larvas (BELLATO, 1995); c) percentual de eclosão das larvas, que foi realizado 30 dias após o início da mesma e estimado visualmente através de análise comparativa com percentuais padrões (DAVEY *et al.*, 1984).

Após a avaliação destes parâmetros, o material não eclodido, foi retirado do tubo de ensaio, lavado em hipoclorito de sódio por um minuto, enxaguado em água deionizada, seco em papel filtro e colocado numa câmara úmida em câmara climatizada nas condições já descritas, para posterior isolamento do fungo.

3.5.2. Infecção de larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense*

As larvas para utilização neste experimento foram obtidas dos tubos de ensaio que continham 25 mg de ovos de *A. cajennense*.

A metodologia empregada foi a mesma utilizada para ovos, sendo que neste caso, a avaliação do efeito dos isolados nas larvas foi feita através de observação do índice de mortalidade, dez dias após a infecção dos fungos, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Os tubos de ensaio foram abertos dentro de uma placa

de Petri (100 mm x 20 mm), que foi colocada dentro de outra placa de Petri (150 mm x 20 mm) que continha álcool 70°, a fim de evitar que larvas vivas saíssem das placas.

Um foco de luz emitia calor na placa pequena, e as larvas sobreviventes tentaram sair da placa menor, caindo no álcool. Após algum tempo, as larvas foram contadas e calculou-se a porcentagem de mortalidade.

Uma parcela das larvas mortas foi lavada em solução de hipoclorito de sódio durante um minuto, enxaguada em água deionizada, seca em papel filtro e colocada em câmara úmida numa câmara climatizada para evidenciar ou não a conidiogênese do fungo.

3.5.3. Infecção de larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense*

As larvas alimentadas utilizadas neste experimento foram obtidas através de infestações artificiais em coelhos, seguindo a técnica de NEITZ *et al.* (1971). Estas foram levadas ao laboratório, contadas e acondicionadas em tubos de ensaio, em número de 30 larvas alimentadas por tubo.

A metodologia empregada foi a mesma utilizada para larvas não alimentadas, sendo que neste caso a avaliação do efeito dos isolados foi realizada através de observação do índice de percentual de ecdise ninfal, que foi avaliado vinte dias após a infecção dos fungos com o auxílio de microscópio estereoscópico. No

decorrer desse período foram realizadas observações diárias, visando verificar a ocorrência de mortalidade das larvas.

Os tubos de ensaio foram abertos dentro de uma placa de Petri (100 mm x 20 mm), que foi colocado dentro de outra placa de Petri (150 mm x 20 mm) que continha álcool 70°, a fim de evitar que ninfas recém emergidas saíssem das placas. Um foco de luz emitiu calor na placa pequena, e as ninfas vivas tentaram sair da placa menor, caindo no álcool. Após algum tempo, contou-se as ninfas e calculou-se a porcentagem de ecdise.

Uma parcela de larvas alimentadas mortas foi lavada em solução de hipoclorito de sódio durante um minuto, enxaguada em água deionizada, seca em papel filtro e colocada em câmara úmida numa câmara climatizada para evidenciar ou não a conidiogênese do fungo.

3.6. Isolamento dos fungos

Após a observação da conidiogênese, os fungos foram isolados em meio de cultura (BDA) para crescimento do micélio. Tubos de ensaio contendo cinco ml do meio de cultura utilizado, tamponado com mecha de algodão foram autoclavados e o pH do meio previamente corrigido para 7 pela adição de NaOH a 1N. Após esse procedimento os tubos foram resfriados com uma inclinação de 30° (ALVES, 1986). O material suspeito foi introduzido nos tubos por meio de uma alça de platina esterilizada por calor seco, sendo que esse processo foi feito no interior de um fluxo laminar.

Após o eventual isolamento, os tubos foram tampados e levados à câmara climatizada nas condições já descritas para observação diária do desenvolvimento do micélio dos fungos estudados. Os tubos porventura contaminados por outros microorganismos foram descartados.

3.7. Análise estatística e próbites

Foram feitas análises de variância (ANOVA), para saber se houve variações dentro de um mesmo tratamento e entre os outros tratamentos, em um nível de significância ($p < 0,05$), com os diferentes isolados e concentrações.

A análise de variância (ANOVA) foi seguida por aplicação do teste de TUKEY, para comparação entre as médias calculando-se o coeficiente de variação, para verificar a precisão dos dados.

Para calcular a dose letal, CL 50 e CL 90 foi usada a análise de próbites, segundo LITCHFIELD & WILCOXON (1949).

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaios

4.1.1. Infecção de ovos de *Amblyomma cajennense*.

A média de dias observada no período de incubação dos ovos tratados com os diferentes isolados variou entre 30,33 e 34,33 dias. Para o grupo controle essa variação de médias ficou entre 30 e 33 dias (Tabela 1). No parâmetro período de eclosão, constatou-se que a média de dias entre os tratamentos com os diferentes isolados variou entre 2 a 8,66 dias, sendo que o grupo controle apresentou uma variação entre 4,33 a 6,66 dias (Tabela 2).

Através da Análise de Variância e Teste de Tukey ($p < 0,05$), observou-se que os períodos de incubação e eclosão não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e/ou quando comparados ao grupo controle dentro das condições de temperatura e umidade já descritas anteriormente.

Tabela 1 . Período médio de incubação de larvas, observados nos ovos de *Amblyomma cajennense* tratados com diferentes concentrações dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas).

Concentrações (conídios/ml)	Período de Incubação (dias)				
	Ma 959 ¹	Ma 319 ¹	Ma E9 ¹	Bb 986 ¹	Bb 747 ¹
Controle	30,00 a	33,00 a	32,33 a	30,33 a	30,67 a
10 ⁵	31,33 a	33,00 a	31,00 a	31,00 a	31,33 a
10 ⁶	31,00 a	34,33 a	32,50 a	33,66 a	30,33 a
10 ⁷	30,50 a	34,00 a	32,66 a	31,00 a	30,67 a
10 ⁸	-----	34,00 a	33,50 a	-----	31,00 a

¹ Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem entre si, (5% de probabilidade)

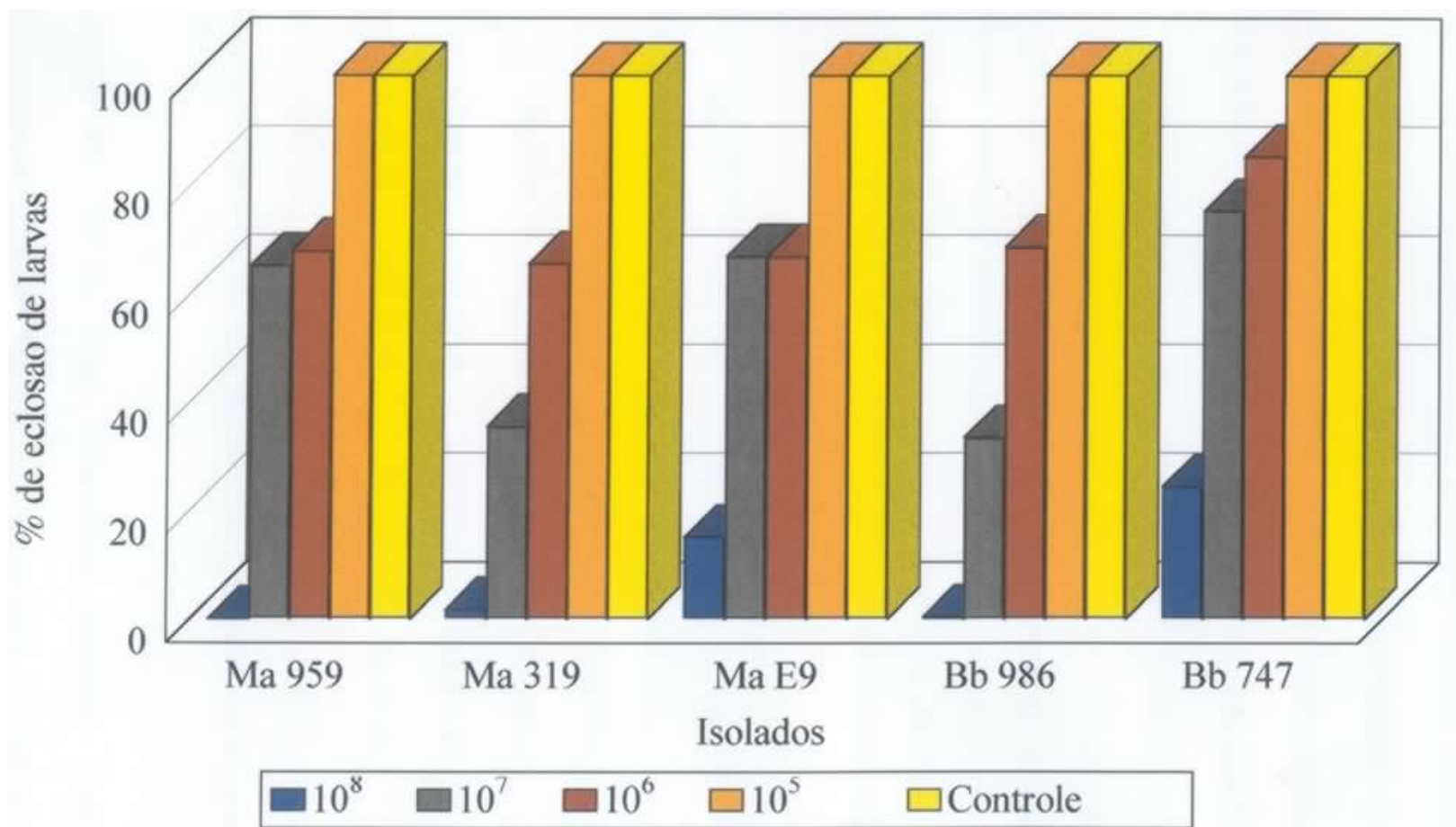
Tabela 2 . Período médio de eclosão de larvas, provenientes de ovos de *Amblyomma cajennense* tratados com diferentes concentrações dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) (Temperatura 27°C $\pm$ 1, Umidade relativa $\geq$ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas).

Concentrações (conídios/ml)	Período de Eclosão (dias)				
	Ma 959 ¹	Ma 319 ¹	Ma E9 ¹	Bb 986 ¹	Bb 747 ¹
Controle	6,66 a	4,33 a	4,66 a	5,66 a	6,00 a
10 ⁵	5,66 a	3,66 a	6,00 a	5,33 a	5,66 a
10 ⁶	5,33 a	3,00 a	8,00 a	3,66 a	6,33 a
10 ⁷	7,00 a	2,33 a	8,66 a	6,00 a	6,67 a
10 ⁸	-----	2,00 a	8,50 a	-----	3,50 a

¹ Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem entre si (5% de probabilidade).

A porcentagem de eclosão de larvas oriundas dos ovos tratados com as suspensões foi inversamente proporcional a concentração de conídios utilizada na suspensão. Quanto maior a concentração de conídios na suspensão, menor foi a porcentagem de eclosão; exceções feitas a concentração 10⁵ conídios/ml em relação aos grupos controle de todos os isolados testados, e entre a concentração 10⁶ e x 10⁷ do isolado M.a E9, onde os percentuais obtidos foram idênticos, apresentando o valor de 66,67% (Figura 3, Tabela 3).

Figura 3. Percentual de eclosão de larvas de *Amblyomma cajennense*, oriundas de ovos infectados com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).



Os resultados obtidos para o percentual de eclosão de larvas oriundas dos ovos tratados com as suspensões apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e/ou controle para alguns dos isolados testados, porém entre os cinco isolados testados, dois entre eles não apresentaram diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de eclosão de larvas de *Amblyomma cajennense*, oriundas de ovos infectados com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb); (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas).

Concentrações (conídios/ml)	Percentual de Eclosão (%)				
	Ma 959 ¹	Ma 319 ¹	Ma E9 ¹	Bb 986 ¹	Bb 747 ¹
Controle	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
10^5	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
10^6	67,66 ab	65,33 ab	66,67 a	68,33 ab	85,00 a
10^7	65,00 ab	35,33 ab	66,67 a	33,33 ab	75,00 a
10^8	0,00 b	1,66 b	15,00 a	0,33 b	24,33 a

¹ Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem entre si (5% de probabilidade).

O isolado Ma 959 do fungo *Metarhizium anisopliae* mostrou-se patogênico, pois a porcentagem de eclosão dos ovos variou entre 0 e 100 %, o que

evidenciou marcada diferença significativa entre os tratamentos grupo controle e 10^5 em relação ao tratamento 10^8 conídios/ml. As concentrações 10^6 e 10^7 mostraram valores percentuais intermediários, não diferindo significativamente entre si e nem em relação às outras concentrações.

Com o isolado Ma 319 obteve-se 100% de eclosão no grupo controle e 10^5 , e reduzido valor (1,66%) no grupo tratado com a concentração 10^8 conídios/ml.

O isolado Ma E9 não apresentou diferença no percentual de eclosão entre os tratamentos com as concentrações 10^6 e 10^7 , sendo que o valor percentual encontrado foi igual em ambas concentrações. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e/ou grupo controle para este isolado, embora nos grupos controle e 10^5 tenha sido encontrado 100% de eclosão e na concentração 10^8 o percentual de eclosão tenha sido de apenas 15%.

No experimento com o isolado 986 de *Beauveria bassiana* observou-se um percentual de eclosão de 100% no grupo controle e 10^5 , enquanto houve reduzido percentual de eclosão de larvas (0,33 %) na concentração 10^8 . Os valores decresceram progressivamente a medida que se aumentou a concentração de conídios/ml na suspensão. Na análise estatística foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e 10^5 em relação ao tratamento 10^8 .

O tratamento com *B. bassiana* isolado 747 demonstrou 100% de eclosão no grupo controle e também na concentração 10^5 conídios/ml, porém na concentração 10^8 conídios/ml este isolado demonstrou uma porcentagem de eclosão reduzida, com

valor de 24,33%, apesar dessa redução não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e/ou grupo controle para este isolado.

Na tabela 4, observamos os índices calculados para inibição de 50 e 90% da eclosão de larvas . O fungo *B. bassiana* conseguiu sua melhor atuação ao inibir 50% da população de larvas com o isolado Bb 986 na concentração $3,2 \times 10^7$ conídios/ml e, este mesmo isolado também teve a melhor CL 90 na concentração de $3,2 \times 10^8$ conídios/ml; o isolado de *B. bassiana* Bb 747 apresentou valores de $3,8 \times 10^8$ e $1,5 \times 10^{10}$ para a CL50 e CL90, respectivamente. Já para o fungo *M. anisopliae*, o isolado que demonstrou a melhor CL 50 foi o isolado Ma 319, com a concentração de $3,2 \times 10^7$ conídios/ml, valor este, idêntico ao encontrado na CL 50 para o isolado de *B. bassiana* Bb 986. O isolado Ma 959 apresentou valores de $4,1 \times 10^7$ e $2,7 \times 10^9$ conídios/ml para a CL 50 e CL 90, respectivamente; já o isolado Ma E9 apresentou valores de $1,1 \times 10^8$ e $3,4 \times 10^9$ conídios/ml para a CL50 e CL90 respectivamente.

Tabela 4. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas em ovos de *Amblyomma cajennense* tratados com os diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma), (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas).

Isolados	Eclosão	
	CL 50 ¹	CL 90 ¹
Ma 959	4,1 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁹
Ma 319	3,2 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁸
Ma E9	1,1 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁹
Bb 986	3,2 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁸
Bb 747	3,8 x 10 ⁸	1,5 x 10 ¹⁰

¹ Concentrações em conídios / ml

No isolamento em meio de cultura (BDA) dos ovos que não deram origem a larvas, observou-se crescimento de fungos. As espécies de fungos que cresceram após o isolamento em BDA foram *M. anisopliae* e *B. bassiana*, sendo classificadas e identificadas segundo PETCH (1931) como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

4.1.2. Infecção de larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense*.

Em relação às larvas não alimentadas, observou-se que o seu percentual de mortalidade, quando tratadas com as diferentes concentrações, foi superior em relação às dos grupos controle.

A ação destes entomopatógenos para larvas não alimentadas de *A. cajennense* foi demonstrada através do fato de que os grupos tratados apresentaram

percentuais de viabilidade de larvas inversamente proporcionais à concentração de conídios/ml da suspensão (Figura 4, Tabela 5).

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em todos os isolados testados; sendo que os isolados de *B. bassiana* 986 e 747 não apresentaram diferença significativa entre o grupo controle e a suspensão 10^5 conídios/ml (Tabela 5).

Figura 4. Percentual de sobrevivência de larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

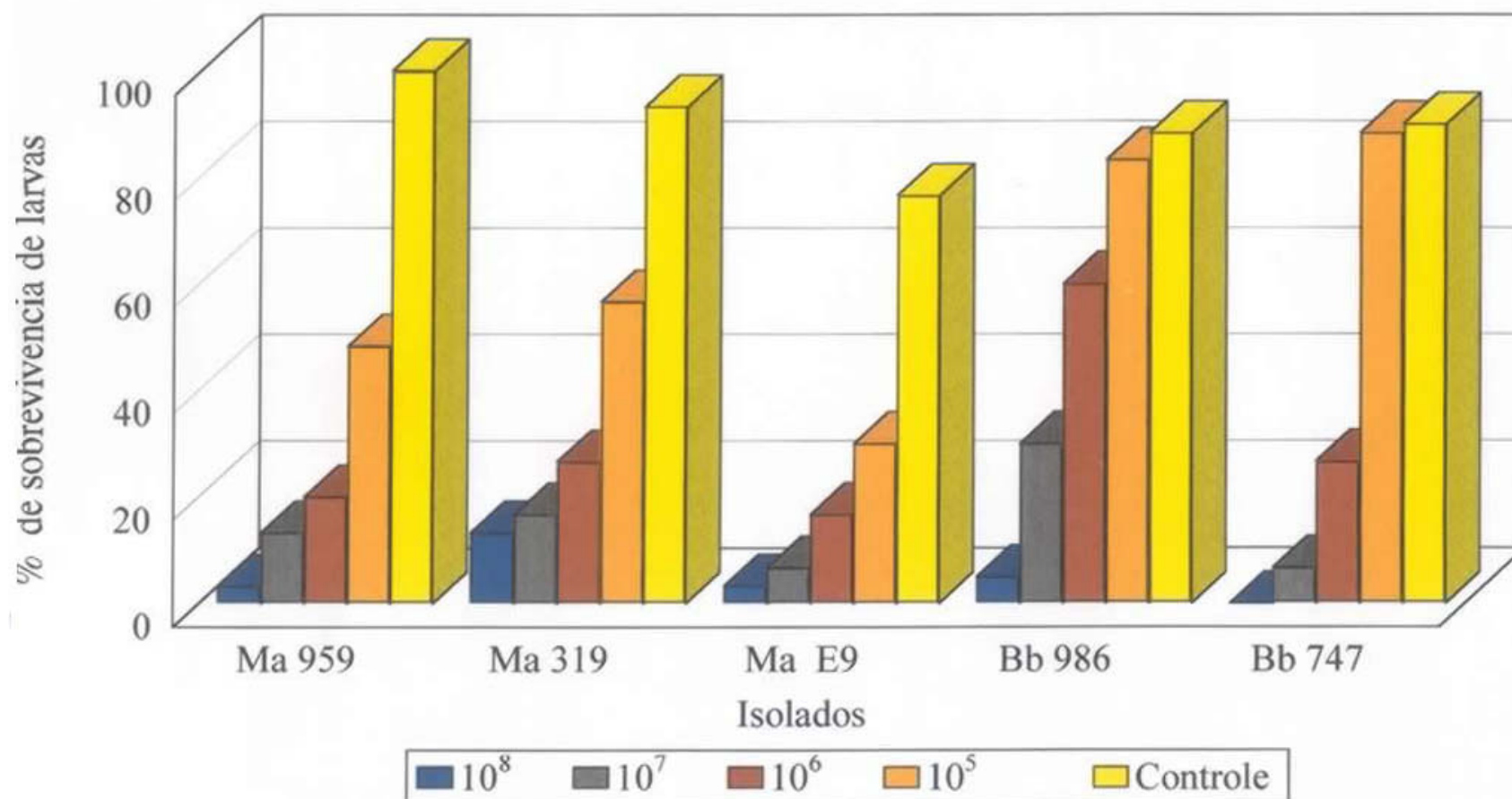


Tabela 5. Percentual de sobrevivência de larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb), (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas).

Concentrações (conídios/ml)	Percentual de Sobrevivência de larvas (%)				
	Ma 959 ¹	Ma 319 ¹	Ma E9 ¹	Bb 986 ¹	Bb 747 ¹
Controle	100,00 a	93,33 a	76,67 a	85,00 a	90,00 a
10^5	48,33 b	56,67 b	30,00 b	83,33 a	88,33 a
10^6	20,00 c	26,67 c	16,67 b	60,00 b	26,67 b
10^7	13,33 c	16,67 c	6,67 bc	30,00 c	6,67 c
10^8	3,33 c	13,33 c	3,33 bc	5,00 d	0,00 c

¹ Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem entre si (5% de probabilidade).

Os valores de CL 50 e CL 90 encontrados para promover a mortalidade de larvas não alimentadas para os diferentes isolados se encontram na Tabela 6, onde podemos observar que os valores obtidos para os isolados de *M. anisopliae* variaram entre $1,8 \times 10^5$ a $6,5 \times 10^5$ conídios/ml para a CL50 e entre $8,6 \times 10^7$ a $1,2 \times 10^9$ conídios/ml para a CL90. Já para os isolados de *B. bassiana* os valores obtidos variaram entre $7,9 \times 10^5$ a $3,9 \times 10^7$ conídios/ml para a CL 50 e entre $5,7 \times 10^7$ a $5,7 \times 10^9$ conídios/ml para a CL 90.

Utilizando as larvas mortas após o tratamento foram feitos isolamentos em meio de cultura e mantidos em câmara climatizada, onde observou-se crescimento de colônias de fungos. As espécies de fungos que cresceram após o isolamento em BDA foram as mesmas encontradas nos isolamentos a partir dos ovos infectados, sendo classificadas e identificadas segundo PETCH (1931), apresentadas nas Figuras 5 a 9.

Tabela 6. Concentrações letais (CL 50 e CL 90), observadas em larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com os diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma), (Temperatura 27°C ± 1, Umidade relativa ≥ 80% e fotoperíodo de 14/10 horas).

Isolados	Mortalidade	
	CL 50 ¹	CL 90 ¹
Ma 959	6,5 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁸
Ma 319	1,8 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁹
Ma E9	2,3 x 10 ⁵	8,6 x 10 ⁷
Bb 986	3,9 x 10 ⁷	5,7 x 10 ⁹
Bb 747	7,9 x 10 ⁵	5,7 x 10 ⁷

¹ Concentrações em conídios / ml



FIGURA 5. Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado 959 sobre a cutícula.



FIGURA 6. Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado 319 sobre a cutícula.



FIGURA 7. Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* isolado E9 sobre a cutícula.

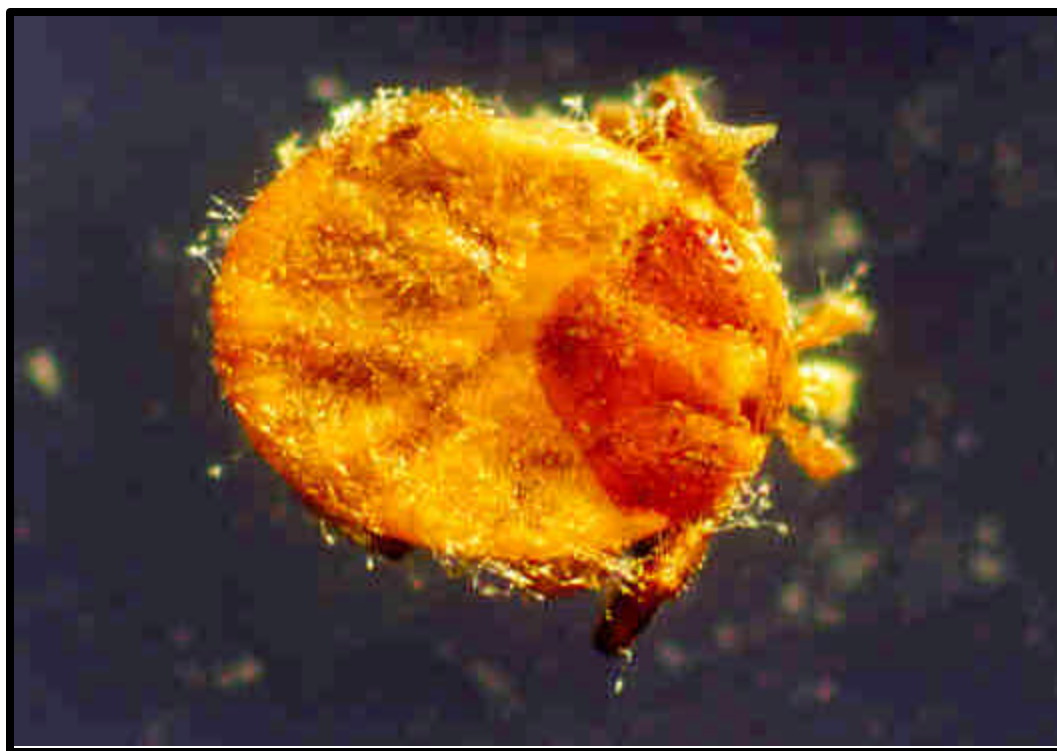


FIGURA 8. Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Beauveria bassiana* isolado 986 sobre a cutícula.



FIGURA 9. Larva não alimentada de *Amblyomma cajennense* após bioensaio, apresentando crescimento do fungo *Beauveria bassiana* isolado 747 sobre a cutícula.

4.1.3. Infecção de larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense*.

Os valores para o percentual de ecdise nos grupos controle variaram de 75% a 83% dentre todos os isolados testados, já para os grupos tratados variaram de 81% a 20 %, conforme as concentrações e os diferentes isolados (Figura 10, Tabela 7).

Em relação ao parâmetro percentual de ecdise ninfal, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 e controle) em todos os isolados testados ($p < 0,05$), reduzindo o percentual de ecdise ninfal a medida que se aumentava a concentração de conídios/ml na suspensão, dados estes, apresentados na Tabela 7.

Os valores de CL 50 e CL 90 encontradas para promover a inibição da ecdise de larvas alimentadas, para os diferentes isolados se encontram na Tabela 8. Onde podemos observar que os valores obtidos para os isolados de *M. anisopliae* variaram entre $5,24 \times 10^7$ a $5,09 \times 10^9$ conídios/ml para a CL50 e entre $2,68 \times 10^{10}$ a $2,26 \times 10^{16}$ conídios/ml para a CL90. Já para os isolados de *B. bassiana* os valores obtidos variaram entre $2,02 \times 10^8$ a $2,94 \times 10^8$ conídios/ml para a CL 50 e entre $6,84 \times 10^{10}$ a $7,64 \times 10^{14}$ conídios/ml para a CL 90.

Figura 10. Percentual de ecdise ninfal de larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb).

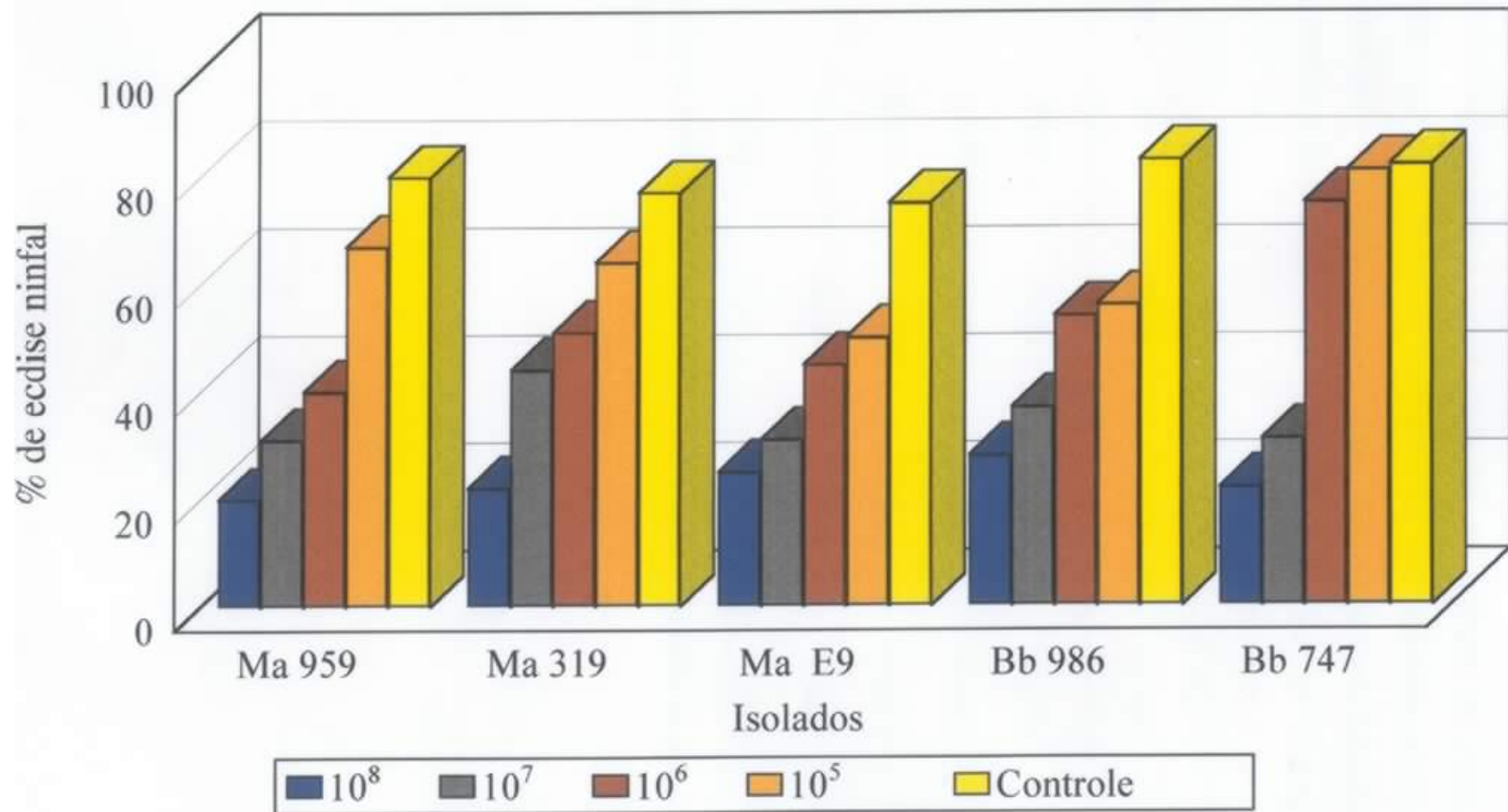


Tabela 7. Percentual de ecdise ninfal de larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense* infectadas com diferentes concentrações dos diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Ma) e *Beauveria bassiana* (Bb), (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas).

Concentrações (conídios/ml)	Percentual de Ecdise Ninfal (%)				
	Ma 959 ¹	Ma 319 ¹	Ma E9 ¹	Bb 986 ¹	Bb 747 ¹
Controle	80,00 a	77,00 a	75,00 a	83,00 a	82,00 a
10^5	67,00 b	64,00 b	50,00 b	56,00 b	81,00 a
10^6	40,00 c	51,00 c	45,00 b	54,00 b	75,00 a
10^7	31,00 cd	44,00 c	31,00 c	37,00 c	31,00 b
10^8	20,00 d	22,00 d	25,00 c	28,00 c	22,00 c

¹ Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem entre si (5% de probabilidade).

Tabela 8. Concentrações letais (CL 50 e CL 90) visando a inibição da ecdise ninfal, observadas em larvas alimentadas de *Amblyomma cajennense* tratadas com os diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) em condições controladas (Temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, Umidade relativa $\geq 80\%$ e fotoperíodo de 14/10 horas).

Isolados	Inibição da ecdise ninfal	
	CL 50 ¹	CL 90 ¹
Ma 959	$5,24 \times 10^7$	$2,68 \times 10^{10}$
Ma 319	$5,09 \times 10^9$	$3,52 \times 10^{15}$
Ma E9	$8,78 \times 10^8$	$2,26 \times 10^{16}$
Bb 986	$2,94 \times 10^8$	$7,64 \times 10^{14}$
Bb 747	$2,02 \times 10^8$	$6,84 \times 10^{10}$

¹ Concentrações em conídios / ml

Utilizando as larvas alimentadas mortas que não conseguiram realizar a ecdise ninfal, foram feitos isolamentos em meio de cultura (BDA), mantidos em câmara climatizada, onde observou-se o crescimento de colônias de fungos. As espécies de fungos que cresceram após o isolamento em BDA foram as mesmas encontradas nos isolamentos a partir dos ovos e larvas não alimentadas infectados, sendo classificadas e identificadas segundo PETCH (1931).

5. DISCUSSÃO

5.1. Período de incubação e eclosão

Os parâmetros período de incubação dos ovos e o período de eclosão das larvas oriundas desses ovos tratados com as suspensões elaboradas com diferentes concentrações de conídios/ml não variaram estatisticamente, quando comparados ao grupo controle e/ou entre os tratamentos, estes dados foram obtidos em todos os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* utilizados neste experimento.

Porém BITTENCOURT *et al.*, (1994 a ; 1996), observaram em seus trabalhos com ovos de *Boophilus microplus* imersos em diferentes suspensões de *M. anisopliae* e *B. bassiana* que ocorria o aumento dos períodos de incubação e de eclosão dos grupos tratados em relação ao grupo controle, os autores também relatam que quanto maior a concentração de conídios na suspensão, maior o período de incubação.

Os resultados obtidos no presente experimento em relação aos parâmetros períodos de incubação e de eclosão diferiram dos obtidos pelos autores anteriormente citados, porém são semelhantes aos obtidos por MONTEIRO (1997), que trabalhando com ovos de *Rhipicephalus sanguineus*, em condições controladas de temperatura e umidade, também não observou diferenças significativas nos mesmos parâmetros avaliados.

Diferenças anatomofisiológicas entre as espécies de carrapatos utilizadas nos experimentos, metodologias diferenciadas para a coleta de dados, podem justificar a diferença observada pelos diferentes autores.

5.2. Percentual de eclosão

PRATA (1998) demonstrou que em condições controladas de temperatura e umidade (27°C e $\text{UR} \geq 80\%$), o percentual de eclosão larval para o carrapato *Amblyomma cajennense* é de aproximadamente $93,53 \pm 5,83 \%$. No presente trabalho, sob condições idênticas de temperatura e umidade, verificamos nos grupos controle um percentual muito próximo, em torno de 95 a 100%, de onde podemos concluir que os resultados obtidos no presente trabalho possuem similaridade com os resultados previamente obtidos pela autora.

Os grupos tratados apresentaram uma porcentagem de eclosão inversamente proporcional à concentração de conídios de cada suspensão, o que

também ocorreu nos trabalhos de BITTENCOURT *et al.* (1994 b ; 1996), que trabalharam com *B. microplus* tratados com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e observaram que o percentual de eclosão de larvas do grupo controle foi muito superior aos encontrados nos grupos tratados, em ambos experimentos com as diferentes espécies de fungo. KAAYA *et al.* (1996) evidenciaram em testes com *B. bassiana* e *M. anisopliae* que a concentração 10^8 conídios/ml inibiu a eclosão de larvas de *A. variegatum* oriundas de fêmeas ingurgitadas tratadas; as fêmeas tratadas com *M. anisopliae* tiveram um índice de eclosão de larvas de 3,92% e nas tratadas com *B. bassiana*, esse índice foi de zero, o que revelou uma grande redução se comparado ao grupo controle, onde o índice de eclosão larval foi de 68,33 %.

Os valores de CL 50 e CL 90 obtidos com a utilização dos diferentes isolados, para promover a inibição da eclosão de larvas oriundas de ovos tratados encontrados no presente trabalho foram elevados, quando comparados aos valores citados por BITTENCOURT *et al.*, (1994 b e 1996) e MONTEIRO (1997), que trabalharam com os mesmos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre os carrapatos *B. microplus* e *R. sanguineus*, respectivamente. Tais diferenças podem ser decorrentes do manuseio laboratorial diferenciado das cepas dos entomopatógenos, já que se trata dos mesmos, diferenças na coleta de dados e principalmente de diferenças anatomofisiológicas entre as espécies de carrapatos utilizadas nos experimentos.

5.3. Percentual de mortalidade de larvas não alimentadas.

BITTENCOURT *et al.*, (1994 b) trabalhando com imersão de larvas não alimentadas de *B. microplus* em diferentes suspensões do fungo *M. anisopliae* (Ma 959) encontraram valores médios de mortalidade larval variando entre 32,67 a 97,33%, à medida que se aumentava a concentração de conídios nas suspensões utilizadas. BITTENCOURT *et al.* (1996) avaliando a ação do fungo *B. bassiana* neste mesmo estágio de *B. microplus* constataram um percentual de mortalidade variando entre 18,8% a 88%, dependendo da concentração utilizada. Os dados apresentados por estes autores são muito semelhantes aos encontrados no presente trabalho, já que da mesma forma, a medida que se aumentou a concentração de conídios nas suspensões, maiores foram os percentuais de mortalidade de larvas não alimentadas obtidos neste experimento.

MWANGI *et al.*, (1995) trabalhando com três isolados de *B. bassiana* e dois de *M. anisopliae*, prepararam suspensões com 10^6 conídios/ml, onde por imersão avaliou a ação destes fungos para larvas não alimentadas de *R. appendiculatus*. Os autores observaram valores de mortalidade variáveis entre 39,9% a 81,1% para *B. bassiana*, e valores de mortalidade variáveis entre 4,2% a 26,9% para *M. anisopliae*. Estes dados indicam uma baixa patogenicidade das cepas de *M. anisopliae* utilizadas por estes autores.

MONTEIRO (1997) em ensaios laboratoriais com larvas não alimentadas de *R. sanguineus*, utilizando isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* observou mortalidade de 13,3% a 96,6 %, variando conforme a concentração e isolado utilizado. No presente experimento os valores variaram de 43,3% a 96,7% para o fungo *M. anisopliae* e de 11,7% a 100% para *B. bassiana*. Por serem utilizados os mesmos isolados, em ambos experimentos, supõem-se que haja uma diferença de patogenicidade para as diferentes espécies de carrapatos envolvidas, sugerindo que as larvas de *A. cajennense* sejam mais sensíveis ao fungo *M. anisopliae*, enquanto larvas de *R. sanguineus* sejam mais sensíveis ao fungo *B. bassiana*.

Na análise de próbites realizada com os dados referentes ao percentual de mortalidade dos isolados de *B. bassiana* verificou-se que a CL 50 variou de $7,9 \times 10^5$ a $3,9 \times 10^7$ conídios/ml e para os isolados de *M. anisopliae* variou de $1,8 \times 10^5$ a $6,5 \times 10^5$ conídios/ml. No trabalhos de BITTENCOURT *et al.* (1996), tratando larvas de *B. microplus* com suspensões de *B. bassiana*, este índice ficou entre $6,83 \times 10^6$ e $1,01 \times 10^7$ conídios/ml. MONTEIRO (1997) avaliando dados de CL 50 para larvas de *R. sanguineus* tratadas com *B. bassiana* encontraram valores entre $2,2 \times 10^5$ e $2,15 \times 10^6$ conídios/ml ; para *M. anisopliae* este índice variou entre $7,8 \times 10^4$ e $1,4 \times 10^5$ conídios/ml. A justificativa para as diferenças observadas em relação à esse índice entre os autores é decorrente de diferenças anatomofisiológicas entre as espécies de carrapatos utilizadas nos experimentos, já que se trata dos mesmos isolados de fungos utilizados.

5.4. Percentual de ecdise ninfal, de larvas alimentadas tratadas.

No trabalho de DAEMON & ISHIZUKA(1992), avaliando o efeito de diferentes temperaturas, os autores demonstram que o percentual de ecdise de larvas de *Amblyomma cajennense* mantidas em temperatura constante de 27°C e umidade relativa igual ou superior de 75% variam de 86,67% a 96,67%, resultados mais elevados do que os verificados no grupo controle do presente trabalho, onde os resultados obtidos variaram de 75% a 83%; a redução deste percentual pode estar ligada ao fato de se utilizar a imersão das larvas do grupo controle do presente experimento, em uma suspensão de água destilada mais espalhante adesivo, metodologia esta não empregada por DAEMON & ISHIZUKA (1992); já para os grupos tratados o percentual de ecdise ninfal variou de 81% a 20 %, conforme as concentrações e os diferentes isolados.

BARBOSA *et al.*, (1997), avaliando a ação de dois isolados de *B. bassiana* sobre larvas alimentadas de *R. sanguineus*, observaram um percentual de mortalidade das larvas do grupo controle de 24%. Já para os grupos tratados, observaram percentuais de 67%, 94% e 100%, para os tratamentos 10^4 , 10^6 e 10^8 , com o isolado 747. Já para o isolado 986, a mortalidade variou de 35% em 10^4 a 100% nas concentrações de 10^6 e 10^8 . Os dados apresentados demonstram que o percentual de

mortalidade de larvas alimentadas reflete-se inversamente no percentual de ecdise ninfal.

Podemos observar que os valores de mortalidade para o grupo controle, encontrados por BARBOSA *et al.*, (1997), são similares aos percentuais de ecdise encontrados no presente trabalho. Já para os valores obtidos nos grupos tratados, observamos uma certa disparidade, pois em nenhum tratamento, observamos um percentual de ecdise de 0%, o que representaria o percentual de mortalidade de 100% encontrado pelos autores supracitados, nos tratamentos 10^8 conídios/ml com ambos isolados. Essa diferença talvez seja em decorrência de se tratar de espécies diferentes de carrapatos .

ZHIOUA *et al.*, (1997) prepararam oito diferentes suspensões conidiais de *M. anisopliae*, com concentrações variáveis de 10 até 10^8 conídios/ml, onde larvas alimentadas de *Ixodes scapularis* permaneceram imersas por 30 segundos. Os resultados obtidos por esses autores revelam mortalidade de 100% das larvas ingurgitadas duas semanas após a infecção para a concentração 10^8 conídios/ml. Foi evidenciado o crescimento de micélio recobrimdo todas as larvas mortas. Estas observações são similares às citadas por BARBOSA *et al.* (1997), assim como por MONTEIRO (1997), onde após dez dias da imersão nas diferentes suspensões dos isolados e em todos os estágios de desenvolvimento testados, evidenciou-se a presença de formações hifais. No presente trabalho também se observou o desenvolvimento hifal sobre ovos e cutícula de larvas não alimentadas e alimentadas

recobrando toda sua extensão, localizando-se principalmente em torno dos seus idiossomas e gnatossomas.

Segundo ZHIOUA *et al.* (1997), uma certa densidade de conídios é requerida para que ocorra a penetração efetiva na cutícula, como um mecanismo de ação em massa, o que explica a baixa patogenicidade encontrada nas suspensões de menor concentração de conídios/ ml, porém a partir de determinada concentração as suspensões desses entomopatógenos demonstraram seu potencial para utilização em controle biológico, principalmente para o controle de carrapatos, devido sua capacidade de penetração cuticular, de forma que a ingestão do patógeno não é requerida como na maioria nos demais patógenos utilizados em controle microbiano.

6. CONCLUSÕES

Após a realização de bioensaios *in vitro* com os diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre ovos, larvas não alimentadas e alimentadas de *Amblyomma cajennense* pode-se concluir que:

- Todos os isolados utilizados promoveram infecção nos ovos e larvas, alimentadas ou não, tratados e mantidos em condições controladas de temperatura e umidade ($27^{\circ}\text{C} \pm 1$ e $\text{UR} \geq 80\%$).
- A ação patogênica dos fungos reflete-se na eclodibilidade e mortalidade larval, assim como no processo de ecdisse ninfal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 1º ed. São Paulo, Manole, 1986, 407p.

ARAGÃO, H. & FONSECA, F. 1961. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, **59**(2):115-130.

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.
- BELLATO, V. 1995. Efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em condições de laboratório. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 59p.
- 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 a. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural - Série Ciências da Vida**, **16**(1-2):41-47.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. 1994 b. 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.; 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.
- BOICEV, D. & RIZVANOV, K. 1960. Relation of *Botrytis cinerea* to Ixodid ticks. **Zool. Zh. Uh**, 39:460.
- BROWN, R. S. & ANDERSON, W. R. 1970. An Endemic Disease Among Laboratory Populations of *Dermacentor andersoni* (= *venustus*) (Acarina: Ixodidae). **J. Invert. Pathol**, 16:142-143.

- BRUM, J.G.W. 1989. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (GRIMONT,1981): etiopatogenia e sazonalidade. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 44p.
- BRUM, J. G. W.; FACCINI. J. L. & AMARAL, M. M. 1991. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). II - Histopatologia e testes “in vitro”. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot**, **43**:31-37.
- BURGDORFER, W.; BRINTON, L.P. & HUNGHERS, L.E. 1973. Isolation and characterization of symbiotes from the Rock Mountain Wood Tick *Dermacentor andersoni*. **J. Invert. Pathol**, **22**:424-434.
- CALBERG, G. 1986. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. **Mirc. Journ**, **2**:267-274.
- CAMACHO, E. R. & MARTINEZ, J. R. 1995. Effectiveness of biological preparations based on entomopathogenous fungi in the control of *Boophilus microplus*. **Recombinant Vacc. for the Control of Cattle Tick**, **242**:36-43.

- 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.
- 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. of. invert. Pathol***, 71:189-191.
- DAEMON, E. & ISHIZUKA, A. C. 1992. Efeito de diferentes temperaturas sobre a ecdise larval de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acarina:Ixodidae). ***Rev. Bras. Parasitol. Vet***, 1(2):105-107.
- DAVEY, R. B.; OSBURN, R. L. & MILLER, J. A. 1984. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) collected from different geographical areas. ***Ann. Ent. Soc. Amer***, 77(1):1-5.

ESTRADA-PENÑA, A.; GONZALEZ, J. & CASOLAS, A. 1990. The activity of *Aspergillus ohraceus* (Fungi) on replete females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in natural and experimental conditions. ***Folia Parasitol***, **37**:331-336.

GLAZER, I. & SAMISH, M. 1993. Suitability of *Boophilus annulatus* replete female ticks as hosts of the nematode *Steinernema carpocapsae*. ***J. Invert. Pathol***, **61**:220-222.

HASSANAIN, M. A; EL GARHY, M. F.; ABDEL – GHAFAR, F. A.; EL – SHARABY KADRIA, A.; ABDEL MEGEED, N. 1997. Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. I. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties on soft and hard ticks (ixodidae). ***Parasitol. Res***, **83**(3):209-213.

HENDRY, D. A. & RECHAV, Y. 1981. Acaricidal Bacteria Infecting Laboratory Colonies of the Tick *Boophilus decoloratus* (Acarina:Ixodidade) ***J. Invert. Pathol***, **38**:149-151.

- KAAYA, G. P.; KOKWARO, E. D. & MURITHI, J. K. 1991. Mortalities in adult *Glossina morsitans* experimentally infected with the entomogenous fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Discov. Innov**, **3**:55-60.
- 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.
- KALSBECK, V., FRANDSEN, F. and STEENBERG, T. 1995. Entomopathogenic fungi associated with *Ixodes ricinus* ticks. **Exper. & Appl. Acarol**, **19**:45-51.
- KRYLOVA, V. N. 1977. Action of toxins of entomopathogenic fungi on blood sucking arthropods. *Biologicheskie metody bor'by krovoososuchchimi nasekomymi : Kleschami*, (Romasheva, L. F., Ed.), 74 -77.
- LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F. 1949. Simple method of fitting dose effect curve. **J. Pharm. Exp. Ther**, **95**:99-113.

- MASSARD, C. DE 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.
- MAULEON, H., BARRE, N. and PANOMA, S. 1993. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus annulatus* (Say). **Exp. Appl. Acarol**, **17**(11):831-838.
- MEGAW, M. W. J. 1978. Virus-like particles pathogenic to salivary glands of the tick *Boophilus microplus*. **Nature**, **271**:483-484.
- 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. 1997. 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, 66p.

- MORAES, S. A. & ALVES, S. B. 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. coord. **Controle Microbiano de Insetos**. 2^a ed., FEALQ, Piracicaba, 765-777.
- 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. 1995. Parasitism of *Amblyomma variegatum* by a hymenopteran parasitoid in the laboratory and some aspects of its basic biology. **Biol. Cont**, 4:101-104.
- NEITZ, W. O.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H. S. 1971. Laboratory investigations on the life caroo paralysis tick *Ixodes rubidicundus* (Neumann, 1904). **Onders. J. Vet. Res**, 38:215-224.
- PEREIRA, M. C. 1980. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887); Revisão taxonômica e morfo-biológica. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 126p.

- PETCH, T. 1935. Notes on Entomogenous Fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **19**:55-75.
- 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.
- SAMISH, M & GLAZER, J. 1991. Killing ticks with parasitic nematodes of insects. *J. Invert. Pathol*, **58**:281-282.
- 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.

ZHIOUA, E., LEBRUN, R. A., GINSBERG, H. S. and AESCHLIMANN, A. 1995. Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema glaseri* (Nematoda : Steinernematidae) to *Ixodes scapularis* (Acari : Ixodidae). *J. of. Med. Entomol* , 32:900-905.

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. of. Parasitol* , 83(5):815-818.

WEYER, F. 1973. Versuche zur Übertragung von *Wolbachia persica* auf keiderläuse. *Zeitsc. Ang. Zool*, 60:77-93.