

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

DISSERTAÇÃO

**Efeito de Formulações Oleosas de Fungos Entomopatogênicos no Controle
do Carrapato *Rhipicephalus microplus*.**

Mariana Guedes Camargo

2011



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

**EFEITO DE FORMULAÇÕES OLEOSAS DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO CARRAPATO
*Rhipicephalus microplus.***

MARIANA GUEDES CAMARGO

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Agosto de 2011

636.208969

62

C172e

T

Camargo, Mariana Guedes, 1985-
Efeito de formulações oleosas de
fungos entomopatogênicos no controle
do carrapato *Rhipicephalus microplus*
/ Mariana Guedes Camargo - 2011.
45 f. : il.

Orientador: Vânia Rita Elias
Pinheiro Bittencourt.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 38-45.

1. Bovino - Parasito - Teses. 2.
Carrapato - Controle biológico -
Teses. 3. Óleos minerais - Teses.
4. *Rhipicephalus* - Teses. I.
Bittencourt, Vânia Rita Elias
Pinheiro, 1959-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

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

MARIANA GUEDES CAMARGO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

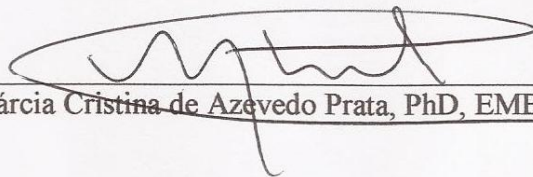
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/08/2011



Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. (Ph.D.) UFRRJ



Everton Kort Kamp Fernandes. (Dr.) UFG



Márcia Cristina de Azevedo Prata, PhD, EMBRAPA.

Dedico este trabalho aos meus pais Agostinho e Vera Lúcia, a minha irmã Anna Carolina, ao meu fofuxo Rodrigo, e a todos os meus familiares e amigos que fizeram parte dele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* por ter guiado meus passos e iluminado meu caminho, sempre me amparando e protegendo em todos os momentos. Agradeço a professora *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por compartilhar comigo todo seu conhecimento, e pelos momentos nos quais, com sua sabedoria, soube me tranquilizar e mostrar o caminho certo. Agradeço a minha mãe *Vera Lúcia Ferreira Guedes*, ao meu pai *Agostinho Jorge dos Reis Camargo* e a minha irmã *Anna Carolina Guedes Camargo* pela dedicação e amor incondicional. Obrigada pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Sem vocês nada disto seria possível, amo muito vocês! Ao meu noivo *Rodrigo Neumann Barros Ferreira* por estar sempre ao meu lado me apoiando, me incentivando, e me mostrando que eu era capaz. Obrigada pela paciência nos momentos de nervosismo e por todo amor dedicado a mim. Fofuxo, você é especial, te amo! A minha sogra e amiga *Regina Célia Ferreira Barros* pelo carinho e momentos de descontração. Valeu Rê! Ao meu avô *Paulo Camargo* e a todos os meus tios e tias, primos e primas pelo apoio e carinho, vocês estão no meu coração! A minha grande amiga e madrinha *Tatiana Rodrigues* que, mesmo a distância, se fez presente com suas palavras de conforto e carinho. A minha querida amiga *Virginia Coimbra Zuvanov* que, desde o primeiro dia de Rural esteve presente não só na minha vida acadêmica como também na minha vida pessoal, me apoiando em todos os momentos. Vir, te adoro! A minha companheira de casa, de laboratório e, principalmente minha amiga *Patrícia Silva Gôlo*, que me acompanha desde a graduação e que contribuiu em cada etapa deste trabalho. Obrigada por tudo Pati! A *Isabele da Costa Angelo* e *Ana Paula Rodrigues de Moraes Badini* pelos preciosos ensinamentos científicos e, principalmente pela amizade e carinho. Obrigada amiguinhas! Ao *Huarrisson Azevedo Santos* pela atenção, além das balinhas e cafés roubados do seu laboratório! A *Wendell Marcelo de Souza Perinotto*, *Simone Quinelato Bezerra* e *Caio Márcio de Oliveira Monteiro* pelas idéias e críticas, e por estarem sempre dispostos a ajudar nos experimentos, além da preciosa amizade. Amigos, com certeza nossas reuniões nas quartas-feiras acrescentaram além dos limites profissionais, obrigada por tudo, amo vocês! Aos companheiros de laboratório *Fillipe Araujo de Sá* e *Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues* pela ajuda nos experimentos e convívio. Aos colegas de turma pelo apoio e momentos de descontração. Aos funcionários da Estação Experimental W. O. Neitz e do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ que contribuíram para a realização deste trabalho. A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela dedicação e ensinamentos. Agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro. A todos, os meus sinceros agradecimentos, vocês fazem parte desta vitória!

BIOGRAFIA

Mariana Guedes Camargo, filha de Agostinho Jorge dos Reis Camargo e Vera Lúcia Ferreira Guedes, nasceu em 10 de maio de 1985, na cidade de Rio Preto, MG.

Em maio de 2005 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído em dezembro de 2009. Foi estagiária do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, de janeiro a julho de 2007, o que permitiu que fosse bolsista de Iniciação Científica deste laboratório de agosto de 2007 a janeiro de 2010. Durante este período participou de congressos e trabalhos científicos.

Em março de 2010 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Desde então tem apresentado trabalhos em congressos e participado de trabalhos científicos.

RESUMO

CAMARGO, Mariana Guedes. **Efeito de formulações oleosas de fungos entomopatogênicos no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2011. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A utilização de formulações de fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos tem sido amplamente estudada. O presente estudo avaliou a eficácia de formulações do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) e Bb 986 de *Beauveria bassiana* contendo 10%, 15% e 20% de óleo mineral sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, além de comparar a eficiência entre formulações oleosas e suspensões aquosas dos mesmos isolados fúngicos sobre as fases do desenvolvimento do carrapato *R. microplus*. Foram formados doze grupos: controle aquoso e controles com 10%, 15% ou 20% de óleo mineral, suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* e formulações de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* contendo 10%, 15% ou 20% de óleo mineral. Para o preparo das suspensões aquosas e formulações oleosas, os isolados fúngicos foram cultivados em grãos de arroz acondicionado em sacos de polipropileno. As suspensões e formulações conidiais utilizadas possuíam concentração de 10^8 conídios/mL. Os bioensaios foram repetidos duas vezes. Os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas foram avaliados; em relação aos ovos foram avaliados os períodos de incubação e eclosão e o percentual de eclosão, e para larvas foi avaliado o percentual de mortalidade. As formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. e de *B. bassiana* foram mais eficazes sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* do que as suspensões aquosas. O isolado de *M. anisopliae* s.l. formulado em óleo mineral causou alterações significativas em todos os parâmetros de fêmeas ingurgitadas, entretanto, as formulações oleosas do isolado de *B. bassiana* alteraram significativamente somente o índice nutricional. Os isolados fúngicos de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* formulados em óleo mineral apresentaram percentual de controle de até 93,69% e 21,67%, respectivamente, enquanto que o percentual de controle das suspensões aquosas de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* foi de 18,70% e 1,72%, respectivamente. No tratamento de ovos, as formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* causaram redução no percentual de eclosão de até 102,5 e 3,64 vezes, respectivamente. No bioensaio com larvas, as formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. causaram um percentual de mortalidade próximo a 100% no quinto dia após o tratamento, enquanto que as formulações de *B. bassiana* atingiram este percentual somente no 20º dia após o tratamento. Os grupos controle contendo óleo mineral causaram mortalidade de larvas a partir do 15º dia após o tratamento, indicando um possível efeito tóxico do óleo sobre este estágio de *R. microplus*. Os resultados demonstram que o isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. foi mais virulento para fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *R. microplus* do que o isolado Bb 986 de *B. bassiana*. As formulações oleosas dos fungos testados foram mais eficazes do que as suspensões aquosas. O óleo mineral utilizado nas concentrações de 10%, 15% e 20% potencializa a ação dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. e Bb 986 de *B. bassiana* contra o carrapato *R. microplus*, podendo ser utilizado como adjuvante em formulações oleosas.

Palavras-chave: controle biológico, carrapato dos bovinos, óleo mineral.

ABSTRACT

CAMARGO, Mariana Guedes. **Effect of oil-based formulations of entomopathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks.** 2011. 45p. Dissertation (Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The formulations of entomopathogenic fungi to control ticks has been widely studied. The present study evaluated the efficacy of *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) and *Beauveria bassiana* oily formulations on different *Rhipicephalus microplus* stages. The efficacy of conidial aqueous suspensions was compared to the efficacy of conidia formulated in 10, 15 or 20% mineral oil. Twelve groups were studied: one control aqueous, three control groups oil-based at 10%, 15% or 20%, two fungal aqueous suspensions of *M. anisopliae* s.l. or *B. bassiana* and *M. anisopliae* s.l. or *B. bassiana* oil-based formulations at 10%, 15% or 20%. To prepare aqueous suspensions and oily formulations, fungal isolates were cultivated on grains rice in polypropylene bags. The conidial suspensions and formulations had concentration of 10^8 conidia/mL. Bioassays were repeated twice. After treatment, the biological parameters of engorged females were evaluated; the following parameters were evaluated in the bioassays with eggs: period of incubation, period of hatch and hatching percentage; in bioassays with larva mortality was evaluated. *Metarhizium anisopliae* s.l. and *B. bassiana* oil-based formulations were more effective than aqueous suspensions to *R. microplus* eggs, larvae and engorged females. *Metarhizium anisopliae* s.l. oil-based formulations caused significant effects in all biological parameters of engorged females while *B. bassiana* oil-based formulations modified significantly the nutritional index only. *Metarhizium anisopliae* s.l. and *B. bassiana* formulated in mineral oil caused a control percentage up to 93.69% and 21.67%, respectively, while *M. anisopliae* s.l. and *B. bassiana* aqueous suspension caused a control percentage of 18.70% and 1.72%, respectively. Eggs treated with *M. anisopliae* s.l. and *B. bassiana* oil-based formulations had reduced percentage of hatch up to 102.5 and 3.65 times, respectively. In the bioassay with larvae, *M. anisopliae* s.l. oil-based formulations caused approximately 100% mortality five days after treatment, while larva treated with *B. bassiana* oil-based formulations reached 100% mortality only at day 20 after treatment. Larva from oil-based control groups had mortality at day 15 after treatment, indicating possible toxic effect off the oil for this *R. microplus* stage. The results showed that *M. anisopliae* s.l., Ma 959 isolate, was more virulent to *R. microplus* engorged females, eggs and larvae than *B. bassiana*, Bb 986 isolate. The fungal mineral oily formulations tested were more effective than the aqueous suspension. Oil-based formulations at 10%, 15% or 20% enhances the activity of *M. anisopliae* s.l., Ma 959, and *B. bassiana*, Bb 986, to *R. microplus* tick and can be used as an adjuvant for oily formulations.

Keywords: biological control, cattle tick, mineral oil.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados fúngicos com suas respectivas espécies, hospedeiro e local de origem. 12
- Tabela 2.** Concentrações de conídios dos fungos *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana*, nas suspensões aquosas e formulações oleosas utilizadas no tratamento de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. 13
- Tabela 3.** Valores médios e desvio padrão do peso inicial da fêmea, período de pré-postura, período de postura, período de incubação e período de eclosão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ 20
- Tabela 4.** Valores médios e desvio padrão do percentual de eclosão, índice de produção de ovos, índice nutricional e eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ 21
- Tabela 5.** Valores médios e desvio padrão do peso inicial da fêmea, período de pré-postura, período de postura, período de incubação e período de eclosão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ 22
- Tabela 6.** Valores médios e desvio padrão do percentual de eclosão, índice de produção de ovos, índice nutricional e eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ 23
- Tabela 7.** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l. e Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ 24
- Tabela 8.** Valores médios e desvio padrão do período de incubação, período de eclosão e do percentual de eclosão de larvas provenientes de ovos de *Rhipicephalus microplus* tratados por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidos sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ 25
- Tabela 9.** Valores médios e desvio padrão do período de incubação, período de eclosão e do percentual de eclosão de larvas provenientes de ovos de *Rhipicephalus microplus* tratados por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidos sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ 26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade no 5° e 10° dia após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.
..... 27
- Figura 2.** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade no 5°, 10°, 15°, 20° e 25° dia após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.
..... 28
- Figura 3.** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* dos grupos controle, seis dias após o tratamento. A: grupo controle aquoso; B: grupo controle com 10% de óleo mineral; C: grupo controle com 15% de óleo mineral; D: grupo controle com 20% de óleo mineral.
..... 30
- Figura 4.** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l.. A: sexto dia após tratamento com suspensão aquosa; B: terceiro dia após tratamento com formulação contendo 10% de óleo mineral; C: terceiro dia após tratamento com formulação contendo 15% de óleo mineral; D: terceiro dia após tratamento com formulação contendo 20% de óleo mineral. 31
- Figura 5.** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 14 dias após o tratamento com o isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*. A: grupo tratado com suspensão aquosa; B: grupo tratado com formulação contendo 10% de óleo mineral; C: grupo tratado com formulação contendo 15% de óleo mineral; D: grupo tratado com formulação contendo 20% de óleo mineral. 32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	2
2.2	Controle Microbiano Utilizando Fungos Entomopatogênicos	3
2.3	Efeitos de Fatores Ambientais sobre Fungos Entomopatogênicos	5
2.3.1	Temperatura	5
2.3.2	Umidade	7
2.3.3	Radiação	8
2.4	Formulação de Fungos Entomopatogênicos	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Localização e Período de Realização do Experimento	12
3.2	Obtenção e Manutenção das Colônias de <i>Rhipicephalus microplus</i>	12
3.3	Obtenção e Manutenção dos Fungos	12
3.4	Preparo das Suspensões e Formulações Fúngicas	13
3.4.1	Suspensão aquosa	13
3.4.2	Formulação oleosa	13
3.5	Delineamento Experimental	14
3.6	Viabilidade dos Conídios	14
3.7	Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas	14
3.8	Bioensaio com Ovos	15
3.9	Bioensaio com Larvas	15
3.10	Reisolamento dos Fungos após Bioensaios	16
3.11	Análise Estatística	16
4	RESULTADOS	17
4.1	Viabilidade dos Conídios	17
4.2	Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas	17
4.2.1	Peso das fêmeas ingurgitadas	17
4.2.2	Período de pré-postura	17
4.2.3	Período de postura	17
4.2.4	Período de incubação	18
4.2.5	Período de eclosão	18
4.2.6	Percentual de eclosão	18
4.2.7	Índice de produção de ovos	18
4.2.8	Índice nutricional	19
4.2.9	Eficiência reprodutiva	19
4.2.10	Percentual de controle	24
4.3	Bioensaio com Ovos	24
4.3.1	Período de incubação	24
4.3.2	Período de eclosão	24
4.3.3	Percentual de eclosão	25
4.4	Bioensaio com Larvas	26
4.4.1	Percentual de mortalidade	26
4.5	Reisolamento dos Fungos	29

5	DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes pertencentes à classe Arachnida e parasitam muitas espécies de vertebrados, sejam anfíbios, répteis, aves ou mamíferos. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1888 (Murrel e Barker, 2003), é um ectoparasito de grande importância para a pecuária, pois é responsável por perdas econômicas de ordem mundial. Além disto, este parasito causa lesões na pele do hospedeiro que predispõem o aparecimento de miíases, anemia, perda de peso e da qualidade do couro, e transmite agentes patogênicos que provocam graves enfermidades.

Na tentativa de controlar este ectoparasito os produtores utilizam indiscriminadamente produtos químicos, contribuindo, desta forma, com a contaminação do ambiente e de produtos de origem animal, com o desenvolvimento de cepas de carrapatos resistentes aos carrapaticidas atuais e com o desequilíbrio ecológico devido à redução de predadores naturais. Em resposta à utilização inadequada de produtos químicos, aliada à necessidade de encontrar novas alternativas para o controle de artrópodes, o controle microbiano vem se destacando.

Os fungos entomopatogênicos são candidatos a agentes de controle biológico com grande potencial de sucesso. Dentre eles, destacam-se as espécies *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) e *Beauveria bassiana*, que já tiveram sua eficácia comprovada em estudos científicos sobre vários estágios evolutivos de diferentes espécies de artrópodes.

Sob condições laboratoriais, os fungos entomopatogênicos demonstram-se eficazes no controle de artrópodes, porém em condições naturais, esta eficiência diminui, pois a ação biológica destes entomopatógenos é dependente de vários fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, exposição à radiação solar direta, saturação de água no solo e a presença de fatores fungistáticos no solo. Dentre estes fatores abióticos que interferem na ação dos entomopatógenos em condições ambientais, a temperatura, a umidade relativa e a radiação solar são os mais importantes. Temperaturas elevadas ou muito baixas, assim como as radiações ultravioleta UV-A e UV-B, podem inviabilizar a utilização de fungos entomopatogênicos antes mesmo destes entrarem em contato com o hospedeiro. Já a umidade relativa interfere principalmente na germinação dos conídios, sendo que a maioria dos entomopatógenos necessita de valores elevados de umidade.

Devido a influência das condições ambientais na ação de entomopatógenos a campo, a utilização de formulações que mantenham a viabilidade e patogenicidade destes patógenos vem se mostrando eficiente no controle biológico de artrópodes. Os óleos minerais e vegetais, quando adicionados a suspensões fúngicas, atuam protegendo os conídios das condições ambientais desfavoráveis, além de promover maior adesão dos conídios à superfície do artrópode.

Apesar de se conhecer a importância de formulações na manutenção da viabilidade, virulência e eficácia de entomopatógenos no controle de artrópodes, mais estudos são necessários para o desenvolvimento de formulações eficientes.

O presente trabalho integra a linha de pesquisa Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica e Veterinária desenvolvida na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e teve como objetivo avaliar a eficácia de formulações oleosas nas concentrações de 10%, 15% ou 20% de óleo mineral, dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. e Bb 986 de *B. bassiana* sobre ovo, larva e fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, além de comparar a eficácia entre formulações oleosas e suspensões aquosas dos mesmos fungos sobre as fases de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus, conhecido como o carrapato dos bovinos, é um parasito obrigatório de origem asiática, e foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais pela importação do gado bovino (WHARTON, 1974). Encontra-se amplamente distribuído entre os paralelos 32° de latitude norte e 35° de latitude sul, ou seja, na América Central, América do Sul, Austrália, Oriente, Sul da África e da Flórida (NUÑEZ et al., 1982). No Brasil, fatores como as condições climáticas, com exceção do inverno no sul do país, e a disponibilidade de raças européias de bovinos favoreceram a dispersão de *R. microplus* por todo o país (GRISI et al., 2002).

Murrel e Barker (2003) observaram, através de estudos moleculares e morfológicos, que algumas espécies pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* são mais estreitamente relacionadas às espécies do gênero *Boophilus* do que a outras espécies de *Rhipicephalus*. Sugeriram então, que *Boophilus* fosse um subgênero do gênero *Rhipicephalus*. Dessa forma, segundo a classificação taxonômica de Murrel e Barker (2003), as cinco espécies pertencentes ao gênero *Boophilus* foram transferidas para *Rhipicephalus* subgênero *Boophilus*.

O ciclo de vida do carrapato *R. microplus* é dividido em duas fases: uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária. A fase de vida livre se inicia com a queda da fêmea ingurgitada ao solo, começando então o período de pré-postura, que dura de dois a três dias. Em seguida, inicia-se o período de postura, que pode variar de três a seis semanas, seguido do período de eclosão das larvas, que varia de cinco a dez dias (FURLONG, 1993). Para que as larvas se tornem infectantes são necessários de dois a três dias após a eclosão, havendo então o fortalecimento da cutícula. A fase de vida parasitária se inicia com a fixação da larva no hospedeiro, ocorrendo em seguida a alimentação, a troca da cutícula, o desenvolvimento para os estágios de ninfa e adulto, o acasalamento, o ingurgitamento e a queda da fêmea ao solo para a postura. Este período dura, em média, de 18 a 26 dias. O macho permanece por mais tempo no hospedeiro e copula com outras fêmeas (FURLONG, 1993).

O carrapato *R. microplus* causa grande impacto econômico devido, principalmente, a sua interferência na pecuária. Grisi et al. (2002) estimaram que só no Brasil este prejuízo é de aproximadamente dois bilhões de dólares por ano. Estas perdas ocorrem devido à desvalorização do couro, à espoliação sanguínea, ao atraso no desenvolvimento dos animais, à queda na produção, ao aumento do custo da mão de obra, aos gastos com materiais utilizados para o controle desta parasitose e pela transmissão de patógenos causadores de doenças como a babesiose (HORN; ARTECHE, 1985). Segundo Furlong (1993), no momento da espoliação sanguínea, a fêmea de *R. microplus* causa intenso desconforto ao bovino, impedindo, assim, que este paste adequadamente, o que gera uma diminuição na conversão alimentar em carne ou leite.

Atualmente, o controle de carrapatos é feito basicamente através do uso de carrapaticidas que, em sua maioria, são organofosforados, amidinas, piretróides, avermectinas, reguladores do crescimento ou inibidores de muda. A utilização inadequada destes produtos tem gerado um aumento progressivo dos casos de resistência de carrapatos e, conseqüentemente, um aumento na frequência da aplicação de acaricidas, com a presença de resíduos desses produtos no leite e na carne (MENDES et al., 2007). Além disso, a utilização indiscriminada de produtos químicos contribui para a poluição ambiental e para o desequilíbrio ecológico devido à redução de predadores naturais (NORVAL et al., 1992).

A necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos de controle de carrapatos é crescente, já que a utilização exclusiva de carrapaticidas está a cada dia menos viável em

termos práticos e econômicos (BARROS; EVANS, 1989). Outros métodos de controle de carrapatos são propostos, como: 1) o uso de animais geneticamente resistentes, 2) o desenvolvimento de vacinas, 3) o gerenciamento de pastagem com alternância de espécies, 4) o controle biológico, 5) a rotação de pastagem e 6) a introdução de machos estéreis na população (PENNA, 1990; LEAL et al., 2003). Dentre estas alternativas, o controle microbiano vem se destacando, e os fungos entomopatogênicos mostrando-se agentes promissores no controle microbiano (BITTENCOURT et al., 1992).

2.2 Controle Microbiano Utilizando Fungos Entomopatogênicos

Na tentativa de diminuir a utilização de produtos químicos e os danos por eles causados, novas alternativas para controle de carrapatos vem sendo estudadas. O controle microbiano representa um ramo do controle biológico, que, por sua vez, trata da utilização racional de patógenos, visando a manutenção da população de pragas a níveis não significativos economicamente.

Em 1726, Réaumur fez a primeira classificação de um entomopatógeno ao identificar um fungo do gênero *Cordyceps* atacando um lepdóptero. No Brasil, um dos primeiros relatos de um entomopatógeno atacando um artrópode foi feito por Pestana em 1923, quando referiu-se ao fungo *Penicillium anisopliae* como um agente promissor no controle de *Tomaspis* spp. Posteriormente, foram feitos novos relatos a patógenos em artrópodes, que contribuíram para o desenvolvimento do controle microbiano no Brasil. Dentre estas referências podem ser citadas: Bittencourt em 1934, que relatou a ocorrência de alguns fungos entomopatogênicos sobre pragas de citros, Pereira em 1937, quando referiu-se ao nematóide *Rhabditis hambletoni* como semiparasito para a broca-do-algodoeiro, e a epizootia de *Metarhizium anisopliae* s.l. sobre *Mahanarva posticata* (a cigarrinha da cana-de-açúcar) em 1964, que chamou a atenção dos pesquisadores (ALVES, 1998).

O controle microbiano possui uma série de vantagens que favorecem a utilização de patógenos no controle de artrópodes, tais como: especificidade e seletividade do patógeno em relação ao artrópode-alvo; alta patogenicidade apresentada por alguns agentes de controle; capacidade de multiplicação e dispersão do mesmo no ambiente; facilidade de produção do agente patogênico em condições laboratoriais; associação do entomopatógeno a inseticidas químicos; facilidade de aplicação; segurança em relação à poluição ambiental e à saúde de seres humanos e animais; efeitos secundários, ou seja, além de causar a mortalidade do artrópode, o patógeno tem ação sobre as gerações subseqüentes, entre outras (ALVES, 1998).

Os fungos são importantes inimigos naturais de artrópodes. A capacidade destes microorganismos em agir sobre todos os estágios evolutivos do hospedeiro, bem como sua virulência relativamente específica os tornam agentes promissores no controle microbiano (SAMISH et al., 2004). Além disso, a grande variabilidade genética destes entomopatógenos é uma de suas principais vantagens no controle microbiano (ALVES, 1998).

O mecanismo de penetração dos fungos entomopatogênicos é uma característica que favorece a sua utilização como agentes no controle microbiano, já que estes são capazes de penetrar através da cutícula do artrópode e não necessitam ser ingeridos (MADELIN et al., 1967). Segundo Zimmermann (2007a), esta infecção pode ser dividida nas seguintes etapas: 1) fixação dos conídios na cutícula, 2) germinação, 3) penetração através da cutícula, 4) superação da defesa imunológica do hospedeiro, 5) proliferação no interior do hospedeiro, 6) crescimento sobre o hospedeiro morto e 7) produção de conídios. O modo de infecção destes patógenos é alvo de muita pesquisa, visando principalmente caracterizar fatores de virulência que possam melhorar este processo de infecção (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Bittencourt et al. (1995) constataram que a principal forma de penetração de *M. anisopliae* s.l. em *R. microplus* é pelo tegumento, visto que não evidenciaram a infecção dos carrapatos

pelas cavidades naturais através de técnicas histológicas. Esta constatação foi comprovada por Bittencourt et al. (1999), ao descreverem pela primeira vez o mecanismo de infecção do fungo *M. anisopliae* s.l. em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, através da microscopia eletrônica de varredura. Neste trabalho estes pesquisadores observaram a fixação dos conídios na cutícula das fêmeas, a germinação do conídio, a formação do tubo germinativo a partir de conídios germinados e o início da dilatação da extremidade deste tubo, formando uma estrutura denominada de apressório.

Mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos têm sido relatadas, porém apenas dez destas espécies foram ou estão sendo utilizadas no controle microbiano de artrópodes (SAMISH et al., 2004). Vários destes entomopatógenos são naturalmente associados a carrapatos e alguns demonstram alta virulência em condições de laboratório (BITTENCOURT et al., 1994; REIS et al., 2001; FERNANDES et al., 2004, FERNANDES et al., 2006; ANGELO et al., 2010). De todos os gêneros e espécies de fungos testados, *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* foram os mais virulentos. Portanto, estes são os fungos entomopatogênicos mais investigados quanto ao seu potencial para o controle de espécies de carrapatos do mundo inteiro (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

O fungo *B. bassiana* foi estudado pela primeira vez com detalhes em 1835 por Agostino Bassi, quando comprovou que este patógeno era o agente da muscardine branca, uma patologia que acomete o bicho-da-seda (*Bombyx mori*). Esta espécie fúngica é cosmopolita, sendo a mais freqüente sobre insetos e amostras do solo. Em condições laboratoriais, pode colonizar a maioria dos insetos (ALVES, 1998). A espécie *B. bassiana* é caracterizada por sua coloração branca, posteriormente amarelada ou ocasionalmente avermelhada, o reverso é incolor ou amarelo-rosado. Os conídios são hialinos, com morfologia variando de globosa a elipsoidal (ZIMMERMANN, 2007a).

O primeiro relato de *B. bassiana* em carrapatos foi feito por Samsinakova (1957), onde uma fêmea de *Ixodes ricinus* coletada na natureza estava naturalmente infectada. Atualmente muitos pesquisadores avaliam a eficácia desta espécie fúngica em diversas espécies de carrapatos.

Bittencourt et al. (1997) avaliaram a eficácia *in vitro* de dois isolados de *B. bassiana* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, onde evidenciaram um baixo percentual de eclosão das larvas nos grupos tratados com os isolados fúngicos, havendo um decréscimo progressivo neste parâmetro conforme aumentava a concentração das suspensões fúngicas e, conseqüentemente, o percentual de controle foi mais elevado nos grupos tratados com as maiores concentrações. Fernandes et al. (2006) confirmaram o potencial patogênico de *B. bassiana* para *R. microplus*, pois todos os 50 isolados testados apresentaram efeito letal sobre as larvas não alimentadas do carrapato.

Prette et al. (2005) ao avaliarem a patogenicidade de três isolados de *B. bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus*, observaram redução no percentual de eclosão de larvas oriundas de ovos tratados, e no percentual de ecdise de larvas e de ninfas. Reis et al. (2001) verificaram a mortalidade *in vitro* de ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* infectados por *B. bassiana*, onde os grupos tratados aumentaram consideravelmente a mortalidade proporcionalmente ao aumento da concentração de conídios nas suspensões, sugerindo o controle de *A. cajennense* por este fungo.

O gênero *Metarhizium* parasita uma grande variedade de espécies de artrópodes, sendo frequentemente isolado do solo e encontrado nos trópicos e regiões temperadas (ALVES, 1998). Geralmente são esverdeados quando esporulam sobre os cadáveres de seus hospedeiros ou em meio de cultura (BISCHOFF et al., 2009).

A espécie *M. anisopliae* foi originalmente descrita por Metschnikoff em 1879 como *Entomophthora anisopliae*, sendo posteriormente transferida para o gênero *Metarhizium* por Sorokin (1883) (ZIMMERMANN, 2007b). Recentemente, Bischoff et al. (2009) através de

estudos filogenéticos, morfológicos e moleculares, concluíram que a espécie *M. anisopliae* é na verdade um complexo formado por sete espécies: *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. majus*, *M. lepidiotae* e *M. guizhouense*. Os isolados de *M. anisopliae* que ainda não foram re-classificados de acordo com Bischoff et al. (2009) devem ser considerados pertencentes a um complexo de espécies e identificados da seguinte forma: *M. anisopliae* sensu lato.

Atualmente, *M. anisopliae* é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados como agente no biocontrole de insetos-praga (ZIMMERMANN, 2007b). Sua patogenicidade é amplamente testada para diversas espécies de carrapatos, como *R. microplus*, *R. sanguineus*, *R. appendiculatus*, *Anocentor nittens*, *Ixodes scapularis*, *A. cajennense*, *A. variegatum*, *A. maculatum*, *A. americanum*, entre outros (BITTENCOURT et al., 1994; KAAAYA et al., 1996; SOUZA et al., 1999; BENJAMIN et al., 2002; MONTEIRO et al., 2003; HORNBOSTEL et al., 2004; KIRKLAND et al., 2004; LOPES et al., 2007; LEEMON; JONSSON, 2008).

Embora a virulência dos fungos entomopatogênicos já tenha sido comprovada em condições de laboratório, sua eficácia diminui consideravelmente quando são testados a campo. O desempenho de fungos entomopatogênicos é afetado por uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, radiação solar, chuvas e ventos, além do microclima no habitat em que o entomopatógeno vive (INGLIS et al., 2001).

2.3 Efeitos de Fatores Ambientais sobre Fungos Entomopatogênicos

A propagação e sobrevivência de qualquer microorganismo no meio ambiente é fortemente afetada por vários fatores bióticos e abióticos. Os mais importantes condicionantes ambientais abióticos para os fungos são a temperatura, a umidade relativa e a radiação solar (ZIMMERMANN, 2007a). Segundo Alves (1998) o efeito dos fatores ambientais é mais evidente durante as fases de disseminação, germinação e penetração dos entomopatógenos do que durante a fase de colonização, quando o patógeno está em desenvolvimento, no interior do inseto.

Dentre os microrganismos utilizados no controle biológico, os fungos entomopatogênicos são os mais susceptíveis às condições climáticas adversas, já que o método de infecção ocorre via cutícula, necessitando da germinação na superfície externa do inseto hospedeiro, ficando assim mais expostos aos fatores ambientais, diferente dos patógenos que utilizam as aberturas naturais do artrópode para a infecção (ROBERTS; YENDOL, 1971).

2.3.1 Temperatura

A temperatura pode afetar um entomopatógeno de diferentes maneiras, já que influencia na germinação, no crescimento e na viabilidade do microorganismo sobre o hospedeiro e no ambiente. Este fator climático é de grande importância para fungos entomopatogênicos, pois afeta seu metabolismo de forma geral, alterando os processos de produção de toxinas e enzimas, a germinação de conídios, o desenvolvimento do tubo germinativo, a penetração, colonização e reprodução (ALVES, 1998).

Altas temperaturas podem inativar um entomopatógeno antes do contato com o inseto hospedeiro, assim como pode reduzir ou acelerar o crescimento dentro do inseto, dependendo dos requisitos de temperatura do entomopatógeno e do inseto hospedeiro. Já as baixas temperaturas podem reduzir ou impedir a germinação e crescimento de um entomopatógeno e, desta forma, prejudicar ou prolongar uma infecção bem sucedida (ZIMMERMANN, 2007a).

A maioria dos fungos entomopatogênicos é mesófila, com crescimento entre 10 °C e 40 °C e temperatura ótima entre 25 °C e 35 °C (COONEY; EMERSON, 1964; ROBERTS; CAMPBELL, 1977). A faixa de temperatura na qual o fungo *M. anisopliae* geralmente cresce é entre 15 °C e 35 °C, e a temperatura ótima para a germinação e crescimento é entre 25 °C e 30 °C (ROBERTS; CAMPBELL, 1977; ALVES et al., 1984). A temperatura máxima encontrada para o crescimento micelial de *M. anisopliae* s.l. varia entre 37 °C e 40°C (WALSTAD et al., 1970; FARGUES et al., 1992), entretanto, a temperatura de germinação e crescimento varia consideravelmente entre os isolados desta espécie fúngica. Yip et al. (1992) observaram que alguns isolados de *M. anisopliae* s.l. que crescem a 5 °C não crescem em temperaturas elevadas (37 °C), já os isolados que crescem a 37 °C não crescem em baixas temperaturas (5 °C); outros isolados desta espécie fúngica não crescem nem a 5 °C nem a 37 °C, mas crescem a 25 °C.

Para *B. bassiana*, a temperatura mínima para seu crescimento é de 5 °C e a máxima varia entre 30 °C e 38 °C. A temperatura ideal para a germinação e crescimento deste fungo varia entre 23 °C e 28 °C, dependendo do isolado (ROBERTS; CAMPBELL, 1977). Em condições ambientais (temperatura entre 15 °C e 38 °C), os conídios não formulados de *B. bassiana* podem perder a viabilidade em 60 dias, enquanto que os conídios já formulados podem atingir até 8 meses de viabilidade (ALVES et al., 1996).

Os entomopatógenos podem sofrer a ação de elevadas temperaturas por um curto período, enquanto os animais estão sob luz solar direta, ou por um longo período, como de 1 a 3 semanas, tempo durante o qual os artrópodes se alimentam em partes quentes do corpo do hospedeiro (MENT et al., 2010). Por isso, para o desenvolvimento de mico-acaricidas para o controle de ectoparasitas de vertebrados de sangue quente, se faz necessária a seleção de isolados de fungos que sejam eficazes em temperaturas relativamente elevadas (MENT et al., 2011). Outros motivos que destacam a importância da seleção de isolados de entomopatógenos capazes de se desenvolverem em temperaturas mais elevadas são: a atuação sobre artrópodes em áreas tropicais e subtropicais, a manutenção da estabilidade dos conídios ou do produto formulado, e a infecção do artrópode e crescimento do patógeno na temperatura de superfície do corpo do mamífero (ZIMMERMANN, 2007b). Segundo Ment et al. (2011) isolados de fungos que cresceram melhor em 34 °C *in vitro* também foram mais patogênicos para *R. microplus in vivo* entre 31 °C e 35 °C.

Diversos trabalhos têm sido realizados visando selecionar isolados resistentes a diferentes temperaturas, avaliando a termotolerância dos mesmos. Fernandes et al. (2010) avaliaram a tolerância ao calor ($45 \pm 0,2$ °C) e a atividade ao frio (5 °C) de diversas espécies e isolados do fungo *Metarhizium*, e após 8 horas de exposição a elevadas temperaturas observaram que todos os isolados até então classificados como *M. anisopliae* variedade *anisopliae* (Ma-an) e os isolados de *Metarhizium* do complexo *flavoviride* (Mf) apresentaram germinação conidial relativa (GR) igual a zero, enquanto os isolados de *M. acridum* demonstraram alta tolerância a temperaturas elevadas (70–100% GR); em relação a atividade ao frio, após quinze dias de exposição a baixa temperatura, as GRs para os isolados de Ma-an e *M. acridum* foram igual a zero, já os dois isolados de Mf testados apresentaram alta atividade ao frio.

O efeito da temperatura de superfície do corpo de animais de sangue quente na germinação, crescimento e virulência de quatro isolados de *M. anisopliae* s.l. foi avaliado sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) annulatus*. Os isolados de *M. anisopliae* s.l. avaliados foram divididos em dois grupos de acordo com suas características térmicas: um grupo composto por isolados que germinaram (90–100%), cresceram e infectaram os carrapatos a 25 °C, 30 °C e 35 °C, e o outro grupo composto por isolados que recuperaram sua habilidade de germinar relativamente rápido após incubação a temperatura favorável, depois de tê-la perdido durante choque térmico (37 ou 40 °C por 6-48 horas). Estes resultados demonstram a

interferência da temperatura de superfície do corpo dos animais na eficiência de infecção dos isolados fúngicos e a importância em selecionar isolados que sejam mais termotolerantes (MENT et al., 2011).

Rangel et al., (2005) observaram uma grande variabilidade na termotolerância de 16 isolados do fungo *M. anisopliae* s.l. e de um isolado de *M. acridum*, após serem expostos as temperaturas 40 °C e 45 °C por 2, 4, 8 e 12 horas. Em geral, isolados provenientes de latitudes mais elevadas foram mais termotolerantes quando comparados a isolados provenientes de localidades mais próximas a Linha do Equador.

Fernandes et al. (2008) também observaram grande variabilidade na termotolerância e atividade ao frio de 59 isolados de *Beauveria* spp. e um isolado de *Engyodontium album* (= *Beauveria alba*) e na atividade ao frio de oito isolados de *Metarhizium* spp.. Estes isolados fúngicos eram provenientes de diferentes regiões geográficas, diferentes artrópodes hospedeiros ou substratos. Em baixa temperatura (5 °C) a maioria dos isolados de *B. bassiana* germinaram bem, diferente dos isolados de *M. Anisopliae* s.l., dos quais somente um apresentou atividade a frio; os isolados ARSEF 252 e GHA de *B. bassiana* se mostraram mais resistentes, apresentando alta termotolerância e atividade a frio, já o isolado de *E. albus* (UFPE 3138) foi o mais susceptível às situações de estresse. Isolados de *B. bassiana* oriundos de latitudes mais elevadas foram mais ativos ao frio quando comparados a isolados de regiões próximas a linha do Equador, porém não houve correlação semelhante para tolerância ao calor.

2.3.2 Umidade

A umidade é de extrema importância não só para a sobrevivência do artrópode como também para o entomopatógeno, atuando nas fases de disseminação, germinação e penetração, sendo também um fator limitante para a reprodução de algumas espécies (ALVES, 1998).

A germinação dos conídios sobre a cutícula do carrapato e a esporulação após a morte do artrópode exigem alta umidade, porém alta ou baixa umidade associada a elevadas temperaturas pode causar a inviabilidade dos conídios (ZIMMERMANN, 2007a). O intervalo de umidade relativa para a germinação dos conídios dos isolados de *B. bassiana* é, geralmente de 92% a 100%, entretanto têm sido relatado fungos infectando insetos sob umidade relativamente baixa, como 60%-70% (ZIMMERMANN, 2007a). Geralmente, isolados do fungo *M. anisopliae* s.l. necessitam de alta umidade relativa para germinar, sendo que o melhor percentual de germinação dos conídios deste fungo foi observado a 100% de umidade relativa (WALSTAD et al., 1970).

Para Alves et al. (2002) a temperatura e umidade, ou umidade atmosférica de armazenamento, são os principais fatores que influenciam na longevidade dos conídios, sendo variável de acordo com a temperatura, o fotoperíodo, a formulação utilizada, o tipo de propágulo, a espécie e o isolado fúngico.

O impacto da umidade na germinação *in vitro* de 11 isolados de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* oriundos de substratos coletados no peridomicílio rural do Brasil Central foi testado, e os autores concluíram que a umidade influencia diretamente no início e no progresso da germinação dos conídios dos isolados testados, já que quando estes foram submetidos a atividade de água ideal ($> 0,99 a_w$) começaram a germinação entre quatro e oito horas de incubação, e quando foram submetidos a uma atividade de água inferior a $0,93 a_w$ houve um atraso no início da germinação da maioria dos isolados fúngicos investigados. (LAZZARINI, et al., 2006).

Bateman et al. (1993) observaram uma infecção bem sucedida do fungo *M. acridum* (*M. flavoviride*) formulado em óleo sobre gafanhotos do deserto, sob condições de campo,

com umidade relativa baixa (20%-30%). Hedgecock et al. (1995), ao avaliarem a influência do teor de umidade sobre a termotolerância e armazenamento de *M. acridum* em formulação oleosa, observaram que a viabilidade diminui sob alta temperatura e umidade relativa elevada.

A influência da temperatura e umidade relativa na formação de clamidósporos do fungo *M. anisopliae* em ovos de carrapato foi estudada pela primeira vez por Ment et al. (2010). Este estudo demonstrou que sob alta umidade (cerca de 100%) e temperatura moderada (25 °C) o fungo emergiu dos ovos e formou conidióforos e conídios, porém ao elevar a temperatura (30 °C) ou reduzir a umidade (55–75%) induziu-se a formação de clamidósporos dentro dos ovos, sem conidiogênese; quando os ovos com clamidósporos maduros foram devolvidos às condições adequadas (25 °C e 100% UR), a conidiogênese foi recuperada.

Segundo Lanza et al. (2009), a temperatura, a umidade e o tipo de solo podem afetar, não só agindo isoladamente, mas também combinados, a persistência do conídio, a mortalidade do hospedeiro e a esporulação do fungo sobre o cadáver do inseto. O efeito da temperatura e do teor de umidade do solo na sobrevivência do fungo *M. anisopliae* em três diferentes tipos de solo foi investigado, quando observou-se alta influência destes fatores na sobrevivência do fungo; os valores mais elevados de crescimento e sobrevivência do isolado fúngico foram observados nas temperaturas de 21,5 °C e 26,8 °C, enquanto que, no solo incubado a 31,5°C, o fungo cresceu pouco, e a população declinou rapidamente; houve rápido crescimento do isolado fúngico em 65% de umidade, porém foi observado um declínio na população no 112º dia; nos teores de 35% e 100% de umidade o crescimento foi menor, porém o fungo sobreviveu por mais tempo no solo (LANZA et al., 2009).

2.3.3 Radiação

Para Alves (1998), a radiação pode estimular, não influenciar ou prejudicar o desenvolvimento de patógenos no campo, dependendo do tipo de microorganismo, da fase de desenvolvimento e da natureza e quantidade de radiação à qual ele é exposto. Alguns fatores devem ser considerados ao avaliar a influência da radiação solar sobre os entomopatógenos, como a faixa de luz visível e diferentes comprimentos de onda que a compõem, o fotoperíodo e a faixa germicida do ultravioleta, que representa o principal agente de inibição dos patógenos (ALVES, 1998).

A radiação solar, principalmente as frações UV-A (330 - 400 nm) e UV-B (290 - 330 nm) é um dos fatores ambientais que mais afeta a viabilidade e persistência dos entomopatógenos a campo. Geralmente, poucas horas de exposição direta ao sol de meio dia no verão em regiões de clima tropical ou temperado são suficientes para inativar totalmente os conídios de praticamente todos os entomopatógenos já estudados, além de atrasar a germinação dos conídios (revisado por FERNANDES et al., 2007).

Alta variabilidade da tolerância a UV-B de 60 isolados de *Beauveria* spp. oriundos de diferentes localidades foi encontrada, tendo variado de 0% a 80%, aproximadamente. Além disso, foi observado um atraso na germinação dos conídios de isolados que resistiram à radiação. Entre os isolados de *B. bassiana* provenientes de 0º a 22º de latitudes, os oriundos de localidade com menor latitude foram estatisticamente mais tolerantes a radiação UV-B do que os isolados oriundos de menores latitudes (FERNANDES et al., 2007).

A tolerância de conídios à radiação solar é um fator importante para a utilização dos fungos como agentes no controle de insetos. Pesquisadores avaliaram a tolerância à UV-B de 20 isolados de *B. bassiana* oriundos de insetos de diversas localidades, e após exposição dos conídios a um gradiente de radiação UV-B observaram perdas de 50%, 75% e 95% na viabilidade dos mesmos, e concluíram que, devido a grande variabilidade na tolerância a

radiação, se faz necessário selecionar isolados tolerantes a UV-B para a utilização destes como agentes no controle microbiano de artrópodes (HUANG; FENG, 2009).

2.4 Formulação de Fungos Entomopatogênicos

Devido à interferência negativa de fatores bióticos e abióticos sobre a virulência de entomopatógenos utilizados no controle microbiano de artrópodes, a formulação adquire grande importância. Segundo Alves (1998), formular um entomopatógeno consiste em acrescentar a ele substâncias que irão melhorar seu desempenho no campo, facilitar seu manuseio e aplicação e, principalmente, permitir o armazenamento sob condições nas quais se minimize os custos, com perda mínima da qualidade do produto.

Os componentes presentes nas formulações devem contribuir para a manutenção da viabilidade, virulência e eficácia do microorganismo, levando em consideração as condições ambientais e de armazenamento do composto. Os adjuvantes são ingredientes que podem ou não estar presentes em uma formulação, e quando presentes atuam otimizando a atividade do microorganismo e melhorando as características do produto formulado, tendo função fotoprotetora e antievaporante. Além do patógeno e do adjuvante, os ingredientes inertes, também chamados de veículos diluentes, absorventes e atrativos são componentes importantes de uma formulação. Estes veículos apresentam grande influência no armazenamento e conservação do patógeno formulado, podendo causar a inativação do microorganismo quando não selecionados adequadamente (ALVES, 1998).

Polar et al., (2005) avaliaram o efeito de suspensão aquosa, formulações a base de óleo de coco e de parafina líquida e óleos adjuvantes emulsionáveis a base de óleo de coco e de parafina líquida sobre a germinação de conídios do fungo *M. anisopliae* s.l.. Estes autores observaram que a maioria dos veículos testados não influenciaram negativamente na germinação dos conídios, já que esta variou de 86,0% a 95,4% 24 horas após o tratamento, com exceção do óleo adjuvante emulsionável de coco, que gerou um percentual de germinação de 10,9% 24 horas após o tratamento, sugerindo que este óleo atrasa o crescimento e desenvolvimento deste isolados fúngico.

Já foram relatados efeitos tóxicos de veículos ou adjuvantes utilizados em formulações, não só sobre o entomopatógeno, como também sobre o artrópode alvo. Abdel-Shafty e Soliman (2004) testaram o efeito de cinco óleos essenciais de plantas contra ovos embrionados, larvas não alimentadas e fêmeas alimentadas do carrapato *Rhipicephalus annulatus* (= *Boophilus annulatus*), quando observaram que o óleo da planta *Lavandula officinalis* foi mais tóxico para ovos, seguido pelos óleos de *Mentha piperita*, de *Ocimum basilicum*, de *Marjorana hortensis* e de *Mentha viridis*; para larvas, o óleo mais tóxico foi o de *O. basilicum* seguido dos óleos de *L. officinalis*, de *M. hortensis*, de *M. piperita* e de *M. viridis*; o óleo da planta *M. hortensis* foi o mais tóxico para fêmeas alimentadas, seguido dos óleos de *O. basilicum*, de *M. piperita*, de *L. officinalis* e de *M. viridis*. Com estes resultados os autores concluíram que os óleos essenciais das plantas testados possuem efeito tóxico em todos os estágios de desenvolvimento de *R. annulatus* utilizados experimentalmente.

Um diluente de micoinseticidas (uma emulsão de água em óleo) tem sido amplamente utilizado na China para diluir formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. (PENG E XIA, 2011). Esta emulsão desenvolvida por Xia et al. (2002), se mantém estável em até 12 meses de armazenamento e mistura-se facilmente com formulações oleosas, além de potencializar a virulência do isolado fúngico em condições de baixa umidade, possivelmente devido ao fornecimento de água necessária para a germinação do conídio. Peng e Xia (2011) confirmaram esta teoria ao investigarem o mecanismo de ação deste diluente através da avaliação da virulência, velocidade de invasão e viabilidade de conídios de *M. anisopliae* s.l. formulados em óleo e diluídos nesta emulsão. Estes pesquisadores concluíram, através de

bioensaios e técnicas moleculares, que o diluente potencializa a virulência do isolado fúngico formulado em óleo em condições de baixa umidade relativa, sem interferir na termotolerância e tolerância a UV-B dos mesmos.

A escolha do tipo de formulação é de extrema importância para o sucesso do biocontrole, e depende da tecnologia de aplicação, do patógeno e do artrópode envolvido. Existem vários tipos de formulações, dentre estas podem ser citadas: pó e pó-molhável, grânulos, concentrado emulsionável, óleo emulsionável, suspensão concentrada, pastas, encapsulados, iscas, entre outras (ALVES, 1998).

Diversos trabalhos têm avaliado o efeito de diferentes tipos de formulações na eficiência de fungos entomopatogênicos. Souza et al. (2009) avaliaram a ação do fungo *B. bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens* em teste de campo, e observaram que os grupos tratados com o fungo associado ao gel polimerizado obtiveram um percentual de controle superior a 50%, enquanto os grupos tratados com a suspensão aquosa obtiveram percentuais de controle inferiores a 20%, desta forma, sugeriram que a utilização do composto gel associado a *B. bassiana* potencializa a virulência do entomopatógeno.

Alves et al. (2001), quantificaram e compararam o espalhamento e a eficiência de formulações do fungo *M. anisopliae* s.l. em óleo adjuvante emulsionável a uma suspensão aquosa com 0,05% de Tween 80, a uma formulação de óleo de amendoim e a uma formulação formada pela mistura de dois óleos minerais (50% Shellson T e 50% Ondina EL), e observaram que as formulações oleosas apresentaram um melhor espalhamento em relação as suspensões a base de água. Observaram também que as formulações de óleo adjuvante emulsionável aumentaram a infectividade do fungo em larvas de *Tenebrio molitor* e foram mais eficientes que o fungo em base aquosa e tão eficientes quanto às oleosas.

Os óleos minerais e vegetais têm sido amplamente testados como adjuvantes em formulações. Estes visam promover maior adesão dos conídios à superfície dos artrópodes e propiciar uma maior proteção à radiação ultravioleta (SOUZA, 2003). Outras vantagens da utilização de formulações de micoinseticidas em base oleosa são: menor dose letal requerida, menor efeito evaporativo sobre o produto aplicado, propriedades quitinofílicas incrementando a adesão e infectividade, e maior período de armazenamento do produto formulado quando comparado às suspensões aquosas (PRIOR et al., 1988).

Diversos pesquisadores avaliaram a eficiência de formulações a base de diferentes óleos no controle microbiano. Leite et al. (1993) ao compararem o efeito do óleo de soja e do óleo mineral na proteção do fungo *B. bassiana* contra a radiação ultravioleta, observaram que o óleo mineral foi mais eficiente.

Angelo et al. (2010) avaliaram a eficiência do fungo *Lecanicillium lecanii* sobre fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas do carrapato *R. microplus* utilizando uma formulação a base de óleo mineral e suspensões aquosas do entomopatógeno. Estes pesquisadores obtiveram melhores resultados com a utilização da formulação oleosa, pois, em geral, as fêmeas tratadas com esta formulação morreram antes de iniciarem a postura, o que gerou um percentual de controle de 97,6; os ovos tratados com a formulação oleosa ficaram inviáveis e as larvas tratadas com esta formulação apresentaram 100% de mortalidade. As suspensões aquosas também causaram alterações nos parâmetros analisados, porém significativamente menores às causadas pela formulação oleosa.

Kaaya e Hassan (2000) avaliaram a ação dos fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* em suspensão aquosa e formulação a base de óleo de amendoim, sobre todos os estágios de desenvolvimento de *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum*, em condições de campo. Estes autores observaram 100% de mortalidade em larvas, de 80% a 100% em ninfas e de 80% a 90% em adultos de ambas as espécies de carrapato tratadas com a formulação oleosa dos dois isolados fúngicos citados acima. A suspensão aquosa também

provocou mortalidade, porém significativamente menor quando comparada à formulação oleosa.

Polar et al. (2005) compararam o efeito de *M. anisopliae* s.l. em suspensão aquosa e formulação de óleo de coco, formulação de parafina líquida, óleo adjuvante emulsionável de coco e óleo adjuvante emulsionável de parafina líquida em fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Houve uma redução significativa no tempo médio de sobrevivência das fêmeas tratadas com as formulações fúngicas a base de óleo de coco ou óleo adjuvante emulsionável de parafina líquida quando comparado a suspensão aquosa. Não houve diferença significativa entre o tempo médio de sobrevivência das fêmeas tratadas com a formulação a base de parafina líquida e a suspensão aquosa, já a formulação a base de óleo adjuvante emulsionável aumentou o tempo médio de vida das fêmeas.

O uso de óleos minerais ou vegetais em formulações de entomopatógenos representa uma vertente crescente entre os atuais produtos formulados. Isto se dá, principalmente, pelo aumento na eficácia do controle de alguns artrópodes, já que o óleo mantém a viabilidade dos fungos entomopatogênicos sob condições de baixa umidade relativa do ar, assim como permite a aplicação de produtos em Ultrabaixo volume (UBV) (SOUZA, 2003). Segundo Prior et al. (1988) a tecnologia UVB se revelou eficaz, provavelmente devido a uma maior adesão de conídios na superfície hidrofóbica do artrópode.

A formulação em que os conídios são aplicados é de fundamental importância para o biocontrole de carrapatos, pois atua na manutenção da viabilidade, virulência e eficácia dos entomopatógenos a nível de campo, promovendo maior adesão dos conídios à superfície dos artrópodes e propiciando proteção contra as condições ambientais adversas. Diversas informações sobre formulações de fungos utilizados para o controle de carrapatos podem ser obtidas a partir de trabalhos com entomopatógenos utilizados no controle de pragas da agricultura, porém, muitos estudos são necessários para o desenvolvimento de formulações eficazes para o controle de carrapatos (SAMISH et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e Período de Realização do Experimento

Os experimentos foram realizados entre abril de 2010 e janeiro de 2011, no Laboratório de Controle Microbiano localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)¹, localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

3.2 Obtenção e Manutenção das Colônias de *Rhipicephalus microplus*

As fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* utilizadas nos experimentos foram oriundas de infestação artificial de bezerros mantidos em baias localizadas na EPPWON. Vinte e um dias após a infestação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e em seguida levadas ao Laboratório de Controle Microbiano para a assepsia da cutícula, sendo imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos e, posteriormente, secas em papel toalha. Uma parte destas fêmeas foi mantida em placas de Petri e acondicionada em câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ para a obtenção de ovos e larvas, enquanto que a outra parte foi pesada individualmente, dividida em grupos homogêneos quanto ao peso e submetida aos tratamentos com as suspensões fúngicas.

3.3 Obtenção e Manutenção dos Fungos

Foram utilizados isolados dos fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana*, cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. Os isolados, a origem e o hospedeiro dos fungos utilizados estão relacionados na Tabela 1. Estes fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e acondicionados em câmara climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 15 dias. Após este período, as placas contendo os fungos foram armazenadas em refrigerador a 4 °C até a realização dos bioensaios.

Tabela 1. Isolados fúngicos com suas respectivas espécies, hospedeiro e local de origem.

Isolado	Espécie	Hospedeiro de origem	Origem geográfica
Ma 959	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	Rio de Janeiro-RJ
Bb 986	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae)	Piracicaba-SP

¹ Entre os paralelos 22°49' e 22°45' de latitude sul, e os meridianos 43°38' e 43°42' de longitude oeste de Greenwich, com altitude de 33 metros e clima do tipo subtropical.

3.4 Preparo das Suspensões e Formulações Fúngicas

3.4.1 Suspensão aquosa

Para o preparo das suspensões, os isolados fúngicos foram cultivados em grãos de arroz acondicionado em sacos de polipropileno, segundo metodologia descrita por Alves (1998), com adaptações. Cada saco continha 60 g de arroz e 30 mL de água destilada, que após serem fechados com barbante, foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C. Após o resfriamento, os sacos com arroz foram acrescidos de fragmentos de meio de cultura BDA cultivados com isolados fúngicos (Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. ou Bb 986 de *B. bassiana*), sendo posteriormente homogeneizados para que os conídios tivessem contato com todos os grãos de arroz. Os sacos de arroz contendo os fungos foram mantidos em câmara climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$, durante 15 dias e homogeneizados diariamente.

Após quinze dias, o arroz com um dos isolados fúngicos foi colocado em Becker estéril com água destilada estéril e Tween 80 0,1%. Em seguida, esta solução foi homogeneizada, filtrada em gaze estéril e quantificada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer, segundo Alves (1998). A suspensão foi ajustada à concentração 10^8 conídios/mL (Tabela 2). Este procedimento foi realizado separadamente com ambos os isolados testados.

Tabela 2. Concentrações de conídios dos fungos *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana*, nas suspensões aquosas e formulações oleosas utilizadas no tratamento de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

		Suspensão		Formulação Oleosa		
		Aquosa	10%	15%	20%	
Fêmeas ingurgitadas	<i>Metarhizium anisopliae</i>	$1,68 \times 10^8$ con./mL	$1,50 \times 10^8$ con./mL	$1,41 \times 10^8$ con./mL	$1,33 \times 10^8$ con./mL	
	<i>Beauveria bassiana</i>	$2,00 \times 10^8$ con./mL	$1,78 \times 10^8$ con./mL	$1,68 \times 10^8$ con./mL	$1,58 \times 10^8$ con./mL	
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	$3,20 \times 10^8$ con./mL	$2,84 \times 10^8$ con./mL	$2,69 \times 10^8$ con./mL	$2,53 \times 10^8$ con./mL	
	<i>Beauveria bassiana</i>	$1,60 \times 10^8$ con./mL	$1,42 \times 10^8$ con./mL	$1,34 \times 10^8$ con./mL	$1,26 \times 10^8$ con./mL	
Ovos	<i>Metarhizium anisopliae</i>	$1,57 \times 10^8$ con./mL	$1,39 \times 10^8$ con./mL	$1,31 \times 10^8$ con./mL	$1,24 \times 10^8$ con./mL	
	<i>Beauveria bassiana</i>	$2,2 \times 10^8$ con./mL	$1,95 \times 10^8$ con./mL	$1,84 \times 10^8$ con./mL	$1,73 \times 10^8$ con./mL	
	<i>Metarhizium anisopliae</i>					
	<i>Beauveria bassiana</i>					
Larvas	<i>Metarhizium anisopliae</i>					
	<i>Beauveria bassiana</i>					
	<i>Metarhizium anisopliae</i>					
	<i>Beauveria bassiana</i>					

3.4.2 Formulação oleosa

As formulações oleosas foram preparadas em três proporções, em função do percentual de óleo mineral: 1) 89% da suspensão aquosa, 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 1% de Tween 80; 2) 84% da suspensão aquosa, 15% de óleo mineral e 1% de Tween 80 e 3) 79% da suspensão aquosa, 20% de óleo mineral e 1% de Tween 80. As proporções de óleo mineral foram adaptadas da metodologia utilizada por Angelo et al. (2010).

3.5 Delineamento Experimental

Para os bioensaios com suspensão aquosa foram formados três grupos: o grupo controle, que recebeu tratamento com água destilada estéril e Tween 80 0,1%, e os outros dois grupos tratados com os conídios de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* suspensos em água destilada estéril e Tween 80 0,1%. Nos bioensaios com formulações oleosas, para cada concentração de óleo utilizada (10%, 15% ou 20%) foram formados três grupos: o grupo controle, que recebeu tratamento com água destilada estéril, Tween 80 0,1% e óleo mineral na sua respectiva concentração, e os outros dois grupos tratados com conídios de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* formulados, respeitando-se as respectivas proporções entre suspensão aquosa, óleo mineral e Tween 80. Os bioensaios foram repetidos duas vezes.

3.6 Viabilidade dos Conídios

Uma alíquota das suspensões aquosas e das formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura BDA com cloranfenicol (500 mg de cloranfenicol para 1 litro de meio de cultura) e incubada sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta pelo microscópio óptico e o cálculo da germinação dos mesmos foi realizado segundo Alves (1998).

3.7 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas

Para a realização do experimento, as fêmeas ingurgitadas destinadas ao tratamento foram pesadas individualmente e divididas em doze classes homogêneas de peso, variando entre 0,200 e 0,280 g. O número de classes foi calculado através da fórmula de Yule (SAMPAIO, 2002), em função do número de observações. Foi escolhida, aleatoriamente, uma fêmea de cada classe para a formação dos grupos. Em seguida, cada fêmea foi pesada, identificada e submersa por três minutos em um mL da suspensão ou formulação de seu respectivo tratamento. Após o tratamento, as fêmeas foram fixadas em placas de Petri com o auxílio de esparadrapo, em decúbito dorsal, e mantidas sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$. Cada grupo possuía dez fêmeas ingurgitadas.

A postura de cada fêmea foi coletada diariamente e armazenada individualmente em frascos de vidro identificados, para posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas. Para avaliar a eficácia das formulações oleosas dos fungos e comparar a eficiência entre formulações oleosas e suspensão aquosa foram investigados alguns parâmetros biológicos, tais como:

Peso inicial das fêmeas, que é o valor obtido da pesagem individual de cada fêmea ingurgitada antes do tratamento.

Período de pré-postura, equivalente ao número de dias compreendido entre a data da coleta da fêmea e o início da postura.

Peso da postura, obtido através do somatório da pesagem diária da postura de cada fêmea tratada.

Período de postura, representado pelo número de dias entre o início e o final da postura.

Período de incubação, equivalente ao número de dias compreendido entre o início da postura e o início da eclosão das larvas.

Período de eclosão, referente ao número de dias compreendido entre o início e o final da eclosão das larvas.

Percentual de eclosão das larvas, obtido através de observação visual e estimativa da quantidade de larvas eclodidas em relação ao total de ovos.

Peso residual das fêmeas, representado pelo peso individual de cada fêmea tratada, três dias após o final da postura.

Índice de produção de ovos (BENNETT, 1974), é obtido através da seguinte equação:

$$\text{IPO} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times 100$$

Índice nutricional (BENNETT, 1974), é obtido através da seguinte equação:

$$\text{IN} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea (g)} - \text{peso residual da fêmea (g)}} \times 100$$

Eficiência Reprodutiva (DRUMMOND, 1971), determinada através da seguinte equação:

$$\text{ER} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)} \times \% \text{ eclosão}}{\text{peso inicial da fêmea (g)}} \times 20000$$

Percentual de controle (DRUMMOND, 1971), calculado através da seguinte equação:

$$\text{Percentual de controle} = \frac{\text{média ER (controle)} - \text{média ER (tratado)}}{\text{média ER (controle)}} \times 100$$

3.8 Bioensaio com Ovos

A postura de fêmeas ingurgitadas não tratadas e mantidas em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ foi separada no décimo dia para a realização dos bioensaios com ovos e larvas. Os ovos foram separados em alíquotas de 50 mg (aproximadamente 1000 ovos) e colocados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo. Em cada tubo foi colocado um mL da respectiva suspensão ou formulação testada, que ficou em contato com os ovos por três minutos. Em seguida, os tubos foram invertidos para retirar o excesso da suspensão/formulação, sendo esta absorvida pelo algodão. Os tubos contendo os ovos tratados foram mantidos em câmara climatizada sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$. Cada grupo possuía oito réplicas. Os parâmetros biológicos analisados foram: o período de incubação, o período de eclosão, e o percentual de eclosão das larvas.

3.9 Bioensaio com Larvas

Os ovos foram separados em alíquotas de 50 mg (aproximadamente 1000 ovos), colocados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo e mantidos a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$. O bioensaio foi realizado no décimo dia após a total eclosão das larvas, e os tubos que não apresentaram percentual de eclosão das larvas superior a 95% foram descartados. A metodologia utilizada no bioensaio com larvas foi semelhante à metodologia utilizada no bioensaio com ovos. Cada grupo possuía oito réplicas. O parâmetro avaliado foi o percentual de mortalidade das larvas, observado a cada cinco dias até o 20º dia após o tratamento.

3.10 Reisolamento dos Fungos

Após os bioensaios foram coletadas amostras de fêmeas, ovos e larvas tanto dos grupos controle quanto dos grupos tratados com as suspensões aquosas e formulações oleosas dos fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana*. Estas amostras foram colocadas em câmaras úmidas e mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ visando facilitar o crescimento fúngico e posterior avaliação de suas características (SAMSON; EVANS, 1982).

3.11 Análise Estatística

Para a análise dos períodos de pré-postura, de postura, de incubação e de eclosão das larvas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), para a comparação entre as médias. Para a avaliação do percentual de eclosão das larvas e dos índices de produção de ovos e nutricional foram realizadas o teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para comparação entre as ordenações médias (SAMPAIO, 2002).

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade dos Conídios

Os conídios das suspensões aquosas de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* apresentaram 100% de germinação em até 24 horas de incubação em BDA a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$, enquanto que os conídios destes mesmos isolados fúngicos formulados em 10%, 15% ou 20% de óleo mineral apresentaram 100% de germinação após 48 horas de incubação nas condições de temperatura e umidade citadas acima.

4.2 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas

Nos grupos tratados com as formulações de *M. anisopliae* s.l. contendo 15% ou 20% de óleo mineral, somente uma e quatro fêmeas, respectivamente, sobreviveram. Portanto, estes grupos foram excluídos da análise estatística dos dados relacionados aos períodos de pré-postura, postura, incubação e eclosão, já que os cálculos são feitos com no mínimo seis amostras.

4.2.1 Peso inicial das fêmeas ingurgitadas

O peso das fêmeas ingurgitadas utilizadas nos bioensaios não variou estatisticamente entre os grupos controle e os grupos tratados tanto com as suspensões aquosas quanto com as três concentrações das formulações oleosas de ambos os isolados fúngicos (Tabela 3 e 5). Desta forma, as alterações ocorridas nos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* podem ser atribuídas aos isolados fúngicos testados, bem como à forma de utilização (suspensão aquosa ou formulação oleosa).

4.2.2 Período de pré-postura

Foi observado aumento significativo no período de pré-postura de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* tratadas com a formulação de *M. anisopliae* s.l. contendo 10% de óleo mineral quando comparado aos demais grupos. Os grupos tratados com as formulações de *M. anisopliae* s.l. contendo 15% ou 20% de óleo mineral foram excluídos da análise estatística. A suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. não causou alteração significativa neste parâmetro quando comparada aos grupos controle (Tabela 3).

Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com a suspensão aquosa e formulações oleosas do isolado fúngico de *B. bassiana*, como demonstrado na Tabela 5.

4.2.3 Período de postura

O período de postura do grupo tratado com a formulação do isolado de *M. anisopliae* s.l. contendo 10% de óleo mineral foi reduzido significativamente quando comparado aos demais grupos. Da mesma forma, foi observada redução neste parâmetro no grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. quando comparado aos demais grupos (Tabela 3). Os grupos tratados com as formulações de *M. anisopliae* s.l. contendo 15% ou 20% de óleo mineral foram excluídos da análise estatística.

Não houve diferença significativa no período de postura de fêmeas tratadas tanto com a suspensão aquosa quanto com as formulações oleosas do isolado fúngico de *B. bassiana*, como pode ser observado na Tabela 5.

4.2.4 Período de incubação

Não foi observada alteração significativa no período de incubação dos grupos tratados com a suspensão aquosa e formulação oleosa de *M. anisopliae* s.l. contendo 10% de óleo mineral (Tabela 3). Os grupos tratados com as formulações de *M. anisopliae* s.l. contendo 15% ou 20% de óleo mineral foram excluídos da análise estatística.

O isolado de *B. bassiana* não causou alteração significativa no período de incubação das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, tanto em suspensão aquosa quanto em formulação oleosa (Tabela 5).

4.2.5 Período de eclosão

Em relação ao período de eclosão das larvas, foi observada redução significativa, no número de dias, do grupo tratado com a formulação do fungo *M. anisopliae* s.l. contendo 10% de óleo mineral, quando comparados aos demais grupos (Tabela 3). Os grupos tratados com as formulações de *M. anisopliae* s.l. contendo 15% ou 20% de óleo mineral foram excluídos da análise estatística. Não houve diferença significativa quando a suspensão aquosa foi comparada aos grupos controle (Tabela 3).

Não ocorreu alteração significativa no período de eclosão das larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com as formulações oleosas e a suspensão aquosa do isolado Bb 986 de *B. bassiana*, como demonstrado na Tabela 5

4.2.6 Percentual de eclosão

As diferentes concentrações de óleo mineral das formulações de *M. anisopliae* s.l. promoveram redução significativa do percentual de eclosão das larvas provenientes de fêmeas ingurgitadas tratadas com estas formulações, quando comparadas aos grupos controle e ao grupo tratado com a suspensão aquosa (Tabela 4). Não houve alteração significativa deste parâmetro entre os grupos controle e o grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l.

As formulações oleosas e a suspensão aquosa do isolado Bb 986 de *B. bassiana* não causaram alterações significativas no percentual de eclosão das larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas tratadas com este fungo (Tabela 6).

4.2.7 Índice de produção de ovos

Foi observada redução significativa no índice de produção de ovos (IPO) de fêmeas ingurgitadas tratadas com cada uma das três concentrações de óleo mineral das formulações de *M. anisopliae* s.l. quando comparadas aos quatro grupos controle. Entretanto, ao comparar as formulações oleosas deste isolado fúngico ao grupo tratado com a suspensão aquosa, somente as duas maiores concentrações de óleo mineral (15% e 20%) foram capazes de reduzir este parâmetro, não havendo, portanto diferença significativa IPO entre os grupos tratados com a formulação de *M. anisopliae* s.l. contendo 10% de óleo mineral e a suspensão aquosa deste mesmo fungo (Tabela 4). As fêmeas ingurgitadas tratadas com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. apresentaram IPO reduzido quando comparadas as fêmeas do grupo controle aquoso, porém não houve diferença significativa deste parâmetro entre o grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. e os três grupos controle oleosos (Tabela 4).

Com relação aos grupos tratados com a suspensão aquosa e as formulações oleosas do isolado fúngico de *B. bassiana*, não foi observada alteração significativa no índice de produção de ovos, como demonstrado na Tabela 6.

4.2.8 Índice nutricional

Os grupos tratados com as formulações oleosas do isolado fúngico de *M. anisopliae* s.l., independente da concentração de óleo mineral utilizada, apresentaram redução do índice nutricional quando comparados aos grupos controle (Tabela 4). Também houve redução significativa deste parâmetro no grupo tratado com a suspensão aquosa deste mesmo fungo, quando comparado aos grupos controle aquoso e controle com 10% de óleo mineral, porém esta redução não ocorreu ao comparar o grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. aos grupos controle com 15% ou 20% de óleo mineral (Tabela 4). Foi observada redução significativa no índice nutricional de fêmeas tratadas com as formulações de *M. anisopliae* s.l. contendo 15% ou 20% de óleo mineral quando comparadas ao grupo tratado com a suspensão aquosa, porém não houve diferença estatística entre o grupo tratado com a formulação de *M. anisopliae* s.l. com 10% de óleo mineral e o grupo tratado com a suspensão aquosa (Tabela 4).

Diferente dos outros parâmetros de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* avaliados neste trabalho, o índice nutricional foi significativamente reduzido após o tratamento com suspensão aquosa e formulações oleosas do isolado Bb 986 de *B. bassiana*. Não houve diferença significativa deste parâmetro ao se comparar o grupo tratado com a suspensão aquosa aos grupos tratados com as formulações oleosas (Tabela 6).

4.2.9 Eficiência reprodutiva

O isolado de *M. anisopliae* s.l. formulado em 10%, 15% ou 20% de óleo mineral promoveu redução significativa na eficiência reprodutiva das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* quando comparado aos grupos controles. As formulações de *M. anisopliae* s.l. com 15% ou 20% de óleo mineral causaram redução significativa deste parâmetro quando comparadas a suspensão aquosa; no entanto, a formulação com 10% de óleo mineral não diferiu estatisticamente da suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. (Tabela 4). Não foi observada alteração significativa deste parâmetro ao comparar as fêmeas do grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. com as fêmeas de todos os grupos controle.

A eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* não foi alterada pelas formulações oleosas e suspensão aquosa do isolado de *B. bassiana*, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão do peso inicial da fêmea, período de pré-postura, período de postura, período de incubação e período de eclosão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Peso Inicial da Fêmea (g)	Período de Pré-Postura (dias)	Período de Postura (dias)	Período de Incubação (dias)	Período de Eclosão (dias)
Controle Aquoso	0,2396 \pm 0,02 a	3,0 \pm 0,00 a	13,6 \pm 1,26 a	24,2 \pm 1,03 a	9,7 \pm 1,78 a
Controle Oleoso 10%	0,2403 \pm 0,03 a	2,9 \pm 0,32 a	13,7 \pm 2,95 a	24,0 \pm 1,15 a	10,1 \pm 1,55 a
Controle Oleoso 15%	0,2398 \pm 0,02 a	2,8 \pm 0,42 a	13,7 \pm 2,58 a	25,0 \pm 0,82 a	10,4 \pm 1,54 a
Controle Oleoso 20%	0,2394 \pm 0,02 a	2,9 \pm 0,57 a	13,0 \pm 2,05 a	24,6 \pm 0,84 a	9,5 \pm 1,32 a
Ma Aquoso	0,2402 \pm 0,03 a	3,0 \pm 0,00 a	9,3 \pm 1,53 b	24,1 \pm 1,45 a	9,4 \pm 2,01 a
Ma Oleoso 10%	0,2408 \pm 0,03 a	4,3 \pm 0,95 b	6,6 \pm 2,70 c	24,7 \pm 0,49 a	6,2 \pm 1,17 b
Ma Oleoso 15%	0,2403 \pm 0,02 a	—	—	—	—
Ma Oleoso 20%	0,2393 \pm 0,02 a	—	—	—	—

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão do percentual de eclosão, índice de produção de ovos, índice nutricional e eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Percentual de Eclosão	Índice de Produção de Ovos	Índice Nutricional	Eficiência Reprodutiva
Controle Aquoso	96,9 ± 9,46 a	61,62 ± 3,61 a	75,32 ± 5,67 a	59,72 ± 6,95 a
Controle Oleoso 10%	92,9 ± 16,32 a	57,66 ± 9,41 ab	69,25 ± 7,84 a	54,87 ± 14,55 a
Controle Oleoso 15%	97,0 ± 3,50 a	57,49 ± 8,10 ab	67,29 ± 7,73 ab	55,91 ± 8,71 a
Controle Oleoso 20%	97,8 ± 4,13 a	58,73 ± 5,67 ab	67,57 ± 6,47 ab	57,57 ± 7,12 a
Ma Aquoso	88,4 ± 31,23 a	49,36 ± 18,05 bc	56,16 ± 20,20 bc	48,55 ± 18,06 ab
Ma Oleoso 10%	51,0 ± 49,17 b	24,10 ± 24,22 cd	28,93 ± 28,41 cd	22,16 ± 22,99 bc
Ma Oleoso 15%	7,0 ± 22,14 b	5,39 ± 17,05 d	6,23 ± 19,71 d	3,77 ± 11,94 c
Ma Oleoso 20%	17,0 ± 36,53 b	9,14 ± 18,02 d	11,36 ± 21,73 d	7,44 ± 16,46 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão do peso inicial da fêmea, período de pré-postura, período de postura, período de incubação e período de eclosão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Peso Inicial da Fêmea (g)	Período de Pré-Postura (dias)	Período de Postura (dias)	Período de Incubação (dias)	Período de Eclosão (dias)
Controle Aquoso	0,2446 \pm 0,02 a	2,6 \pm 0,51 a	13,3 \pm 2,13 a	25,6 \pm 1,45 a	11,3 \pm 0,91 a
Controle Oleoso 10%	0,2416 \pm 0,02 a	2,9 \pm 0,34 a	12,0 \pm 3,35 a	24,9 \pm 0,96 a	9,4 \pm 2,63 a
Controle Oleoso 15%	0,2443 \pm 0,02 a	3,6 \pm 1,22 a	14,1 \pm 1,17 a	25,1 \pm 0,66 a	9,6 \pm 2,06 a
Controle Oleoso 20%	0,2443 \pm 0,02 a	3,9 \pm 1,29 a	13,6 \pm 1,22 a	26,0 \pm 0,78 a	9,7 \pm 0,47 a
Bb Aquoso	0,2408 \pm 0,02 a	3,1 \pm 0,62 a	13,5 \pm 2,13 a	25,9 \pm 1,20 a	9,4 \pm 2,25 a
Bb Oleoso 10%	0,2411 \pm 0,02 a	3,3 \pm 1,90 a	12,6 \pm 2,47 a	25,7 \pm 0,91 a	9,2 \pm 2,36 a
Bb Oleoso 15%	0,2423 \pm 0,02 a	3,2 \pm 0,98 a	13,3 \pm 1,98 a	25,6 \pm 0,89 a	9,1 \pm 2,35 a
Bb Oleoso 20%	0,2402 \pm 0,02 a	3,2 \pm 0,94 a	13,3 \pm 2,19 a	25,0 \pm 1,00 a	9,0 \pm 2,04 a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão do percentual de eclosão, índice de produção de ovos, índice nutricional e eficiência reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Percentual de Eclosão	Índice de Produção de Ovos	Índice Nutricional	Eficiência Reprodutiva
Controle Aquoso	96,00 \pm 7,04 a	54,73 \pm 5,43 a	71,02 \pm 7,63 a	52,67 \pm 7,61 a
Controle Oleoso 10%	92,38 \pm 11,17 a	52,44 \pm 12,51 a	67,58 \pm 14,44 a	48,75 \pm 14,22 a
Controle Oleoso 15%	96,86 \pm 7,16 a	55,22 \pm 4,62 a	70,67 \pm 5,17 a	53,74 \pm 7,56 a
Controle Oleoso 20%	91,43 \pm 12,24 a	55,29 \pm 4,35 a	71,78 \pm 1,34 a	50,75 \pm 9,05 a
Bb Aquoso	93,69 \pm 10,33 a	54,82 \pm 4,94 a	64,44 \pm 7,89 b	51,77 \pm 9,35 a
Bb Oleoso 10%	87,64 \pm 15,97 a	47,67 \pm 11,09 a	59,03 \pm 10,76 b	43,16 \pm 15,73 a
Bb Oleoso 15%	97,69 \pm 3,28 a	56,26 \pm 5,61 a	64,54 \pm 6,60 b	55,02 \pm 6,25 a
Bb Oleoso 20%	92,67 \pm 7,44 a	51,61 \pm 8,51 a	63,63 \pm 8,65 b	48,08 \pm 9,67 a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

4.2.10 Percentual de controle

Os percentuais de controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* tratadas com as suspensões aquosas e formulações contendo 10%, 15% e 20% de óleo mineral dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. e Bb 986 de *B. bassiana* estão demonstrados na Tabela 7.

As três concentrações de formulação oleosa mostraram-se eficientes ao potencializarem a ação do isolado de *M. anisopliae* s.l. sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo observado um percentual de controle variando entre 58,12% e 93,69%. Em relação aos grupos tratados com o fungo *B. bassiana*, foi observado um aumento do percentual de controle somente nos grupos com 10% ou 20% de óleo mineral, os quais apresentaram 18,07% e 21,67% de controle, respectivamente.

Tabela 7. Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l. e Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Suspensão Aquosa	Formulação Oleosa		
		10%	15%	20%
<i>Metarhizium anisopliae</i>	18,70	58,12	93,69	87,54
<i>Beauveria bassiana</i>	1,72	18,07	0,71	21,67

4.3 Bioensaio com Ovos

4.3.1 Período de incubação

O período de incubação de ovos de *R. microplus* tratados com as formulações de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações 10%, 15% e 20% de óleo mineral sofreu uma redução significativa quando comparado aos grupos controle e ao grupo tratado com a suspensão aquosa (Tabela 8). Entretanto, não foi observada alteração significativa deste parâmetro entre o grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. e os grupos controle, como demonstrado na Tabela 8.

Os ovos tratados com a suspensão aquosa e com as três concentrações de óleo mineral das formulações oleosas do isolado Bb 986 de *B. bassiana* não apresentaram alteração neste parâmetro (Tabela 9).

4.3.2 Período de eclosão

Foi observada uma redução significativa, no número de dias, do período de eclosão de larvas provenientes de ovos de *R. microplus* tratados com as três concentrações de óleo mineral das formulações de *M. anisopliae* s.l. quando comparados ao grupo tratado com a suspensão aquosa deste fungo e aos grupos controle (Tabela 8). Houve redução significativa deste parâmetro entre o grupo tratado com a suspensão aquosa do fungo *M. anisopliae* s.l. e o grupo controle aquoso, porém esta diferença não foi observada entre os três grupos controle da formulação oleosa e o grupo tratado com a suspensão aquosa deste mesmo isolado fúngico (Tabela 8).

O isolado Bb 986 de *B. bassiana* foi capaz de reduzir significativamente o período de eclosão das larvas provenientes de ovos de *R. microplus* tratados tanto com a suspensão aquosa quanto com as formulações oleosas deste fungo ao compará-los ao grupo controle aquoso (Tabela 9). Porém, esta alteração não foi observada quando os grupos tratados com a suspensão aquosa e formulações oleosas foram comparados aos grupos controle oleosos, como consta na Tabela 9.

4.3.3 Percentual de eclosão

As formulações nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral mostraram-se eficientes ao potencializarem a ação do fungo *M. anisopliae* s.l. sobre a eclosão de larvas oriundas de ovos tratados com estas formulações, já que causaram redução significativa deste parâmetro quando comparadas ao grupo tratado com a suspensão aquosa e aos grupos controle (Tabela 8). O grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. também promoveu redução significativa deste parâmetro ao compará-lo aos grupos controle aquoso e controle oleoso 10% e 20%; entretanto, esta redução não foi significativa quando comparado ao grupo controle oleoso 15%.

As três concentrações de óleo mineral das formulações de *B. bassiana* também se mostraram eficientes ao reduzirem o percentual de eclosão de larvas oriundas de ovos de *R. microplus* tratados com tais formulações. Esta redução foi observada ao comparar tais grupos aos grupos controle e ao grupo tratado com a suspensão aquosa do mesmo isolado fúngico, entretanto não foi observada diferença significativa entre o grupo controle aquoso e o grupo tratado com a suspensão aquosa de *B. bassiana* (Tabela 9).

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão do período de incubação, período de eclosão e do percentual de eclosão de larvas provenientes de ovos de *Rhipicephalus microplus* tratados por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolados Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidos sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Período de Incubação (dias)	Período de Eclosão (dias)	Percentual de Eclosão
Controle Aquoso	21,88 \pm 0,34 a	6,88 \pm 0,96 a	96,38 \pm 1,86 a
Controle Oleoso 10%	19,38 \pm 6,79 a	6,63 \pm 0,89 ab	96,00 \pm 2,88 a
Controle Oleoso 15%	21,86 \pm 0,36 a	6,71 \pm 0,91 ab	93,57 \pm 2,34 ab
Controle Oleoso 20%	21,88 \pm 0,34 a	6,38 \pm 0,72 ab	93,38 \pm 9,32 a
Ma Aquoso	21,81 \pm 0,40 a	5,63 \pm 1,20 b	63,06 \pm 31,64 b
Ma Oleoso 10%	13,81 \pm 11,05 b	2,13 \pm 2,06 c	2,19 \pm 2,32 c
Ma Oleoso 15%	13,94 \pm 11,16 b	1,50 \pm 1,71 c	1,38 \pm 1,86 c
Ma Oleoso 20%	14,00 \pm 11,21 b	1,19 \pm 1,28 c	0,94 \pm 1,24 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão do período de incubação, período de eclosão e do percentual de eclosão de larvas provenientes de ovos de *Rhipicephalus microplus* tratados por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidos sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

	Período de Incubação (dias)	Período de Eclosão (dias)	Percentual de Eclosão
Controle Aquoso	23,00 \pm 0,00 a	9,00 \pm 1,03 a	97,75 \pm 2,24 a
Controle Oleoso 10%	23,00 \pm 0,00 a	8,25 \pm 0,68 ab	98,38 \pm 2,06 a
Controle Oleoso 15%	23,00 \pm 0,00 a	8,50 \pm 0,89 ab	93,50 \pm 13,24 a
Controle Oleoso 20%	23,00 \pm 0,00 a	8,50 \pm 0,89 ab	95,00 \pm 4,47 a
Bb Aquoso	22,94 \pm 0,25 a	7,25 \pm 1,53 b	91,69 \pm 8,93 a
Bb Oleoso 10%	23,13 \pm 0,34 a	7,31 \pm 2,50 b	27,00 \pm 21,43 b
Bb Oleoso 15%	23,00 \pm 0,00 a	7,44 \pm 1,21 b	39,69 \pm 20,93 b
Bb Oleoso 20%	22,88 \pm 0,50 a	7,31 \pm 2,09 b	47,50 \pm 23,87 b

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

4.4 Bioensaio com Larvas

4.4.1 Percentual de mortalidade

As formulações com 10%, 15% ou 20% de óleo mineral demonstraram que são capazes de potencializar a ação dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* s.l., já que causaram significativos percentuais de mortalidade de larvas tratadas com estas formulações (Figuras 1 e 2).

As larvas tratadas com cada uma das três concentrações de óleo mineral das formulações de *M. anisopliae* s.l. apresentaram, no quinto dia após o tratamento, elevado percentual de mortalidade, que variou de 90,7% a 99,1%, diferente do grupo tratado com a suspensão aquosa do mesmo isolado fúngico, que apresentou 1,95% de mortalidade. Já o grupo controle, não apresentou mortalidade das larvas (Figura 1). No décimo dia após o tratamento, o percentual de mortalidade das larvas tratadas com cada uma das três formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. foi de 100%, enquanto os grupos controle apresentaram percentual de mortalidade variando entre 0,0% e 1,75%; o grupo tratado com a suspensão aquosa do mesmo isolado fúngico apresentou um percentual de mortalidade de 11,06% (Figura 1).

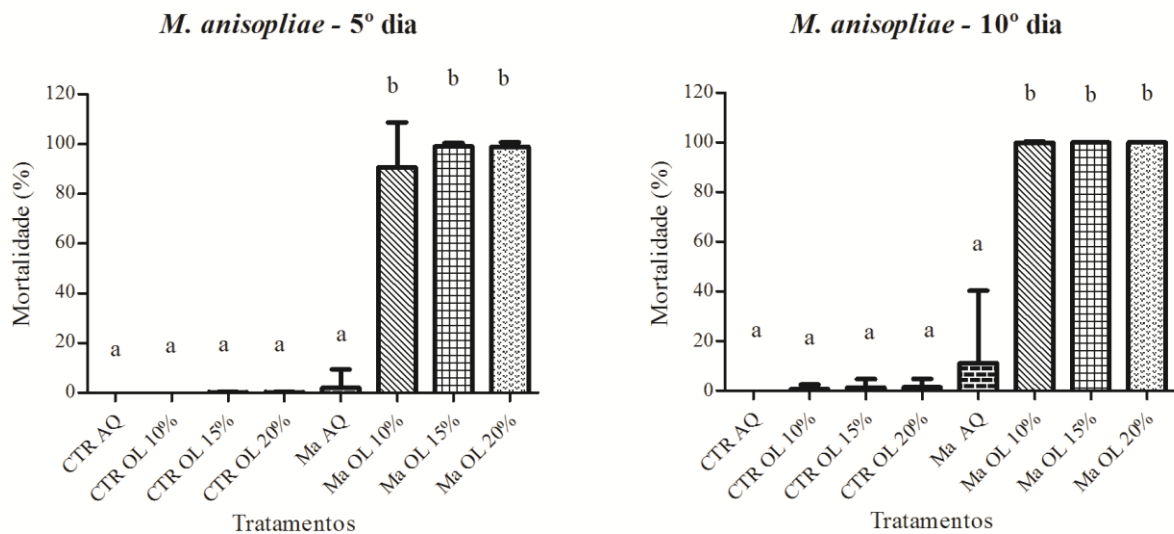


Figura 1. Percentual médio e desvio padrão da mortalidade no 5º e 10º dia após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

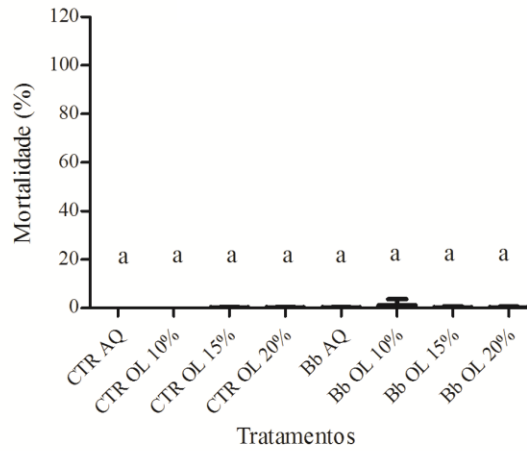
No quinto dia após o tratamento não foi observada diferença estatística no percentual de mortalidade de larvas tratadas tanto com a suspensão aquosa quanto com as formulações oleosas do isolado de *B. bassiana* quando comparados aos grupos controle. No 10º, 15º, 20º e 25º dia após o tratamento foram observadas variações significativas. Estas alterações podem ser observadas na Figura 2.

Os grupos tratados com as formulações de *B. bassiana* com 15% ou 20% de óleo mineral apresentaram percentual de mortalidade de larvas, no décimo dia após o tratamento, que diferiu estatisticamente tanto dos grupos controle quanto do grupo tratado com a suspensão aquosa. Já o grupo tratado com a formulação com 10% de óleo mineral deste mesmo isolado fúngico, diferiu somente dos grupos controle aquoso e controle oleoso 15%. Também no décimo dia após tratamento não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e o grupo tratado com a suspensão aquosa de *B. bassiana* (Figura 2).

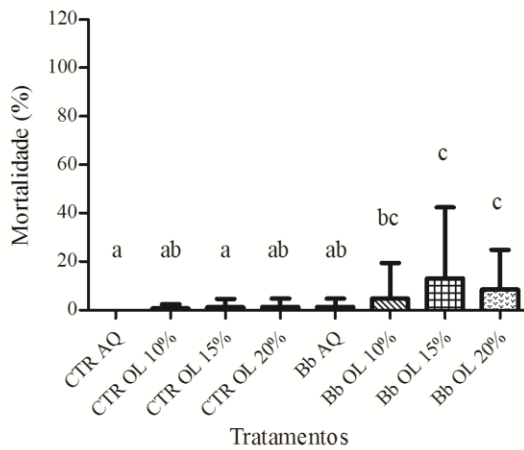
No 15º dia após o tratamento, as formulações oleosas de *B. bassiana* causaram aumento significativo do percentual de mortalidade das larvas quando comparadas aos grupos tratados com a suspensão aquosa e com os grupos controle. Também foi observado aumento na mortalidade das larvas do grupo controle com 20% de óleo ao compará-lo ao grupo controle aquoso. Não houve diferença estatística entre o grupo tratado com a suspensão aquosa de *B. bassiana* e os grupos controle (Figura 2).

As formulações de *B. bassiana* com 10%, 15% ou 20% de óleo mineral promoveram elevado percentual de mortalidade de larvas no 20º e 25º dia após o tratamento, diferindo estatisticamente dos demais grupos. A suspensão aquosa de *B. bassiana* também promoveu percentual de mortalidade que diferiu significativamente do grupo controle aquoso, porém não foi observada diferença entre o grupo aquoso deste isolado fúngico e os grupos controle oleosos. Um aumento significativo da mortalidade das larvas também foi observado nos grupos controle contendo 10% ou 15% de óleo mineral, a partir do 20º dia após o tratamento (Figura 2).

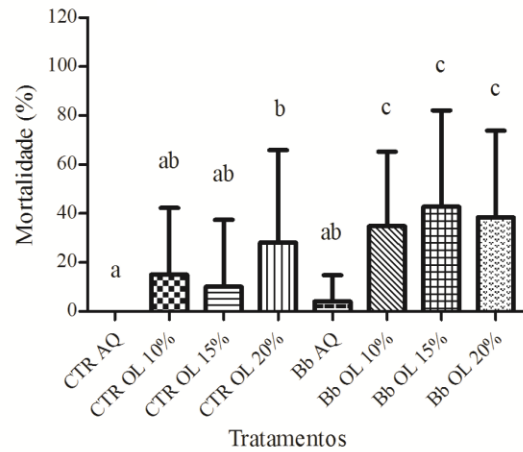
***B. bassiana* - 5° dia**



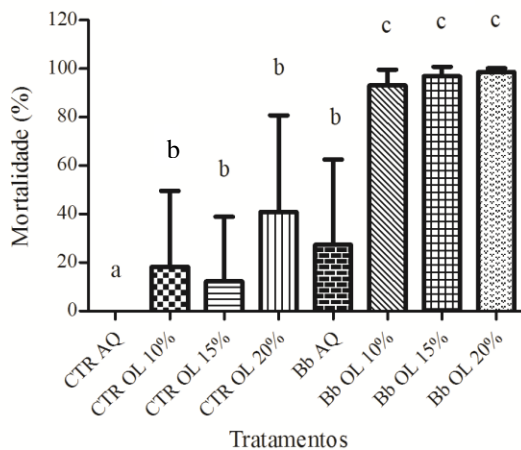
***B. bassiana* - 10° dia**



***B. bassiana* - 15° dia**



***B. bassiana* - 20° dia**



***B. bassiana* - 25° dia**

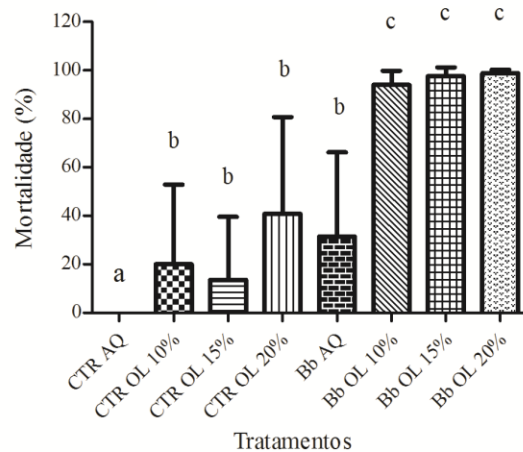


Figura 2. Percentual médio e desvio padrão da mortalidade no 5°, 10°, 15°, 20° e 25° dia após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão aquosa ou formulações oleosas nas concentrações 10%, 15% ou 20% de óleo mineral do isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*, e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

4.5 Reisolamento dos Fungos

As amostras de fêmeas, ovos e larvas de *R. microplus* submetidas ao tratamento com a suspensão aquosa ou as formulações oleosas dos isolados de *M. anisopliae* s.l. ou de *B. bassiana* foram incubadas em câmara úmida e apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas. Tais colônias foram identificadas como sendo dos mesmos gêneros utilizados nos bioensaios, comprovando que os fungos foram capazes de colonizar e causar alterações nos diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

As fêmeas de *R. microplus* dos grupos controle não apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas, como ilustrado na Figura 3.

Foram observadas colônias fúngicas sobre a cutícula de fêmeas ingurgitadas tratadas com *M. anisopliae* s.l. formulado em 15% e 20% de óleo mineral a partir do terceiro dia após o tratamento. Neste mesmo dia, as fêmeas tratadas com a formulação de *M. anisopliae* s.l. contendo 10% de óleo mineral apresentavam-se escurecidas, no entanto as colônias fúngicas somente foram observadas sobre a cutícula destas fêmeas a partir do quarto dia após o tratamento. No grupo tratado com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. as colônias foram observadas sobre a cutícula das fêmeas a partir do sexto dia após o tratamento (Figura 4).

Nos grupos tratados com as formulações oleosas ou suspensão aquosa de *B. bassiana* foram observadas colônias fúngicas sobre a cutícula de fêmeas a partir do 14º dia após o tratamento (Figura 5).

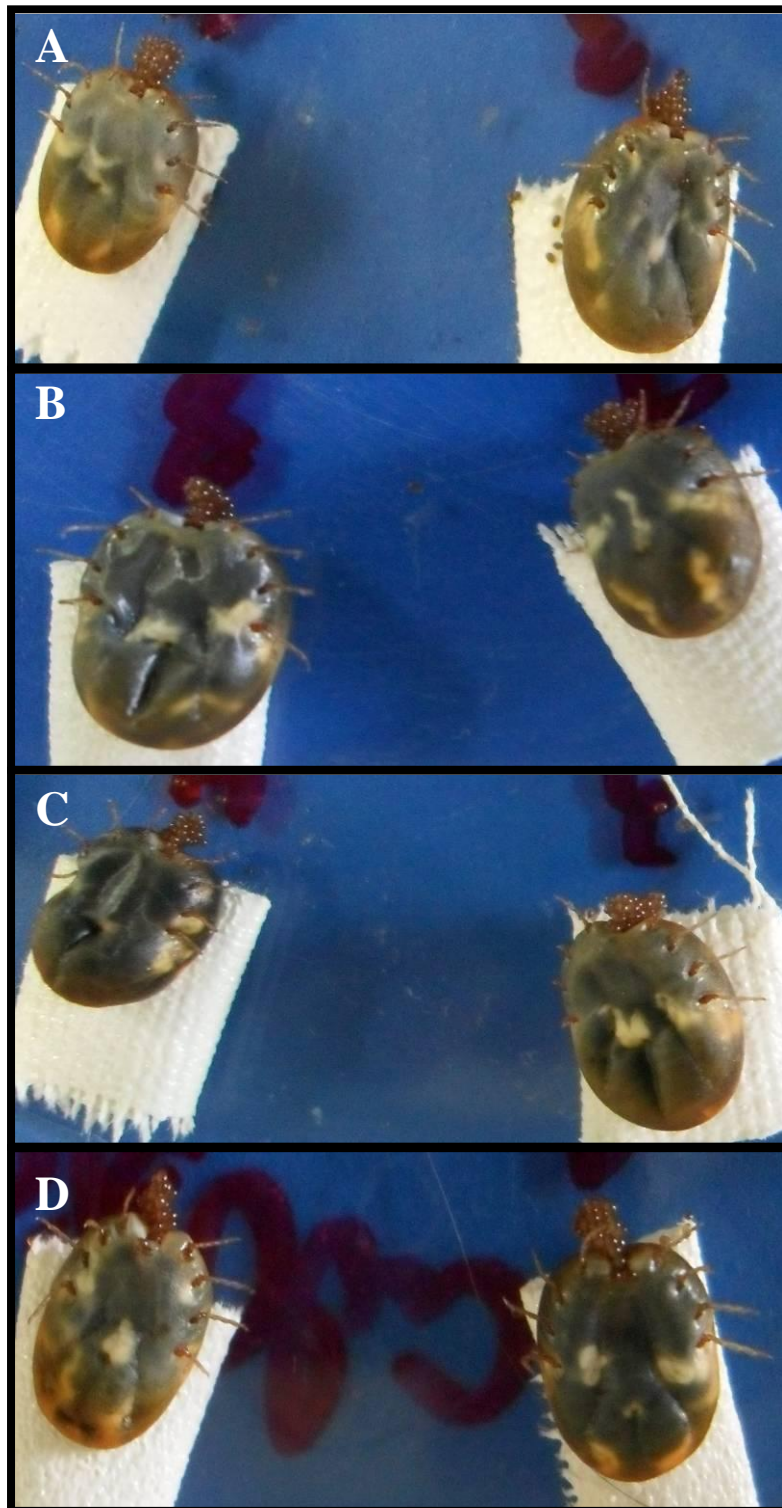


Figura 3. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* dos grupos controle, seis dias após o tratamento. A: grupo controle aquoso; B: grupo controle com 10% de óleo mineral; C: grupo controle com 15% de óleo mineral; D: grupo controle com 20% de óleo mineral.

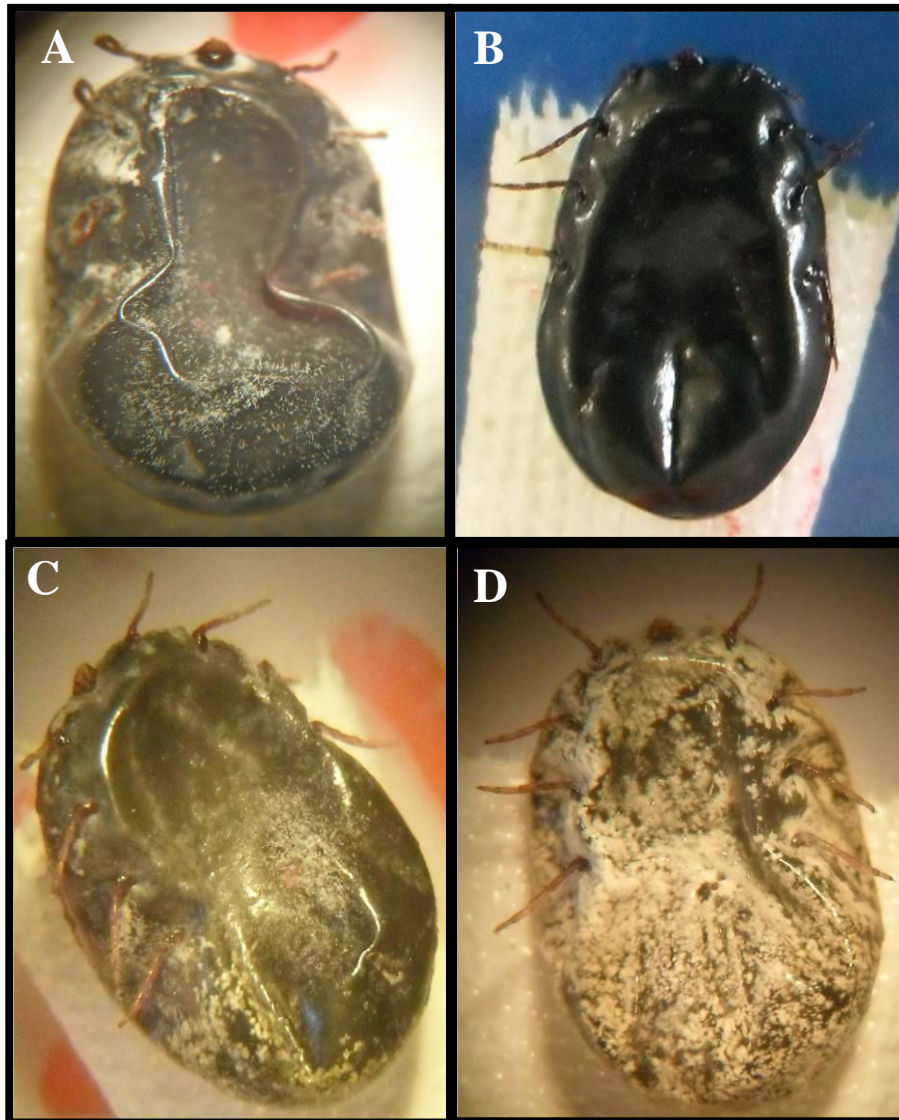


Figura 4. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado Ma 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l.. A: sexto dia após tratamento com suspensão aquosa; B: terceiro dia após tratamento com formulação contendo 10% de óleo mineral; C: terceiro dia após tratamento com formulação contendo 15% de óleo mineral; D: terceiro dia após tratamento com formulação contendo 20% de óleo mineral.

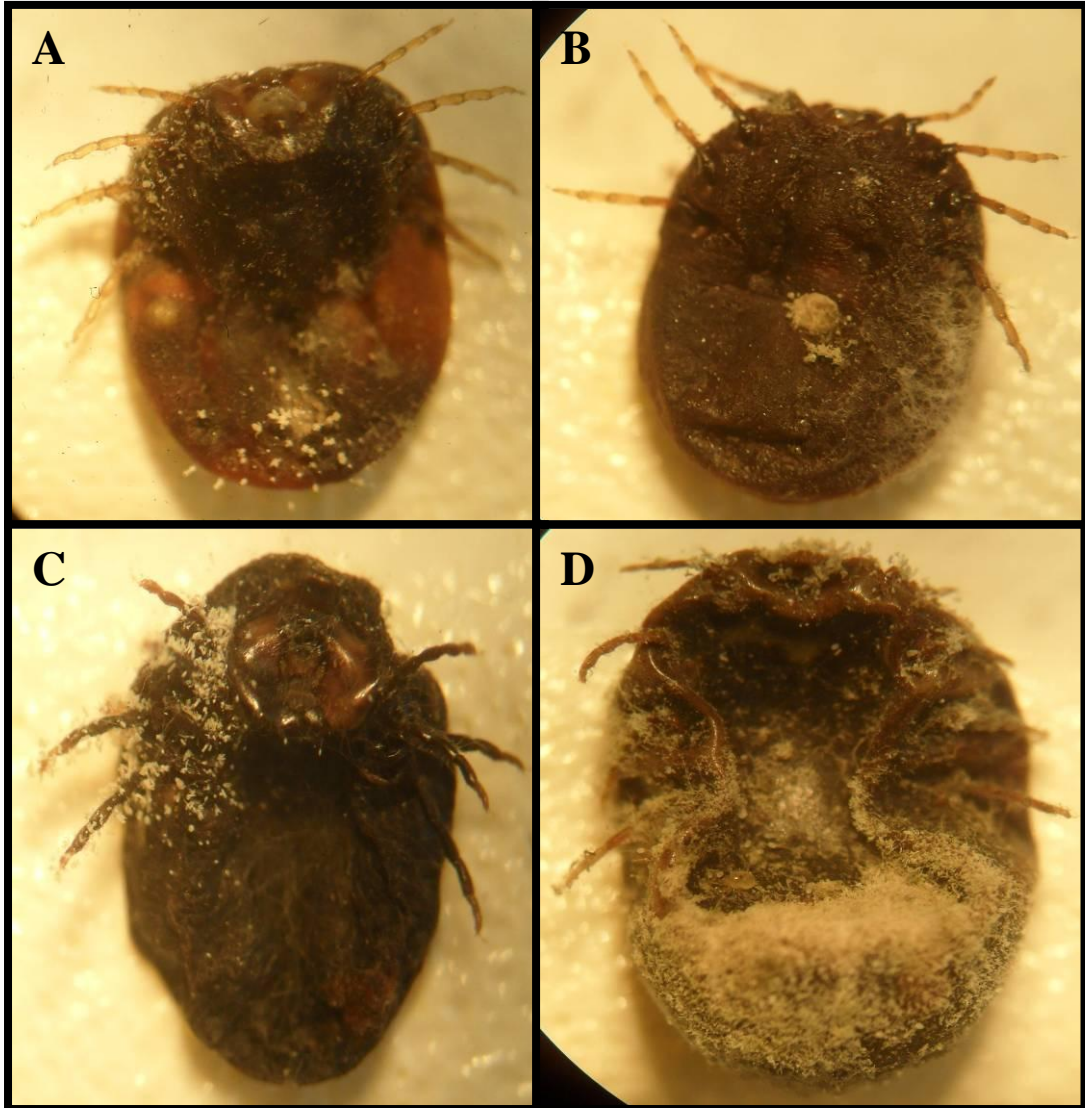


Figura 5. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 14 dias após o tratamento com o isolado Bb 986 de *Beauveria bassiana*. A: grupo tratado com suspensão aquosa; B: grupo tratado com formulação contendo 10% de óleo mineral; C: grupo tratado com formulação contendo 15% de óleo mineral; D: grupo tratado com formulação contendo 20% de óleo mineral.

5 DISCUSSÃO

A utilização e importância de formulações de entomopatógenos no controle de carrapatos têm sido amplamente estudadas (KAAYA; HASSAN, 2000; MARANGA et al., 2005; POLAR et al., 2005; LOPES et al., 2007; LEEMON, et al., 2008; REIS et al, 2008; SOUZA et al., 2009; ÁNGEL-SAHAGÚN et al., 2010; ANGELO et al., 2010; JACKSON et al., 2010; PENG; XIA, 2011). Os óleos minerais e vegetais estão sendo utilizados como adjuvantes em formulações, pois estes promovem uma proteção dos conídios em condições adversas e potencializam o desempenho dos mesmos, além de aumentar o tempo de armazenamento e facilitar o manuseio e aplicação dos entomopatógenos (ALVES, 1998). O presente estudo mostra a eficiência de formulações contendo 10%, 15% ou 20% de óleo mineral na potencialização do desempenho dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. e Bb 986 de *B. bassiana* no controle dos diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

A primeira etapa do processo de infecção de fungos entomopatogênicos é a penetração ativa através da cutícula do artrópode, que se inicia com a germinação dos conídios em até 24 horas (BITTENCOURT et al., 1999; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). No presente estudo, o óleo mineral utilizado para formular os fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* atrasou a germinação dos conídios em até 24 horas, entretanto, os fungos mostraram-se viáveis e aptos para serem utilizados nos experimentos. Estes dados corroboram o encontrado por Polar et al. (2005), que avaliaram o efeito de diferentes formulações sobre *M. anisopliae*. Estes autores concluíram que as formulações de óleo de coco, parafina líquida e de óleo adjuvante emulsionável de parafina líquida, possuem pouco efeito sobre a velocidade de germinação dos conídios, já que o percentual de germinação dos conídios formulados variou de 86,0% a 91,6% após 24 horas de incubação, e após 48 horas de incubação este percentual foi de aproximadamente 100% para a maioria das formulações. Estes dados demonstram a importância de se avaliar o efeito dos constituintes de formulações sobre os conídios de fungos entomopatogênicos, uma vez que podem retardar ou até mesmo inibir a germinação, que constitui a primeira etapa do processo de infecção de artrópodes.

No presente estudo, as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com as formulações oleosas e com a suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l. apresentaram crescimento de colônias fúngicas sobre a cutícula a partir terceiro e sexto dias após tratamento, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Angelo et al., (2010) que observaram crescimento de colônias de *Lecanicillium lecanii* formulado em 15% de óleo mineral sobre a cutícula de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* a partir do quarto dia após o tratamento, enquanto que as fêmeas tratadas com a suspensão aquosa apresentaram crescimento fúngico somente a partir do décimo dia após tratamento. Estes resultados indicam a capacidade do óleo mineral em potencializar a ação dos entomopatógenos sobre o carrapato *R. microplus*. O isolado de *B. bassiana* utilizado no presente estudo necessitou de 14 dias para colonizar a cutícula de fêmeas de *R. microplus* tratadas tanto com a suspensão aquosa quanto com as formulações oleosas. O atraso no tempo de esporulação de *B. bassiana* sobre a cutícula do carrapato, quando comparado com *M. anisopliae* s.l., provavelmente se deve à menor virulência demonstrada por este isolado fúngico sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Os óleos atuam de diversas maneiras na proteção e potencialização do desempenho dos fungos entomopatogênicos no controle de artrópodes. Segundo Peng e Xia (2011) as formulações a base de óleo melhoram a virulência dos isolados fúngicos através da diminuição da dependência de água em ambientes com baixa umidade. Outra característica importante dos óleos utilizados como adjuvantes em formulações é a capacidade de evitar a

dessecação dos conídios sobre elevadas temperaturas, diminuindo a evaporação e mantendo o ambiente úmido por mais tempo para atender as necessidades hídricas exigidas pelos entomopatógenos (ALVES et al., 2000). O mecanismo pelo qual as formulações à base de óleo protegem os entomopatógenos das radiações UV ainda não está totalmente esclarecido, entretanto Peng e Xia (2011) sugerem que a explicação pode estar relacionada às características físicas de uma emulsão de água em óleo, já que o óleo mantém o ambiente úmido por mais tempo, evitando a evaporação da água; e a água, por possuir maior calor específico que o óleo, absorve a radiação solar elevando menos a temperatura, evitando desta forma, danos aos conídios. No presente estudo, o isolado de *M. anisopliae* s.l. teve seu potencial patogênico melhorado pelas formulações contendo 10%, 15% ou 20% de óleo mineral sobre todos os estágios de desenvolvimento avaliados do carrapato *R. microplus*. Estes resultados concordam com os resultados encontrados por Angelo et al. (2010), que formularam *L. lecanii* em 15% de óleo mineral e verificaram diferenças significativas em todos os estágios de desenvolvimento de *R. microplus*.

A cutícula dos carrapatos é formada por duas camadas: a epicutícula, fina camada composta por proteínas e secreções lipídicas, e a procutícula, camada mais espessa composta por proteína e quitina. (SONENSHINE, 1991). Esta constituição confere característica hidrofóbica à cutícula destes artrópodes (PRIOR et al., 1988; JENKINS et al., 1998), desta forma, os conídios que são suspensos somente em meio aquoso têm a adesão à cutícula do hospedeiro dificultada. Os conídios de alguns isolados fúngicos também apresentam propriedade hidrofóbica, o que dificulta ainda mais a sua adesão à cutícula do carrapato quando suspensos exclusivamente em água (PRIOR et al., 1988; JENKINS et al., 1998). No presente estudo, as formulações de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* foram mais eficientes sobre *R. microplus* quando comparadas às suspensões aquosas. Estes resultados podem ser explicados pelo aumento da adesão dos conídios à cutícula dos carrapatos proporcionado pelo adjuvante oleoso utilizado nas formulações, que possui propriedade quitinofílica. Esta propriedade dos óleos pode ter aumentado a afinidade dos conídios hidrofóbicos com a cutícula do carrapato, aumentando também a infectividade e, conseqüentemente a patogenicidade do isolado fúngico.

Outro fato que deve ser levado em consideração na explicação da superioridade das formulações oleosas sobre as suspensões aquosas observada no presente estudo é o melhor espalhamento de formulações oleosas em relação às suspensões aquosas. Esta afirmação é sustentada pelos resultados encontrados por Alves et al. (2001), que observaram um melhor espalhamento de formulações contendo óleos adjuvantes emulsionáveis sobre superfícies hidrofóbicas quando comparadas a suspensões à base de água. Este fato é explicado pela diminuição da tensão superficial do líquido causada pelo óleo, o que facilita o espalhamento dos conídios e a aderência dos mesmos sobre a cutícula do hospedeiro. Desta forma, a proporção de conídios em contato com a cutícula do artrópode é aumentada por formulações à base de óleo, já que um mesmo volume desta formulação tende a se espalhar melhor do que um volume equivalente de uma suspensão à base de água (ALVES et al, 2001).

A presença de compostos fungistáticos e compostos que estimulam a germinação dos conídios já foi relatada na superfície do corpo de artrópodes (SMITH; GRULA, 1982; BOUCIAS; LATGÉ, 1988; BUTT et al., 1995; LECUONA et al., 1997; KIRKLAND et al., 2004). Ibrahim et al., (1999) ao avaliarem o efeito de formulações oleosas na germinação de conídios de *M. anisopliae* s.l., sugeriram que o óleo seria capaz de liberar ou diluir compostos fungistáticos e estimulantes presentes na cutícula de insetos hospedeiros, e que a razão entre a quantidade destes compostos depende tanto do tipo de óleo utilizado, quanto da solubilidade dos compostos presentes em cada espécie de artrópode. Neste sentido, o óleo mineral utilizado nos bioensaios do presente estudo pode ter carregado compostos presentes na superfície de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *R. microplus* que estimularam a

germinação dos conídios, potencializando a primeira etapa de infecção dos fungos. Possivelmente, este fato pode ter acelerado o processo de infecção, uma vez que nos grupos tratados com formulação oleosa, os danos causados às fêmeas, ovos e larvas foram observados em menor período de tempo.

Estudos prévios (BITTENCOURT et al., 1996; BITTENCOURT et al., 1997; PAIÃO et al., 2001; FERNANDES et al., 2006) relataram a eficiência de *B. bassiana* em suspensão aquosa sobre fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *R. microplus*. Entretanto, no presente estudo, este isolado fúngico se mostrou pouco patogênico para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Esta diferença entre os resultados encontrados na literatura e os observados no presente estudo pode estar relacionada a diminuição da virulência do entomopatógeno após cultivos sucessivos em meios de cultura artificiais (ALVES, 1998). Segundo Castrillo e Brooks (1998), a virulência dos isolados fúngicos está relacionada a características genéticas, e existem fatores que podem aumentar ou diminuir este potencial. Desta forma, Fargues e Roberts (1983) observaram um aumento da virulência de um isolado de *M. anisopliae* s.l. após passagem pelo hospedeiro e, posteriormente uma diminuição desta virulência após cultivo em meio de cultura artificial, sugerindo que o substrato no qual o entomopatógeno é cultivado e as sucessivas passagens em meios de cultura artificiais são fatores que interferem na virulência do mesmo.

Outro fator que pode estar relacionado à variação entre os resultados do bioensaio com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* infectadas pelo isolado 986 de *B. bassiana* encontrados no presente estudo e os relatados na literatura, é a variação da susceptibilidade entre populações distintas desta espécie de carrapato. Fernandes et al., (2011) ao avaliarem a virulência de 60 isolados de *Beauveria* spp. notaram que, em um primeiro bioensaio, os isolados causaram mortalidade tardiamente em larvas de *R. microplus*, entretanto, em um segundo bioensaio com larvas de *R. microplus* de outra procedência, os mesmos isolados fúngicos causaram mortalidade no décimo dia após o tratamento. Perinotto (2010) também observou diferença na susceptibilidade de duas populações distintas de *R. microplus* infectadas por *B. bassiana* e *M. anisopliae* s.l.. Desta forma, se faz necessário avaliar não só a patogenicidade, e virulência dos isolados fúngicos, mas também a susceptibilidade de indivíduos de uma determinada população de carrapatos a estes entomopatógenos. Tendo em vista que é possível selecionar isolados fúngicos com maior potencial patogênico para diferentes populações de carrapato, o desenvolvimento de formulações que protejam estes isolados e potencializem a ação dos mesmos em condições ambientais ganha importância no controle biológico de carrapatos.

Pesquisadores observaram que a susceptibilidade a entomopatógenos e a adjuvantes utilizados em formulações varia entre ovos, larvas e fêmeas de carrapatos, e que as larvas mostraram-se mais susceptíveis (KAAYA; HASSAN, 2000; ABDEL-SHAIFY; SOLIMAN, 2004; PERINOTTO, 2010). Kaaya e Hassan (2000) observaram alterações significativas em todos os estágios de desenvolvimento de *Amblyomma variegatum* e *R. appendiculatus* tratados com formulações de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* contendo 15% de óleo de amendoim, entretanto as larvas foram mais susceptíveis, alcançando 100% de mortalidade. No presente estudo, ovos e larvas de *R. microplus* mostraram-se mais susceptíveis ao tratamento com as formulações de *B. bassiana* do que as fêmeas ingurgitadas, e apresentaram um percentual de mortalidade das larvas de até 99% no 25º dia após tratamento das mesmas, e uma redução no percentual de eclosão das larvas provenientes de ovos tratados de até 3,6 vezes em relação ao grupo controle. Outra alteração importante observada no bioensaio com larvas do presente trabalho foi a mortalidade das larvas do grupo controle, a partir do 15º dia após o tratamento com a maior concentração de óleo mineral. Um aumento significativo da mortalidade das larvas também foi observado nos grupos controle contendo 10% e 15% de óleo mineral, a partir do 20º dia após o tratamento. Estes resultados podem estar relacionados

a um possível efeito tóxico do óleo mineral sobre as larvas deste carrapato. No entanto, não foram observadas alterações nos grupos controle oleosos de ovos e fêmeas ingurgitadas, que pudessem ser atribuídas a toxicidade do óleo, possivelmente por estes estágios serem menos susceptíveis. Esta hipótese é reforçada por Abdel-Shafy e Soliman (2004) que, apesar de terem observado uma ação tóxica de cinco óleos essenciais sobre ovos, larvas e fêmeas de *Rhipicephalus annulatus* (= *Boophilus annulatus*), constataram que as larvas foram mais susceptíveis, seguidas de ovos e fêmeas ingurgitadas.

A aceitação e o uso de fungos entomopatogênicos como agentes de biocontrole de carrapatos podem ser facilitados pelo desenvolvimento de formulações que devem melhorar a eficiência de aplicação, estender a vida útil, reforçar a virulência e prolongar a persistência do patógeno no campo. No presente estudo, o óleo mineral se mostrou eficaz como adjuvante de formulações de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* no controle *in vitro* de *R. microplus*, o que possivelmente contribuirá com sua utilização no biocontrole a campo desta espécie de carrapato.

6 CONCLUSÕES

O óleo mineral utilizado nas concentrações de 10%, 15% ou 20% potencializa a ação dos isolados Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. e Bb 986 de *B. bassiana* sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, podendo ser utilizado como adjuvante em formulações oleosas para o controle deste carrapato.

O isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. é mais virulento para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* do que o isolado Bb 986 de *B. bassiana*.

O óleo mineral possui efeito deletério para larvas de *R. microplus* após prolongado período de contato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAIFY, S.; SOLIMAN, M. M. M. Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (acari: ixodida: amblyommidae) infesting cattle in Egypt. **Acarologia**, v. 44, p. 23-30, 2004.

ALVES, S. B.; RISCO, S. H.; ALMEIDA, L. C.. Influence of photoperiod and temperature on the development and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Journal of Applied Entomology**, v. 97, p. 127-129, 1984.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M.; STIMAC, J. L.; VIEIRA, S. A. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 575-581, 1996.

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

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

ALVES, R. T.; OLIVEIRA, M. A. S.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Espalhamento e eficiência de uma formulação de fungo à base de óleo adjuvante emulsionável. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** – Embrapa Cerrados, Planaltina, n. 6, p. 1-14, 2001.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of Different Formulations on Viability and Medium-Term Storage of *Metarhizium anisopliae* Conidia. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 91-99, 2002.

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

ÁNGEL-SAHAGÚNA, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; SKODAH, S. R.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; LORENZONI, A. G.; GALINDO-VELASCO, E.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.; FOSTER, J. E. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 278–286, 2010.

BARROS, T. A. M.; EVANS, D. E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infectantes do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, p. 17-21, 1989.

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

BENJAMIN, M. A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 723-728, 2002.

BENNETT, G. F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, 1974.

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

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 197-202, 1992.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 41-47, 1994.

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

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 de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, 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). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 49-52, 1997.

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

BOUCIAS, D. G.; LATGÉ, J. P. Non-specific induction of germination of *Coridiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* host and non-host cuticle extracts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 43, p. 288-292, 1988.

BUTT, T. M.; IBRAHIM, L.; CLARK, S. J.; BECKETT, A. The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. **Mycological Research**, v. 99, p. 945-950, 1995.

CASTRILLO, L. A; BROOKS, W. M. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isosyme and RAPD analyses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 190-196, 1998.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic Fungi. An Account of their Biology, Activities and Classification. San Francisco, CA: W.H. Freeman. 1964.

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

FARGUES, J. F.; ROBERT, P. H. Effects of passaging through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 576-583, 1983.

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

FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 270–274, 2004.

FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v. 98, p. 324-332, 2006.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 237–243, 2007.

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

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 69–78, 2008.

FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; CHONG, J. P.; RANGEL, D. E. N.; MILLER, M. P.; ROBERTS, D. W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 115–128, 2010.

FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, A. M. L.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. E. P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 2011. **No prelo**.

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

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, p. 23-28, 2002.

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

HORNBOSTEL, V. L.; OSTFELD, R. S.; ZHIOUA, E.; BENJAMIN, M. A. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 922-929, 2004.

HUANG, B. F.; FENG, M. G. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. **Mycopathologia**, v. 168, p. 145-152, 2009.

IBRAHIM, L.; BUTT, T. M.; BECKETT, A.; CLARK, S. J. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. **Mycological research** v. 103, p. 901-907, 1999.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; TARIQ, M. B.; STRASSER, H. **Fungi as Biological Control Agents**. CAB International, Wallingford, pp. 23-69, 2001.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, p. 129-145, 2010.

JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of massproduction technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v. 19, p. 21N-31N, 1998.

KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 15-20, 1996.

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

KIRKLAND, B. H.; CHO, E.; KEYHANI, N. O. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, p. 414- 421, 2004.

- LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, v.39, p.6-12, 2009.
- LAZZARINI, G. M. J.; ROCHA, L. F. N.; LUZ, C. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v. 110, p. 485–492, 2006.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ Jr., I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 1-11, 2003.
- LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 40-49, 2008.
- LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; MACHADO, L. A.; CARDOSO, C. L.; HAYASHI, M. S. Efeito do óleo de soja e do óleo mineral na proteção do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. contra a radiação ultravioleta 2537Å. **In Resumos do Congresso Brasileiro de Entomologia**, p. 308, 1993.
- LECUONA, R.; CLEMENT, J.-L.; RIBA, G.; JOULIE, C.; JUAREZ, P. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 119-123, 1997.
- LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; P'REZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 27-31, 2007.
- MADELIN, M. F.; ROBINSON, R. K.; WILLIAMS, R. J. Apressoriumlike structures in insects parasiting deuteromycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 404–412, 1967.
- MARANGA, R. O.; KAAAYA, G. P.; MUEKE, J. M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, v. 159, p. 527–532, 2005.
- MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; PRADO, A. P. Determinação da frequência de realização de bioensaios para o monitoramento da resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 87-93, 2007.
- MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**, v. 114, p. 49–56, 2010.
- MENT, D.; IRAKI, N.; GINDIN, G.; ROT, A.; GLAZER, I.; ABU-JREIS, R.; SAMISH, M. Thermal limitations of *Metarhizium anisopliae* efficacy: selection for application on warm-blooded vertebrates. **BioControl**, v. 56, p. 81–89, 2011.

- MONTEIRO, S. G.; BAHIENSE, T. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nittens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v. 33, p. 559-563, 2003.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.
- NORVAL, R. A. I.; PERRY, B. D.; YOUNG, A. S. The epidemiology of theileriosis in Africa. **Academic Press London**, 1992. p. 301-342.
- NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*: La Garrapata Común del Ganado Vacuno**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1982. 184p.
- PAIÃO, J. C. V.; MONTEIRO, A. C.; KRONKA, S. N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 245–251, 2001.
- PENG, G.; XIA, Y. The mechanism of the mycoinsecticide diluent on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. **BioControl**, 2011. No prelo.
- PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 4, p. 65, 1990.
- PERINOTTO, W. M. S. **Ação de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes localidades**. 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, SALLY-ANN. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v. 160, p. 151–157, 2005.
- PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C.; GARCIA, A. C.; SOARES, V. E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 855–861, 2005.
- PRIOR, C.; JOLLANDS, P., LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera:Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 66–72, 1988.
- RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 116–125, 2005.

REIS, R.C. S.; MELO, D. R.; SOUZA, E. J.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius,1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 544-547, 2001.

REIS, R. C. S.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Fungal Formulations to Control *Rhipicephalus sanguineus* Engorged Females. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, v. 1149, p. 239–241, 2008.

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

ROBERTS, D. W.; CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 10, p. 19–76, 1977.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 389-413, 2004.

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

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg.) Pic. Lako Parasit. Klistete *Ixodes ricinus*. **Zoologie List**, v. 39, p. 93-97, 1957.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. Two new *Beauveria* spp. from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 93-97, 1982.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins **Toxicon**, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SMITH, R. J.; GRULA, E. A. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 15–22, 1982.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. Old Dominion University, Norfolk, Virginia. Oxford University Press, 1991. 447 p. v. 1.

SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Evaluation of in vitro effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 8, p. 127-131, 1999.

SOUZA, E. J.; **Avaliação da eficácia de bioacaricidas a base de fungos entomopatogênicos, em diferentes formulações, no controle dos carrapatos *Anocentor nitens* e *Boophilus microplus***. 2003. 56 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2003.

SOUZA, E. J.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FAGUNDES, A. S. Ação do fungo *Beauveria bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens* em teste de campo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 163-169, 2009.

WALSTAD, J. D.; ANDERSON, R. F.; STAMBAUGH, W. J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 16, p. 221–226, 1970.

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

XIA, Y. X.; WANG, Z. K.; PENG, G. X.; ZENG, D. Y. A mycoinsecticide diluent. China Patent ZL02134002.1, 2002.

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

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553-596, 2007 a.

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