

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

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS FUNGOS**  
***Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana* COM A**  
**DELTAMETRINA, SOBRE UMA CEPA DE *Boophilus***  
***microplus* RESISTENTE A PIRETRÓIDES**

**Thiago Campanharo Bahiense**

**2003**



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

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS FUNGOS *Metarhizium  
anisopliae* E *Beauveria bassiana* COM A DELTAMETRINA, SOBRE  
UMA CEPA DE *Boophilus microplus* RESISTENTE A PIRETRÓIDES**

**THIAGO CAMPANHARO BAHIENSE**

Sob Orientação da Professora  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

E Co-orientação dos Professores  
**Kátia Maria Famadas**  
**Fábio Barbour Scott**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Magister Scientiae** em  
Ciências Veterinárias, Área de  
Concentração em Parasitologia  
Veterinária.

Seropédica, RJ  
lanho de 2003

636.0896968 Bahiense, Thiago Campanharo, 1977-  
B151a Avaliação da associação dos fungos  
T Metarhizium anisopliae e Beauveria  
bassiana com a deltametrina, sobre uma  
cepa de Boophilus microplus resistente a  
piretróides / Thiago Campanharo Bahiense,  
2003.  
31f. : tab.  
Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro  
Bittencourt.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Instituto de Veterinária.  
Bibliografia: f. 26-31.  
1. Fungos entomopatogênicos Teses. 2.  
Carrapato - Controle biológico - Teses.  
3. Inseticidas - Efeito fisiológico -  
Teses. 4. Piretróides - Toxicologia -  
Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias  
Pinheiro, 1959-. II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Instituto de  
Veterinária. III. Título.

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

**THIAGO CAMPANHARO BAHIENSE**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/06/2003.

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittecourt. PhD. UFRRJ  
(Orientador)

Ligia Miranda Ferrira Borges. Dr. UFG

Fabio Barbour Scott. PhD. UFRRJ

*Dedico esta vitória a minha mãe  
que me desafia a crescer, a meu pai  
que se MM adeus, mas continua  
presente e eterno, e aos (mães- que  
fizeram parte dela.*

## AGRADECIMENTOS

A professora e orientadora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, que me deixou seguir seus passos por esses anos de trabalho, compartilhou seus conhecimentos e além de profissional foi também amiga.

Ao amigo Éverton Kort Kamp Fernandes, que compartilhou com mesmo afeto as vitórias e derrotas, estando sempre ao lado. Hoje mais que um amigo, um irmão.

Aos professores Adevair Henrique da Fonseca e Gonzalo Efraim Moya Borba pela amizade, sugestões e que em nenhum momento mediram esforços para me ajudar a concretizar essa e outras idéias.

A Gisela Lara da Costa pelo auxílio e ensinamentos, sempre acompanhados de muita dedicação.

Aos colegas de laboratório Rosana Colatino Soares Reis, Edson Jesus de Souza e Denise Ribeiro Melo que estiveram sempre presente nos momentos de trabalho com críticas e sugestões que certamente engrandeceram este trabalho. Aos novos colegas de laboratório Sandra Borges da Silva, Luiz Carlos Teixeira de Souza Júnior, Isabele da Costa Angelo e Wendell Marcelo de Souza Perinotto.

Ao funcionário José Maurício Mattos de Souza pela ajuda nos trabalhos laboratoriais.

Aos amigos do curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, que fizeram parte de uma caminhada onde o crescimento só existiu porque estávamos sempre unidos e com novas idéias críticas e construtivas.

Em especial a amiga Márcia Cristina de Azevedo Prata, por seus preciosos conselhos, dedicação e estímulo que se sobrepuseram às barreiras do profissionalismo.

Aos funcionários da Estação de Bovinocultura Leiteira-Pesagro Walcir Muniz Araújo e Valdemir Muniz de Araújo que pela confiança e amizade me ajudaram nos trabalhos de coleta.

A Capes pelo auxílio financeiro que foi de suma importância para realização do experimento.

A todos os professores, funcionários e alunos do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

A Deus pela saúde, força e serenidade e por ter colocado todas essas pessoas em um mesmo caminho.

## **BIOGRAFIA**

Thiago Campanharo Bahiense, filho de José Iris Bahiense e Maria das Graças Campanharo Bahiense, nasceu em 14 de agosto de 1977, na cidade do Rio de Janeiro -RJ.

Cursou o primeiro grau no Colégio Leopoldo e na escola Estadual Castelo Branco, ambos no município de Nova Iguaçu — RJ, concluindo em dezembro de 1992, o segundo grau foi cursado e concluído na Escola Técnica João Luiz do Nascimento em Nova Iguaçu - RJ, onde fez o Curso Técnico de Administração de Empresas.

Em 1996 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Seropédica - RJ, graduando-se em setembro de 2001. Durante o curso foi bolsista de iniciação Científica CNPq-PIBIC no período de 1º de fevereiro de 1999 até 31 de julho de 2001 sob orientação da Professora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Durante esse período apresentou diversos trabalhos em congressos e simpósios nacionais e internacional e publicou um trabalho científico em periódico indexado.

Em março de 2002 iniciou o curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Parasitologia Veterinária ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## RESUMO

BAHIENSE, Thiago Campanharo. **Avaliação da associação dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* com a deltametrina, sobre uma cepa de *Boophilus microplus* resistente a piretróides**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 31p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária).

*Boophilus microplus* causador de diversas patologias em rebanhos bovinos e severos prejuízos econômicos aos produtores, possui grande capacidade de desenvolver resistência a carrapaticidas químicos. O controle biológico se destaca como promissor para manter em níveis aceitáveis as populações de carrapatos nos rebanhos bovinos. Com o objetivo de desenvolver novas técnicas que complementarão o controle desta parasitose, avaliou-se a compatibilidade entre a deltametrina e os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Boophilus microplus* resistentes a piretróide. A deltametrina um piretróide sintético nas concentrações de 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,12 ppm e os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml foram utilizados sozinhos ou em associação entre eles, em testes *in vitro* para estabelecer sua compatibilidade, efeito sinérgico e eficácia sobre larvas não alimentadas de *Boophilus microplus*, avaliados através do percentual de mortalidade. Os ensaios com a deltametrina demonstraram que a cepa utilizada apresentou elevados fatores de resistência, sendo seu valor reduzido quando associado a deltametrina com os entomopatógenos. A mortalidade de larvas variou entre 1 a 39% quando utilizado as diferentes concentrações de deltametrina. Para as diferentes concentrações de *M. anisopliae* a mortalidade variou de 10 a 96%, enquanto que para *B. bassiana* foi de 3 a 61% de mortalidade. As mortalidades foram proporcionais às concentrações de deltametrina utilizadas, foram também proporcionais às concentrações fúngicas utilizadas. Na maioria dos tratamentos, a mortalidade das associações se apresentavam com valores superiores que as mortalidades das respectivas concentrações de piretróide ou de fungo sozinhos. O presente experimento demonstrou então que a associação entre deltametrina e os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pode ser utilizado como ferramenta para o manejo integrado de pragas. A associação se tornou *mais eficiente* que os agentes quando utilizados de forma não associada. A compatibilidade entre os fungos testados se expressou através do efeito sinérgico entre os agentes.

**Palavras-chave:** Controle biológico, entomopatógenos, deltametrina.

## ABSTRACT

BAHIENSE, Thiago Campanharo. **Evaluation of an association of the fungus *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* the deltamethrin, on a strain of *Boophilus microplus* pyrethroid resistant.** Seropédica: UFRRJ, 2003. 31p. (Dissertation, Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology).

*Boophilus microplus*, which is responsible for a variety of pathologies in herds of cattle and severe economic losses to producers, has a big capacity of resistant development to chemical tickicide. The biological control shows up as a promising maintainer of acceptable levels of tick populations on herds of cattle. With the objective of developing new techniques that will complete this parasitic disease control, the compatibility of deltamethrin with the fungus *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on *Boophilus microplus* larvae resistant to pyrethroids was evaluated. Deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the concentrations of 0.39, 0.78, 1.56, 3.12 and 6.12 ppm and the fungus *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the concentrations of  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  conidia/ml were used the separated and associated in tests *in vitro*, to establish the compatibility, synergic effect and efficiency on unfed larvae of *Boophilus microplus*. The mortality rate was used to evaluate them. The assays with deltamethrin demonstrated that the strain utilized presented high factors of resistance, but had a decreasing value with the association of the deltamethrin with the entomopathogen. The mortality of larvae varied between 1 and 39% when used with different concentrations of deltamethrin. To the different concentrations of *M. anisopliae* the mortality varied between 10 and 96%, while the mortality to *B. bassiana* was between 3 and 61%. These mortalities were proportional to the concentrations of deltamethrin utilized, and were also proportional to the fungus concentrations utilized. In most of treatments, the mortality of the association had increased values comparing to the mortality of the pyrethroid and the fungus separated. The present study demonstrated that the association of deltamethrin with the fungus *B. bassiana* and *M. anisopliae* can be used as a tool to the integrated pest management. The association became more efficient than the not associated form. The compatibility between the tested fungus was expressed by the synergic effect of them.

**Key words:** Biological control, entomopathogen, deltamethrin.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 O Carrapato .....	3
2.2 O Controle e a Resistência .....	3
2.3 O Controle Biológico .....	6
2.4 A Compatibilidade .....	7
2.5 Efeito dos fungos entomopatogênicos sobre mamíferos .....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
3.1 Localização do experimento .....	10
3.2 Obtenção da cepa resistente do carrapato <i>Boophilus microplus</i> .....	10
3.3 Obtenção e utilização das amostras de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> .....	10
3.4 Elaboração das suspensões de fungos entomopatogênicos .....	10
3.5 Elaboração da solução de piretróides sintéticos .....	11
3.6 Ensaios com larvas não alimentadas tratadas com piretróide sintético.....	11
3.7 Ensaios com larvas não alimentadas tratadas com <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> e suas associações com deltametrina .....	12
3.8 Isolamento dos fungos após bioensaios .....	12
3.9 Análise Estatística e Próbites .....	12
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>14</b>
4.1 Ensaio com larvas não alimentadas tratadas com piretróide sintético .....	14
4.2 Ensaios com larvas não alimentadas tratadas com <i>M. anisopliae</i> .....	16
4.3 Ensaios com larvas não alimentadas tratadas com <i>M. anisopliae</i> associado a piretróide sintético.....	16
4.4 Ensaios com larvas não alimentadas tratadas com <i>B. bassiana</i> .....	19
4.5 Ensaios com larvas não alimentadas tratadas com <i>B. bassiana</i> associado a piretróide sintético .....	19
4.6 Considerações sobre as associações .....	22
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>24</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>25</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores das CL50 da deltametrina pura e associada com *Metarhizium anisopliae*, sobre larvas de *Boophilus microplus* e seus respectivos limites de confiança, equação da regressão e fator de resistência..... 14
- Tabela 2.** Valores das CL50 da deltametrina pura e associada com *Beauveria bassiana*, sobre larvas de *Boophilus microplus* e seus respectivos limites de confiança, equação da regressão e fator de resistência ..... 15
- Tabela 3.** Valores médios de mortalidade de larvas de *Boophilus microplus*, obtidos dos tratamentos com *Metarhizium anisopliae*, deltametrina e suas associações em diferentes concentrações ..... 17
- Tabela 4.** Valores médios de mortalidade de larvas de *Boophilus microplus*, obtidos dos tratamentos com *Beauveria bassiana*, deltametrina e suas associações em diferentes concentrações..... 20

## I. Introdução

*Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae), conhecido como o carrapato dos bovinos, é um carrapato homoxeno, encontrado principalmente parasitando o corpo dos bovinos, podendo também se alimentar em outros mamíferos, os quais servem como hospedeiros alternativos como eqüinos, ovinos, caprinos, caninos e veados (GONZALES, 1975) além de búfalo, gato, porco, onça, preguiça, canguru e coelhos (PEREIRA, 1980).

Esta espécie de ixodídeo é originária do continente Asiático e foi introduzida em outros continentes através das importações de bovinos. Encontra-se amplamente distribuída nas regiões de clima tropical e sub-tropical. Sua ocorrência tem sido assinalada em vários países da América Central e da América do Sul, região Sul e Ocidental da África e região Norte da Austrália. É uma parasitose de grande importância na pecuária leiteira, principalmente no Brasil-Central, estando presente em todas as propriedades destinadas a produção leiteira da região Sudeste. No Brasil *Boophilus microplus* é a única espécie deste gênero (PEREIRA, 1980).

Afora os danos diretos causados pela espoliação sanguínea e prejuízos econômicos, tais como perda da produtividade leiteira e desvalorização do couro, esta espécie é considerada como vetor de importantes agentes de doenças infecciosas.

Os métodos de controle utilizados para o *B. microplus* estão relacionados em menor parte com a fase não parasitária e em maior parte com a fase parasitária. As técnicas empregadas no controle da fase não parasitária estão correlacionadas com o manejo de pastagens. As medidas para o controle da fase parasitária deu origem a pesquisas sobre a resistência do hospedeiro, desenvolvimento de vacinas e uso de carrapaticidas químicos.

Atualmente no Brasil, o controle desta espécie de ixodídeo, tem sido feito através do uso de diferentes grupos químicos de produtos carrapaticidas encontrados no comércio, sendo utilizados indiscriminadamente e sem critério, isto por sua vez, aliado com formas inadequadas de aplicação contribuem de forma grandiosa para a poluição ambiental e o aparecimento de resistência dos ixodídeos às substâncias carrapaticidas, refletindo em perda da eficiência destes compostos para controle dos seus diferentes estádios parasitários (WHARTON & ROULSTON, 1970; BITTENCOURT *et al.*, 1997). Segundo BARROS & EVANS (1989), o uso exclusivo de carrapaticidas é pouco viável em termos práticos e econômicos, tornando-se necessário a adição de métodos alternativos a serem empregados em sistemas de controle integrado. Para tanto, o conhecimento dos aspectos biológicos 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 com o objetivo de empregar patógenos como controladores biológicos de parasitos. Fungos entomopatogênicos são importantes inimigos naturais de artrópodes e podem ser utilizados no controle biológico (CHANDER *et al.*, 2000). Segundo ALVES *et al.* (1998a), o controle microbiano não deve ser encarado como uma solução única e infalível para todos os problemas de pragas. Estes agentes deverão fazer parte de um conjunto de medidas, que aplicadas resultem na manutenção da população do artrópode, de forma que não causem danos econômicos.

Os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, pertencem a subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes e são atualmente empregados como agentes promissores no controle microbiológico de carrapatos.

Para aumentar a eficácia e otimizar a utilização dos produtos químicos, bem como dos entomopatógenos, pesquisas iniciais tem focado a compatibilidade entre ambos, mas não se conhece ainda os resultados da associação entre os acaricidas químicos mais comuns e os principais fungos entomopatogênicos.

Os resultados entre essas associações podem ser expressos através do sinergismo, que compreende em uma ação simultânea do entomopatógeno e do agente químico na realização de suas funções, ou seja os entomopatógenos e os agentes químicos agem sobre o carrapato mas sem que um interfira no modo de ação do outro ou no seu desenvolvimento. A interação é outra forma que a associação pode se expressar, sendo a ação recíproca entre o agente biológico e o agente químico, um sobre o outro, de forma que um agente interfira e modifique o modo de ação ou desenvolvimento do outro.

Os objetivos principais do presente trabalho foram: a) determinar a possibilidade de associação entre deltametrina e estes entomopatógenos a fim de desenvolver e avaliar metodologia para controle integrado do *B. microplus*. b) determinar a compatibilidade entre acaricida químico e biológico quando empregados simultaneamente em larvas de *B. microplus*. c) avaliar a eficácia dos fungos entomopatogênicos *M. anisoplicie* e *B. bassiana* quando associados a deltametrina sobre uma cepa deste carrapato sabidamente resistente a esta base.

Com a finalidade de desenvolver novas técnicas de controle de carrapatos, visando amenizar a capacidade destes ao desenvolvimento de resistência aos acaricidas, tornando a prática do controle mais eficiente e segura, buscando o aumento da produtividade e amenizando os danos ao meio ambiente.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 O carrapato

O carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) é conhecido como o carrapato dos bovinos, sendo um parasito obrigatório e encontrado na faixa compreendida entre os paralelos 32° de latitude Norte e 35° de latitude Sul, na parte superior e inferior desses paralelos os carrapatos do gênero *Boophilus* têm dificuldades de sobreviver e se multiplicar devido aos fatores climáticos e, dentre eles, o mais importante é a temperatura (NUT1 EZ *et al.*, 1982). No Brasil, os prejuízos causados, somente pelo parasitismo por *B. microplus* chegam a 2 bilhões de dólares por ano (GRISI *et al.*, 2002). Como prejuízos causados pelo *B. microplus* podemos citar a espoliação sanguínea, desvalorização do couro, aparecimento de miíases e a transmissão de doenças causadas por vírus, riquetsias, bactérias e protozoários, tais como anaplasmose e babesiose o que vai se refletir no atraso do desenvolvimento dos animais, na queda da produção ou mesmo a morte dos animais, além do aumento do custo da mão de obra, gastos com materiais que serão utilizados para o controle desta parasitose, assim como os carrapaticidas (HORN & ARTECHE, 1985; GRISI *et al.*, 2002).

Em função da dificuldade de erradicar o carrapato em regiões de clima tropical e de que sua presença no rebanho permite a manutenção da imunidade natural contra os agentes do complexo tristeza parasitária, é importante conviver com o parasito, porém em níveis capazes de manter essa imunidade e amenizando ao máximo as perdas econômicas causadas (FURLONG, 1993).

### 2.2 O controle e a resistência

Desde muitos anos, os produtores vêm investindo na compra de produtos carrapaticidas na tentativa de controlar essa parasitose. Ao mesmo tempo, a indústria química vem lançando produtos cada vez mais eficientes e com maior poder residual. Tais medidas, porém, não melhoram o nível de controle, que permitisse em médio prazo uma distribuição dos custos e das perdas. Paralelamente a isso, a introdução de maior grau de sangue europeu no rebanho, com conseqüente diminuição da resistência do hospedeiro, aliada a novas variedades e espécies de gramíneas para pastejo que permitem maior lotação animal por área, vem oferecendo melhores condições de multiplicação, sobrevivência e desenvolvimento do carrapato (FURLONG, 1993).

O mau uso dos produtos químicos, uma vez que direcionados apenas para o tratamento de populações elevadas, banhos por aspersão em concentrações baixas e falhas na aplicação têm causado resistência e resistência cruzada em populações de carrapato, o que dificulta ainda mais o controle (FURLONG, 1993).

Resistência é a habilidade de indivíduos sobreviverem a doses de drogas que poderiam normalmente matar outros da mesma espécie e estágio. Isto é herdado e selecionado devido aos sobreviventes aos tratamentos que passam genes da resistência para seus descendentes. Os genes da resistência são inicialmente raros em uma população ou aparecem como raras mutações nos genes, assim como por seleções contínuas. A proporção dos genes resistentes aumenta de acordo com a proporção dos parasitas resistentes. (SANGSTF,R, 2001)

SUTHEREST & COMINS (1979) descreveram três componentes para a origem da resistência. O primeiro é o estabelecimento da resistência, que é basicamente ao acaso; um evento influenciado pelo tamanho e diversidade da população e a razão de mutação para o gene em questão. Não temos controle sobre este fator. O segundo componente é o desenvolvimento, neste processo, o uso de agentes químicos seletivos, permitem o desenvolvimento da resistência. Subseqüentemente, acontece a dispersão dos genes da resistência na população da praga. O processo de desenvolvimento e dispersão da resistência é influenciado pela biologia, manejo e outros eventos, incluindo a dispersão dos genes e o desequilíbrio. Se a seleção continua e os organismos resistentes são suficientemente capazes, aparece o terceiro componente que é a emergência da resistência, onde esta se torna perceptível.

Depois de instalada a resistência em uma população, esta consegue escapar da eficiência de um produto através da redução na taxa de penetração do produto no parasita, mudanças no metabolismo, através do desenvolvimento de processos de detoxificação, armazenamento e excreção do produto; e, mudanças no sítio de atuação, o que possibilita ao parasito menor sensibilidade aos efeitos do produto (SOLOMON, 1983).

Os métodos laboratoriais para a detecção da resistência em populações de carrapatos, são hoje em dia realizados através do teste de larvas com idade entre uma a três semanas, tratadas em diluições sucessivas de um determinado acaricida (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO, 1984), GRILLO TORRADO & GUTIERREZ (1969), através do teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (DRUMMOND *et al.* 1971, GRAHAM & DRUMMOND 1964), através de testes bioquímicos para detecção de enzimas como acetilcolinesterase e esterase (MENDES *et al.*, 2001) ou ainda pela detecção através da técnica de reação em cadeia da polimerase-PCR (GUERRERO *et al.*, 2001).

Os métodos para controle de *B. microphis* estão relacionados principalmente com a fase parasitária do seu ciclo biológico, sendo a utilização de produtos químicos a principal alternativa. A utilização indiscriminada de carrapaticidas tem acarretado sérios problemas no que se refere a poluição ambiental e ao aparecimento de resistência aos produtos químicos (BITTENCOURT *et al.*, 1994a). Apesar de sabermos que os produtos químicos têm grande desempenho para o controle dos carrapatos devemos lembrar que não podemos perder a sensibilidade dos carrapatos a esses produtos.

A habilidade que apresenta o *B. microphis* a desenvolver resistência tem sido demonstrada por vários autores. Segundo WHARTON (1976) os carrapaticidas a base de arsenicais vinham sendo utilizados 30 a 40 anos antes de ocorrerem os primeiros registros de resistência em 1963 na Argentina e na Austrália. No Brasil, as investigações sobre a resistência dos carrapatos aos acaricidas iniciaram-se no ano de 1950, no Rio Grande do Sul, onde FREIRE (1953) comprovou a resistência aos produtos arsenicais. Outros estudos sobre a susceptibilidade do *H. microplus* a arsenicais, no Brasil, foram realizados por FREIRE (1955 e 1956) e ARTECHE *et al.* (1977a).

A resistência do *B. microphis* a produtos organoclorados foi detectada em 1952, no Estado do Rio Grande do Sul (FREIRE, 1953). Outros estudos de resistência a organoclorados no Brasil foram desenvolvidos por FREIRE (1955 e 1956) e ARTECHE *et al.* (1974).

A resistência do *R. microplus* a base organofosforado foi inicialmente constatada, na Austrália, Brasil e Argentina em 1963 (WHARTON 1976). Na Região Sul do Brasil estudos sobre resistência foram desenvolvidos por ARTECHE *et al.* (1977a); ARTECHE *et al.* (1977b); ARREGUI *et al.* (1974); ARTECHE *et al.* (1974); ARTECHE *et al.* (1975).

No Sudeste brasileiro, a resistência do *B. microplus* aos organofosforados foi estudada sobre larvas não alimentadas provenientes do Estado de Minas Gerais por PATARROYO & COSTA (1980). No Estado do Rio de Janeiro, OLIVEIRA *et al.* (1986), também constataram resistência sobre larvas não alimentadas.

A resistência do *B. microplus* aos carrapaticidas formulados com piretróides sintéticos foi constatada em cepa Australiana resistente a organoclorados, mantidas em laboratório (NOLAN *et al.*,1977). No Brasil, Estado do Rio de Janeiro, cepa resistente do *B. microplus* aos piretróides foi constatada em testes *in vivo e in vitro* por LEITE (1988). Na Austrália, NOLAN *et al.* (1989) constataram a presença de resistência a piretróides em cepas de campo, mostrando o aumento da habilidade de detoxificação dos piretróides pelos carrapatos, além da resistência cruzada ao DDT. A potencialização da atividade carrapaticida dos piretróides quando associados a organofosforados foi constatada por NOLAN *et al.*(1979).

Experimentos realizados por MARTINS & FURLONG (2001) em um estudo a campo, demonstraram haver uma cepa resistente ao grupo químico das avermectinas no Estado do Rio Grande do Sul.

Apesar do estabelecimento da resistência do carrapato aos carrapaticidas, tais produtos continuaram a ser utilizados contra outras espécies de insetos e ácaros, tanto na pecuária quanto na agricultura. O resultado disso foi um polvilhamento em todo o globo terrestre desses inseticidas com sérias conseqüências para a vida da natureza e das próprias pessoas, que acumulam cada vez mais resíduos em seus organismos. A ótica da resistência também pode ser vista como um marcador para a excessiva utilização de produtos químicos, sendo os carrapatos e os insetos um aliado à humanidade para denunciar o uso abusivo desses compostos (GONZÁLES, 2002).

Comparando a biologia da fase não parasitária de estirpes resistentes e sensíveis, GLÓRIA *et al.* (1993) não constataram diferenças, sendo assim podemos utilizar os mesmos métodos de controle para ambas as estirpes.

A utilização adequada dos produtos carrapaticidas é fundamental para a obtenção de bons resultados no controle químico dos carrapatos. NOLAN & ROULSTON (1979) erradicaram de uma área experimental, população de *B. microplus*, resistente a organofosforados, através de aplicações monitoradas de carrapaticidas a base de organofosforados. ARTECHE *et al.* (1974) controlaram estirpe de *B. microplus* organofosforado resistente ao nível de campo utilizando produto deste grupo químico. Os autores constataram a necessidade do acompanhamento técnico na utilização de carrapaticidas, a fim de evitar o surgimento de resistência bem como para um controle eficaz.

A necessidade de testes *in vitro* para a recomendação de produtos carrapaticidas, em um determinado estabelecimento pecuário, foi demonstrada por ARTECHE *et al.* (1977b), ao constatarem a necessidade de alteração na concentração indicada pelo fabricante a fim de obter percentagem de eficácia adequada, mesmo em produto recentemente introduzido para o controle do *B. microplus* na região.

Atualmente, os métodos para controle de cepas resistentes são o uso de sobre-dose do produto o qual o carrapato já se tornou resistente ou a troca de uma base química por outra, sendo esta nova base nem sempre de grupo químico diferente, ou seja, a primeira tentativa torna a prática mais poluidora e perigosa tanto para o aplicador quanto para os animais e seus sub produtos. A segunda prática faz com que se esgotem as diferentes bases e grupos químicos, o que deve ser feito com cautela, pois os carrapatos são capazes mais rapidamente de se tomarem resistentes do que as empresas de lançarem novos produtos no mercado (FURLONG & MARTINS, 2000).

A capacidade do *B. microplus* de sobrepor-se à pressão dos acaricidas tem sido enorme, o que tem obrigado os pesquisadores a buscarem continuamente métodos alternativos de controle e aplicá-los de forma integrada no combate a este parasita.

Independente do mecanismo que provoca o aparecimento de resistência e a intensidade em que esta se instalou, a utilização de outros métodos de controle pode diminuir a intensidade de utilização única e exclusiva de produtos químicos, retardando o aparecimento de linhagens resistentes aos acaricidas (LEMOS, 1982).

Enquanto o controle dos carrapatos for baseado principalmente no uso de produtos químicos, cepas resistentes irão continuamente aparecer, mesmo se novos acaricidas forem desenvolvidos, e certamente se um contínuo estoque de novos acaricidas forem acessíveis a indústria, a pecuária enfrentará crise após crise, a menos que outras alternativas e métodos de controle sejam introduzidos. A mais lógica solução para o controle da resistência é a redução no uso de acaricidas (WHARTON, 1967).

### 2.3 O controle biológico

Em resposta a utilização indiscriminada de produtos químicos, os quais vêm provocando grandes danos aos ecossistemas, e aliado a necessidade do homem encontrar novas alternativas para o controle de artrópodes, o controle microbiano vem se destacando principalmente na área de entomologia agrícola (BITTENCOURT, 1992). Além da resistência outro fator que nos leva a pensar na não utilização de produtos químicos, é a produção de alimento orgânico que, nesses tipos de sistema de produção os parasitos são essencialmente controlados por agentes biológicos ou manejados de forma a se manterem em níveis que não causem prejuízos. Os entomopatógenos, que são considerados como importantes fatores na redução da população de pragas, ocorrem naturalmente no ambiente, são aplicados ou introduzidos. Portanto há a necessidade da conservação da população desses agentes microbianos, e para tal é importante sabermos a compatibilidade entre os entomopatógenos e outras práticas utilizadas tanto na agricultura como na pecuária, para evitar perdas da eficiência deste controle natural (HIROSE *et al.*, 2001).

LIPA (1971) relatou que a importância de patógenos no controle de ácaros e carrapatos já foi demonstrada por vários pesquisadores, citando algumas epizootias causadas por vírus, protozoários e fungos.

O primeiro agente utilizado no controle microbiano descrito na literatura foi o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 quando foi testado para o controle de larva de um curculionídeo, importante praga da beterraba. Este fungo tem sido empregado no controle de um grande número de pragas de plantas cultivadas no Brasil, além disso, tem sido testado no controle de espécies das famílias Muscidae, Reduviidae e Culicidae, insetos de importância na saúde pública (ALVES, 1998c). Este entomopatógeno tem sido apontado como um dos mais promissores no controle biológico dos carrapatos (BITTENCOURT, 1999).

No Brasil, já foi descrita infecção artificial de ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* pelo fungo *M. anisopliae*, quando observou-se elevada mortalidade, verificando o desenvolvimento deste fungo na hemolinfa deste 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, 1992).

BITTENCOURT *et al.* (1994b) testaram a ação do fungo *M. anisopliae* isolados Mãe e Bm sobre larvas do carrapato *B. microplus*, através da imersão das larvas em

diferentes suspensões do fungo, onde foi observado um percentual de mortalidade entre 32,67% para a concentração de  $1,6 \times 10^5$  con/ml e 84,67% para a concentração de  $5,1 \times 10^8$  con/ml. Nas análises de próbites realizadas, verificou-se uma CL 50 de  $5,6 \times 10^6$  con/ml para o isolado Mãe e CL 50 de  $2,0 \times 10^6$  con/ml para o isolado Bm.

BITTENCOURT *et al.* (1996) avaliaram os efeitos de *B. bassiana* isolado 986 e isolado 747 nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/ml sobre ovos e larvas de *B. microplus*, foi observada mortalidade das larvas tratadas entre 18,8% a 88%, sendo para a cepa 986 a CL50 de  $6,83 \times 10^6$  conídios/ml e CL 90 de  $5,95 \times 10^8$  conídios/ml, enquanto que para a cepa 747 a CL50 de  $2,49 \times 10^7$  conídios/ml e CL 90 de  $3,69 \times 10^9$  conídios/ml.

ZHIOUA *et al.* (2002) testaram o fungo *M. anisopliae* em cepas de *B. microplus* sensíveis e resistentes a organofosforados e verificou que este fungo é altamente patogênico para ambas as cepas. Suspensões na concentração de  $10^8$  conídios por ml resultaram em 100% de mortalidade, 20 dias após infecção para ambas as cepas.

## 2.4 A compatibilidade

Existem diversas estratégias para a utilização de entomopatógenos no controle de pragas, tais como introdução inoculativa, introdução inundativa, incremento e conservação. A estratégia mais prática e econômica é aquela que se baseia na conservação dos entomopatógenos dentro dos agrossistemas. A conservação pode ser feita através da adoção de técnicas simples, tais como aplicação de agrotóxicos seletivos a esses entomopatógenos (ALVES *et al.*, 1998a).

ALVES *et al.* (1998a) afirmam que pode ocorrer sinergismo entre produtos químicos e produtos biológicos resultando em aumento da eficácia no tratamento de alguns artrópodes resistentes ou menos susceptíveis à produtos químicos.

O uso de produtos químicos incompatíveis com produtos biológicos pode inibir o desenvolvimento e reprodução desses patógenos, afetando o controle da praga alvo e de outros artrópodes. De outro modo, o uso seletivo de produtos é uma importante estratégia para o manejo integrado de pragas, que é um sistema de controle que, no contexto do meio ambiente e da dinâmica da população das espécies de pragas, utiliza todas as técnicas e métodos adequados da melhor forma compatível possível para manter populações de pragas abaixo daqueles níveis que causam danos econômicos consideráveis (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1975). A ação dos produtos químicos sobre os entomopatógenos pode variar desde a inibição do crescimento vegetativo e a conidiogênese, até a ocorrência de mutações genéticas, alterando sua virulência (ALVES *et al.* 1998a). Em alguns casos, produtos químicos compatíveis podem ser associados com fungos entomopatógenos, aumentando a eficiência do controle (MOINO & ALVES, 1998).

CAMARGO (1983) testou os piretróides fenvalerato, cipermetrina, permetrina e deltametrina, misturando-os ao meio de cultura batata-dextrose-ágar, nas concentrações de 30, 60, 120, 240 e 480ppm, exceto para a deltametrina que também foi testada nas concentrações de 7,5 e 15ppm, sendo distribuídos em placas de Petri, onde foi inoculado o fungo *M. anisopliae*. A avaliação foi baseada na medida dos diâmetros das colônias e resultou que todos os produtos inibiram o desenvolvimento do *M. anisopliae* em relação à testemunha. O inseticida que provocou uma maior inibição foi a deltametrina que se refletiu em modificações no aspecto da colônia e que ocorreu na concentração de 30 ppm e superiores. O fungo foi medianamente afetado pela permetrina e fenvalerato e menos afetado pela cipermetrina.

HIROSE *et al.* (2001) verificaram o efeito fungitóxico *in vitro* de três biofertilizantes: E.M.-4 a 3%, Multibion a 5%, Supermagro a 3% e óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss), utilizados na agricultura orgânica, sobre os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Estes produtos foram misturados em meio de cultura, onde os dois fungos estavam inoculados. Os produtos Supermagro e E.M.-4 foram os menos tóxicos para ambos os fungos, Multibion causou maior inibição em *M. anisopliae*, com redução na germinação em 37,74%, no diâmetro das colônias em 30,26% e conidiogênese em 42,62%, enquanto que o óleo de nim provocou maior efeito negativo sobre *H. bassiana*, inibindo a germinação em 45,27%, diâmetro das colônias em 36,62% e conidiogênese em 87,93%.

MOHAMED *et al.* (1987) avaliaram a compatibilidade do fungo *M. anisopliae* com produtos químicos do grupo dos piretróides, relatando não haver inibição nos diferentes estágios de desenvolvimento deste fungo. Em outro experimento, PAIÃO *et al.* (2001a) associaram deltametrina nas doses de 20% a 80% recomendada ao fungo *M. anisopliae* e observaram o crescimento radial da colônia, a esporulação e a viabilidade dos conídios, dentre os diferentes acaricidas, a deltametrina foi a única que não reduziu o crescimento do fungo.

MOINO JR & ALVES (1998) avaliaram o efeito fungitóxico dos inseticidas imidacloprid e fipronil nas doses comerciais e 70% inferior, sobre *R. bassiana* e *M. anisopliae*, por meio do diâmetro das colônias e contagem do número de conídios produzidos por colônia que cresceu em meio de cultura contendo esses inseticidas. O imidacloprid foi menos tóxico que fipronil para ambos os fungos, sendo que o *M. anisopliae* se mostrou menos suscetível que *B. bassiana*. Todas as concentrações testadas foram classificadas como compatíveis segundo metodologia de compatibilidade proposta por ALVES *et al.* (1998a). Uma hipótese levantada pelos autores é o fato de que o microrganismo, ao metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, em um mecanismo de resistência fisiológica, provoque a liberação no meio de moléculas que possa utilizar como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e conidiogênese. Outra possibilidade é de que o fungo, em uma atividade similar ao que ocorre com seres vivos em geral, utilize todo seu esforço reprodutivo quando em presença de um princípio tóxico que altere seu ambiente, prejudicando o seu desenvolvimento, resultando assim, em maiores níveis de crescimento vegetativo e conidiogênese.

MOHAMED *et al.* (1987) relataram o efeito de vários inseticidas no crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios de *M. anisopliae* E9 em experimento laboratorial, através da utilização de discos impregnados com o inseticida, sendo colocados sobre o meio inoculado com o fungo, avaliando então o halo ao redor do disco. Clorpirifós foi o organofosforado mais tóxico para o crescimento micelial e esporulação em todas as concentrações. Temefós, malation e leptofós foram altamente tóxicos para a esporulação enquanto malation foi o maior inibidor da germinação. Os carbamatos, carbofuram, metomil e oxamil foram moderadamente tóxicos para o crescimento micelial e esporulação enquanto oxamil teve efeito adverso sobre a germinação. Os piretróides: piretrina, permetrina e resmetrina, utilizados nas doses até 25.000 ppm não inibiram o crescimento micelial, no entanto, a piretrina e a resmetrina resultaram em baixa esporulação a partir da concentração de 10.000ppm. Os reguladores de crescimento: diflubenzurom e metoprene não inibiram os vários estágios de desenvolvimento deste isolado de *M. anisopliae*. Os hidrocarbonetos clorados clorano, lindano e toxafene foram os mais deletérios que todos os outros grupos de inseticidas testados.

RODRIGUES *et al.* (2002) observaram o crescimento micelial e esporulação de *M. anisopliae* sob a ação de diclorvós associado a cipermetrina, o qual não apresentou ações

inibitórias, constatando que houve ação estimulante em relação ao crescimento.

BATISTA FILHO *et al.* (2001) testaram a compatibilidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* com alguns produtos químicos através da adição deste em meio de cultura, nas doses máximas e mínimas recomendadas pelo fabricante, dentre eles a deltametrina (Decis 25 CE), onde observou acentuada diminuição no número de conídios produzidos na dose máxima e pouca diminuição na produção de conídios na dose mínima. Quanto ao diâmetro da colônia não houve diferença em relação ao controle. Mas segundo a metodologia para a classificação de compatibilidade de ALVES *et al.* (1998a), a deltametrina foi classificada como compatível na dose máxima e moderadamente tóxica na dose mínima, sendo ainda observada grande variação no aspecto da colônia.

PAIÃO *et al.* (2001a) avaliaram o desempenho de *M. anisopliae* submetido a diferentes doses dos carrapaticidas químicos amitraz, cipermetrina, deltametrina, triclorfon, coumafós e ciflutrin, adicionando-os ao meio de cultura nas doses comerciais e até 20% delas. Foram observados o crescimento radial, a esporulação e a viabilidade dos conídios. As doses comerciais dos carrapaticidas prejudicaram o desenvolvimento do fungo nos vários parâmetros avaliados, porém este efeito foi menor nos tratamentos com subdoses. Apenas a deltametrina não reduziu o crescimento do fungo. Os tratamentos com 20% das doses comerciais de amitraz, cipermetrina, triclorfon, coumafós e cyflutrin não interferiram na esporulação. Somente a cipermetrina reduziu significativamente a germinação dos conídios. PAIÃO *et al.* (2001b), em experimento similar ao anterior, avaliaram a compatibilidade do amitraz, cipermetrina, deltametrina, triclorfon, coumafós e ciflutrin com *M. anisopliae* para o controle das fases de ovo, larva e adulto do carrapato *B. microplus*, observando então que a associação do fungo com os carrapaticidas aumentou a mortalidade e reduziu a eclosão de larvas, não tendo efeito sobre a mortalidade das fêmeas.

ALZOGARAY *et al.* (1998) avaliaram o efeito de deltametrina sobre a capacidade de germinação e virulência de *B. bassiana* contra ninfas de *Triatoma infrstans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). Foi observada diminuição significativa da germinação de conídios em proporção ao aumento da concentração do inseticida em meio de cultura líquido. Na mais alta dose aplicada, 550 mg/ml, foi observado retardamento da germinação e interrupção do desenvolvimento do fungo. A exposição de ninfas à concentrações subletais de deltametrina não alterou de forma significativa a virulência de *B. bassiana*.

## 2.5 Efeito dos fungos entomopatogênicos sobre mamíferos.

*Beauveria bassiana* foi inoculada via oral durante 60 dias através da adição do fungo à alimentação e intraperitoneal através da inoculação de suspensão do fungo em ratos e camundongos. Estes animais sofreram eutanásia dias após a inoculação, quando foram realizados exames micológicos e histopatológicos no fígado, pulmão, cérebro e rins. Nenhuma alteração foi encontrada, sugerindo que o fungo assim como sua toxina, a beauvericina, não são tóxicos para mamíferos expostos a esse biopesticida (DAL BELLO *et al.* 2000)

HENKE *et al.* (2002) diagnosticaram e descreveram o primeiro caso de infecção em tecido humano por *Beauveria bassiana* em um paciente que recebia terapia imunossupressiva.

De uma forma geral quando se tratando de agentes biológicos, cuidados básicos no seu manuseio são necessários. Se as técnicas laboratoriais forem tomadas em experimentos realizados com esses entomopatógenos, haverá segurança para operador.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS:

#### 3.1 Localização do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Controle Microbiológico na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EEPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica - RJ, no período de março de 2002 à maio de 2003.

#### 3.2 Obtenção da cepa resistente do carrapato *Boophilus microplus*

Fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram coletadas no horário da manhã, antes da queda da maioria das teleóginas, de animais naturalmente infestados e sem contato recente com carrapaticidas na Estação de Bovinocultura de Leite da PESAGRO, no município de Seropédica, RJ. Esta cepa, foi denominada Granja, e estabelecido seu grau de resistência para deltametrina, segundo LEITE (1988). Após a coleta, as mesmas foram levadas ao laboratório, lavadas em água corrente e em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, secas, identificadas segundo ARAGÃO & FONSECA (1961) e acondicionadas em placas de Petri em número não superior a 15 fêmeas por placa de 12cm de diâmetro e 25 fêmeas por placa de 20 cm de diâmetro em câmara climatizada (BOD) com temperatura e umidade controladas ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR >80%) e escotofase.

#### 3.3 Obtenção e utilização das amostras de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

O isolado de *M. anisopliae* utilizado no experimento foi o 959, isolado no Rio de Janeiro do carrapato *B. microplus*. O isolado de *B. bassiana* utilizado foi o 986, também isolado de *B. microplus* no Estado de São Paulo. Estes isolados são mantidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / USP e pelo Laboratório de Controle Microbiano de artrópodes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

#### 3.4 Elaboração das suspensões de fungos entomopatogênicos

As suspensões de conídios foram preparadas a partir dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* produzidos em meio de arroz em sacos de polipropileno.

Placas de Petri contendo o isolado puro em meio BDA (batata, dextrose e ágar-ágar) foram utilizadas para inoculação em saco de polipropileno contendo arroz. A confecção dos sacos de arroz foi realizada colocando 1Kg de arroz parboilizado em Becker graduado de 2,5l adicionando água destilada até completar o mesmo nível alcançado pelo arroz, o conjunto foi levado ao microondas e cozido por 15 minutos, sendo mexido a cada 3 minutos e após esse tempo deixado em descanso por mais 3 minutos. Após este procedimento o arroz foi escorrido e alíquotas de 60g foram colocadas em cada saco de polipropileno, os quais foram fechados com auxílio de barbante. Os sacos foram

autoclavados durante 20 minutos a 121°C. Após o resfriamento os sacos foram inoculados com uma alíquota de 2 cm<sup>2</sup> do meio de cultura contendo o fungo.

Depois da inoculação dos fungos, foi realizada a homogeneização do meio, e estes levados à câmara climatizada regulada a 27 ± 1°C e fotofase de 16 horas. Sendo homogeneizados diariamente.

Quinze dias após a inoculação, os sacos contaminados foram eliminados e os selecionados foram utilizados para elaboração das diferentes concentrações utilizadas.

Uma porção de arroz contendo o fungo foi homogeneizada em Becker graduado em 100 ml contendo água deionizada e 0,1% de espalhante adesivo (Tween 80). Após homogeneização, uma amostra da suspensão foi colocada na câmara de Neubauer e levada ao microscópio para avaliação do número de esporos encontrados.

A média de contagem por campo (n) foi multiplicada por um fator fixo (n x 4 x 10<sup>6</sup>), o que determinou o número de conídios existentes na suspensão (ALVES & MORAES, 1998b). Utilizando esta metodologia foi preparada uma suspensão na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/ml, e com sucessivas diluições foram preparadas suspensões com 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>5</sup> conídios/ml. Entre cada contagem a câmara de Neubauer foi lavada, enxaguada e seca.

### **3.5 Elaboração da solução de piretróides sintéticos**

Foram elaboradas soluções utilizando o medicamento comercial Butox® (Akzo Nobel LTDA — Divisão Intervet) a base do piretróide sintético deltametrina. Foram preparadas cinco soluções deste produto nas concentrações de 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 ppm, através de diluições sucessivas em água destilada estéril. Estas concentrações foram estabelecidas devido a resultados de um teste piloto, que determinou quais concentrações de deltametrina seriam mais favoráveis a determinação da compatibilidade. Sendo realizado a primeira repetição no período de 22 de novembro de 2002 quando foi realizada a coleta de fêmeas ingurgitadas, até 15 de janeiro de 2003, data onde se realizou a leitura dos dados obtidos. E a segunda repetição no período de 26 de dezembro de 2002 até 16 de fevereiro de 2003.

### **3.6 Ensaio com larvas não alimentadas tratadas com piretróide sintético**

Cada grupo de tratamento foi composto por dez repetições. Cada repetição foi composta por uma alíquota de 50mg de ovos de *B. microplus*, proveniente dos 10 primeiros dias de postura das fêmeas ingurgitadas coletadas. Estas alíquotas foram colocadas em tubos de ensaio de 12cm, tampados com rolhas de algodão hidrófilo e tratados quinze dias após a eclosão das larvas.

Cada tratamento foi imerso durante três minutos, através da inoculação de 1ml de suspensão no interior do tubo de ensaio com auxílio de uma seringa de 10ml graduada acoplada a uma agulha metálica 30x8 estéreis, em cada uma das diferentes concentrações de deltametrina (6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 ppm). Após esse tempo os tubos foram invertidos para que o excesso de líquido fosse absorvido pelo algodão e todos os grupos foram mantidos nas condições de temperatura e umidade controladas (27 ± 1°C e 80%UR) e escotofase. A metodologia utilizada foi adaptada da metodologia de DRUMMOND *et al.* (1971), GRAHAM & DRUMMOND (1964), GRILLO TORRADO & GUTIERREZ (1969) e SHAW (1966). O percentual de mortalidade foi observado 10 dias após os tratamentos.

### **3.7 Ensaio com larvas não alimentadas tratadas com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e suas associações com deltametrina**

Cada grupo de tratamento foi composto por dez repetições. Cada repetição foi composta por uma alíquota de 50mg de ovos de *B. microplus*, proveniente dos 10 primeiros dias de postura das fêmeas ingurgitadas coletadas. Estas alíquotas foram colocadas em tubos de ensaio de 12cm, tampados com rolhas de algodão hidrófilo e tratados quinze dias após a eclosão das larvas.

Cada tratamento foi imerso durante três minutos através da inoculação de 1ml de suspensão no interior do tubo de ensaio, com auxílio de uma seringa de 10ml graduada acoplada a uma agulha metálica 30x8 estéreis, em cada uma das diferentes concentrações do fungo, sendo *M. anisopliae* nas concentrações de  $2,2 \times 10^8$ ,  $2,2 \times 10^7$ ,  $2,2 \times 10^6$  e  $2,2 \times 10^5$  conídios/ml e *B. bassiana* nas concentrações de  $2,4 \times 10^8$ ,  $2,4 \times 10^7$ ,  $2,4 \times 10^6$  e  $2,4 \times 10^5$  conídios/ml. Após esse tempo os tubos foram invertidos para que o excesso de líquido fosse absorvido pelo algodão e todos os grupos foram mantidos nas condições de temperatura e umidade controladas ( $27 \pm 1$ oC e 80%UR) e escotofase. A metodologia utilizada foi adaptada da metodologia de DRUMMOND *et al.* (1971), GRAHAM & DRUMMOND (1964), GRILLO TORRADO & GUTIERREZ (1969) e SHAW (1966).

Para os tratamentos realizados com associação do fungo com a deltametrina, foram aspirados para o interior da seringa 5ml de uma suspensão do fungo e 5ml da solução da deltametrina previamente preparadas com concentrações ao dobro daquela desejada, para que após a mistura se obtivesse então a concentração final esperada dentro da seringa, homogeneizadas e então inoculadas 1 ml em cada tubo conforme descrito.

Todos os tratamentos foram acompanhados de um grupo controle negativo que não recebeu nenhum tratamento e um grupo controle positivo que recebeu água e 0,1% de espalhante adesivo (Tween 80). O percentual de mortalidade foi observado 10 dias após os tratamentos.

### **3.8 Isolamento dos fungos após bioensaios.**

Depois de realizada a leitura do percentual de mortalidade dos grupos tratados, amostras de cadáveres das larvas foram retiradas dos grupos de menores concentrações do fungo assim como das suas associações com todas as concentrações da deltametrina e foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidas em câmara climatizada com temperatura e umidade controladas já descritas. Para crescimento fúngico posterior identificação.

### **3.9 Análise Estatística e Próbites**

Foram realizadas análises não paramétricas, através do teste de Kruskal-Wallis, para verificar se houve variações entre os grupos de tratamento, pois se trata de uma variável discreta e sua avaliação de caráter qualitativo.

O teste de Kruskal-Wallis foi seguido do teste t de Student para comparação entre as ordenações médias e verificar entre quais tratamentos houve diferença significativa, com níveis de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ) (SAMPAIO, 2002).

O fator de resistência foi calculado através da razão entre CL 50 da cepa examinada e a CL 50 da cepa Mozo de referência (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION,

1984), a qual foi determinada por LEITE (1988).

O cálculo matemático das concentrações letais, CL 50 e CL 90 e dos limites de confiança, foram feitos pelo método de análise de próbites, segundo FINNEY (1971) e a realização dos cálculos foram feitas através do programa "Probit or Logit Analysis".

Diferenças entre as concentrações letais foram consideradas significativas quando os limites de confiança não se sobrepuseram.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio com larvas não alimentadas tratadas com piretróide sintético.

O ensaio com larvas não alimentadas tratadas com o piretróide sintético - deltametrina ocorreu em duas etapas, pois foram feitos simultaneamente com os ensaios realizados com os fungos entomopatogênicos associados ou não a deltametrina, para que se procedesse a análise estatística.

Na primeira etapa, na qual também se testou o fungo *Metarhizium anisopliae*, se observou mortalidade progressiva das larvas de *Boophilus microplu.s*, acompanhado o aumento da concentração do piretróide sintético deltametrina. O controle negativo, aquele que não recebeu nenhum tratamento, apresentou média de 2,5% de mortalidade das larvas, enquanto que o controle positivo apresentou 3,2% de mortalidade. Não houve diferença estatística significativa entre eles. A menor taxa de mortalidade foi encontrada na concentração de 0,39 ppm de deltametrina, onde morreram apenas 7% das larvas tratadas. A maior taxa de mortalidade foi de 36,5% na concentração de 6,25 ppm. A CL 50 foi de 10,85 ppm como mostra a Tabela 1 e a CL 90 de 136,71 ppm.

**Tabela I.** Valores das CL50 da deltametrina pura e associada com *Metarhizium anisopliae* (Ma), sobre larvas de *Boophilus microplus* e seus respectivos limites de confiança, equação da regressão e fator de resistência.

	CL 50 (ppm)	Limite de confiança 95%	Equação de regressão	Fator de resistência
Deltametrina	10,85	4,55 - 25,88	$Y = 3,78 + 1,16X$	1261
Ma 10 <sup>5</sup> + Deltametrina	4,39	2,85 - 6,75	$Y = 4,08 + 1,42X$	510
Ma 10 <sup>6</sup> + Deltametrina	3,65	1,86 - 7,16	$Y = 4,54 + 0,81X$	424
Ma 10 <sup>7</sup> + Deltametrina	0,11	$3,43 \times 10^{-2} - 2,53$	$Y = 6,19 + 1,27X$	12
Ma 10 <sup>8</sup> + Deltametrina	$6,06 \times 10^{-9}$	$5,87 \times 10^{-39} - 1,13 \times 10^{23}$	$Y = 6,28 + 0,15X$	$7,04 \times 10^{-7}$

Para a segunda repetição, onde testamos também o fungo *Beauveria bassiana*, observamos dados semelhantes à primeira repetição, pois quanto maior a concentração de deltametrina, maior a taxa de mortalidade das larvas tratadas. O controle negativo apresentou mortalidade de 0%, enquanto o controle positivo apresentou mortalidade média de 2,6%, sem apresentar diferença estatística significativa entre eles. A mais baixa média de mortalidade foi encontrada na concentração de 0,39 ppm de deltametrina que matou apenas 1,1% das larvas tratadas, enquanto que a maior mortalidade foi para a concentração de 6,25 ppm que matou 39% das larvas tratadas. A CL 50 foi de 10,65 ppm, sendo semelhante a CL 50 da primeira repetição, como mostra a Tabela 2 e a CL 90 de 60,38 ppm.

**Tabela 2.** Valores das CL50 da deltametrina pura e associada com *Beauveria bassiana* (Bb), sobre larvas de *Boophilus microplus* e seus respectivos limites de confiança, equação da regressão e fator de resistência.

	CL 50 (ppm)	Limite de confiança 95%	Equação de regressão	Fator de resistência
Deltametrina	10,65	4,05 - 27,97	$Y = 3,24 + 1,70X$	1238
Bb 10 <sup>5</sup> + Deltametrina	5,26	2,99 - 9,24	$Y = 4,14 + 1,19X$	611
Bb 10 <sup>6</sup> + Deltametrina	6,87	4,06 - 11,61	$Y = 3,71 + 1,53X$	798
Bb 10 <sup>7</sup> + Deltametrina	1,78	1,37 - 2,30	$Y = 4,55 + 1,76X$	206
Bb 10 <sup>8</sup> + Deltametrina	0,37	0,19 - 0,74	$Y = 5,46 + 1,09X$	43

Segundo LEITE (1988), a CL 50 para a esta mesma cepa, denominada Granja, no ano do referido trabalho foi de 1,6 ppm, demonstrando no experimento atual que o uso contínuo e indiscriminado do piretróide sintético deltametrina, como por exemplo a utilização de dose mosquicida, não só manteve, mas também aumentou a resistência a esse produto em 6,7 vezes para a primeira repetição com deltametrina e 6,6 vezes para a segunda repetição em relação ao valor da antiga CL 50. Ao compararmos o fator de resistência do atual trabalho com o de LEITE (1988) que era de 186,04 para essa mesma cepa, vemos que o fator de resistência aumentou para 1261 e 1238 para a primeira e segunda repetição respectivamente em relação a cepa sensível Mozo. O fator de resistência foi obtido através da razão entre os valores da CL 50 calculado do presente trabalho com o valor da CL 50 referente a cepa Mozo, obtida por LEITE (1988).

A semelhança entre as CL 50 do primeiro e do segundo ensaio confirma que os dados obtidos provem de uma metodologia confiável, e que através da paridade dos dados nos mostram que mesmo em épocas diferentes em um período inferior a um ano, poderemos obter semelhantes CL 50 já que o manejo com os bovinos e carrapaticidas desta localidade se manteve sem alterações.

No Brasil o controle do *B. microplus* é considerado ainda insuficiente, devido a falta de um monitoramento racional e eficaz no uso de produtos químicos. Este e outros fatores relacionados ao manejo contribuem para o rápido crescimento e manutenção de cepas de carrapatos resistente ou multiresistente a produtos químicos.

O aumento dos indicadores que denunciam a resistência em uma população comprova a teoria de SANGSTER (2001) que afirma que os genes da resistência são inicialmente raros em uma população ou aparecem como raras mutações, assim como por seleção contínua. Portanto isto é herdado, selecionado e multiplicado devido os sobreviventes aos tratamentos que passam genes da resistência para seus descendentes.

#### **4.2 Ensaio com larvas não alimentadas tratadas com *Metarhizium anisopliae*.**

As concentrações fúngicas testadas foram capazes de matar até 96,9% das larvas de *B. microphis* tratadas com a concentração de  $10^k$  conídios/ml, e um percentual de controle de 10% para a concentração de  $10^5$  conídios/ml, sendo a CL 50 de  $1,28 \times 10^7$  e a CL 90 de  $1,85 \times 10^8$ . BITTENCOURT *et al.* (1994b) testaram a ação do fungo *M. anisopliae* isolados Mãe e Bm sobre larvas do carrapato *B. miemplus* e observaram o percentual de mortalidade entre 32,67% para a concentração de  $1,6 \times 10^5$  e 84,67% para a concentração de  $5,1 \times 10^8$ . Nas análises de próbites realizadas, verificaram uma CL 50 de  $5,6 \times 10^6$  conídios/ml para o isolado Mãe e CL 50 de  $2,0 \times 10^6$  para o isolado Bm. Podemos considerar que o percentual de mortalidade para a mais alta concentração dos fungos são semelhantes, enquanto que para a menor concentração encontramos uma disparidade, que pode ser devido à diferença entre as cepas testadas. Essas diferenças entre os percentuais de mortalidade são suficientes para que ocorra a diferença apresentada entre as concentrações letais CL50.

#### **4.3 Ensaio com larvas não alimentadas tratadas com *Metarhizium anisopliae* associado a piretróide sintético.**

Quando associamos o fungo *M. anisopliae* ao piretróide sintético deltametrina, observa-se que em todas as associações a mortalidade se expressou em maior grau que nos tratamentos utilizando unicamente o fungo ou a deltametrina em doses inferiores ou iguais às associadas, exceto para o tratamento com a associação do fungo na concentração de  $10^8$  conídios/ml com a deltametrina a 1,56 ppm, que apresentou menor mortalidade que o fungo sozinho, conforme a Tabela 3.

O desempenho do fungo se torna mais eficiente conforme há o aumento da concentração do piretróide utilizado, o inverso também acontece, pois a deltametrina desempenha um melhor papel quando associada às crescentes concentrações do fungo *M. anisopliae*.

Mesmo verificando o aumento contínuo da mortalidade na maioria das associações, devemos observar que o sinergismo não se expressou com a mesma intensidade em todas as combinações. Podemos considerar que houve sinergismo naquelas associações que apresentaram mortalidade superior estatisticamente, tanto em relação a sua respectiva concentração fúngica sozinha quanto no a sua respectiva concentração de deltametrina sozinha.

Na suspensão com concentração de  $10^5$  conídios/ml, apesar de demonstrar um aumento de mortalidade conforme o aumento da concentração de deltametrina, não se percebeu uma grande diferença entre esses valores. As diferenças somente se tornaram significativas entre o fungo e a associação a partir daquela realizada com 1,56 ppm de deltametrina, mas mesmo assim nenhuma destas se apresentaram diferente das respectivas doses não associadas de deltametrina sozinha, exceto para a última associação desta categoria, ou seja,  $10^5$  con/ml com 6,25 ppm de deltametrina, onde sua mortalidade chegou

a 68% e foi diferente tanto do fungo como da deltametrina isoladamente, demonstrando sinergismo.

**Tabela 3.** Valores médios de mortalidade de larvas de *Boophilus microplus*, obtidos dos tratamentos com *Metarhizium anisopliae*, deltametrina e suas associações em diferentes concentrações.

Concentrações de Deltametrina (ppm)		Concentrações de <i>Metarhizium anisopliae</i> ( con/ml)			
		2,2 x 10 <sup>5</sup>	2,2 x 10 <sup>6</sup>	2,2 x 10 <sup>7</sup>	2,2 x 10 <sup>8</sup>
		10 A, b	16,5 B, b	55 C, b	96,9 D, c
0,39	7 A, bc	13,5 B, b	20 C, b	87 D, d	96,5 D, c
0,78	9 A, c	14 B, b	34 C, c	67 D, c	95,3 E, c
1,56	24 A, d	25 A, c	40 B, c	99,1 C, eg	66,5 D, b
3,12	32 A, e	35 A, d	54 B, d	96 C, de	95,3 C, c
6,25	36,5 A, e	68 B, e	54 C, d	100 D, fg	100 D, d
Controle negativo	2,5 A, a	2,5 A, a	2,5 A, a	2,5 A, a	2,5 A, a
Controle positivo	3,2 A, ab	3,2 A, a	3,2 A, a	3,2 A, a	3,2 A, a

Médias na *mesma* linha com pelo menos uma letra maiúscula igual são equivalentes (p<0,05).

Médias na mesma coluna com pelo menos uma letra minúscula igual são equivalentes. (p<0,05)

A concentração de 10<sup>6</sup> conídios/ml iniciou o sinergismo a partir de um nível mais baixo de deltametrina, 0,78 ppm. Essa concentração com a imediatamente superior, não houve diferença estatística, mesmo obtendo-se valores maiores de mortalidade. As concentrações de 3,12 e 6,25 ppm apresentaram resultado estatístico igual e foram associações sinérgicas.

As associações com a concentração fúngica de 10<sup>7</sup> conídios/ml apresentaram bom desempenho, pois em todas as associações houve um melhor desempenho que suas mortalidades observadas isoladamente, havendo sinergismo em todas elas. Na concentração de 0,78ppm verificamos uma mortalidade inferior (67%) à observada na concentração 0,39ppm, não havendo uma explicação lógica para tal fato. Os melhores resultados foram os encontrados nas concentrações de 1,56 ppm e 6,25 ppm, atingindo um percentual de 99,1% e 100% de mortalidade respectivamente.

Para a mais alta concentração do fungo *M. anisopliae* observamos que a maioria das associações não diferiu estatisticamente da mortalidade encontrada para 10<sup>8</sup> con/ml não associado, não caracterizando portanto sinergismo. Verificou-se uma diminuição do percentual de mortalidade estatisticamente significativo e inferior aos demais tratamentos, quando se associou o fungo com 1,56 ppm de deltametrina. A associação observada desta concentração de fungo com uma concentração de 6,25 ppm de deltametrina apresentou sinergismo, atingindo 100% de mortalidade.

As mais altas mortalidades foram observadas tanto nas associações da deltametrina 6,25 ppm com *M. anisopliae*  $10^7$  con/ml como com a concentração de  $10^8$  con/ml, atingindo 100% de mortalidade em ambas associações. Sendo portanto mais indicado a utilização da concentração fúngica de  $10^7$  conidios/ml, pois não haveria a necessidade de utilizar uma carga fúngica elevada para que se obtivesse mesmo resultado com carga fúngica menor.

Os valores obtidos das CL 50 permitiram constatar que há um aumento da sensibilidade desta cepa de carrapato à deltametrina, quando se utiliza concomitantemente os agentes de controle testados. Quanto mais alta a concentração de fungo associado à deltametrina, menor a CL 50 apresentada, conforme Tabela 1.

Quando as larvas foram tratadas somente com a deltametrina, apresentaram uma CL 50 de 10,85. Este valor apresentou significativa redução quando associamos a deltametrina com o fungo *Meiarhizium anisopliae* na concentração de  $10^5$  con/ml, onde a CL 50 foi de 4,39. Dados semelhantes se apresentaram em seqüência, pois para as concentrações de  $10^6$  con/ml e  $10^7$  con/ml, suas CL 50 foram de 3,65 e 0,11 respectivamente. A CL 50 referente a concentração de  $10^8$  con/ml foi de  $6,06 \times 10^{-9}$  sendo de difícil interpretação, isto devido aos valores médios de mortalidade encontrados serem todos eles muito elevados, sendo possível o cálculo matemático, mas de difícil interpretação.

Os fatores de resistência encontrados conseqüentemente demonstram os mesmos resultados que suas respectivas CL 50, sendo interessante ressaltar que o encontrado para a associação da deltametrina com o fungo *M. anisopliae* na concentração de  $10^7$  con/ml foi menor que o encontrado por LEITE (1988), demonstrando que a associação pode resgatar parcialmente a sensibilidade de uma cepa resistente.

CAMARGO (1983) avaliando o efeito da deltametrina sobre *M. anisopliae* inoculado em meio de cultura verificou a inibição do crescimento da colônia do fungo, alterando seu aspecto em doses superiores a 30 ppm. A concentração de 7,5 ppm utilizada por este autor foi semelhante a de 6,25 ppm utilizada no presente experimento, CAMARGO (1983) não verificou alteração no crescimento da colônia do fungo nessa concentração, verificamos que houve uma mortalidade maior dos grupos associados nesta concentração em relação a deltametrina sozinha (6,25ppm) e também em relação ao fungo sozinho, demonstrando um sinergismo entre esta concentração de deltametrina com as diferentes concentrações do fungo.

Em todas as associações testadas houve crescimento micelial de *M. anisopliae* sobre cadáveres das larvas, no interior do tubo, sobre a rolha de algodão ou mesmo sobre as cascas dos ovos que ficaram no interior do tubo após eclosão das larvas. Amostras foram cultivadas e após 10 dias foram observados em todas as placas examinadas o crescimento micelial e esporulação, sendo então realizada a identificação dos fungos entre lâmina e lamínula, confirmando o reisolamento (PETCH, 1935).

Confirmando os resultados de PALÃO *et al.* (2001a) que observaram que a deltametrina foi o único produto dentre os demais testados por ele que não reduziu o crescimento do fungo.

Segundo MOHAMED *et al.* (1987), os piretróides: piretrina, permetrina e resmetrina, utilizados em doses até 25.000 ppm não inibem o crescimento micelial, porém a piretrina e a resmetrina resultaram em baixa esporulação a partir da concentração de 10.000 ppm. Mesmo que essas concentrações sejam apenas impregnadas em papel de filtro sobre o meio de cultura, o autor verificou que concentrações muito elevadas de piretróides não são capazes de interferir no crescimento micelial do fungo *M. anisopliae*. Estes dados corroboram a hipótese do presente experimento que a deltametrina, também do grupo dos

piretróides, não inibe o crescimento deste fungo, sendo compatível a sua utilização.

BATISTA FILHO *et al.* (2001) avaliaram a deltametrina nas concentrações máximas e mínimas recomendadas pelo fabricante do produto comercial Decis 25 CE<sup>1</sup> em meio de cultura inoculado com *M anisopliae*. Segundo o fator de compatibilidade, a deltametrina se expressou como compatível na dose máxima e moderadamente tóxica na dose mínima (7,5ppm). Esses resultados foram devido a acentuada diminuição no número de conídios produzidos na dose mínima e pouca diminuição na produção de conídios na dose máxima, porém o diâmetro da colônia não apresentou diferença em relação ao controle. Tais dados podem ser discutidos no presente experimento, pois se a deltametrina não inibe o crescimento vegetativo e inibe a conidiogênese, podemos utilizar esse fungo a campo para que se consiga a mortalidade dos artrópodes alvos, porém sem que estes causem epizootias. Com a inibição da conidiogênese o fungo tem limitado potencial de disseminação a campo, mas se seu crescimento vegetativo não foi afetado, este possui capacidade de penetrar e se desenvolver no artrópode, mantendo seu processo de infecção.

PALÃO *et al.* (2001a) e PALÃO *et al.* (2001b) através de seus resultados, corroboram com o presente trabalho, pois mesmo obtendo resultados em que as doses comerciais dos carrapaticidas prejudicaram o desenvolvimento do fungo nos vários parâmetros avaliados, foi verificado que este efeito foi menor nos tratamentos com sub-doses, que são as doses utilizadas no presente trabalho. Observaram também que a associação do fungo com carrapaticida aumentou a mortalidade e reduziu a eclosão de larvas, sendo que a deltametrina não reduziu o crescimento radial do fungo e os resultados obtidos para esporulação e a germinação evidenciam a compatibilidade de sub-doses de deltametrina com o *M anisopliae*.

#### **4.4 Ensaio com larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* tratadas com *Beauveria bassiana***

O percentual médio de mortalidade de larvas na maior concentração fúngica foi de 61% de mortalidade de larvas e para a menor concentração foi de apenas 3%. A CL 50 foi de  $1,78 \times 10^8$  e a CL 90 foi de  $1,81 \times 10^9$ . Observamos então uma diferença entre estes dados e os obtidos por BITTENCOURT *et al.* (1996), que avaliaram os efeitos deste fungo, isolado 986 e isolado 747 na concentração mínima de  $10^4$  e máxima de  $10^8$  conídios/ml, sobre ovos e larvas de *R. microphis*, quando observaram mortalidade das larvas tratadas variando entre 18,8% a 88%, sendo que a CL 50 foi de  $6,83 \times 10^6$  conídios/ml e a CL 90 de  $5,95 \times 10^8$  conídios/ml. Porém em ambos casos, BITTENCOURT *et al.* (1996) e no presente trabalho, a relação de concentração fúngica utilizada e sobrevivência das larvas mantiveram-se inversamente proporcionais, pois quanto maior a concentração fúngica utilizada, menor a sobrevivência das larvas tratadas.

#### **4.5 Ensaio com larvas de *Boophilus microplus* não alimentadas tratadas com *Beauveria bassiana* associado a piretróide sintético.**

Nas associações do fungo *H. bassiana* com as diferentes doses do piretróide sintético utilizado obtivemos uma maior mortalidade que as respectivas doses não associadas tanto do fungo *R. bassiana* quanto da deltametrina, exceto para a associação da deltametrina na concentração de 0,39 ppm com a concentração fúngica de  $10^6$  conídios/ml em relação a solução de deltametrina pura e na concentração de deltametrina na

concentração de 0,39 ppm com a concentração fúngica de  $10^8$  conídios/ml em relação a suspensão de *B. bassiana* pura. Os resultados da mortalidade podem ser verificados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores médios de mortalidade de larvas de *Boophi/us microplus*, obtidos dos tratamentos com *Beauveria bassiana*, deltametrina e suas associações em diferentes concentrações.

Concentrações de Deltametrina (ppm)		Concentrações de <i>Beauveria bassiana</i> (con/ml)			
		$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$
		3 A, a	4,3 A, b c	10,5 B, b	61 C, bc
0,39	1,1 A, a	9,3 B, b	3,2 A, b	19 C, c	47 D, b
0,78	7,1 A, b	19 B,c	8,3 A, c	27 B,c	72 C, c
1,56	7,8 A, b	19 BC, c	17 B, d	26 C, c	77 D, cd
3,12	18 A, c	43,5 BC, d	22,5 AC, d	71,5 D, d	71 D, c
6,25	39 A, d	53,5 A, e	52,5 A, e	88,5 B, d	97,6 B, d
Controle negativo	0 A, a	0 A, a	0 A, a	0 A, a	0 A, a
Controle positivo	2,6 A, a	2,6 A, a	2,6 A, ab	2,6 A, a	2,6 A, a

Médias na mesma linha com pelo menos uma letra maiúscula igual são equivalentes. ( $p < 0,05$ ).

Médias na mesma coluna com pelo menos uma letra minúscula igual são equivalentes. ( $p < 0,05$ )

A mortalidade aumenta conforme aumentamos as concentrações associadas, tanto a deltametrina quanto o fungo desempenham maior eficácia quando associados um ao outro, exceto para a associação da deltametrina com  $10^6$  conídios/ml de *B. bassiana* que obteve menor mortalidade que as observadas nas associações com  $10^5$  conídios/ml deste mesmo fungo, onde esperávamos resultados inversos; como se nessa concentração fúngica, os produtos fossem incompatíveis. O aumento da mortalidade nas associações com *B. bassiana* foi observado em menor grau quando comparada com as observadas nos ensaios com *M. anisopliae*.

As associações deste fungo na concentração de  $10^5$  conídios/ml com a deltametrina, apresentaram bom desempenho, podendo ser classificadas como sinérgicas em todas as concentrações de deltametrina, exceto para a concentração de 6,25ppm de deltametrina.

A concentração de  $10^6$  conídios/ml teve um comportamento inesperado, pois todas as suas associações obtiveram valores de mortalidade iguais ou menores quando comparados com as concentrações fúngicas de  $10^5$  conídios/ml. Dentre as associações com  $10^6$  conídios/ml, a única que apresentou efeito sinérgico foi 1,56 ppm as demais não

demonstraram resultados satisfatórios.

Os resultados obtidos com a concentração de  $10^7$  conídios/ml demonstraram haver sinergismo do fungo com todas as concentrações de deltametrina, porém somente a partir da concentração 3,12 ppm os resultados podem ser considerados satisfatórios, sendo que as concentrações mais baixas apresentaram mortalidade muito inferior, apesar de apresentarem diferenças significativas em relação ao controle.

O fungo na concentração de  $10^8$  conídios/ml quando associado a deltametrina demonstrou sinergismo em apenas um nível de associação, aquele em que se utilizou o fungo com 6,25 ppm, as demais associações foram similares ou inferiores estatisticamente as suas respectivas doses de *B. bassiana* não associada.

Os valores obtidos das CL 50 demonstram que há um aumento da sensibilidade desta cepa de carrapato à deltametrina, quando se utiliza concomitantemente os agentes de controle testados. Quanto mais alta a concentração de fungo associado à deltametrina, menor o valor da CL 50 (Tabela 2).

Quando as larvas foram tratadas somente com a deltametrina, apresentaram uma CL 50 de 10,65. Este valor apresentou significativa redução quando associamos a deltametrina com o fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^5$  con/ml, onde a CL 50 foi de 5,26. Dados semelhantes foram obtidos para as concentrações de  $10^6$  con/ml,  $10^7$  con/ml e  $10^8$  con/ml suas CL 50 foram de 6,87; 1,78 e 0,37 respectivamente. Os fatores de resistência encontrados conseqüentemente refletiram os mesmos resultados das suas respectivas CL 50, sendo interessante ressaltar que o encontrado para a associação da deltametrina com o fungo *B. bassiana* na concentração de  $10^8$  con/ml foi menor que o encontrado por LEITE (1988), demonstrando que a associação pode resgatar parcialmente a sensibilidade de uma cepa resistente.

BATISTA FILHO *et al.* (2001) obtiveram como resultados da adição em meio de cultura de deltametrina das doses máximas e mínimas recomendada pelo fabricante de Decis 25 CE<sup>®</sup>, que o número de conídios produzidos foi drasticamente afetado, porém em maior grau na concentração mínima e em menor grau na concentração máxima. O diâmetro da colônia e a produção de conídios também foram afetados, sendo, portanto, segundo o autor incompatível a deltametrina associada ao fungo *R. bassiana* tanto na dose máxima quanto na dose mínima recomendada pelo fabricante. Estes resultados contradizem o presente experimento, pois nas condições estudadas observamos que as mortalidades obtidas na associação de *R. bassiana* com as diferentes doses de deltametrina foram maiores que as respectivas doses do fungo ou da deltametrina sozinhos. Sendo, na maioria dos casos, a mortalidade da associação maior mesmo que a soma das mortalidades de ambos os agentes utilizados de forma não associada.

Da mesma forma, ALZOGARAY *et al.* (1998) observaram uma diminuição significativa da germinação de conídios em proporção ao aumento da concentração da deltametrina em meio de cultura líquido. Na mais alta dose aplicada foi observado o retardamento da germinação e interrupção do desenvolvimento do fungo. Porém nos experimentos com ninfas de *Triatorna infestans* expostas a concentrações subletais de deltametrina verificou-se que este produto não alterou de forma significativa a virulência de *B. bassiana*. Isto corrobora com a hipótese de que os resultados obtidos na avaliação de um determinado produto associado a meios de cultura é mais intenso e tendo, portanto a capacidade de interferir negativamente no crescimento do agente microbiano, enquanto que em associações utilizadas diretamente sobre a praga alvo, este efeito negativo é muito mais brando, visto que o microrganismo utiliza outras fontes de carboidrato para seu crescimento, além de tornar o experimento mais próximo da realidade em que será utilizada quando aplicado a campo.

Após o fim do ensaio observou-se crescimento de pequenas colônias de *R. bassiana* sobre os cadáveres das larvas, além de se observar também este mesmo crescimento sobre as rolhas de algodão que fechavam os tubos e sobre as cascas dos ovos provenientes da eclosão das larvas. Amostras foram cultivadas e após 10 dias foram observados em todas as placas examinadas o crescimento micelial e esporulação, sendo então realizada a identificação dos fungos entre lâmina e lamínula, confirmando o reisolamento (PETCH, 1935).

#### 4.6 Considerações sobre as associações.

Devemos ressaltar que os testes realizados com defensivos e patógenos normalmente são conduzidos em condições de laboratório, o que superestima a ação dos defensivos sobre os entomopatógenos, já que no campo o tempo de contato do patógeno com o defensivo seria bem menor (MOHAMED *et al.*, 1987). O objetivo das associações entre entomopatógenos e agentes químicos, não é manter o contato direto entre esses agentes, mas sim fazer com que ambos entrem em contato com a praga alvo, para que possam otimizar a sua forma de ação e promover o controle.

Se um determinado produto químico interfere na produção de conídios, ou no crescimento vegetativo, serão igualmente deletérios aos entomopatógenos a uma primeira interpretação. Portanto, se observarmos a maneira como os fungos entomopatogênicos atuam sobre os artrópodes, veremos que produtos que diminuem a conidiogênese, mas não interferem no crescimento vegetativo são mais interessantes que o inverso. Pois, para ocorrer a morte do artrópode necessitamos que o fungo penetre e colonize o corpo da praga, sendo este o principal fator da morte, com isso, podemos então considerar a conidiogênese um fator secundário à sobrevivência do fungo até o controle desta geração da praga tratada.

Por outro lado, se pensarmos em promover uma epizootia no ambiente, os produtos escolhidos não podem afetar o crescimento vegetativo e nem a conidiogênese, pois o fungo para se propagar no ambiente e disseminar seus propágulos, deve realizar o fenômeno da conidiogênese. Este processo será realizado com eficiência se ocorrer o desenvolvimento fúngico sobre o corpo de um artrópode, que é o melhor meio em que se desenvolve um entomopatógeno.

Em relação a interação, podemos dizer que a associação entre entomopatógenos e produtos químicos, pode ocorrer uma interação unilateral ou bilateral, sendo apenas um elemento agindo sobre o outro ou ambos agindo reciprocamente. Como por exemplo o produto químico agindo no entomopatógeno e aumentando ou diminuindo sua capacidade de germinação ou produzir conídios, sendo o inverso passível de ocorrer em menor grau, pois os metabólitos dos fungos também podem interferir no modo de ação do produto químico.

Sendo sinergismo a capacidade do entomopatógeno e do agente químico em realizar suas ações de forma simultânea, sem interferência recíproca, na realização de suas funções, podemos afirmar que no presente experimento, tanto na associação do fungo *M. anisopliae* como *B. bassiana* com a deltametrina houve sinergismo, pois a deltametrina e o fungo agiram sobre as larvas de carrapatos independentemente, a fim de obter um resultado comum, cada um agindo em um determinado sítio diferente, e promovendo a morte de forma eficiente e provavelmente mais rápida que quando utilizados isoladamente. De um modo geral, o uso associado proporciona maior efetividade de ambos os produtos além de levar a uma quebra da resistência.

Os resultados obtidos confirmam a hipótese de ALVES *et al.* (1998a) que afirmam que pode ocorrer sinergismo entre produtos químicos e produtos biológicos resultando em maior eficácia no tratamento de alguns artrópodes resistentes ou menos susceptíveis à produtos químicos. Ainda podemos considerar que os pesticidas podem atuar de forma combinada com agentes entomopatogênicos, através de doses subletais que facilitariam o processo de infecção através de uma debilidade ou estresse ao artrópode, tornando este mais suscetível a ação entomopatogênica ou de toxinas.

Essa associação descrita pode assegurar que, tanto o produto como o patógeno possam ser utilizados em concentrações reduzidas, diminuindo custos, otimizando os benefícios e aumentando a segurança e a eficácia. Devendo ainda ser considerada antes da recomendação de um agente químico, pois representa uma importante ferramenta em um programa de controle integrado. A manutenção dos patógenos naturais deve ser o primeiro objetivo quando se pretende adotar técnicas de controle biológico.

Quando a aplicação de um determinado carrapaticida é interrompida por não produzir mais efeito, a pressão de seleção que favorece os alelos para a resistência fica relaxada, podendo até reverter em favor dos alelos originais para a sensibilidade. Portanto, depois de algumas gerações de seleção reversa, ou seja, depois de algumas gerações sem a pressão de seleção, a população pode tornar-se sensível novamente. Pelo menos em alguns casos, parece que o relaxamento é seguramente seguido por um enfraquecimento da resistência, mas a sensibilidade completa não é recuperada (DOBZHANSKY, 1973 Apud LEMOS, 1982). A utilização do controle biológico na seleção reversa pode contribuir de forma significativa para o reaparecimento da suscetibilidade parcial ou total, pois o controle biológico não estimula de nenhuma maneira a resistência.

Uma hipótese levantada é o fato de que o microrganismo, ao metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, num mecanismo de resistência fisiológica, provoque a liberação no meio de moléculas que possam ser utilizadas como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e conidiogênese. Outra possibilidade é de que o fungo, numa atividade compatível ao que ocorre com seres vivos em geral, utilize todo seu esforço reprodutivo quando em presença de um princípio tóxico que altere seu ambiente, prejudicando o seu desenvolvimento, resultando assim, em maiores níveis de crescimento vegetativo e conidiogênese (ALVES *et al.*, 1998a).

Atualmente os métodos de controle de carrapatos utilizados se fundamentam em tratamentos com produtos químicos, basicamente por não haver outro método que se compare a rápida e alta eficácia, no entanto os efeitos deletérios deste método não são levados em conta, caso se considerássemos estes efeitos, certamente outros métodos de controle já estariam sendo colocados em prática.

A comparação de entomopatógenos com pesticidas químicos convencionais é unicamente pela perspectiva de sua eficácia e custo. Segundo LACEY *et al.* (2001), se os benefícios ambientais incluindo segurança para humanos, animais e outros organismos não alvos, redução de resíduos nos alimentos, preservação do meio ambiente, aumento da atividade de outros inimigos naturais, aumento e conservação da biodiversidade em manejo de ecossistemas fossem tomados em conta suas vantagens seriam numerosas.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos dados analisados, podemos concluir que a associação entre deltametrina e os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pode ser utilizada como ferramenta para o manejo integrado de pragas.

A compatibilidade entre os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e a deltametrina se expressou através do efeito sinérgico entre eles.

Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* quando associados ao piretróide sintético – deltametrina para o tratamento de larvas de uma cepa de *Boophilus microplus* resistente a este piretróide levam a um aumento da sensibilidade destes artrópodes a este produto.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998e. cap. 11, p.289-382.
- ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. cap. 8, p.217-238.
- ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b. cap. 23, p.765-777.
- ALZOGARAY, R.; LUZ, C.; SILVA, I.G.; LECUONA, R.E. TIGRANO, M.S. Effect of deltamethrin on germination and virulence of *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill. On *Triatoma infestans* (Klug.) **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 27, n.4, p. 663-668, dec. 1998.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.
- ARREGUI, L. A.; LARANJA, R. J. & ARTECHE C. C. P. Comparação "in vitro" de duas estirpes de *Boophilus microplus* (Canestrini 1888), sensível e resistente, quanto ao seu comportamento frente ao coumafós 16, dado em concentração que inibe a postura viável de teleóginas em 50%, **C.I.P.V.**, 50, 1974.
- ARTECHE, C. C. P.; ARREGUI, L. A.; LARANJA, R. A. Alguns aspectos da resistência do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) aos carrapaticidas organofosforados no Rio Grande do Sul (Brasil). **Bol. IPVDF.**, v. 3, p. 91-99, 1975.
- ARTECHE, C. C. P.; ARREGUI, L. A. & LARANJA, R. A. Comportamento do Chloromethiuron "in vitro". **Bol. IPVDF.**, v.4, p. 5-11, 1977b.
- ARTECHE, C. C. P.; LARANJA, R. A. & ARREGUI, L. A. O uso atual dos carrapaticidas arsenicais no Rio Grande do Sul (Brasil). **Bol. IPVDF.**, v. 4, p. 13-19, 1977a.
- ARTECHE, C. C. P.; LARANJA, R.J., ARREGUI, L.A. & MACHADO Jr. T. L. Primeiros resultados do combate a uma estirpe de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) resistente no Rio Grande do Sul. **Bol. IPVDF.**, Especial, v. 2, p. 15-24, 1974.
- BARROS, A.T.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 9, n. 1-2, p. 17-21, 1989.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 437-447, sep. 2001.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. **Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. 1992.

105p. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

BITTENCOURT, V.R.E.P. Controle Biológico de Carrapatos. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Vol. 2, Jaguariúna, SP: EMBRAPA. cap. 4, p. 145-171. 1999.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico do *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural, Série Ciência da Vida**, Seropédica, v.16, n. 1-2, p. 4955, jan./dez. 1994a.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural, Série Ciências da Vida**, Seropédica. v.16, n. 1-2, p. 41-47, jan./dez. 1994b.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F.S.; VIEGAS, E.C.; ALVES, S.B. 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.**, v. 5, n. 2, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J.; PERALVA, S.L.E.S.; MASCARENHAS, A.G.; ALVES, S.B. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v 6, n. 1, p.49-52, 1997.

CAMARGO, L.M.P.C.A. Efeito de alguns piretróides sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Biológico**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 65-68, mar. 1983.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**. v. 10, p. 357-384, 2000.

DAL BELLO, G. M.; PADIN, S.M.; CAGLIADA, P.; CARBONE, C.; VASICEK, A. ARCAS, J. Bioactivity of beauvericin (BEA), produced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* in lab rats and mice. **Rev. Toxicol.**, v. 17, n. 1, p. 36-40, 2000.

DOBZHANSKY, T. **Genética do processo evolutivo**. São Paulo: Polígono, 1973. 453p.

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

FINNEY, D.S. **Probit analysis**. 3.ed. Cambridge: University Press, 1971. 333p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. 1975. Rep. FAO Panel of Experts on Integrated Pest Control. 5th. Oct. 15-25, 1974, Rome, Italy: FAO — UN, Meeting Rep. 1975/M/2. 41pp.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES. **Ticks and tick-borne disease control: A practical field manual**, vol. I and II. FAO, Rome, 1984, 621p.

FREIRE, J. F. Arsênio e cloro, resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888). **Bol. Dir. Prod. Anim.**, v. 9, n. 17, p. 3-31. 1953.

FREIRE, J. F. Novas observações sobre o uso do Parathion (Thiofosfato de Dietilparanitrofenila) no combate ao carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) Arseno e cloro resistente. **Bol. Dir. Prod. Anim.**, n.11, p. 5- 25. 1955.

FREIRE, J. F. Carrapato resistente as balneações carrapaticidas no Rio Grande do Sul, combate. **Bol. Dir. Prod. Anim.**, v. 13, n. 25, p. 62-80. 1956.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, n. 8, p. 49-61. 1993.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. **Circ. Téc.** n. 59. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 25p. 2000

GLORIA, M.A.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E.; GRIST, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *Boophilus microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticidas em condições de laboratório. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 2, n. 2, p. 79-84. 1993.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 103p.

GONZALES, J. C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A hora veterinária**, v. 21, n. 125, p. 23-28, 2002.

GRAHAM, O. II.; DRUMMOND, R. O. Laboratory' screening of insecticides for the prevention of reproduction of *Boophilus* ticks. **J. Econ. Entomol.**, v. 57, p. 335-338, 1964.

GRILLO TORRADO, J. M. G.; GUTIERREZ, R. O. Método para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata. Evolución de sensibilidad. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**. serie 4, Patol. Anim., v. 6, n. 14, p.135-158. 1969.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUERRERO, F.D.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J. Use of allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant starins of *Boophilus microplus*. **J. Med. Entomol.** v. 38, n. 1, p.44-50, 2001.

HENKE, M.O.; HOOG, G.S.; GROSS, U.; ZIMMERMANN, G.; KRAEMER, D.; WEIG, M. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n.7, p. 2698-2702, 2002.

- HIROSE, E.; NEVES, P.M.O.; ZEQUÍ, J.A.C.; MARTINS, L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO Jr.; A.M. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 44, n. 4, p. 419-423, 2001.
- HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A hora Veterinária**, v. 4, n. 23, p.12-32, 1985.
- LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAY A, H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? **Biological Control**. v. 21, n. 3, p.230-248, 2001.
- LEITE, R. C. *Boophilus microplus* ( CANESTRINI, 1887 ): Susceptibilidade, Uso Atual e Retrospectivo de Carrapaticidas em propriedades das regiões Fisiogeográficas da Baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma Abordagem Epidemiológica. 1998. 151p. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- LEMOES, A.M. A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato. **Documentos**. n. 6. EMBRAPA, CNPGL, MG., 42p. 1982.
- LIPA, J. J. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H. D. & HUSSEY, N. W. **Microbial control of insects and mites**. 2. ed. London, Academic Press. 1971. cap. 15, p. 357- 374.
- MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil, **The Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.
- MENDES, M.C.; SILVA, M.K.; BRACCO, J.E. Teste bioquímico para determinar a resistência de duas cepas do carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 10, n. 2, p.61-65, 2001.
- MOHAMED, A.K.; PRATT, J.P.; NELSON, F.R. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. **Mycopathologia**, v. 99, n. 2, p. 99105, 1987.
- MOINO JR, A.M.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tennisi*. **An. Soc. Entomol. Brasil**. v. 27, n. 4, p. 611-619, 1998.
- NOLAN, J. & ROULSTON, W. J. & SCHNITZERLING, H. J. The potencial of some synthetic pyrethroids for control of the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Aust. Vet. Jour.**, v. 55, p. 463-466, 1979.
- NOLAN, J., ROULSTON, W. J. Acaricide resistance as a factor in the mangement of acari amedical and veterinary importance. **Rec. Advan. Acarol.**, v. 2, p.3-13, 1979.
- NOLAN, J.; ROULSTON, W. J. & WHARTON, R. II. Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT-resistant strain of *Boophilus*. **Pestic. Sci.**, v. 8, p.484-486, 1977.
- NOLAN, J.; WILSON, J. T.; GREEN, P. E. & BIRD, P. E. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Aust. Vet. Jour.**, v. 66, n. 6,

p.179-182, 1989.

NUÑEZ, J.L.; MUTIOZ-COBENAS, M.E. & MOLTEDO, H.L. *Boophilus microplus lu gurruputu comum del ganado vacuno*. 1. ed., Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1982. 184p.

OLIVEIRA, T. C. G.; PATARROYO, J. H. & MASSARD, C. L. Susceptibilidade de amostras de *Boophilus microplus* (Canestrini,1887), do Rio de Janeiro, Brasil, a carrapaticidas Organothsforados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 38, p. 204-214, 1986.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos utilizados no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: VII SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2001b, Poços de Caldas. **Anais**. Minas Gerais: p. 1 17.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Desempenho de *Metarhizium anisopliae* submetidos a diferentes doses de carrapaticidas químicos usados no controle de *Hoophihis microphrs* (Acari: Ixodidae). In: VII SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2001a, Poços de Caldas. **Anais**. Minas Gerais: p. 160.

PATARROYO, J. H.; COSTA J. O. Susceptibility of brazilian samples of *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. **Trop. Anim. Walt. Prod.**, v. 12, n. I, p. 6-10, 1980.

PEREIRA, M.C. *Boophilus microplus: Revisão taxionômica e morfo-biológica*. 1980. 126p. Tese (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

PETCH, T. Notes on Entomogenous Fungi. **Trans. of the Brit. Mycol. Soc.**, v. 19, p 5575, 1935.

RODRIGUES, J.A.R.; SANTOS, G F; ATHAYDE, A.C.R.; LIMA, E.A.L.A. Características comportamentais de *Metarhizium anisopliae* após passagem em meio de cultura mais acaricida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais**. RJ, 2002. 1 CD.

ROULSTON, W.J.; WHAR'TON, R.H.; NOLAN, J.; KERR, J.D ; WILSON, J.T.; THOMPSON, P.G.; SCHOTZ, M. A survey for resistance in cattle ticks to acaricides. **Aust. Vet. J.**, v. 57, n. 8, p. 362-371, 1981.

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

SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**. v. 98, n. 1-3, p. 89-109, 2001.

SHAW, R.D. Culture of na organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) and an assessment of its resistance spectrum. **Bull. Entomol. Res.**, v. 56, p. 389-405, 1966.

SOBZHANSKY, T. **Genética do processo evolutivo**. São Paulo: Poligono, 1973. 453p.

SOLOMON, K.R. Acaricide resistance in ticks. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v. 27, p. 273-296, 1983.

SUTHERST, R.W., COMINS, H.N., The management of acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*, in Australia. **Bull. Entomol. Res.**, v. 69, p. 519-537, 1979.

WHARTON, R. H. Tick-borne livestock diseases and their vectors: 5. Acaricide resistance and alternative methods of tick control. **World. Anim. Rev.(FAO)**, v. 20, p. 8-15, 1976.

WHARTON, R.H. Acaricide resistance and cattle tick control. **Aust. Vet. J.**, v. 43, p. 394-398, 1967.

WHARTON, R.H.; ROULSTON, W.I. Resistance of ticks to chemicals. **Ann. Vet. Entomol.**, v. 15, p. 381-404, 1970.

ZHIOUA, E.; REVULCABA, M.F.; GINSBERG, H.S.; VASQUEZ, Z.G. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus *Meiarhizium anisopliae* for controlling organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TICKS AND TICK BORNE PATHOGENS, 4., 2002, Canada. **Resumos.**, 2002, p. 90.