

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* UTILIZANDO
Metarhizium anisopliae NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Inês dos Santos Pereira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2021**

**CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* UTILIZANDO
Metarhizium anisopliae NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Inês dos Santos Pereira

Médica Veterinária

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração (Produção animal).

Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto

Co-orientador: Prof. Dr. Joselito Nunes Costa

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

P436c

Pereira, Inês dos Santos.

Controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando *Metarhizium anisopliae* no Recôncavo da Bahia / Inês dos Santos Pereira. _ Cruz das Almas, Bahia, 2021.

76f.

Orientador: Wendell Marcelo de Souza Perinotto.

Coorientador: Joselito Nunes Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. Controle de carrapatos – *Boophilus microplus*.
2. Controle de carrapatos – Fungos – Solos. 3. Recôncavo (BA) – Análise. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 582.28

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* UTILIZANDO
Metarhizium anisopliae NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Inês dos Santos Pereira

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2021

**Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Orientador**

**Prof^a. Dr^a. Rosangela Soares Uzeda
Universidade Federal da Bahia
Examinadora Externa**

**Dr. Leandro de Souza Rocha
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador Externo**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha vida e possibilidade de estar alcançando mais um sonho.

A família Pereira e Santos, especialmente aos meus pais José Valter Sena Pereira e Ivanilda dos Santos Pereira, por todos os esforços direcionados ao nosso melhor. A minha irmã Jocilene Pereira, pelo apoio e incentivo ao longo da minha vida acadêmica e pessoal.

Ao meu namorado Raoni Pires, pelo companheirismo, amor e compreensão.

Aos meus amigos, especialmente a Edilaine Reis pela amizade e carinho ao longo desses anos. A lally Moura, pela amizade e auxílio na execução do trabalho, por aturar minhas reclamações e dramas durante a pós-graduação. A Leandro Silva, por toda ajuda com a estatística do trabalho, pelos conselhos e amizade. Aos colegas do curso de mestrado e do grupo de pesquisa, Luis Eduardo Faria e Giancarlo Bomfim por sempre mostrar-se solícitos. Aos colegas de pós-graduação, por tornarem as aulas mais tranquilas e divertidas, pelo apoio e churrascos.

Ao meu orientador professor Wendell Perinotto, pela orientação, conselhos, direcionamento ao longo do curso de mestrado e por toda disponibilidade e atenção com seus alunos.

Ao meu co-orientador Joselito Nunes, pela orientação desde a graduação, pelo cuidado, apoio, incentivos, direcionamento e por toda disponibilidade.

Ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da UFRB, especialmente ao técnico Roque Antônio Menezes por sempre mostrar-se disposto a sanar dúvidas.

Aos meninos da Fazenda Experimental da UFRB, Vaval, Diego, Bel, Danilo e Crô, pelas risadas, cafezinhos, alegria e pela ajuda com o manejo dos animais durante o experimento.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, especialmente ao analista Leandro Rocha e ao Laboratório de Fitopatologia, pela parceria realizada e por sempre estar disponível para sanar as dúvidas e auxiliar na execução das atividades da pesquisa.

Ao Setor de Forragicultura da UFRB e ao professor Ossival Ribeiro, por ter cedido o espaço para a realização do experimento a campo, bem como, todo o auxílio prestado.

Ao professor Caio Márcio Monteiro da Universidade Federal de Goiás, por ter cedido a cepa de *R. microplus* para a realização dos ensaios biológicos.

As professoras Patrícia Silva Gôlo e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter doado o isolado fúngico que foi utilizado no presente experimento.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

E a agência de fomento CNPq pelo auxílio financeiro para a execução da pesquisa.

CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* UTILIZANDO *Metarhizium anisopliae* NO RECÔNCAVO DA BAHIA

RESUMO: Os objetivos deste estudo foram avaliar a patogenicidade *in vitro* e em condições seminaturais do fungo *Metarhizium anisopliae* em formulações aquosa e oleosa sobre os estágios de vida livre do carrapato *Rhipicephalus microplus*, e verificar o período de permanência deste microrganismo no solo. O ensaio biológico em condições seminaturais utilizou fêmeas ingurgitadas, que foram depositadas em vasos previamente cultivados com *Brachiaria brizantha* e pulverizados com 80 mL dos tratamentos propostos. O experimento foi composto por quatro tratamentos: controle aquoso (água destilada e Tween 80 a 0,1%); controle oleoso (água destilada + Tween 80 a 0,1% + 10% de óleo mineral); formulação aquosa (*M. anisopliae* + água destilada + Tween 80 a 0,1%); formulação oleosa (*M. anisopliae* + água destilada + Tween 80 a 0,1% + 10% de óleo mineral), com 10 vasos por grupo. A ação *in vitro* do fungo sobre *R. microplus* foi avaliada utilizando o teste de imersão de fêmeas. No teste em condições seminaturais, a patogenicidade do fungo sobre o carrapato foi avaliada por meio de vistorias diárias a fim de identificar a mortalidade das fêmeas e pela recuperação das larvas das gramíneas no 42º dia, após o tratamento. Também foi realizado o isolamento fúngico a partir das fêmeas de *R. microplus* mortas e do solo dos vasos. Para a avaliação da sobrevivência do fungo no solo foram coletadas amostras antes da pulverização e no 3º, 7º, 21º e 52º dia após o tratamento. No teste *in vitro* a formulação oleosa de *M. anisopliae* reduziu significativamente o peso da massa de ovos das teleóginas, bem como, do índice de produção de ovos, conferindo um percentual de controle de 78,6%, o que pode ser justificado pela proteção e melhor adesão a cutícula do carrapato conferida pelo óleo mineral aos conídios. O tratamento formulação oleosa também reduziu o número de larvas infestantes no experimento nas condições seminaturais, promovendo percentual de controle entre 58,4 e 61,3% sobre larvas de *R. microplus*. As análises macro e micromorfológica das colônias fúngicas isoladas das fêmeas e do solo tratados com as formulações aquosa e oleosa foram compatíveis com as descritas na literatura para *M. anisopliae*. Para ambos os grupos se verificou persistência do fungo no solo por até 52 dias após tratamento. Os resultados apontam a capacidade de *M. anisopliae* de reduzir os parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* no teste *in vitro*, reduzir o número

de larvas e sua viabilidade no solo em condições seminaturais no Recôncavo da Bahia.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos; controle biológico; fungos entomopatogênicos

CONTROL OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* USING *Metarhizium anisopliae* IN THE CLIMATE CONDITIONS OF RECÔNCAVO DA BAHIA

ABSTRACT: The objectives of this study were to evaluate the pathogenicity *in vitro* and in semi-natural conditions of the fungus *Metarhizium anisopliae* in aqueous and oily formulations on the free life stages of the tick *Rhipicephalus microplus*, and to verify the period of permanence of this microorganism in the soil. The biological assay in semi-natural conditions used engorged females, which were deposited in pots previously grown with *Brachiaria brizantha* and sprayed with 80 mL of the proposed treatments. The experiment consisted of four treatments: aqueous control (distilled water and 0.1% Tween 80); oily control (distilled water + 0.1% Tween 80 + 10% mineral oil); aqueous formulation (*M. anisopliae* + distilled water + 0.1% Tween 80); oily formulation (*M. anisopliae* + distilled water + 0.1% Tween 80 + 10% mineral oil), with 10 pots per group. The *in vitro* action of the fungus on *R. microplus* was evaluated using the female immersion test. In the test under semi-natural conditions, the pathogenicity of the fungus on the tick was assessed by daily surveys in order to identify the mortality of the females and by the recovery of the grass larvae on the 42nd day after treatment. Fungal isolation was also performed from dead *R. microplus* females and pot soil. To assess the survival of the fungus in the soil, samples were collected before spraying and on the 3rd, 7th, 21st and 52nd days after treatment. In the *in vitro* test the oily formulation of *M. anisopliae* significantly reduced the weight of the egg mass of the teleogens, as well as the egg production index, giving a control percentage of 78.6%, which can be justified by the protection and better adhesion to the tick cuticle conferred by mineral oil to the conidia. The oily formulation treatment also reduced the number of weed larvae in the experiment under semi-natural conditions, promoting a control percentage between 58.4 and 61.3% over *R. microplus* larvae. Macro and micromorphological analyzes of fungal colonies isolated from females and soil treated with aqueous and oily formulations were compatible with those described in the literature for *M. anisopliae*. For both groups, the fungus persisted in the soil for up to 52 days after treatment. The results indicate the capacity of *M. anisopliae* to reduce the reproductive parameters of engorged females of *R. microplus* in the *in vitro* test, to reduce the number of larvae, and their viability in the soil under semi-natural conditions in the Recôncavo da Bahia.

KEYWORDS: Bovine tick; biological control; entomopathogenic fungi

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Método de mensuração de colônias, baseado no número de cruzes (+) que categoriza a quantidade de colônias isoladas em placas de Petri após a inoculação das amostras de solo em meio seletivo CTC para *Metarhizium* sp.....35
- Tabela 2 Intervalos de medidas de concordâncias entre observadores da estatística de Kappa, segundo a interpretação de Landis e Koch (1977).....37
- Tabela 3 Comparação de médias e desvio padrão das variáveis peso inicial das fêmeas ingurgitadas (mg), peso da massa de ovos (mg), índice de produção de ovos (%), percentual de eclosão de larvas (%) e percentual de controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no ensaio *in vitro*. Média ± Desvio padrão.....41
- Tabela 4 Comparação das médias e desvio padrão das contagens de larvas infestantes provenientes de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* dos grupos controles e formulação aquosa e oleosa, obtidas aos 42 dias após os tratamentos propostos. Média ± Desvio padrão.....42
- Tabela 5 Eficácia (%) das formulações aquosa e oleosa de *Metarhizium anisopliae* sobre a recuperação das larvas infestantes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, em ensaio biológico em condições seminaturais.....43
- Tabela 6 Classificação do número de colônias de *Metarhizium anisopliae* isoladas do solo (3^o, 7^o, 21^o e 52^o dia), segundo o método proposto por Marciano (2016).....46
- Tabela 7 Comparação da intensidade da concordância entre as avaliações feita por três avaliadores (AV) do número de colônias de *Metarhizium anisopliae* isolados do solo. A concordância foi mensurada utilizando o método estatístico Kappa.....48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Vista dorsal do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A. macho. B. fêmea ingurgitada.....6
- Figura 2 Morfologia do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A. Vista ventral. B. Vista dorsal..... 7
- Figura 3 Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 1. ninfa; 2. fêmea iniciando o repasto sanguíneo; 3. fêmea ingurgitada; 4. teleóquina no solo; 5. ovos; 6. larva infectante.....8
- Figura 4 Mapa dos biomas no estado da Bahia, demonstrando as áreas livres, áreas de instabilidade e estabilidade enzoótica para o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 11
- Figura 5 Mapa do Brasil indicando os estados com populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a acaricidas comerciais. Siglas: AM: amitraz; P: Piretroides; OF: Organofosforado; LM: Lactona Macroclícica; SP: Piretróides Sintéticos..... 14
- Figura 6 *Metarhizium anisopliae*. A. Hifas, fiálides e conídios; B. Colônia madura (9 dias) em Batata Dextrose Ágar a 28°C..... 19
- Figura 7 Exteriorização de *Metarhizium* sp. sobre fêmea de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A. vista ventral e B. vista dorsal21
- Figura 8 Fêmeas de *Rhipicephalus* após infecção com *Metarhizium anisopliae*. A. 1 hora de infecção, presença de conídios sobre a superfície do carrapato. B. 18 horas de infecção, formação de tubo germinativo e estrutura semelhante ao apressório. C. Entre 18 a 48 horas, penetração do fungo na hemocele. D. 48 e 72 horas, colonização do fungo sobre a superfície do carrapato. E. Entre o 4º e 5º dia, mortalidade das fêmeas com esporulação do fungo. F. Extrusão do micélio fúngico sobre o cadáver do carrapato..22
- Figura 9 Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tubos de ensaio com formulações aquosa e oleosa de *Metarhizium anisopliae*. B. Fêmeas fixadas em placa de Petri após o tratamento..30
- Figura 10 A. Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* realizando ovoposição. B. Coleta da massa de ovos. C. Massa de ovos em frascos de vidro para incubação e posterior eclosão de larvas.....30
- Figura 11 Esquema representativo do ensaio biológico em condições seminaturais.32
- Figura 12 Corte do ápice das hastes de *Brachiaria brizantha* para recuperação das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.33
- Figura 13 Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inviáveis. A. Fêmeas apresentando coloração enegrecida no solo. B. Fêmeas mantidas em câmara úmida para isolamento fúngico34

Figura 14 A. Colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> após 7 dias de incubação em B.O.D. sob temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$. B. Hifas e conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Escala: $50\mu\text{m}$	38
Figura 15 Presença de conídios não germinados e conídios germinados, evidenciando-se o tubo germinativo. C: conídio; TG: tubo germinativo. Escala: $20\mu\text{m}$	39
Figura 16 A. Fêmea de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> colonizada por <i>Metarhizium anisopliae</i> . B. Microfotografia de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Escala: $50\mu\text{m}$	44
Figura 17 A. Colônias de <i>Metarhizium anisopliae</i> (setas amarelas) e colônias de fungos contaminantes (setas vermelhas) em meio seletivo CTC a partir de amostras de solo. A: Placa sem colônias características de <i>Metarhizium anisopliae</i> (-); B: Placa contendo de 1 a 25 colônias características de <i>Metarhizium anisopliae</i> (+); C: Placa contendo de 51 a 75 colônias características de <i>Metarhizium anisopliae</i> (+++); D: Placa contendo mais de 76 colônias (++++) características de <i>Metarhizium anisopliae</i>	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESES.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo geral.....	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4.1 Taxonomia, morfologia e biologia do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	5
4.2 Importância do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> na produção de bovinos.....	9
4.3 Método convencional para o controle do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
4.4 Métodos alternativos para o controle do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	14
4.5 Caracterização do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
5. MATERIAL E METÓDOS.....	25
5.1 Local de realização do experimento e monitoramento das condições climáticas.....	25
5.2 Preparação dos vasos e plantio de <i>Brachiaria brizantha</i>	25
5.3 Manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	26
5.4 Delineamento experimental.....	27
5.5 Obtenção e manutenção dos isolados fúngicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> e preparo das formulações aquosa e oleosa.....	28
5.6 Viabilidade dos conídios.....	29
5.7 Teste <i>in vitro</i> utilizando fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	29
5.8 Ensaio biológico em condições seminaturais.....	32
5.9 Recuperação das larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e percentual de controle.....	33

5.10 Isolamento de <i>Metarhizium anisopliae</i> a partir das fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	35
5.11 Isolamento e identificação de <i>Metarhizium anisopliae</i> para a avaliação da persistência do fungo no solo.....	34
5.12 Análise estatística.....	37
6. RESULTADOS.....	39
6.1 Teste <i>in vitro</i> utilizando fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	39
6.1.1 Parâmetros reprodutivos.....	41
6.2 Ensaio biológico em condições seminaturais.....	42
6.2.1 Recuperação das larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e percentual de controle.....	42
6.2.2 Isolamento de <i>Metarhizium anisopliae</i> a partir das fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	44
6.2.3 Isolamento e identificação de <i>Metarhizium anisopliae</i> para a avaliação da persistência do fungo no solo.....	45
7. DISCUSSÃO.....	50
8. CONCLUSÕES.....	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICES.....	65
ITENS EXIGIDOS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Dentre os ectoparasitos de interesse pecuário, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* merece maior destaque na produção de bovinos. Apresenta ampla distribuição geográfica, presente principalmente em regiões de clima tropical e subtropical e são responsáveis por prejuízos na produção de carne e leite, além de serem vetores na transmissão de importantes agentes patogênicos como, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* (GARCIA *et al.*, 2016).

O Recôncavo da Bahia possui clima tropical quente e úmido favorecendo a manutenção de pastagens durante todo o ano, possibilitando assim, condições favoráveis para a atividade da bovinocultura (GUIMARÃES *et al.*, 2016). No entanto, o clima observado nessa região possibilita condições necessárias para o desenvolvimento e sobrevivência desse parasito durante todo o ano (CAMPOS JUNIOR e OLIVEIRA, 2005; BIEGELMEYER *et al.*, 2012).

O controle de *R. microplus* é baseado na utilização de acaricidas químicos, entretanto, o uso massivo desses produtos induziu a seleção de cepas resistentes, sendo possível observar diferentes mecanismos ligados a resistência parasitária, por exemplo, a resistência metabólica e insensibilidade do sítio alvo a molécula acaricida. Outra preocupação atual, são os resíduos químicos que podem ser encontrados na carne e leite (KLAFKE *et al.*, 2017; GARCIA *et al.*, 2019). A relevância de *R. microplus* para a pecuária nacional, assim como, a presença de cepas resistentes aos acaricidas sintéticos, revelam a necessidade de pesquisas por métodos alternativos de controle. Assim, o controle biológico tem ganhado destaque, principalmente com a utilização de fungos entomopatogênicos, com destaque para o fungo *Metarhizium anisopliae* (MARCIANO *et al.*, 2015; SIMI, GARCIA e RODRIGUES, 2019).

Atualmente *M. anisopliae* é comumente empregado no combate à diferentes pragas agrícolas (REHNER e KEPLER, 2017) e os estudos com a utilização desse patógeno na parasitologia veterinária para o controle de *R. microplus* são bastantes promissores. Os resultados *in vitro* têm revelado sua especificidade e patogenicidade para essa espécie de carrapato, sua eficácia foi

demonstrada em diferentes fases de vida livre do parasito (CAMARGO *et al.*, 2012; PERINOTTO *et al.*, 2012; QUINELATO *et al.*, 2012; CAMARGO *et al.*, 2014), o que denota grande importância, pois, o principal entrave atual está na dificuldade do seu controle ambiental (QUINELATO *et al.*, 2012).

A viabilidade de *M. anisopliae* no ambiente sofre influência de alguns fatores abióticos, principalmente temperatura, umidade relativa do ar e a radiação solar (MARCIANO *et al.*, 2013). A adição de veículos oleosos a formulações fungícas têm funcionado como adjuvantes, pois possibilitam o aumento da eficácia do fungo contra *R. microplus*, uma vez que, o óleo confere proteção aos conídios frente as intempéries ambientais, além de facilitar sua adesão a superfície do carrapato. Assim, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a patogenicidade *in vitro* e em condições seminaturais do fungo *M. anisopliae* em formulações aquosa e oleosa sobre os estágios de vida livre do carrapato *R. microplus*, e verificar o período de permanência deste microrganismo no solo.

2. HIPÓTESES

A formulação oleosa do fungo *M. anisopliae* apresenta maior atividade carrapaticida do que a formulação aquosa em testes *in vitro* e em condições seminaturais sobre *R. microplus*

As condições climáticas do Recôncavo da Bahia favorecem a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* sobre *R. microplus* em condições seminaturais.

Tais condições climáticas permitem a sobrevivência do fungo no solo, aumentando as chances de controlar os estágios de vida livre do carrapato.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a patogenicidade *in vitro* e em condições seminaturais do fungo *Metarhizium anisopliae* em formulação aquosa e oleosa sobre os estágios de vida livre do carrapato *R. microplus*, e verificar o período de permanência deste microrganismo no solo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a patogenicidade *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* em formulação aquosa e oleosa, sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.
- Avaliar a recuperação das larvas após o tratamento com o fungo *Metarhizium anisopliae* em formulação aquosa e oleosa, mantidos em vasos com *Brachiaria brizantha*.
- Realizar o isolamento fúngico a partir das fêmeas de *Rhipicephalus microplus* mortas.
- Verificar o período de persistência de *Metarhizium anisopliae* no solo em vasos com *Brachiaria brizantha*.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Taxonomia, morfologia e biologia do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida e Superfamília Ixodoidea. A classe Arachnida é caracterizada pela ausência de asas, antenas e mandíbulas, presença de quelíceras e pedipalpos, e corpo dividido em cefalotórax e abdômen (KOLLER e MATIAS, 2016; MONTEIRO, 2017).

A Superfamília Ixodoidea é constituída por três famílias, Argasidae, Ixodidae e Nutalliellidae. A família Ixodidae, difere-se das demais devido a presença de escudo dorsal, peças bucais projetadas para frente e por apresentarem estigmas respiratórios após o quarto par de patas. Sendo constituída pelos seguintes gêneros, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes* e *Haemaphysalis*. Vale ressaltar que a maioria dos carrapatos de importância veterinária está incluída nessa família (AHID, 2009; MONTEIRO, 2017).

No Brasil o gênero *Rhipicephalus* encontra-se dividido em duas espécies: *Rhipicephalus sanguineus*, responsável por parasitar principalmente os cães, animais silvestres e esporadicamente o homem, e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cujos principais hospedeiros são os bovinos, podendo excepcionalmente parasitar outras espécies animais (KOLLER e MATIAS, 2016). O carrapato *R. microplus* é uma espécie monoxena, ou seja, necessita apenas de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida (MONTEIRO, 2017).

Morfologicamente, os machos são menores, apresentando cerca de 1,5 e 2 mm, já as fêmeas medem entre 2,3 e 13 mm (ingurgitadas) (Figura 1). Possuem dimorfismo sexual bastante acentuado e sua coloração varia entre castanha avermelhada e castanha com tons de marrom (AHID, 2009; KOLLER e MATIAS, 2016).

Figura 1 Vista dorsal do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A. macho. B. fêmea ingurgitada.

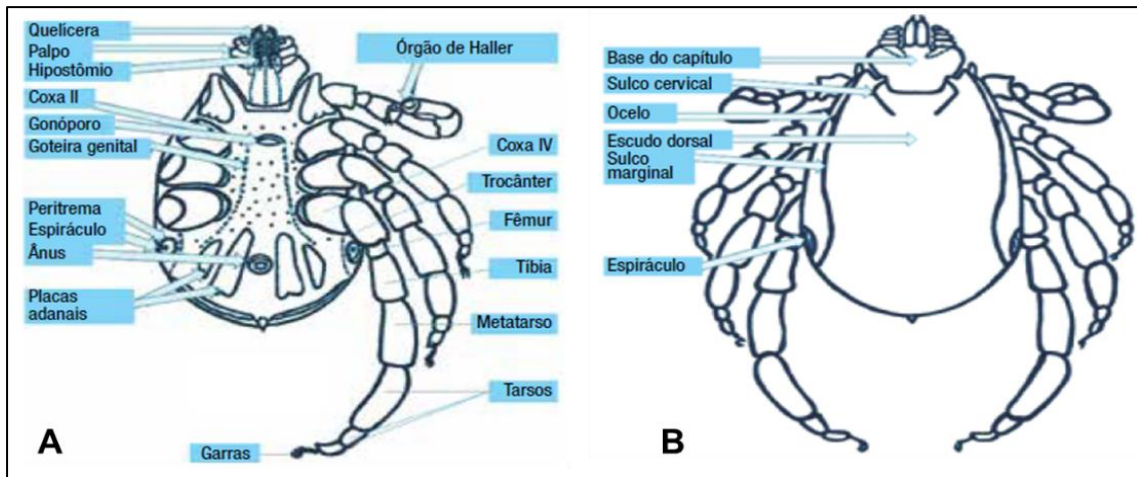


Fonte: <http://carrapatos.cnpqc.embrapa.br/museu.html>

O capítulo ou gnatossoma está localizado na borda anterior do corpo do carrapato e é constituído por estruturas bucais bastante quitinizadas, são elas: base do capítulo, palpos, quelíceras e hipostômio. A base do capítulo possui formato hexagonal; os palpos são relativamente mais curtos do que o hipostômio; o par de quelíceras permite cortar, dilacerar e perfurar a pele do hospedeiro; e o hipostômio apresenta dentes e tem a função de órgão fixador do parasito no animal durante a fase parasitária (AHID, 2009).

O idiossoma é a junção do cefalotórax e abdômen, pois não há separação entre esses segmentos. Outra característica marcante nessa espécie é a presença de escudo com ornamentações na região dorsal do idiossoma, além de apresentarem olhos localizados na lateral desse escudo (AHID, 2009; KOLLER e MATIAS, 2016). Na face ventral do idiossoma localizam-se os pares de patas, que nos adultos e ninfas são no total de quatro pares e no estágio larval três pares (SANTOS *et al.*, 2013). No primeiro par de patas está localizado o órgão de Haller, estrutura sensorial que atua como órgão olfativo, além de detectar umidade. Os machos possuem dois pares de placas adanais e podem apresentar um apêndice caudal (Figura 2) (MONTEIRO, 2017).

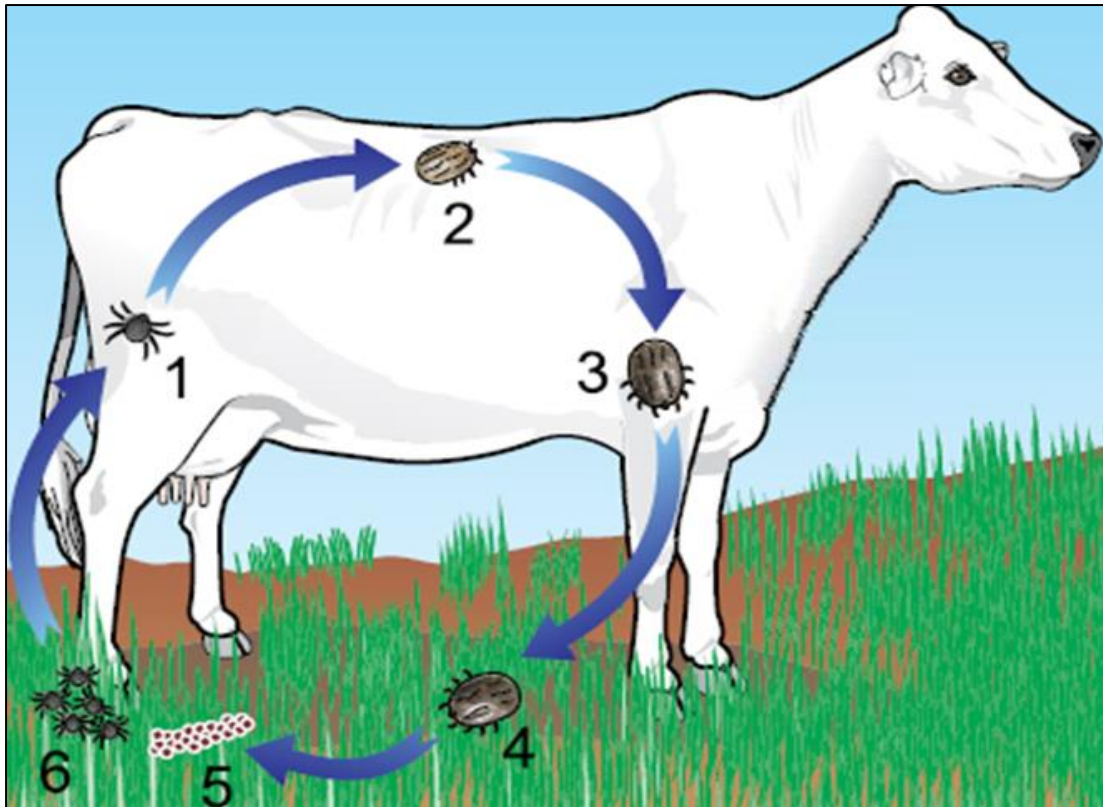
Figura 2 Morfologia do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A. Vista ventral. B. Vista dorsal.



Fonte: KOLLER e MATIAS (2016).

O ciclo evolutivo deste parasito é caracterizado por duas fases, uma fase parasitária e outra de vida livre (Figura 3). A fase parasitária constitui todo o período que o carrapato se encontra no hospedeiro, desde a fixação da larva até à fêmea ingurgitada, esse período compreende em média 21 dias (GARCIA *et al.*, 2019). Após fixação no hospedeiro as larvas podem distribuir-se por todo o corpo do animal, no entanto, algumas regiões são mais favoráveis para seu desenvolvimento. Geralmente se alojam nas regiões perianal, perineal, perivulvar, barbela e face interna da orelha. Inicialmente a larva se alimenta de linfa, até realizar a primeira ecdise e se transformar em ninfa, esse período compreende cerca de sete dias (RODRIGUES *et al.*, 2016). A ninfa sofre nova ecdise após sete dias, ocorrendo diferenciação sexual em macho e fêmea. Os machos permanecem no hospedeiro e copulam com várias fêmeas. A fêmea adulta após ser copulada, realiza o repasto sanguíneo até estar totalmente ingurgitada, para então desprender-se do bovino. Nesse período de ingurgitamento as fêmeas aumentam cerca de duzentas vezes seu peso inicial (GARCIA *et al.*, 2016).

Figura 3 Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 1. ninfa; 2. fêmea iniciando o repasto sanguíneo; 3. fêmea ingurgitada; 4. teleógina no solo; 5. ovos; 6. larva infectante.



Fonte: PEREIRA, SOUZA e BAFFI (2010).

Após o desprendimento da teleógina fecundada e ingurgitada, tem-se o início da fase de vida livre do parasito. A duração dessa fase varia de acordo com as variações climáticas, sendo 27°C e 80% de umidade as condições ideais para o ciclo de vida livre do parasito (MONTEIRO, 2017). A fase de vida livre é caracterizada pela ovoposição, embriogênese (incubação dos ovos) e posteriormente eclosão da larva. As condições climáticas exercem grande influência na fase de vida livre do parasito, em condições favoráveis esse ciclo pode durar cerca dois meses, podendo estender-se em climas frios ou secos (GARCIA *et al.*, 2019).

Cerca de 52% do peso corporal das fêmeas será convertido em produção de ovos, isso justifica a necessidade de alimentação pela teleógina, o sangue ingerido possibilita matéria-prima energética para a produção de aproximadamente 3.000 a 4.000 ovos/fêmea (MONTEIRO, 2017; GARCIA *et al.*, 2016). A fase posterior à ovoposição é denominada embriogênese, que é

caracterizada pelo desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação e crescimento do embrião, essa fase dura em torno de 17 a 60 dias (GUIZZO *et al.*, 2012; MONTEIRO, 2017; MARTINS *et al.*, 2018).

Logo após a eclosão as larvas apresentam três pares de patas e não possuem poder infestante, ou seja, ainda não consegue parasitar o animal. Após cerca de 2 a 3 dias há o completo endurecimento de sua cutícula e as mesmas sobem para o ápice das hastes da gramínea. As larvas possuem uma região sensorial, denominada órgão de Haller que possibilita a mesma o reconhecimento do hospedeiro pelo olfato, secreções da pele e pelo gás carbônico liberado pelos bovinos (FORTES, 2004; PEREIRA *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2019).

Durante a fase de vida livre a pressão ambiental sobre o carrapato é bem mais significativa, pois estão expostos a diferentes fatores, tais como: temperatura, umidade relativa do ar, tipo de forragem e manejo utilizado no pasto, presença de inimigos naturais e também a raça bovina utilizada na propriedade (PINHEIRO *et al.*, 2014). Dentre os fatores citados, a temperatura ambiental é considerada o fator abiótico de maior relevância para a sobrevivência do ectoparasito na pastagem (ESTRADA-PEÑA, AYLLÓN e LA FUENTE, 2012).

4.2 Importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na produção de bovinos

De acordo com Grisi *et al.* (2014) o carrapato *R. microplus* é um dos parasitos que causam maiores prejuízos direto ou indireto na pecuária nacional, gerando impacto anual em torno de US\$ 3,2 bilhões. O prejuízo econômico é decorrente dos gastos com acaricidas para o seu controle e tratamento de animais doentes (GARCIA *et al.*, 2016).

Além dos gastos com controle e tratamento de animais enfermos, *R. microplus* é responsável por danos diretos aos bovinos como, redução na produção de carne e leite. Cada fêmea pode ingerir cerca de 0,5 a 3,0 mL de sangue durante a fase parasitária e estima-se uma perda de 1 grama de peso

vivo e 8,9 mL de leite por carrapato (BRITO et al., 2010). De acordo com Rodrigues e Leite (2013), estima-se uma redução de 92,24 litros de leite por vaca durante uma lactação. Observa-se também, ineficiência reprodutiva e depreciação do couro, decorrente de lesões inflamatórias pela fixação do parasito e infecções secundárias, como presença de miíases. Além da transmissão de agentes patogênicos como, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, responsáveis pelo complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (ANDREOTTI, 2010; ANDREOTTI, KOLLER e GARCIA, 2016; GARCIA et al., 2019).

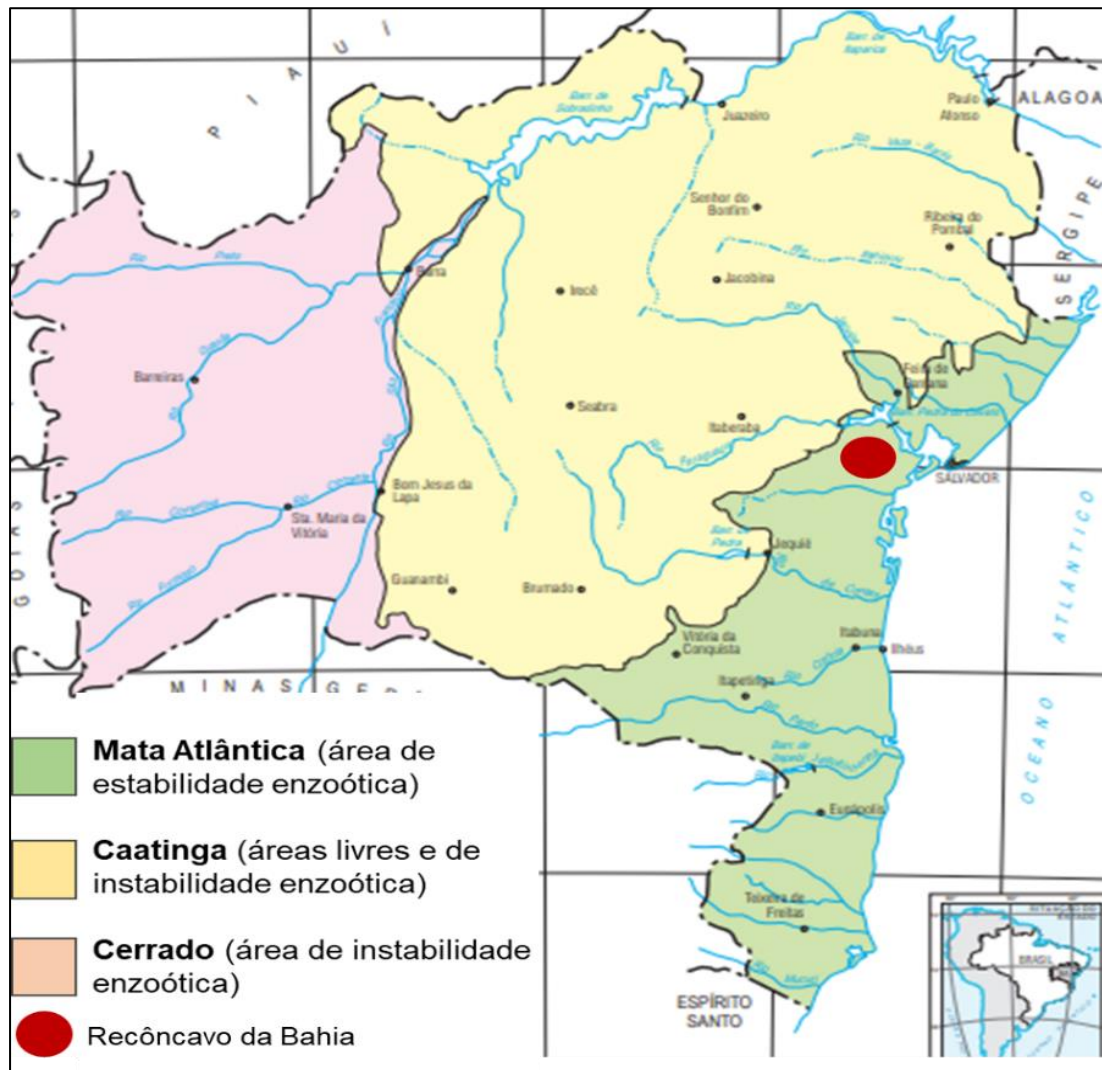
A TPB é uma importante doença parasitária, caracterizada por alta morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2017). Os indivíduos acometidos geralmente apresentam perda de peso, pelos eriçados, apatia, enfraquecimento muscular, anemia, dispneia, taquicardia, icterícia, hemoglobinúria, hipertermia e nos casos graves pode evoluir para o óbito (GONÇALVES et al., 2011). Segundo Gonçalves et al. (2011), um conjunto de fatores pode influenciar a susceptibilidade desses animais a TPB, tais como: condições epidemiológicas da região; fatores ligados ao animal, como raça e imunidade e ao agente etiológico, por exemplo, carga parasitária.

De acordo com Amorim et al. (2014), o estado da Bahia possui condições propícias para o desenvolvimento e sobrevivência desse ectoparasito, no entanto, devido às diferenças climáticas presentes na região, verificam-se variações na sua incidência. No presente estado é possível identificar três diferentes biomas: mata atlântica, que possui clima tropical úmido e subtropical, além de precipitação regular durante todo o ano, abrangendo a região do Recôncavo da Bahia; caatinga, com clima semi-árido e baixo índice pluviométrico; e o cerrado, caracterizado pelo clima tropical sazonal (EVANGELISTA, 2011; COSTA et al., 2013; CARDOSO, 2016; GUIMARÃES et al., 2016).

A presença ou ausência do carrapato nestes diferentes biomas pode ser influenciada pelas particularidades climáticas, definindo assim as seguintes áreas: áreas livres, áreas de instabilidade enzoótica e de estabilidade enzoótica (Figura 4). As áreas livres são aquelas cujas condições ambientais não permitem a sobrevivência do carrapato. Já as áreas de instabilidade enzoótica, são caracterizadas pela oscilação da presença desse ectoparasito, em virtude da

existência de estações mais frias ou secas durante o ano, reduzindo assim, a sua fase de vida livre (COSTA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2014; VILELA *et al.*, 2020). No que se refere às áreas de estabilidade enzoótica, verifica-se a presença do carrapato durante todo o ano, devido condições climáticas que favorecem sua sobrevivência (SANTOS *et al.*, 2017).

Figura 4 Mapa dos biomas no estado da Bahia, demonstrando as áreas livres, áreas de instabilidade e estabilidade enzoótica para o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Fonte: Adaptado de https://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto_biomias.pdf

Estudos realizados por Costa *et al.* (2013) e Barros *et al.* (2017), demonstraram que os períodos prolongados de estiagem observado no bioma

da Caatinga implicam na baixa ocorrência de *R. microplus*, caracterizando essa região como uma área de instabilidade enzoótica e até mesmo como área livre (COSTA *et al.*, 2018). Pelo fato dos animais não terem contato contínuo com os agentes da TPB, principalmente quando jovens, não desenvolvem uma resposta imunológica específica e, portanto, tornam-se adultos mais susceptíveis a doença (COSTA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2018).

Quando ocorre o deslocamento de animais de áreas livres ou de instabilidade enzoótica para aquelas de estabilidade, há grandes chances da ocorrência de surtos da doença, uma vez que estes animais não possuem imunidade para os agentes *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale* (GONÇALVES, 2000). Um fator importante a ser mencionado que ocorre na Bahia e reforça a importância desse ectoparasito, é a movimentação de bovinos entre propriedades da região semiárida, nas épocas de seca para as regiões sul e do recôncavo, que são áreas de estabilidade enzoótica, aumentando a possibilidade de surtos de TPB. Portanto, é necessário o cuidado ao introduzir novos animais ao rebanho, principalmente bovinos adquiridos de regiões de instabilidade enzoótica ou áreas livres (AMORIM *et al.*, 2014).

Os estudos epidemiológicos regionais são de grande relevância para identificação de áreas de estabilidade ou instabilidade enzoótica, pois possibilitam determinar fatores climáticos, manejo utilizado, sistema produtivo, presença do vetor e características do animal. Esse conjunto de informações permite identificar a probabilidade de ocorrência de doenças, bem como, o planejamento de medidas preventivas (GUIMARÃES *et al.*, 2011).

4.3 Método convencional para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O controle de *R. microplus* comumente empregado na pecuária nacional ainda é através do uso de diferentes bases acaricidas, são elas: organofosforados, piretroides, amidínicos, fenilpirazoles, lactonas macrocíclicas, benzoilfeniluréis e thiazolinas (ANDREOTTI, 2010; HIGA *et al.*, 2019). Geralmente esses produtos são utilizados sob as formas de pulverização, banho

de imersão, injetáveis ou *pour-on* e objetivam o controle da fase parasitária do carrapato (ANDREOTTI, 2010; BIEGELMEYER et al., 2012; HIGA et al., 2019).

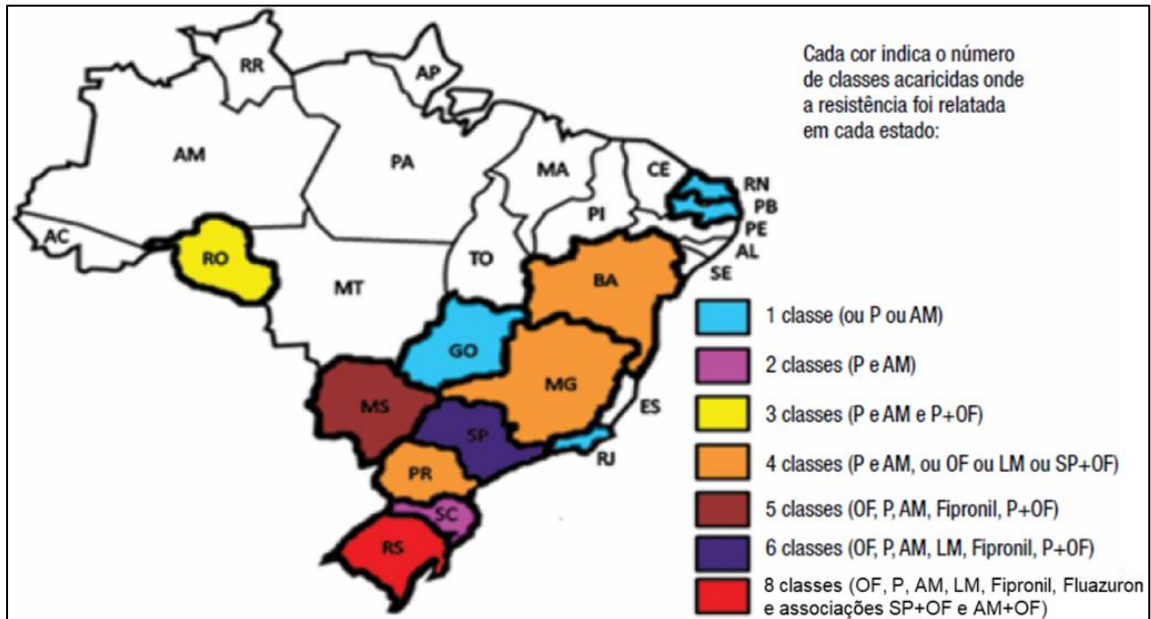
Todavia, o uso indiscriminado desses produtos, com a utilização de subdosagens, tratamentos frequentes e práticas inadequadas de manejo, contribuíram para a seleção de cepas resistentes (GARCIA et al., 2016; PERINOTTO et al., 2017). Para Garcia et al. (2016), a ausência de políticas públicas no controle e venda desses acaricidas, permite a maior facilidade do uso indiscriminado e conseqüentemente fracassos na tentativa de controle do parasito.

Higa et al. (2015) relataram a presença de populações de *R. microplus* resistentes a diferentes bases químicas disponíveis no mercado, revelando a presença dessas cepas em diferentes estados brasileiros (Figura 5). Esse estudo demonstrou que no estado da Bahia existem cepas resistentes a diferentes classes de acaricidas, são elas: piretroides, amitraz, organofosforados, lactona macrocíclica e a associação entre piretroides e organofosforados.

Esses achados são corroborados por estudos de diversos autores que verificaram a redução da eficácia de grupos químicos em diferentes estados do país: Goiás (SILVEIRA NETO et al., 2017), Bahia (CAMPOS JUNIOR e OLIVEIRA, 2005; SPAGNOL, PARANHOS e ALBUQUERQUE, 2010; RAYNAL et al., 2013; RAYNAL et al., 2018), Rondônia (BRITO et al., 2011), Santa Catarina (PEDRASSANI e REISDORFER, 2015), Ceará, Espírito Santo e Mato Grosso (HIGA et al., 2016), Rio Grande do Sul (KLAFKE et al., 2017) e Minas Gerais (CARNEIRO et al., 2015).

Para Garcia et al. (2016) é necessário o monitoramento das cepas resistentes, através de testes de biocarrapaticidograma, toxicológico e bioensaios, os quais contribuem para o diagnóstico da resistência e conseqüentemente maior segurança durante a escolha do produto. Além disso, alguns aspectos também são importantes para estratégias de controle, devendo-se conhecer o ciclo biológico, sazonalidade do carrapato e verificar a existência de cepas resistentes na região em questão.

Figura 5 Mapa do Brasil indicando os estados com populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a acaricidas comerciais. Siglas: AM: amitraz; P: Piretroides; OF: Organofosforado; LM: Lactona Macroclíca; SP: Piretroides Sintéticos.



Fonte: GARCIA *et al.* (2016) adaptado de HIGA *et al.* (2015).

4.4 Métodos alternativos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

As recorrentes discussões sobre os impactos ambientais decorrentes do uso de antiparasitários na pecuária atual e seus resíduos nos produtos de origem animal, bem como, os riscos para a saúde humana, atrelado a uma demanda da população por produtos com menos resíduos químicos e produzido de forma sustentável. Que somado ao elevado custo com o uso dessas substâncias e ao cenário da resistência parasitária, impulsionaram pesquisas com métodos alternativos de controle (GARCIA *et al.*, 2019; BEYES-DA-SILVA *et al.*, 2020).

Pesquisas buscam métodos alternativos de controle para *R. microplus*, e estes estudos revelam resultados positivos, foram testados: formulações à base de fitoterápicos, óleos essenciais, homeopatia, vacinas, rotação de pastagem, raças com menor predisposição ao carrapato e o controle biológico, com uso de bactérias, nematoides e fungos entomopatogênicos. O controle alternativo pode ser empregado de forma integrada ao método convencional, a fim de reduzir o

uso massivo de antiparasitários (MARCIANO *et al.*, 2013; SIMI, GARCIA e RODRIGUES, 2019; FERNANDEZ *et al.*, 2020).

Algumas plantas apresentam propriedades bactericida, inseticida e fungicida, no entanto, sua ação acaricida também tem sido estudada e sua eficácia sobre *R. microplus* foi observada (MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.* 2011; CAMPOS *et al.*, 2012; BUZATTI *et al.*, 2013). A fitoterapia tem se revelado uma alternativa promissora, devido a variabilidade de espécies, baixos custos, além de não gerar resíduos tóxicos para o animal ou ambiente (AGNOLIN *et al.*, 2010). Dentre as plantas com potencial atividade acaricida pode-se citar a citronela (*Cymbopogon nardus*), estudo *in vitro* utilizando óleo de citronela a 25% demonstrou efeitos deletérios na oviposição e eclosão das larvas (SANTOS *et al.*, 2012). Sua utilização *in vivo* também foi estudada, o uso do óleo de citronela a 8,6% revelou eficácia de 90% aproximadamente, no 21º dia após o tratamento dos bovinos com pulverização do óleo vegetal (AGNOLIN *et al.*, 2014).

Santos *et al.* (2018) utilizaram extratos da planta capim-açu (*Digitaria insularis*) em ensaio *in vitro*, com o objetivo de verificar sua ação sobre o carrapato *R. microplus*, e verificaram que os extratos acetato de etila e hexânico e sua fração 2, promoveram maior redução da oviposição e eclodibilidade das larvas. De acordo com Rosado-Aguilar *et al.* (2017), diferentes metabólitos secundários encontrados em extratos vegetais como o timol, carvacrol, n-hexanal e 1,8-cineol são considerados os principais agentes com ação acaricida sobre diferentes espécies de carrapatos, incluindo *R. microplus*.

Outras plantas utilizadas em testes *in vitro* e que revelaram atividade acaricida sobre *R. microplus* foram, o nim (*Azadirachta indica*), andiroba (*Carapa guianensis*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), eucalipto (*Eucalyptus* spp. e *Corymbia*) e os óleos essenciais de sementes de cominho (*Cuminum cyminum*), pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica*) e folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) (MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.* 2011; ALVES, LORENZETTI e GONÇALVES, 2012). Especialmente os estudos com a planta *Azadirachta indica* tem demonstrado efeitos deletérios sobre *R. microplus*, as pesquisas revelam que além da mortalidade das fêmeas, há também redução na taxa de oviposição e eclodibilidade das larvas (BROGLIO-MICHELETTI *et al.*, 2010; GIGLIOTTI *et al.*, 2011; BUZATTI *et al.*, 2013). As pesquisas com a utilização de fitoterápicos são promissoras, seu uso para controle do carrapato a campo pode ser associado

aos acaricidas comerciais, com a finalidade de reduzir o uso massivo desses produtos e conseqüentemente gerar menos resíduos para o animal e ambiente (MARTINEZ-VELAZQUEZ *et al.* 2011).

De acordo com Cunha *et al.* (2019) a utilização de vacinas é uma alternativa valiosa no controle de *R. microplus*, e sua eficácia é maior quando este método é associado a outros tipos de controle, por exemplo, aos acaricidas químicos. Uma vez que, se observa uma diminuição dos títulos de anticorpos do animal após cerca de 3 meses de uso da vacina, logo, recomenda-se sua utilização com repetições a cada 6 meses. A vacinação induz diferentes níveis de proteção nos rebanhos, sua eficácia varia de acordo com o antígeno utilizado e o tipo de cepa de *R. microplus* alvo, assim, estudos regionais afim de determinar o grau de proteção que a vacina confere é importante.

A utilização de vacinas a partir da proteína Bm86 revelaram proteção parcial aos bovinos, frente à futuras infestações pelo parasito, uma vez que, se reduz o número de carrapatos no animal, além de afetar os parâmetros reprodutivos das fêmeas, como fertilidade e oviposição (CUNHA *et al.*, 2019). Estudo recente com base em análises filogenéticas identificaram populações de *R. microplus* de diferentes regiões geográficas, susceptíveis ao antígeno da proteína Bm86 (BLECHA *et al.*, 2018). O imunógeno sintético anti-*R. microplus* (SBm7462®) contendo peptídeos do intestino do carrapato, foi utilizado experimentalmente no intuito de avaliar a resposta dos linfonodos superficiais de bovinos após 3 doses do imunizante, com intervalos de 30 dias (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). De acordo com os mesmos autores, 15 dias após a vacinação verificou-se resposta imune adaptativa T-dependente, com alterações hiperplásicas das regiões paracorticais e formação de centros germinativos. O peptídeo rSBm7462 utilizado, foi encontrado nos linfonodos superficiais dos bovinos testados.

O controle biológico consiste na utilização de determinados inimigos naturais para controle de pragas indesejáveis, à níveis que não causem danos econômicos significativos na cultura de interesse (BADI e ABREU, 2006; PARRA, 2014). Os agentes de biocontrole mais estudados são: nematoides, bactérias, vírus e fungos (LACEY *et al.*, 2015). Os principais nematoides entomopatogênicos utilizados como controle biológico de *R. microplus* pertencem ao gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis*, estes são carreadores

biológicos de duas bactérias: *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*. O nematoide atua liberando esses patógenos na hemocele do carrapato, com consequente morte do parasito (MONTEIRO e PRATA, 2015). Ainda segundo os mesmos autores, as principais vantagens do uso desses nematoides são os baixos custos com sua produção; armazenamento sem prejuízos para sua viabilidade; possuem a propriedade de procurar o hospedeiro no ambiente; apresentam compatibilidade com vários pesticidas; possuem boa especificidade para as pragas alvo e segurança para os animais vertebrados.

De acordo com Veríssimo (2013), a utilização de raças bovinas resistentes ao carrapato constitui uma prática econômica eficaz e ecológica, pelo fato de não haver nenhum tipo de resíduo para o ambiente ou animal. Ressalta ainda que essa alternativa possui maior aplicabilidade para o setor da bovinocultura de corte, devido a maior disseminação de raças zebuínas, pois são mais resistentes ao carrapato.

Os primeiros patógenos a serem utilizados no biocontrole de pragas foram os fungos entomopatogênicos, dos quais *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* são atualmente os mais estudados e utilizados. Alguns fatores são responsáveis por sua grande aplicabilidade, por exemplo, a variabilidade genética que possibilita a seleção de isolados virulentos, especificidade e eficiência em causar a morte de determinadas pragas e não menos importante, sua comprovada segurança ambiental (ANGELO e BITTENCOURT, 2015).

4.5 Caracterização do fungo *Metarhizium anisopliae*

Fungos entomopatogênicos constituem o grupo de maior importância e aplicabilidade no controle de pragas (VEGA *et al.*, 2012). Podem ser encontrados naturalmente parasitando diferentes artrópodes, são microrganismos eucarióticos e heterotróficos, se reproduzem de forma sexuada ou assexuada, produzem grandes variedades de propágulos infecciosos, e o seu processo de infecção ocorre através da fixação, germinação e penetração da cutícula do

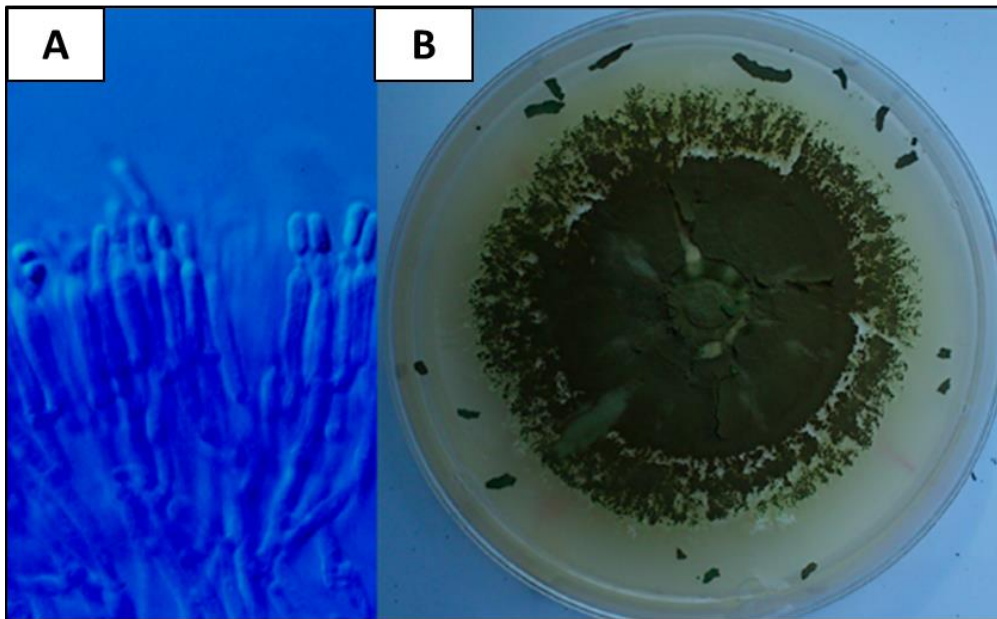
hospedeiro (VEGA *et al.*, 2012; LACEY *et al.*, 2015; BEYS-DA-SILVA *et al.*, 2020).

Os fungos que compõem o gênero *Metarhizium* fazem parte da classe Sordariomycetes, ordem Moniliales e família Moniliaceae. O pesquisador Metschnikoff em 1879 foi o pioneiro na utilização do controle microbiano. Neste estudo o fungo foi utilizado para o controle de larvas do besouro *Anisopliae austríaca* e a partir disso foi denominado como *Entomophthora anisopliae*. Somente em 1883 foi classificado por Sorokin como *Metarhizium anisopliae*. A partir dessas pesquisas iniciais sua utilização vem sendo estudada devido a sua grande potencialidade para o controle biológico, pois o mesmo possui mais de 300 espécies de artrópodes como hospedeiro (ALVES, 1998).

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentosos, endofítico e saprofítico, e encontra-se amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado no solo, raízes de plantas, rizosfera ou parasitando artrópodes (BAYES DA SILVA *et al.*, 2020), é um fungo mesófilo, ou seja, crescem em temperatura entre 10° e 40°C, com ótima germinação em temperatura entre 25° e 30°C. A maioria dos fungos entomopatogênicos necessita de umidade relativa do ar acima de 90% para sua germinação e crescimento (ROBERTS e CAMPBELL, 1977).

Suas colônias apresentam inicialmente coloração branca e pigmentação amarela durante a fase inicial da produção de conídios (cerca de 4 a 7 dias), tornando-se verde olivácea a medida que ocorre a maturação dos conídios (8 a 9 dias) (Figura 6) (BISCHOFF *et al.*, 2009). Apresentam hifas septadas e conidióforos ramificados, na sua extremidade se observa fiálides alongadas, individuais ou agrupadas. Os conídios possuem formato cilíndrico a oval e são estreitos centralmente e truncados nas extremidades, com pigmentação verde ou hialina e estão dispostos em cadeias, seu tamanho pode variar entre 3,5x9,0µm de comprimento (Figura 6) (DRIVER *et al.*, 2000; BRUNNER-MENDOZA *et al.*, 2019).

Figura 6 *Metarhizium anisopliae*. A. Hifas, fiálides e conídios; B. Colônia madura (9 dias) em Batata Dextrose Ágar a 28°C.



Fonte: RUNNER-MENDOZA *et al.* (2019).

Na agricultura a utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas é amplamente utilizado, seja no combate a pragas de pastagens ou cana-de-açúcar (BARCI *et al.*, 2009; BOTELHO e MONTEIRO, 2011; REHNER e KEPLER, 2017). As principais vantagens da utilização desses fungos estão na facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial; variabilidade genética que possibilita a seleção de isolados virulentos; praticidade na aplicação em condições de campo; baixo custo em práticas agrícolas; especificidade em infectar apenas as pragas alvo e principalmente, o baixo impacto ambiental nos programas estabelecidos (JACKSON, DUNLAP e JARONSKI, 2010; ORLANDELLI e PAMPHILE, 2011).

Mundialmente há um grande número de micoinseticidas e micoacaricidas produzidos. Desde a década de 1960 cerca de 170 produtos comerciais a base de fungos foi registrada, sendo 33,9% a base de *M. anisopliae* (FARIA e WRAIGHT, 2007). No Brasil, 50% dos produtos biopesticidas são produzidos com fungos, sendo que, *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os mais estudados e possui potencial para controle de diferentes artrópodes (MASCARIN *et al.*, 2019). Diferentes estudos evidenciaram a ação acaricida de *M. anisopliae* sobre algumas espécies de carrapatos, por exemplo, *R. microplus* (CAMARGO *et al.*, 2012; PERINOTTO *et al.*, 2012a; QUINELATO *et al.*, 2012; CAMARGO *et*

al., 2014; PERINOTTO *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.*, 2016; PERINOTTO *et al.*, 2017), *Ornithodoros mimon* (PERINOTTO *et al.*, 2013b) e *Dermacentor nitens* (PERINOTTO *et al.*, 2013a).

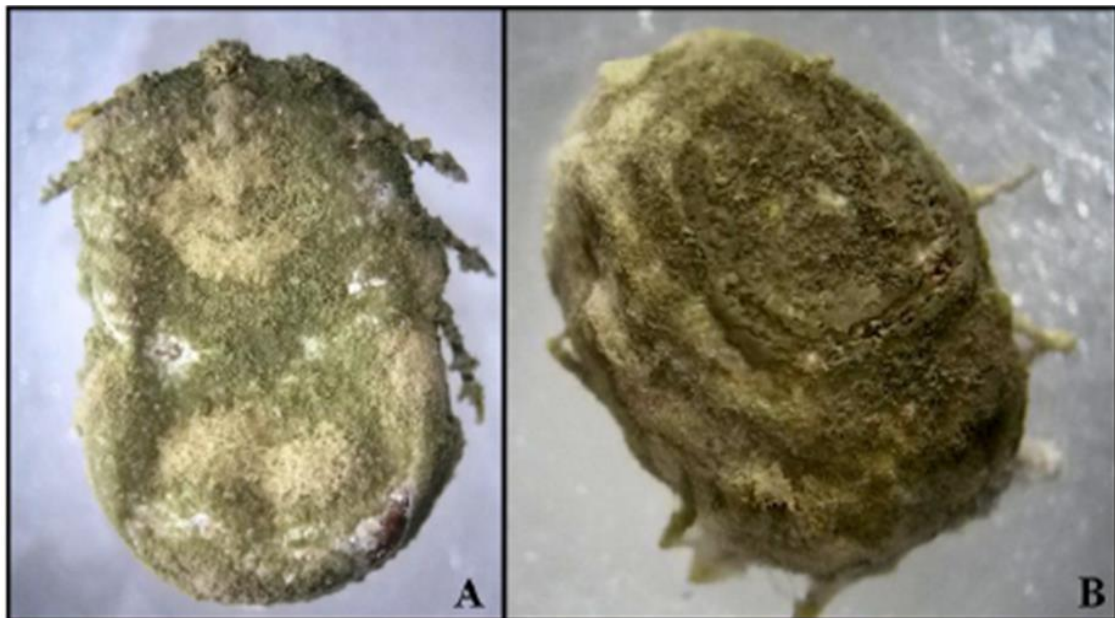
Os resultados promissores observados ao longo dos anos utilizando espécies fúngicas como controladoras de pragas, despertaram alguns questionamentos sobre a segurança desses microrganismos para aquelas espécies não alvos. No entanto, Zimmermann (2007) revisou os riscos da aplicação de *M. anisopliae* para mamíferos, aves, peixes e invertebrados, relatando diversos estudos que garantem a seguridade deste agente para os animais estudados.

O mecanismo de infecção do fungo nos artrópodes ocorre via cutícula, através de um conjunto de processos que envolvem fatores químicos e mecânicos (SAN AW e HUE, 2017). Inicialmente ocorre a fixação dos conídios à cutícula por meio de interações hidrofóbicas, as principais enzimas envolvidas nesse processo são hidrofobinas de superfície e adesinas; seguido pela sua germinação e formação de um tubo germinativo, vale ressaltar que essa etapa apresenta maior susceptibilidade a fatores bióticos como, hidrocarbonetos cuticulares presente nos artrópodes e também das intempéries ambientais, como umidade, temperatura e radiação solar; a dilatação da extremidade do tubo germinativo dá origem a estrutura denominada de apressório, abaixo dessa estrutura localiza-se o peg de penetração, que rompe mecanicamente a cutícula; nessa etapa há também a secreção de enzimas como lipases, proteases e quitinases, as principais enzimas envolvidas no processo de infecção são: proteases semelhante à subtilisina, metaloproteinase semelhante à termolisina, serina protease e peptidases, que são responsáveis pela degradação química da cutícula do hospedeiro, além de fornecer proteção ao fungo contra a ação de proteínas antifúngicas e atuam também na regulação do pH do microambiente (ARRUDA *et al.*, 2005; BRUNNER-MENDOZA *et al.*, 2019; BAYES DA SILVA *et al.*, 2020).

Posteriormente a penetração da cutícula, inicia-se a colonização da hemolinfa pelos conídios, com a formação de hifas que diferenciam-se em blastosporos e são responsáveis pela colonização dos tecidos e nutrição do fungo, gerando alterações proteicas e lipídicas que culminam na exaustão dos nutrientes e morte do parasito, algumas espécies de *Metarhizium sp.* liberam

destruxinas que podem atuar na supressão da resposta imune do artrópode, além de causar alterações celulares; a hemocele do carrapato possui nutrientes necessários à manutenção e sobrevivência do fungo, e em condições adequadas inicia-se a fase de exteriorização e conidiogênese sobre o cadáver do parasito (Figura 7), essa fase garante a produção de conídios que ao alcançarem outros alvos darão continuidade ao ciclo do fungo no ambiente (SANTI *et al.*, 2010; SANJAYA, OCAMPO e CAOILI, 2013; PERINOTTO *et al.*, 2014; BRUNNER-MENDOZA *et al.*, 2019).

Figura 7 Exteriorização de *Metarhizium* sp. sobre fêmea de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A. vista ventral e B. vista dorsal.

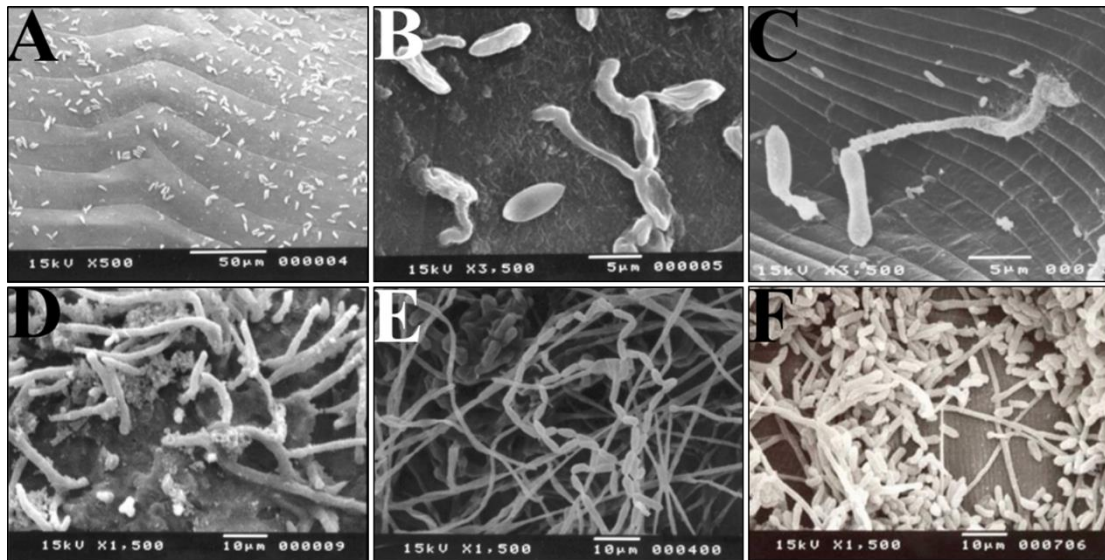


Fonte: BERNARDO *et al.* (2018).

Garcia, Monteiro e Szabó (2004), detalharam o processo de infecção de *M. anisopliae* em fêmeas do gênero *Rhipicephalus* através de eletromicrografias de varredura. As diferentes fases de infecção estão detalhadas na Figura 8. Os principais achados foram que a penetração do fungo não se deu por cavidades ou aberturas naturais do ectoparasita (aparelho bucal, espiráculos respiratórios, orifício genital e anal), além de que a mortalidade das fêmeas ocorreu antes mesmo da realização da ovoposição. Para Perinotto *et al.* (2017), um dos principais potenciais no uso de fungos entomopatogênicos para o controle de *R.*

microplus se deve a sua eficácia em diferentes fases do estágio de vida livre do parasito. Além da mortalidade da teleóquina, observa-se efeitos deletérios sobre os parâmetros reprodutivos, por exemplo, redução do percentual de oviposição, eclosão e viabilidade larval.

Figura 8 Fêmeas de *Rhipicephalus* após infecção com *Metarhizium anisopliae*. A. 1 hora de infecção, presença de conídios sobre a superfície do carrapato. B. 18 horas de infecção, formação de tubo germinativo e estrutura semelhante ao apressório. C. Entre 18 a 48 horas, penetração do fungo na hemocele. D. 48 e 72 horas, colonização do fungo sobre a superfície do carrapato. E. Entre o 4^o e 5^o dia, mortalidade das fêmeas com esporulação do fungo. F. Extrusão do micélio fúngico sobre o cadáver do carrapato.



Fonte: GARCIA, MONTEIRO e SZABÓ (2004).

Em estudo experimental, Quinelato *et al.* (2012) determinaram 100% de mortalidade de larvas após 20 dias de realização do tratamento das fêmeas com formulações a base de *M. anisopliae*. Sugerindo que no estágio larval haja maior susceptibilidade à ação do fungo. Ainda de acordo com os autores, esses achados representam um fator de grande relevância, partindo do pressuposto que a maior dificuldade atual é controlar a fase ambiental desse ectoparasito.

Tanto o calor quanto o frio representam condições adversas para a sobrevivência deste fungo, no entanto, o fator abiótico mais relevante é a radiação solar, sobretudo a UV-B (PERINOTTO *et al.*, 2017). Segundo Ottati-de-Lima *et al.* (2010), a temperatura ideal para manutenção da viabilidade dos

conídios é de 25°C. Já a umidade relativa influencia principalmente na germinação dos conídios no ambiente (CAMARGO, 2011). De acordo com autores Quinelato *et al.* (2012) e Marciano *et al.* (2013), foi verificado percentual de germinação dos conídios entre 99% e 100% em temperatura de 25 ± 1°C e umidade relativa de ≥80%.

Estudos laboratoriais com a utilização do fungo associado a veículos oleosos demonstraram sua maior virulência sobre o carrapato (CAMARGO *et al.*, 2012; KAAYA e HEDIMBI, 2012; MARCIANO *et al.*, 2015; CAMARGO *et al.*, 2016; PERINOTTO *et al.*, 2017). Acredita-se que formulações oleosas confirmam proteção ao fungo, principalmente contra a radiação UV-B e umidade, bem como, promover a maior adesão dos conídios a superfície do carrapato (MARCIANO *et al.*, 2013; CAMARGO *et al.*, 2014).

Segundo Perinotto *et al.* (2017), tais formulações demonstraram uma eficácia de 75% sobre o ectoparasito. Para os autores esse resultado é bastante promissor, pois possibilita baixos níveis de carga parasitária e ao mesmo tempo mantém os animais em contato com uma pequena população do carrapato, permitindo a manutenção de estabilidade enzoótica, em virtude da necessidade da interação parasito-hospedeiro para a manutenção de anticorpos específicos para os agentes *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale*, que são responsáveis pela TPB.

As pesquisas atuais *in vitro* com o controle biológico a partir de *M. anisopliae* vislumbram sua utilização a campo. Esses estudos darão maior precisão sobre fatores como viabilidade e resistência a condições adversas (temperatura e radiação), manutenção da sua virulência e conseqüentemente a determinação de sua eficácia em condições ambientais (ANGELO e BITTENCOURT, 2015).

Em estudo com condições seminaturais realizado por Marciano *et al.* (2020), foi possível identificar 100% de eficácia no controle de *R. microplus*, utilizando *Metarhizium* sp. e persistência do fungo no solo por até 60 dias. Demonstrando o potencial deste no controle do parasito no ambiente. Algumas pesquisas *in vivo* têm demonstrado a eficácia de isolados do fungo sobre as fases parasitárias de *R. microplus* e os efeitos adversos sobre o animal durante o tratamento foi nulo. No entanto, os autores apontam a necessidade de novos

estudos afim de aumentar a margem de segurança da utilização desse tipo de controle no animal (CAMARGO *et al.*, 2016).

5. MATERIAL E METÓDOS

5.1 Local de realização do experimento e monitoramento das condições climáticas

O experimento foi realizado no Campus da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) (12°38'50" S, 39°06'48" W, com altitude de 215 m) localizada no município de Cruz das Almas – BA, nos meses de julho a dezembro de 2020. O ensaio *in vitro* e em condições seminaturais foram conduzidos no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV), setor de Forragicultura da UFRB e no Laboratório de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura de Cruz das Almas – BA.

De acordo com a classificação de Köppen (AYOADE, 1986) o clima da região é caracterizado como tropical quente e úmido (Aw). Durante os 52 dias de experimentação a precipitação total foi de 89,8 mm; a umidade relativa média foi 60%, variando entre 33% e 100%; e a temperatura média foi de 28°C e verificou-se variação entre 21°C e 33°C. Os dados meteorológicos foram obtidos por meio da estação meteorológica locada na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada a 2,2 km de distância da UFRB.

5.2 Preparação dos vasos e plantio de *Brachiaria brizantha*

Três meses antes do início do experimento, sementes de *B. brizantha*, cultivar MG-5 foram semeadas em vasos de polipropileno com volume de 5 litros, preenchidos com solo de superfície, de subsolo e adubo orgânico na proporção de 1:1:1 e corrigido com fósforo. Todos os vasos foram mantidos no setor de Forragicultura da UFRB, em área com incidência de chuva e sol. Sete dias antes

do experimento, a forrageira *B. brizantha* de todos os vasos foram podadas, padronizando a altura em 35 cm.

No dia zero (dia do tratamento), antes da pulverização com os tratamentos propostos, os vasos foram distribuídos nos respectivos grupos de forma randomizada. A partir de então, os mesmos não receberam qualquer tipo de manejo e foram apenas irrigados artificialmente com o volume de 300 ml de água a cada um dia, a fim de permitir mínima condição de sobrevivência para a gramínea.

5.3 Manutenção da colônia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A colônia de *R. microplus* utilizada, foi oriunda de uma cepa de campo e foi mantida no LPDP do HUMV da UFRB. Para tanto, dois bezerros foram submetidos a uma infestação induzida com larvas provenientes de 150 mg de ovos de *R. microplus* durante três dias consecutivos (a utilização dos animais possuía aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UFRB, com número de registro: 2300700006228/2019-16).

Os animais passaram por prévio exame físico (avaliação de escore corporal, coloração de mucosas, linfonodos, frequência cardíaca e respiratória, movimentos ruminais e temperatura). Além de exames laboratoriais tais como, parasitológico de fezes, hematológico (volume globular) e pesquisa de hemoparasitos, a fim de verificar alguma enfermidade que inviabilizasse sua utilização.

A alimentação dos bovinos foi baseada na dieta proposta por Barbosa *et al.* (2007), na qual a ingestão de volumoso correspondeu a 6% do peso vivo (PV) e concentrado a 1% do PV dos animais. Os bezerros permaneceram confinados em baias individuais durante a fase parasitária do carrapato *R. microplus* (ciclo de aproximadamente 21 dias). No final do ciclo, fêmeas totalmente ingurgitadas que se desprenderam dos bovinos foram coletadas do piso da baia e encaminhadas ao laboratório. No LPDP, as fêmeas foram devidamente higienizadas em água corrente e imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 1 minuto para assepsia da cutícula e posteriormente secas em papel

toalha. As teleóginas foram utilizadas no teste *in vitro* e no ensaio biológico em condições seminaturais. Após o ciclo de 21 dias e coleta das fêmeas ingurgitadas, os bovinos receberam tratamento com banho de aspersão de acaricida (Triatox®), e foram submetidos a novo exame físico e exames laboratoriais, com posterior devolução ao setor responsável.

5.4 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os testes *in vitro* e em condições seminaturais foram compostos por quatro grupos de tratamentos: Controle aquoso (tratado com solução de água destilada e Tween 80 a 0,1%); Controle oleoso (tratado com solução de água destilada, Tween 80 a 0,1% e acrescida de 10% de óleo mineral); Formulação aquosa de *M. anisopliae* (tratado com a formulação de *M. anisopliae* diluída em água destilada e Tween 80 a 0,1%); Formulação oleosa de *M. anisopliae* (tratado com a formulação de *M. anisopliae* diluída em água destilada e Tween 80 a 0,1% e acrescida de 10% de óleo mineral).

Para o ensaio *in vitro*, cada tratamento recebeu o total de 10 fêmeas ingurgitadas, cada fêmea representou uma unidade experimental. Já no ensaio em condições seminaturais, cada grupo de tratamento foi composto por 10 vasos, cada vaso representou uma unidade experimental, nos quais foram depositadas três fêmeas ingurgitadas, totalizando trinta fêmeas por tratamento. O delineamento experimental, assim como, as formulações propostas foram baseadas na metodologia proposta por Marciano (2016).

5.5 Obtenção e manutenção dos isolados fúngicos de *Metarhizium anisopliae* e preparo das formulações aquosa e oleosa

O isolado fúngico de *M. anisopliae* ARSEF 3643 utilizado foi cedido pelo acervo de fungos entomopatogênicos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com atividade de biocontrole em parasitos já comprovada. O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e as placas foram mantidas em *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 dias. Após o crescimento fúngico os conídios foram lavados com água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%, em seguida, a suspensão foi homogeneizada e quantificada em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada a 2×10^8 conídios/mL, de acordo com Alves (1998), essa concentração é justificada por trabalhos prévios observados na literatura.

Para inoculação e multiplicação dos conídios, sacos contendo 500g de arroz branco foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento, em cada saco foi adicionado 30 mL da suspensão contendo conídios fúngicos, ajustada à concentração de 2×10^8 conídios/mL. Em seguida, foi realizada homogeneização manual dos sacos, a fim de possibilitar a distribuição homogênea da suspensão fúngica no arroz, posteriormente, os sacos de arroz foram mantidos em B.O.D a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 dias.

As formulações propostas para cada tratamento foram realizadas a partir do crescimento fúngico nos sacos de arroz. A suspensão foi preparada com aproximadamente 500g de arroz, que foi lavado com água destilada e Tween 80 a 0,1% para dispersão dos conídios e em seguida peneirada. Posteriormente, a suspensão foi quantificada em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer e sua concentração ajustada a 2×10^8 conídios/mL.

O grupo formulação aquosa de *M. anisopliae* foi preparado com água destilada, Tween 80 a 0,1% e conídios fúngicos, como descrito anteriormente; o grupo formulação oleosa de *M. anisopliae* foi preparado com água destilada, Tween 80 a 0,1%, conídios fúngicos e acrescido de 10% de óleo mineral (NP – 35); para o grupo controle aquoso foi preparado uma solução composta somente de água destilada e Tween 80 a 0,1%; o grupo controle oleoso, recebeu uma

solução contendo água destilada, Tween 80 a 0,1% e acrescido de 10% de óleo mineral (NP – 35), totalizando 800 mL por tratamento.

5.6 Viabilidade dos conídios

Uma alíquota de 20µL das formulações de *M. anisopliae* foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em B.O.D por até 24 horas, para a avaliação da germinação e viabilidade do fungo. A avaliação da viabilidade dos conídios foi feita por meio de observação direta em microscópio óptico e o cálculo de germinação foi realizado segundo a metodologia proposta por Alves (1998).

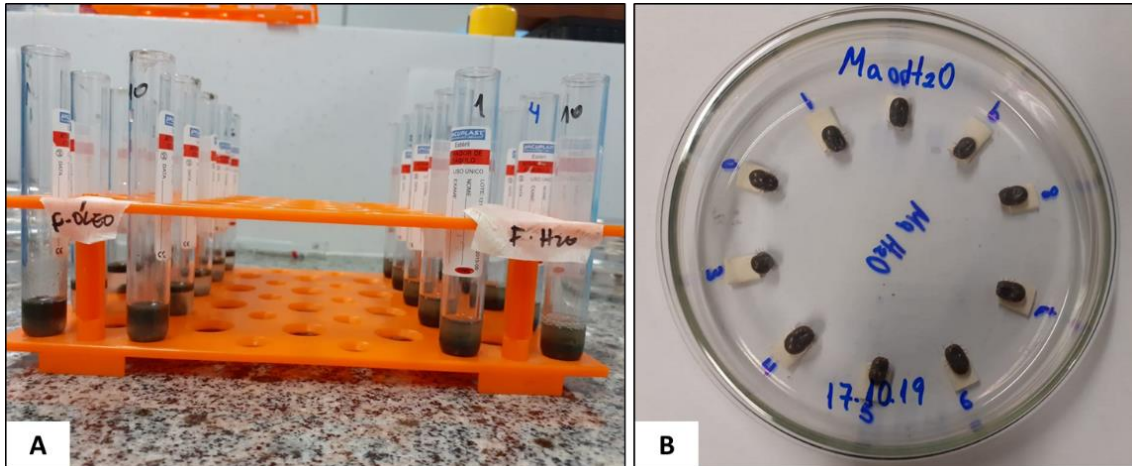
5.7 Teste *in vitro* utilizando fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Após devida higienização, as fêmeas coletadas foram pesadas individualmente e distribuídas homogeneamente de acordo com o peso nas placas de Petri (previamente esterilizadas), sendo cada grupo composto por 10 fêmeas. Foram utilizados quatro grupos de tratamentos: controle aquoso, controle oleoso, formulação aquosa de *M. anisopliae* e formulação oleosa de *M. anisopliae*. As mesmas formulações propostas para o ensaio biológico em condições seminaturais foram utilizadas no teste *in vitro*.

Antes de serem distribuídas nas placas de Petri as fêmeas foram depositadas em tubos de ensaio, contendo 1mL de cada tratamento proposto. Após 5 minutos de imersão, as teleóginas foram retiradas da solução e levemente secas em papel toalha, e posteriormente fixadas pela parte dorsal do idiossoma utilizando fita adesiva dupla face (Figura 9). Após a realização da oviposição, as massas de ovos foram pesadas e acondicionadas em frascos de

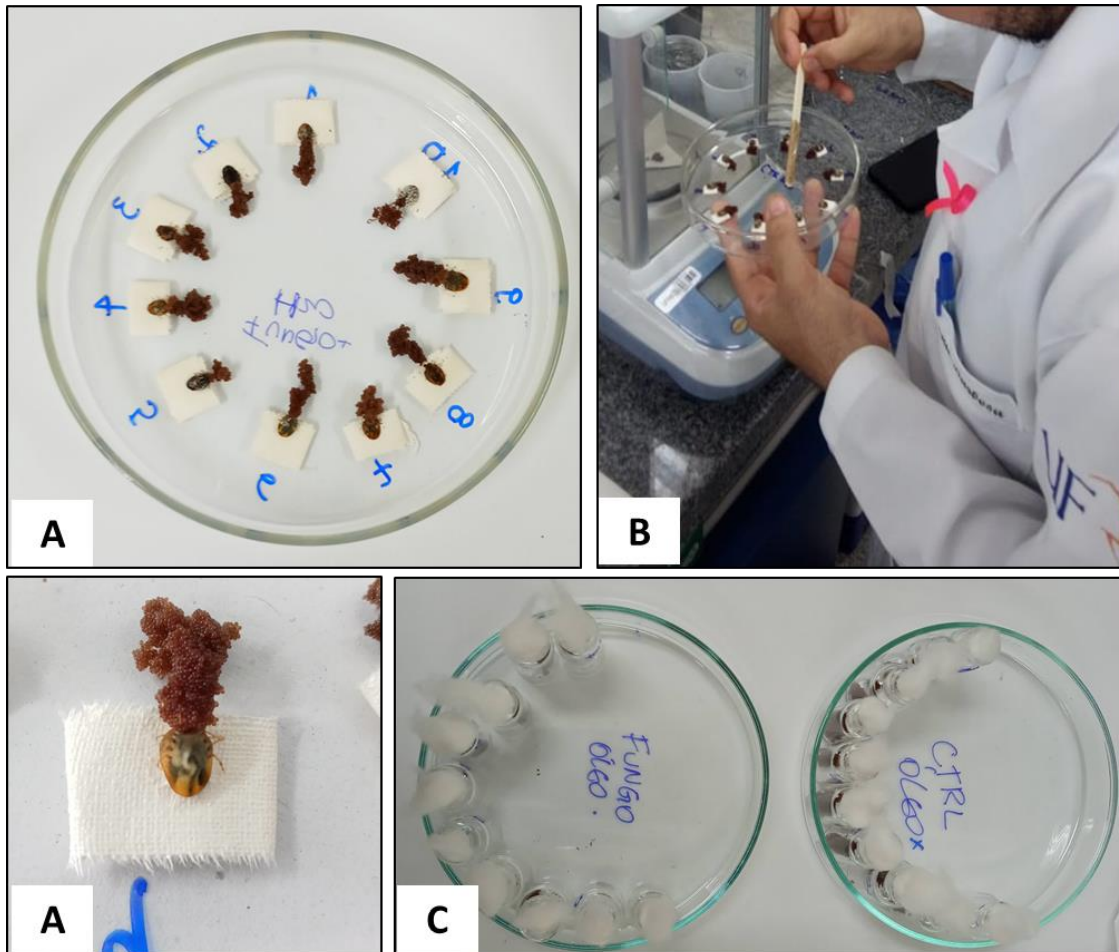
vidro vedados com algodão hidrofílico, para incubação e posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas (Figura 10).

Figura 9 A. Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tubos de ensaio com formulações aquosa e oleosa de *Metarhizium anisopliae*. B. Fêmeas fixadas em placa de Petri após o tratamento.



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Figura 10 A. Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* realizando ovoposição. B. Coleta da massa de ovos. C. Massa de ovos em frascos de vidro para incubação e posterior eclosão de larvas.



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Os parâmetros reprodutivos mensurados para avaliar a patogenicidade do fungo *in vitro* sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram os seguintes: peso inicial da fêmea ingurgitada (peso individual de cada teleógina antes de receberem os tratamentos propostos); peso da massa de ovos; percentual de eclosão das larvas (através da estimativa visual de porcentagem de larvas eclodidas em relação a massa de ovos). A partir de tais parâmetros foi calculado o índice de produção de ovos (IPO), utilizando a equação proposta por Bennett (1974):

(IPO) = Peso da massa de ovos (mg) x 100/ Peso inicial da fêmea ingurgitada (mg).

A obtenção do percentual de controle de *R. microplus* exercido pelo fungo *M. anisopliae*, foi calculada a partir da Reprodução Estimada (RE), de acordo com Drummond *et al.* (1971).

$RE = \text{Peso da massa de ovos (mg)} \times \% \text{ eclosão larvas} \times 20.000 / \text{Peso da fêmea ingurgitada (mg)}$.

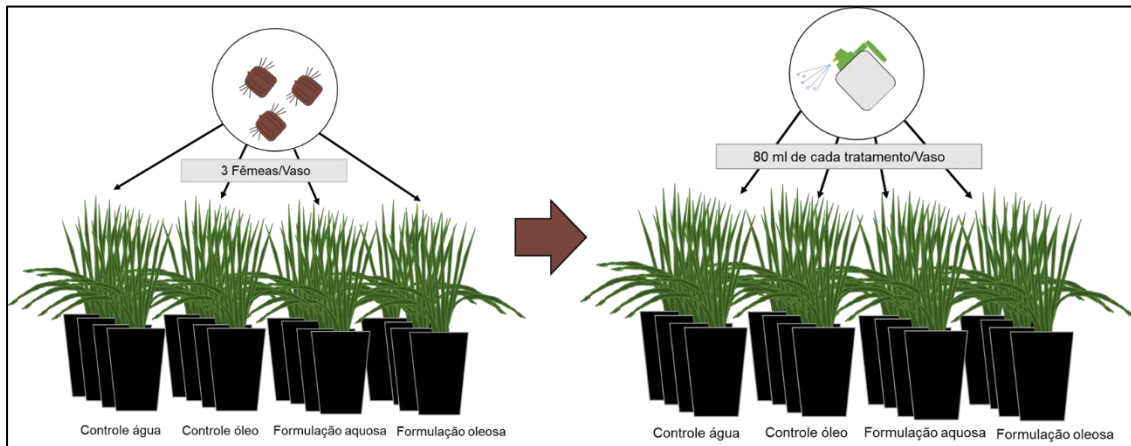
$\text{Percentual de controle} = \frac{\text{Média RE (controle)} - \text{média RE (tratado)}}{\text{média RE (controle)}} \times 100$.

Após o término da postura, as fêmeas inviáveis foram destinadas à câmara úmida e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em B.O.D, para facilitar o crescimento fúngico e posterior realização de microcultivo, para confirmação de suas características macro e micromorfológicas.

5.8 Ensaio biológico em condições seminaturais

No dia zero, após as 16:00 horas (horário de menor incidência solar e temperatura mais amena) grupos de peso médio e homogêneo contendo três fêmeas ingurgitadas foram depositados em cada vaso, e em seguida o solo, as fêmeas e a gramínea dos vasos foram pulverizados com 80mL da formulação fúngica (2×10^8 conídios/ml), proposta para cada grupo. Da mesma forma, foram tratados o solo e a gramínea dos vasos dos grupos controle aquoso, com água destilada e Tween 80 a 0,1% e controle oleoso, com a emulsão de óleo mineral e água destilada (Figura 11).

Figura 11 Esquema representativo do ensaio biológico em condições seminaturais.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

5.9 Recuperação das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e percentual de controle

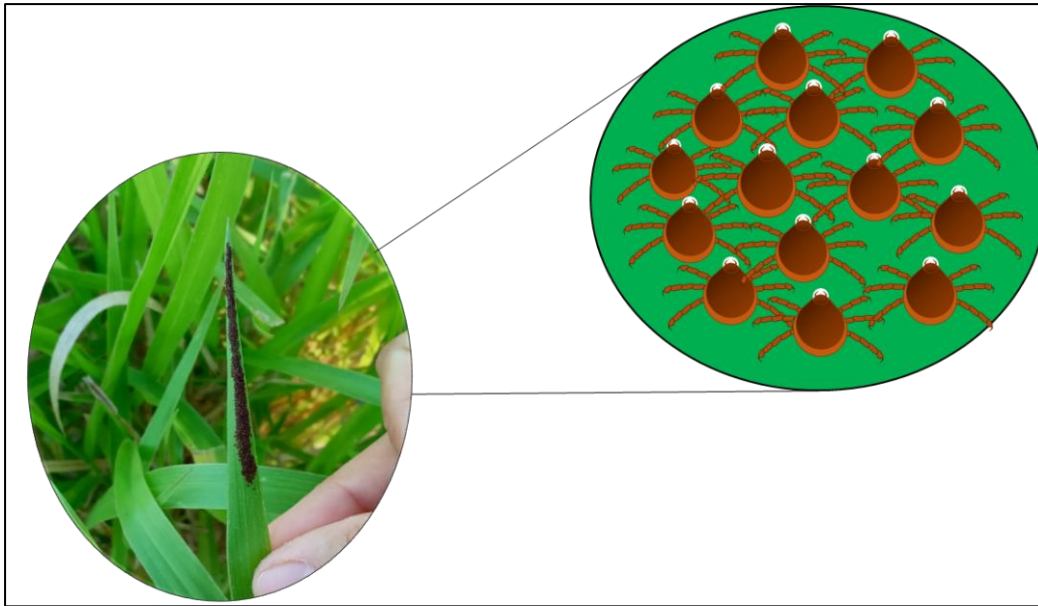
Para a quantificação das larvas, as mesmas foram recuperadas a partir da padronização do corte da graminha em 30 cm, aos 42 dias após o tratamento (período compreendido com a oviposição, incubação dos ovos, eclosão das larvas e o enrijecimento de suas cutículas, até tornarem-se infestantes) (Figura 12). Em cada coleta, as gramíneas contendo as larvas obtidas de cada vaso foram acondicionadas em sacos plásticos, que foram identificados, lacrados e congelados para posterior quantificação das mesmas. As larvas fixadas nas folhas coletadas foram removidas com o auxílio de um pincel e em seguida, foram separadas e quantificadas com ajuda de pinça e estilete.

Para avaliar o efeito das formulações fúngicas de cada tratamento sobre a recuperação das larvas, a eficácia foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ eficácia} = (A-B)/A * 100$$

Onde A = média de larvas recuperadas no respectivo grupo controle e B = média de larvas recuperadas no respectivo grupo tratado, de acordo com a metodologia proposta por Bittencourt *et al.* (2003).

Figura 12 Corte do ápice das hastas de *Brachiaria brizantha* para recuperação das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

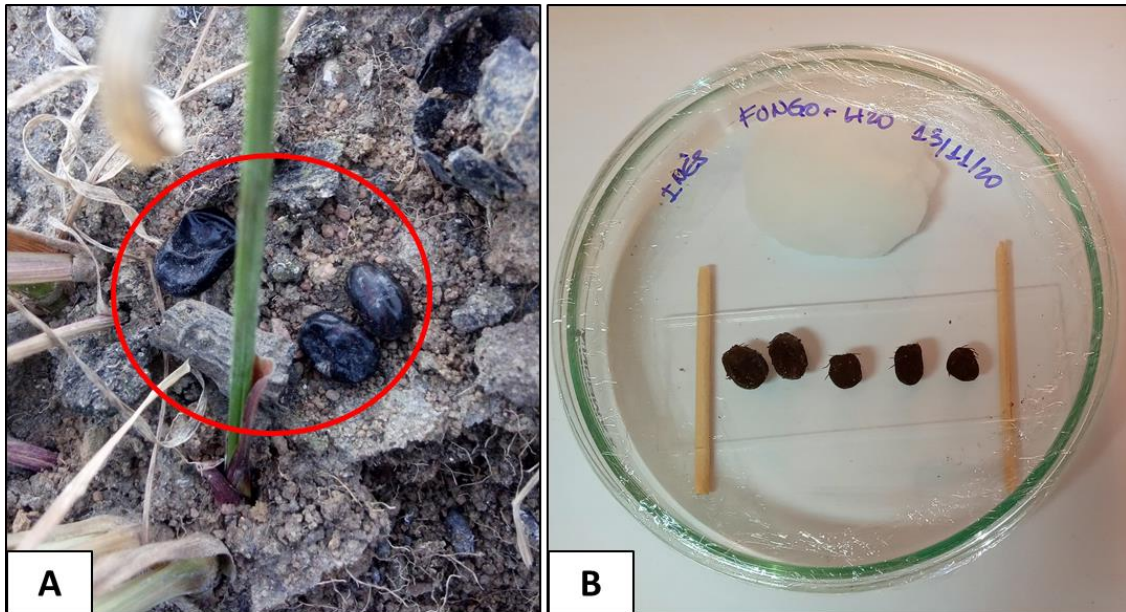


Fonte: Arquivo pessoal (2021).

5.10 Isolamento de *Metarhizium anisopliae* a partir das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Durante a inspeção visual da mortalidade das fêmeas, todas aquelas que foram encontradas mortas (enegrecidas, secas ou sem reação a estímulos externos), foram coletadas e mantidas em câmara úmida sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em B.O.D, durante sete dias ou até a exteriorização fúngica (Figura 13). Posteriormente, em condições assépticas amostras do material fúngico exteriorizado sobre a cutícula foi coletado com auxílio de uma alça de platina, para posterior identificação de suas características micromorfológicas através da técnica de microcultivo supracitada.

Figura 13 Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inviáveis. A. Fêmeas apresentando coloração enegrecida no solo. B. Fêmeas mantidas em câmara úmida para isolamento fúngico.



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

5.11 Isolamento e identificação de *Metarhizium anisopliae* para a avaliação da persistência do fungo no solo

Para monitorar o desenvolvimento e permanência do fungo pulverizado em cada vaso, foram coletadas aleatoriamente três amostras de solo de diferentes vasos, dos quatro tratamentos. Os momentos de coleta foram no dia do tratamento, antes da pulverização (dia 0), a fim de verificar se havia presença de *M. anisopliae* no solo, e no 3^o, 7^o, 21^o e 52^o dia após o tratamento.

As amostras de solo foram homogeneizadas formando uma única amostra composta para cada tratamento. Em seguida, foi pesada em microtubos uma alíquota de 0,35g de cada amostra composta e diluída em 1mL de solução de Tween 80 a 0,01%. Posteriormente, os microtubos foram submetidos a agitação vigorosa por 30 segundos em agitador do tipo Vórtex, e uma alíquota de 50µl de cada microtubo foi adicionada em placas de Petri (três placas de Petri para cada tratamento).

Tais placas foram vertidas com meio seletivo Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida (CTC), meio específico para o isolamento de *Metarhizium* sp., com a seguinte formulação: meio de cultura BDA (35g/L), acrescido de Cloranfenicol (0,25g/L), Tiabendazol (0,001g/L), Ciclohexamida (0,25g/L) e extrato de levedura (1g/L). Com o auxílio da alça de Drigalski o solo diluído foi distribuído de forma homogênea sobre o meio de cultura na placa, conforme a metodologia descrita por Fernandes *et al.* (2010). As placas foram mantidas em B.O.D com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 21 dias, sendo avaliadas a cada 7 dias quanto a presença ou não de colônias características de *M. anisopliae*.

Para avaliar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. anisopliae* foi utilizada a metodologia proposta por Marciano (2016), na qual o número de colônias observadas nas placas de Petri contendo o meio seletivo CTC foram categorizadas por cruces. Durante a avaliação das placas a ausência de cruz (-) equivale a nenhuma colônia fúngica característica de *M. anisopliae*; uma cruz (+) corresponde ao intervalo de 1 a 25 colônias fúngicas; duas cruces (++) equivalem ao intervalo de 26 a 50 colônias; três cruces (+++) ao intervalo de 51 a 75 colônias e quatro cruces (++++) a uma observação de mais de 76 colônias (Tabela 1).

Para a avaliação das placas e validação do método, três diferentes observadores avaliaram visualmente as características macro e micromorfológicas das colônias de *M. anisopliae*, classificando-as de acordo com o método de cruces descrito acima.

Tabela 1 Método de mensuração de colônias, baseado no número de cruces (+) que categoriza a quantidade de colônias isoladas em placas de Petri após a inoculação das amostras de solo em meio seletivo CTC para *Metarhizium* sp.

Número de colônias	Intervalo de classe do número de colônias
-	0
+	1 – 25
++	26 – 50
+++	51 – 75
++++	≥ 76

Fonte: MARCIANO (2016).

Para a avaliação das características micromorfológicas das colônias foi utilizada a técnica de microcultivo, adaptado de Riddell (1950), com posterior observação em microscópio óptico (LEICA® 550M com câmera LEICA® ICC50E acoplada). As características macro e micromorfológicas foram avaliadas seguindo as descritas na literatura por Tulloch (1976), Driver *et al.* (2000) e Bischoff *et al.* (2009). Devendo apresentar macroscopicamente colônia com pigmentação inicialmente branca, adquirindo coloração amarela e verde olivácea, após a maturação dos conídios. Microscopicamente os conídios devem apresentar formato cilíndrico a oval, estreitos centralmente e truncados nas extremidades, com medidas podendo variar entre 3,5x9,0µm de comprimento e dispostos em cadeias.

5.12 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise descritiva e posteriormente foi feito a distribuição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, posteriormente, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para a comparação entre as médias. As análises foram realizadas pelo programa estatístico R (R CORE TEAM, 2020). No que se refere a avaliação do número de colônias fúngicas, para a análise de concordância entre os observadores foi utilizada a estatística de Kappa, segundo a interpretação de Landis e Koch (1977) (Tabela 2).

Tabela 2 Intervalos de medidas de concordâncias entre observadores da estatística de Kappa, segundo a interpretação de Landis e Koch (1977).

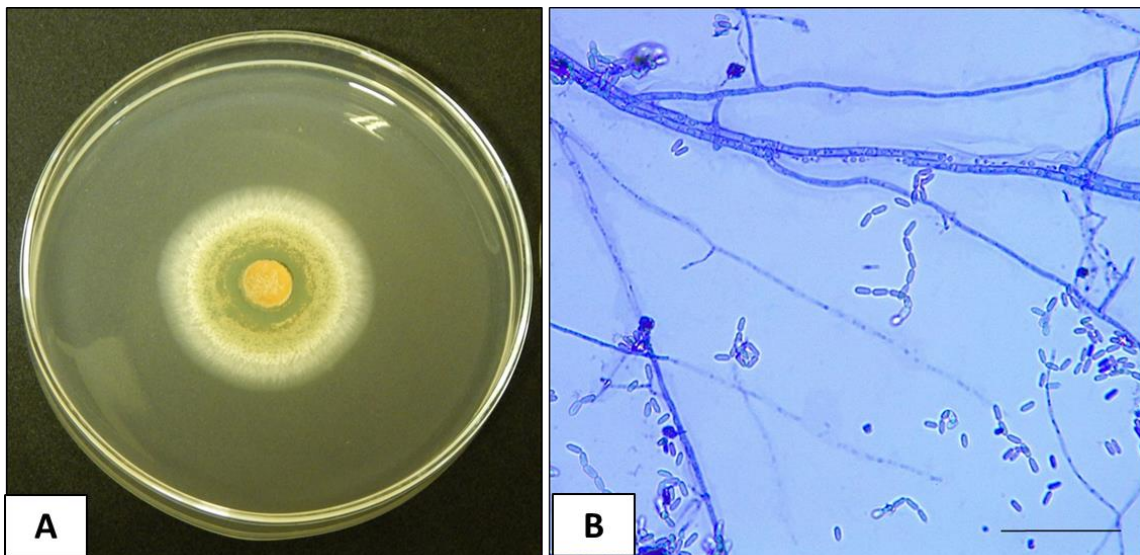
Valores de Kappa	Interpretação
< 0	Nenhuma concordância
0 – 0,19	Baixa concordância
0,20 – 0,39	Razoável concordância
0,40 – 0,59	Moderada concordância
0,60 – 0,79	Substancial concordância
0,80 – 1,00	Quase/perfeita concordância

6 RESULTADOS

6.1 Teste *in vitro* utilizando fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O isolado de *M. anisopliae* ARSEF 3643 utilizado no presente estudo apresentou características morfológicas semelhantes com a descrita na literatura por Driver *et al.* (2000) e Bischoff *et al.* (2009). Inicialmente a colônia apresentou pigmentação branca, tornando-se amarela e posteriormente verde olivácea com a maturação dos conídios. A avaliação micromorfológica revelou hifas septadas, com a presença de fiáldes individuais ou agrupadas e com formato cilíndrico. Os conídios apresentaram cor verde, formando cadeias e com formato cilíndrico a oval, estreitos centralmente e truncados nas extremidades (Figura 14).

Figura 14 A. Colônia de *Metarhizium anisopliae* após 7 dias de incubação em B.O.D. sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$. B. Hifas e conídios de *Metarhizium anisopliae*. Escala: $50\mu\text{m}$.



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Os conídios de *M. anisopliae* utilizados nas formulações aquosa e oleosa apresentaram 99% de germinação, após o período de 24 horas de incubação, em B.O.D sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$. Logo, os conídios fúngicos estavam viáveis e aptos a serem utilizados nas formulações (Figura 15).

Figura 15 Presença de conídios não germinados e conídios germinados, evidenciando-se o tubo germinativo. C: conídio; TG: tubo germinativo. Escala: $20\mu\text{m}$.



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

O peso médio inicial das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* que foram utilizadas nos grupos controles e formulação aquosa e oleosa de *M. anisopliae* não diferiram estatisticamente (Tabela 3). Assim, as diferenças observadas durante o ensaio nos parâmetros biológicos dos diferentes grupos, podem ser atribuídas aos tratamentos utilizados.

6.1.1 Parâmetros reprodutivos

O peso da massa de ovos dos grupos controles e formulação aquosa não apresentaram diferença estatística. Entretanto, o grupo formulação oleosa apresentou redução significativa na postura da massa de ovos (Tabela 3), evidenciando a maior eficácia de *M. anisopliae* quando associado ao óleo mineral.

Para o índice de produção de ovos, o grupo formulação aquosa não diferiu estatisticamente, quando comparado aos grupos controles água e óleo, no entanto, o grupo formulação oleosa apresentou redução significativa no IPO. Sabendo-se que cada teleógina consegue converter aproximadamente 50% do seu peso em massa de ovos, pode-se afirmar que a associação entre *M. anisopliae* e o óleo mineral atuou na redução da conversão do sangue ingerido em massa de ovos, obtendo-se um IPO menor (Tabela 3).

No que se refere ao percentual de eclosão das larvas, os grupos formulação aquosa e oleosa não apresentaram diferença estatística quando comparados aos grupos controles. Assim, as formulações de *M. anisopliae* não demonstraram influência sobre este parâmetro biológico, o percentual de eclosão variou entre 67,8% e 97,6% entre os grupos (Tabela 3). Entretanto, o tratamento formulação oleosa de *M. anisopliae* destacou-se com 78,6% de eficácia no controle de *R. microplus* (Tabela 3), o que revela o aumento da eficácia do fungo quando associado a veículos oleosos.

Tabela 3 Comparação de médias e desvio padrão das variáveis peso inicial das fêmeas ingurgitadas (mg), peso da massa de ovos (mg), índice de produção de ovos (%), percentual de eclosão de larvas (%) e percentual de controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no ensaio *in vitro*. Média \pm Desvio padrão.

Tratamentos	Peso das fêmeas antes da postura (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Índice de produção de ovos (%)	Percentual de Eclosão de larvas (%)	Percentual de Controle (%)
Controle água	207,52 \pm 26,37a	101,45 \pm 27,37a	48 \pm 9a	97,1 \pm 1,5a	
Controle óleo	205,01 \pm 28,78a	100,09 \pm 22,56a	49 \pm 10a	97,6 \pm 1,5a	0,2
Formulação aquosa	201,40 \pm 37,00a	93,17 \pm 39,27a	45 \pm 16a	87,8 \pm 30,5a	14,4
Formulação oleosa	204,16 \pm 28,33a	30,53 \pm 17,56b	15 \pm 9b	67,8 \pm 46,8a	78,6

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

6.2 Ensaio biológico em condições seminaturais

O peso médio dos grupos das fêmeas ingurgitadas que foram utilizadas no ensaio biológico em condições seminaturais foi similar e variou entre 6,7 gramas e 6,8 gramas/grupo ($p > 0,05$). Assim, as diferenças observadas nos parâmetros biológicos dos diferentes grupos durante o ensaio seminatural, podem ser atribuídas aos tratamentos utilizados.

6.2.1 Recuperação das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e percentual de controle

Na tabela 4 pode-se observar que, na avaliação aos 42 dias os tratamentos formulação oleosa e aquosa apresentaram o melhor resultado quanto à redução do número de larvas recuperadas, com valor médio de 1429 e 2078 de larvas, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as formulações fúngicas utilizadas. O grupo que apresentou a maior quantidade de larvas, ou seja, a menor redução como era esperado, foi o grupo controle água,

com média de 3700 larvas. Mesmo no grupo controle água a recuperação das larvas foi considerado reduzido, o que pode ser justificado pelos efeitos que as condições climáticas causam ao parasito, seja durante a oviposição, embriogênese e sobrevivência das larvas no ambiente.

Tabela 4 Comparação das médias e desvio padrão das contagens de larvas infestantes provenientes de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* dos grupos controles e formulação aquosa e oleosa, obtidas aos 42 dias após os tratamentos propostos.

Tratamentos	Larvas obtidas aos 42 dias
Controle água	3700 ± 1358 a
Controle óleo	3442 ± 660 a
Formulação aquosa	2078 ± 876 b
Formulação oleosa	1429 ± 672 b

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No que se refere ao percentual de controle das formulações fúngicas sobre as larvas de *R. microplus*, observou-se que as formulações aquosa e oleosa apresentaram eficácia de 43,8% e 58,4%, respectivamente, em relação aos seus respectivos grupos controles (Tabela 5). Quando comparado o grupo formulação oleosa com o controle água, observou-se aumento da eficácia (61,3%). Assim, pode-se inferir que o grupo formulação oleosa apresentou maior eficácia no controle das larvas de *R. microplus* (Tabela 5).

Tabela 5 Eficácia (%) das formulações aquosa e oleosa de *Metarhizium anisopliae* sobre a recuperação das larvas infestantes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, em ensaio biológico em condições seminaturais.

Controles	Tratamentos	Eficácia (%)
Controle água	Controle óleo	6,9
Controle água	Formulação aquosa	43,8
Controle água	Formulação oleosa	61,3
Controle óleo	Formulação aquosa	39,6
Controle óleo	Formulação oleosa	58,4

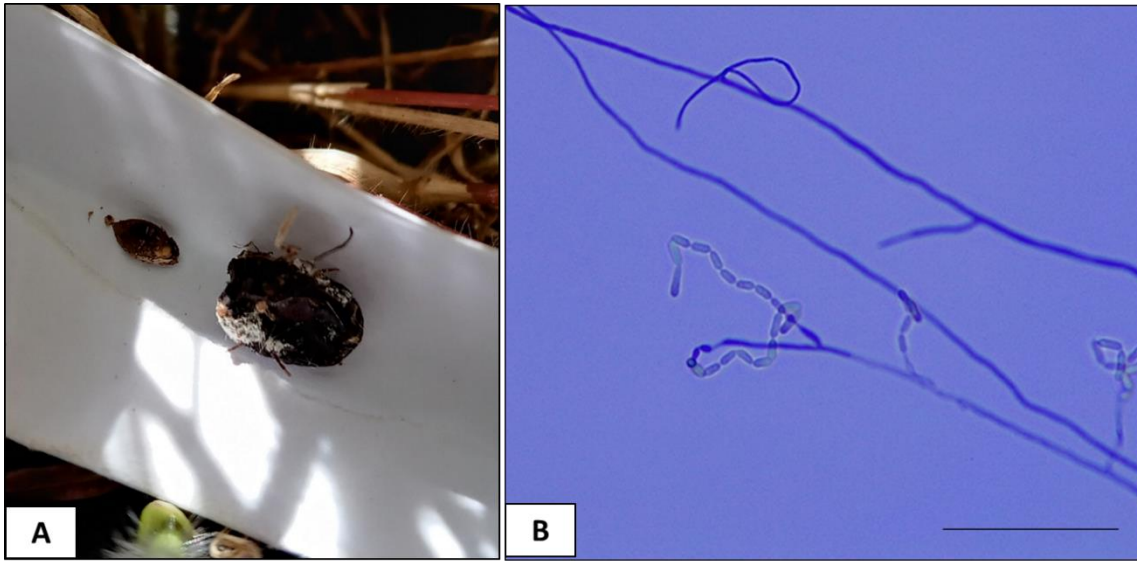
6.2.2 Isolamento de *Metarhizium anisopliae* a partir das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Após a realização dos tratamentos foram feitas inspeções visuais nos vasos durante 21 dias, a fim de identificar a presença de fêmeas mortas, oviposição e do crescimento fúngico no solo ou sobre as fêmeas. Nos grupos controles foi observada maior viabilidade das teleóginas, cerca de 17 dias após o tratamento ainda estavam realizando oviposição. No entanto, no grupo formulação oleosa observou-se fêmeas enegrecidas e com exteriorização fúngica na sua superfície a partir do 7º dia após o tratamento. No que se refere ao grupo formulação aquosa notou-se a mortalidade das teleóginas a partir do 13º dia. Todas as fêmeas mortas foram submetidas à técnica de câmara úmida e microcultivo.

Todas as amostras do microcultivo dos grupos formulação aquosa e oleosa apresentaram características micromorfológicas compatíveis com a descrição de *M. anisopliae* observada na literatura (Figura 16) (DRIVER *et al.*, 2000 e BISCHOFF *et al.*, 2009). Confirmando assim, que todas as fêmeas coletadas em ambos os grupos apresentaram infecção por *M. anisopliae*. No entanto, as fêmeas coletadas dos grupos controles não se observou a presença de estruturas fúngicas compatíveis com a de *M. anisopliae*, logo, pode-se descartar a mortalidade destas pelo fungo avaliado.

Durante o período de realização da postura, foi possível observar exteriorização fúngica sobre a cutícula das teleóginas dos grupos formulação aquosa e oleosa. Assim, pode-se confirmar que *M. anisopliae* possui atividade patogênica sobre o carrapato, podendo-se observar também, sua capacidade de realizar todas as fases do seu crescimento sobre este artrópode.

Figura 16 A. Fêmea de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colonizada por *Metarhizium anisopliae*. B. Microfotografia de *Metarhizium anisopliae*. Escala: 50µm.



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

6.2.3 Isolamento e identificação de *Metarhizium anisopliae* para a avaliação da persistência do fungo no solo

Não houve crescimento fúngico característico de *M. anisopliae* nas amostras de solo coletadas de todos os grupos antes da pulverização com os tratamentos propostos (dia zero). Nas amostras de solo coletadas no 3º dia após os tratamentos, verificou-se presença de UFC características de *M. anisopliae* nos grupos formulação aquosa e oleosa, sendo o número de colônias classificada como 4 cruces (≥ 76 colônias por placa), para ambos os grupos. No

que se refere aos grupos controles não houve crescimento fúngico característico em nenhuma das coletas realizadas (Tabela 6 e Figura 17).

No 7º dia de coleta das amostras de solo após os tratamentos, também se observou a presença de UFC com características de *M. anisopliae* nos grupos formulação aquosa e oleosa. Sendo que, não houve diferença no número de colônias entre esses grupos, todas as placas avaliadas foram classificadas como 4 cruces (≥ 76 colônias por placa) (Tabela 6 e Figura 17).

Na coleta realizada no 21º dia após tratamento, foram isoladas colônias características de *M. anisopliae* de ambos os grupos. No entanto, verificou-se redução no número de UFC no grupo formulação aquosa, classificado por três cruces (51 – 75 colônias por placa). Entretanto, as amostras de solo do grupo formulação oleosa apresentaram mais de 76 colônias por placa (Tabela 6 e Figura 17).

A avaliação da última coleta de solo realizada no 52º dia após os tratamentos revelou uma redução acentuada no número de colônias dos grupos formulação aquosa e oleosa, sendo classificado por 1 cruz (1 – 25 colônias por placa) (Tabela 6 e Figura 17).

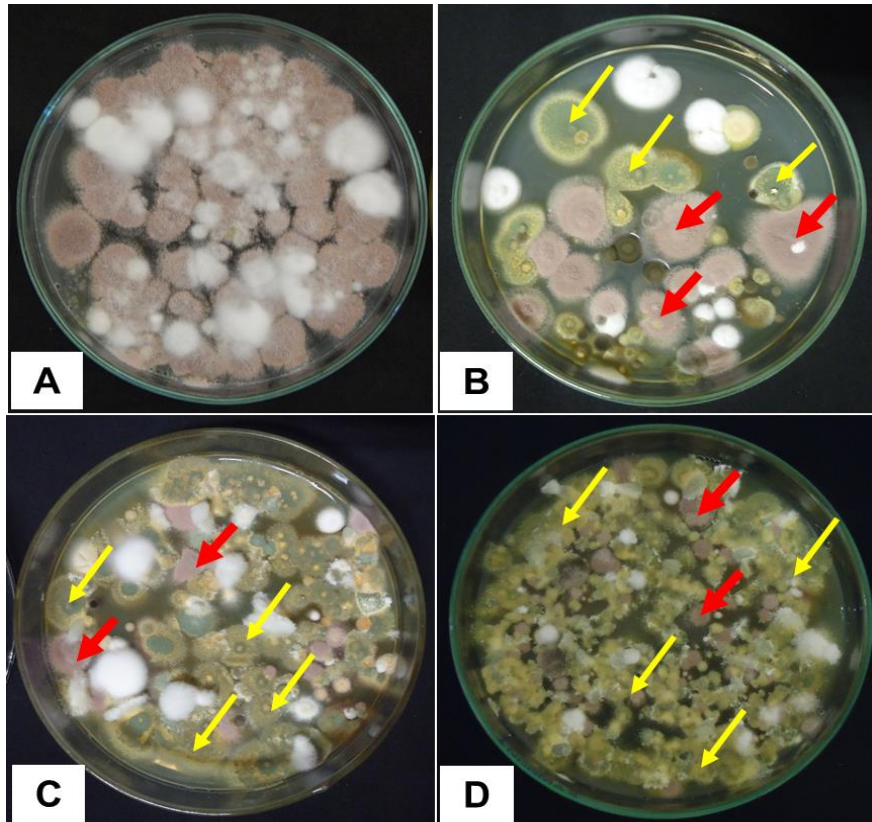
A técnica de microcultivo realizada a partir das colônias fúngicas das amostras de solo dos grupos formulação aquosa e oleosa, revelaram características microscópicas compatíveis com as de *M. anisopliae* descritas na literatura por DRIVER *et al.* (2000) e BISCHOFF *et al.* (2009). A avaliação microscópica revelou a presença de hifas septadas, com fiálides únicas ou agrupadas e conídios de formato cilíndrico e oval e dispostos em cadeias. As colônias observadas nos grupos controles também foram submetidas à técnica de microcultivo, no entanto, na avaliação microscópica foram verificadas estruturas fúngicas incompatíveis com as do fungo avaliado.

Tabela 6 Classificação do número de colônias de *Metarhizium anisopliae* isoladas do solo (3^o, 7^o, 21^o e 52^o dia), segundo o método proposto por Marciano (2016).

Repetição	3 ^o dia				7 ^o dia			
	Controle H2O	Controle óleo	Formulação aquosa	Formulação oleosa	Controle H2O	Controle óleo	Formulação aquosa	Formulação oleosa
1	-	-	++++	++++	-	-	++++	++++
2	-	-	++++	++++	-	-	++++	++++
3	-	-	++++	++++	-	-	++++	++++
Repetição	21 ^o dia				52 ^o dia			
	Controle H2O	Controle óleo	Formulação aquosa	Formulação oleosa	Controle H2O	Controle óleo	Formulação aquosa	Formulação oleosa
1	-	-	+++	++++	-	-	+	+
2	-	-	+++	++++	-	-	+	+
3	-	-	+++	++++	-	-	+	+

(-) zero colônia de *Metarhizium anisopliae* isolada; (+) 1 a 25 colônias de *Metarhizium anisopliae* isoladas; (++) 26 a 50 colônias de *Metarhizium anisopliae* isoladas; (+++) 51 a 75 colônias de *Metarhizium anisopliae* isoladas; (++++) ≥ 76 colônias de *Metarhizium anisopliae* isoladas.

Figura 17 Colônias de *Metarhizium anisopliae* (setas amarelas) e colônias de fungos contaminantes (setas vermelhas) em meio seletivo CTC a partir de amostras de solo. A: Placa sem colônias características de *Metarhizium anisopliae* (-); B: Placa contendo de 1 a 25 colônias características de *Metarhizium anisopliae* (+); C: Placa contendo de 51 a 75 colônias características de *Metarhizium anisopliae* (+++); D: Placa contendo mais de 76 colônias (++++). Características de *Metarhizium anisopliae*.



Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Após a avaliação do número de colônias realizada pelos três avaliadores, os resultados foram submetidos à estatística de Kaapa. A concordância obtida variou entre 0,48 e 0,89 entre os avaliadores, os valores encontrados permitem classificá-los como de superficial a quase perfeita concordância, de acordo com a interpretação de Landis e Koch (1977). O grau de concordância entre os avaliadores está expresso na Tabela 7. A total concordância entre os avaliadores é representada pelo valor igual a 1, quando os valores são negativos ou próximos de zero indicam nenhuma concordância.

Tabela 7 Comparação da intensidade da concordância entre as avaliações feita por três avaliadores (AV) do número de colônias de *Metarhizium anisopliae* isolados do solo. A concordância foi mensurada utilizando o método estatístico Kappa.

	Controle água			Controle óleo			Formulação aquosa			Formulação oleosa		
	AV 1	AV 2	AV 3	AV 1	AV 2	AV 3	AV 1	AV 2	AV 3	AV 1	AV 2	AV 3
AV 1	---	0,48*	0,48*	---	0,48*	0,48*	--	0,83*	0,57*	--	0,89*	0,89*
AV 2	0,48*	---	0,48*	0,48*	---	0,48*	0,83*	--	0,65*	0,89*	--	0,89*
AV 3	0,48*	0,48*	---	0,48*	0,48*	---	0,57*	0,65*	--	0,89*	0,89*	--

*Significantes ao nível de $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

Os resultados observados no teste *in vitro* revelaram que a formulação de *M. anisopliae* quando associada ao óleo mineral possibilita a maior eficácia do fungo no controle de *R. microplus*, o que pode ser justificado pela proteção conferida pelo óleo mineral e melhor adesão dos conídios a cutícula do artrópode. Foi possível verificar alterações em alguns parâmetros reprodutivos das fêmeas, por exemplo, redução significativa no peso da massa de ovos, bem como, no índice de produção de ovos. Esses achados são extremamente relevantes quando se pensa no controle de *R. microplus*, pois diminuindo a ovipostura consequentemente diminui a quantidade de larvas infestantes nas pastagens, favorecendo assim o controle do parasito na propriedade.

O presente trabalho destaca-se por ser pioneiro na utilização de formulações fúngicas a base de *M. anisopliae* para o controle de *R. microplus* em condições seminaturais na região Nordeste. Os resultados aqui apresentados demonstraram a patogenicidade do fungo sobre o carrapato estudado, e são importantes pois darão subsídios para futuras pesquisas em condições de campo, especialmente para as regiões de bioma de Mata Atlântica, por exemplo, o Recôncavo da Bahia por apresentar clima compatível com as condições necessárias para a sobrevivência do fungo no ambiente.

Um ponto importante na utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico é a avaliação do percentual de germinação antes do preparo das formulações, uma vez que, o primeiro estágio de infecção do fungo é a adesão, germinação e penetração na cutícula do artrópode. O isolado de *M. anisopliae* ARSEF 3643 utilizado nos ensaios *in vitro* e em condições seminaturais apresentou germinação de 99%, portanto, apto a ser utilizado. De acordo com Alves e Faria (2010), uma taxa de germinação acima de 80% é satisfatória.

O isolado *M. anisopliae* ARSEF 3643 utilizado, já possui atividade carrapaticida comprovada em estudos anteriores. Jones (2017), demonstrou que este isolado na concentração de 10^8 conídios/mL apresentou 58,77% de eficácia sobre *R. microplus*, além de alterar diferentes parâmetros biológicos das fêmeas tratadas. Sabe-se que há diferença na patogenicidade entre diferentes isolados

de *M. anisopliae* (PERINOTTO *et al.*, 2014), e também há variação quando o mesmo isolado é utilizado em formulações oleosas (PERINOTTO *et al.*, 2017). Isso pode ser observado no presente estudo, pois o isolado testado apresentou melhor ação carrapaticida quando formulado em óleo mineral.

A utilização das formulações fúngicas em condições seminaturais confirmaram a patogenicidade do fungo sobre os diferentes estágios de vida livre de *R. microplus*. Foram observadas fêmeas inviáveis com crescimento fúngico sobre sua cutícula a partir de 7 dias após o tratamento com a formulação oleosa, e após a realização do reisolamento fúngico identificou-se estruturas micromorfológicas compatíveis com *M. anisopliae*. Apesar de não haver diferença estatística entre as formulações propostas, quando se compara os grupos controle água e formulação oleosa o percentual de eficácia do fungo foi de 61,3% na redução do número de larvas infestantes, já o grupo formulação aquosa obteve um percentual de controle de 43,8%, ou seja, o percentual de controle quando utilizado o óleo mineral foi superior a formulação aquosa.

No 21º dia de coleta do solo, foi isolado um maior número de colônias do grupo formulação oleosa, quando comparado ao grupo formulação aquosa. Este resultado pode inferir que o óleo mineral conferiu proteção ao fungo no ambiente, prolongando assim, sua viabilidade no solo e conseqüentemente sua ação sobre o parasito. Verificou-se a permanência do fungo no solo por 52 dias, no entanto, houve uma redução acentuada de UFC na última coleta (52 dias). Que pode ser justificada pela ação de fatores abióticos como temperatura, umidade e radiação solar sobre o microclima dos vasos, uma vez que, 12 dias anteriormente a última coleta do solo, houve o corte da gramínea para recuperação das larvas, e conseqüentemente influência dos efeitos climáticos sobre o fungo.

De maneira geral, nas condições estudadas, o isolado de *M. anisopliae* foi capaz de persistir no solo por 52 dias, sendo esse resultado relevante quando se pensa na aplicabilidade de tais formulações a campo, uma vez que, o conhecimento da persistência do fungo no solo permite determinar frequências de aplicação das formulações fúngicas nas pastagens, auxiliando assim no desenvolvimento de protocolos de controle.

Marciano *et al.* (2020) em estudo sob condições seminaturais, obtiveram resultados satisfatórios utilizando formulações de *Metarhizium* sp. associada ao óleo mineral e vegetal, apresentando eficácia média de 85,08 a 100% no controle

de *R. microplus*, além de proporcionar ao fungo um período de viabilidade no solo de até 60 dias. Essa diferença observada por esses autores pode ser atribuída aos diferentes isolados fúngicos utilizados (ARSEF 3641 e CG 148), às condições climáticas, visto que, o estudo foi realizado no estado do Rio de Janeiro e também à população de carrapatos estudada, sabe-se que há variação da patogenicidade entre diferentes populações de *R. microplus* (PERINOTTO *et al.*, 2012). Marciano (2016) ressalta a importância dos ensaios biológicos a campo, pois é possível mimetizar condições de campo no qual a maior população do carrapato é encontrada, tais condições possibilitam que tanto o fungo quanto o parasito sofram as influências das variações ambientais.

Bittencourt *et al.* (2003) avaliaram a utilização de formulação aquosa de *M. anisopliae* pulverizada sobre larvas de *R. microplus* em canteiros com pastagem de *Brachiaria decumbens*, foi observado percentual de controle de até 53,78% na terceira aplicação com a suspensão fúngica, na concentração de 2×10^9 . Garcia *et al.* (2011) avaliaram a ação da formulação aquosa do isolado E9 do fungo *M. anisopliae*, em pastagem de *B. decumbens* naturalmente infestada com larvas de *R. microplus* e submetida ao pastejo com bovinos, não sendo observado diferença na contagem do número de teleóginas e na recuperação das larvas dos grupos tratados e controles. No entanto, o ensaio laboratorial utilizando o mesmo isolado, revelou redução significativa no peso da massa de ovos e na taxa de eclosão das larvas.

Estudo realizado por Ángel-Sahagún *et al.* (2010) no México, utilizando formulações aquosa e sólida de *M. anisopliae* em pastagens infestadas com larvas de *R. microplus*, revelou um percentual de redução de larvas de 67,8 e 94,2%, respectivamente, 14 dias após a aplicação das formulações, sendo que, a formulação sólida obteve redução de 58,3% na recuperação das larvas 21 dias após os tratamentos. Os mesmos autores ainda apontam, que a utilização de adjuvantes possui grande influência na eficácia das formulações a base de *M. anisopliae* em estudos de campo.

Estes estudos possibilitam identificar a influência que as variações climáticas exercem sobre o fungo, sabe-se que um dos problemas na utilização deste fungo a campo é a sua susceptibilidade a temperaturas elevadas, umidade e a radiação solar. Estudos *in vitro* revelam bons percentuais de controle de *R. microplus*, no entanto, quando realizado ensaios de campo nota-se uma redução

desse percentual, pode-se inferir que a utilização de adjuvantes que confiram proteção aos conídios possibilita a sua persistência no ambiente e o controle do parasito, portanto, um fator fundamental nos programas de controle biológico utilizando *M. anisopliae*; outro fator importante que pode influenciar a eficácia dos tratamentos são os isolados utilizados, é possível observar nos trabalhos estudados isolados com diferentes percentuais de controle.

Para Alves e Faria (2010) a associação do fungo a veículos oleosos minimiza os danos ambientais causados ao agente, principalmente os efeitos de radiação UV-B e umidade, além de conferir melhor adesão dos conídios à cutícula do artrópode e até mesmo sobre as plantas. No presente estudo observou-se 60% de umidade relativa média ao longo do ensaio seminatural, com variação entre 33% e 100%; a temperatura média observada no mesmo período foi de 28°C. Camargo (2014) utilizando formulação a base de *M. anisopliae* em estudo laboratorial com diferentes umidades relativas, identificaram eficácia do fungo associado ao óleo mineral quando submetido a umidades relativas entre 30% e 50%, diferentemente da formulação fúngica aquosa, que apenas tiveram efeitos sobre os parâmetros biológicos do carrapato em umidade relativa variando entre 70% e 90%.

Os resultados do presente estudo, assim como, dos demais trabalhos revisados apontam a patogenicidade do fungo sobre as fases de vida livre de *R. microplus* em ensaios *in vitro* e em condições de campo, tais resultados vislumbram a utilização de formulações fúngicas como método integrado as formas convencionais de controle. De acordo com Schumacher e Poehling (2012), a associação de fungos entomopatogênicos a acaricidas químicos podem aumentar a eficácia do fungo, desde que, não haja efeitos negativos sobre a sua germinação e conidiogênese. Webster *et al.* (2015) relataram a compatibilidade entre o isolado de *M. anisopliae* (TIS-BR03) aos acaricidas cipermetrina e clorpirifós, nesse mesmo estudo a formulação fúngica associada aos acaricidas foi pulverizada em bovinos, sendo observado o percentual de 97,9% de eficácia no controle do carrapato. Resultado positivo também foi encontrado no estudo de Murigu *et al.* (2016), no qual a compatibilidade do isolado de *M. anisopliae* (ICIPE 7) com o acaricida amitraz foi demonstrada.

De acordo com as exigências do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), os acaricidas químicos devem apresentar eficácia de

95% no controle do parasito, no entanto, no que se refere ao panorama nacional, se tem relatos de cepas com múltipla resistência aos acaricidas disponíveis no mercado, diante do cenário da resistência parasitária e com base nos trabalhos de compatibilidade entre o fungo e acaricidas químicos, pode-se inferir que essa associação como método integrado de controle é possível.

No presente estudo foi observado que as condições climáticas do Recôncavo da Bahia são favoráveis para a viabilidade e patogenicidade do fungo em condições de campo, dando subsídio para pesquisas futuras com a utilização desse agente para o controle biológico de *R. microplus*. O uso de *M. anisopliae* no controle desse carrapato é promissor, os estudos *in vitro* apontam sua eficácia, assim como, os testes em condições seminaturais, no entanto, ainda são necessários ajustes metodológicos a fim de determinar a concentração fúngica que confira melhor virulência; formas e intervalos de aplicação; e o uso de adjuvantes, pois como foi observado no presente trabalho a formulação fúngica associada ao óleo mineral obteve maior percentual de controle em ambos os testes. Tais pesquisas a campo são importantes, pois esses resultados vislumbram a utilização desse tipo de controle biológico integrado a outros métodos convencionais de controle, por exemplo, aos acaricidas químicos, afim de reduzir o uso massivo desses compostos.

8. CONCLUSÕES

A formulação oleosa de *M. anisopliae* apresenta maior percentual de controle de *R. microplus* em condições laboratoriais, quando comparado aos demais tratamentos.

As formulações de *M. anisopliae* apresentam eficácia no controle das fases de vida livre do parasito, quando aplicado no solo e na gramínea em condições seminaturais.

Foi possível verificar que *M. anisopliae* sobrevive no solo por um período de 52 dias em condições seminaturais, resistindo assim as intempéries ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHID, S.M.M. 2009. **Apostila Didática em Entomologia Veterinária**, Universidade Federal Rural do Semi árido, Mossoró.
- ALVES, R.T.; FARIA, M. 2010. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. 1 edição. Embrapa Cerrados, Planaltina (DF).
- ALVES, S.B. 1998. **Fungos entomopatogênicos**. In: Controle microbiano de insetos. eds. ALVES S.B. Fealq, Piracicaba, São Paulo.
- ALVES, W.V.; LORENZETTI, E.R.; GONÇALVES, F.C. 2012. Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável** 2(2):14–25.
- AYOADE, J. 1986. **Introdução a Climatologia Dos Trópicos**. São Paulo: Difel.
- AMORIM, L.S.; WENCESLAU, A.A.; CARVALHO, F.S.; CARNEIRO, P.L.S.; ALBUQUERQUE, G.R. 2014. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 23(3):328–336.
- ANDREOTTI, R. 2010. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. 2 edição. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Minas Gerais.
- ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. 2016. **Procedimentos para o controle do carrapato-do-boi em dez passos**. p. 197-207. In: Carrapatos protocolos e técnicas para estudo. eds. ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.
- ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; SKODA, S.R.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; LORENZONI, A.G.; GALINDO-VELASCO, E.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.; FOSTER, J.E. 2010. 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** 170(3-4):278-286.
- ANGELO, I.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2015. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos**. p. 69–95. In: Controle de carrapatos nas pastagens. eds. VERISSIMO, J.C. Nova Odessa, São Paulo.
- AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J.; LEAL, M.L.R.; BECK, R.C.R.; MEINERZ, G.R.; PARRA, C.L.C.; MACHADO, P.R.; FOLETTTO, V.; BEM, C.M.; NICOLODI, P.R.S.J. 2010. Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 12(4):482-487.
- AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J.; PARRA, C.L.C.; AGUIRRE, P.F.; BEM, C.M.D.; ZENI, D.; MOREL, A.F. 2014. Eficácia acaricida do óleo de citronela contra o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 15(3):604-612.
- ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005. 144p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BADI, M.H; ABREU, J.L. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. **International Journal of Good Conscience** 1(1): 82–89.
- BARBOSA, F.A. GRAÇA, D.S.; MAFFEI, W.E.; SILVA JÚNIOR, F.V.; SOUZA, G.M. 2007. Desempenho e consumo de matéria seca de bovinos sob suplementação protéico-energética, durante a época de transição água-seca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59(1): 160-167.

- BARCI, L.A.G.; ALMEIDA, J.E.M.; NOGUEIRA, A.H.C.; ZAPPELINI, L.O.; PRADO, A.P. 2009. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 18(1):7–13.
- BARROS, M.N.D.; RIET-CORREA, F.; AZEVEDO, S.S.; LABRUNA, M.B. 2017. Off-host development and survival of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Brazilian semiarid. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 9:17–24.
- BEYS-DA-SILVA, W.O.; ROSA, R.G.; BERGER, M.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; SANTI, L. 2020. Updating the Application of *Metarhizium Anisopliae* to Control Cattle Tick *Rhipicephalus Microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology** 208:1–29.
- BENNETT, G.F. 1974. Ovoposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia** 16:52–61.
- BERNARDO, C.C.; BARRETO, L.P.; SILVA, C.S.R.; LUZ, C.; ARRUDA, W.; FERNANDES, E.K.K. 2018. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases** 9:1334-1342.
- BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L.Q.; CARDOSO, F.F.; DIONELLO, N.J.L. 2012. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. **Revista Archivos de Zootecnia** 61:1–11.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia** 101:512–530.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; BAHIANSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; SOUZA, E.J. 2003. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 12:38–42.
- BLECHA, I.M.Z.; CSORDAS, B.G.; AGUIRRE, A.D.A.R.; CUNHA, R.C.; GARCIA, M.V.; ANDREOTTI, R. 2018. Análise de epítomos conservados da Bm86: é possível uma vacina global contra Carrapato-do-Boi *Rhipicephalus microplus*? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 27(3):267-279.
- BOTELHO, A.A.A.; MONTEIRO, A.A. 2011. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. **Bragantia** 70(2):361–369.
- BRITO, L.G.; ROCHA, R.B.; SILVA NETTO, F.G.; BARBIERI, F.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; GONÇALES, M.A.R.; CARVALHO, G.L.O. 2010. Eficácia de carrapaticidas em rebanhos leiteiros de Rondônia. **Circular Técnica**: Embrapa 113:01–04.
- BRITO, L.G.; BARBIERI, F.S.; ROCHA, R.B.; OLIVEIRA, M.C.S.; RIBEIRO, E.S. 2011. Evaluation of the Efficacy of Acaricides Used to Control the Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*, in Dairy Herds Raised in the Brazilian Southwestern Amazon. **Veterinary Medicine International** 2011:01–06.
- BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; DIAS, N.S.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; LOPES, D.O.P.; SANTOS, J.M. 2010. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 19(1):44–48.
- BRUNNER-MENDOZA, C.; REYES-MONTES, M.D.R.; MOONJELY, S.; BIDOCHKA, M.J.; TORIELLO, C. 2019. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. **Biocontrol Science and Technology** 29(1):83-102.
- BUZATTI, A.; SPRENGER, L.K.; KUCHARSKY, T.; MOLENTO, M.B. 2013. Ação do óleo de nim frente à teleóginas de *Rhipicephalus (boophilus) microplus* em testes *in vitro*. **Archives of Veterinary Science** 18(3):07–12.
- CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to

control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology** 188:140–147.

CAMARGO, M.G.; MARCIANO, A.F.; SÁ, F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; QUINELATO, S.; GÔLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2014. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology** 205:271–276.

CAMARGO, M.G. **Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: testes em condições laboratoriais e a campo**. 2014. 75f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

CAMARGO, M.G.; NOGUEIRA, M.R.S.; MARCIANO, A.F.; PERINOTTO, W.M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SCOTT, F.B.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2016. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology** 223:38–42.

CAMPOS JUNIOR, D.A.; OLIVEIRA, P.R. 2005. Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, bahia, brasil. **Ciência Rural** 35(6):1386–1392.

CAMPOS, R.N.S.; BACCI, L.; ARAÚJO, A.P.A.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SANTOS, G.R.A.; RONEER, M.N.B. 2012. Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* **Revista Archivos de Zootecnia** 61:67–78.

CARDOSO, J.T. 2016. A Mata Atlântica e sua conservação. **Revista Encontros Teológicos** 31(3):441–458.

CARNEIRO, J.C.; COSTA, E.G.L.; VASCONCELOS, V.O.; OLIVEIRA, N.J.F.; DUARTE, E.R. 2015. Diagnóstico do controle e eficácia de acaricidas para o carrapato bovino no Semiárido do Norte de Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae** 43:01–10.

CARVALHO, T.B.; ZEN, S. 2017. A cadeia de pecuária de corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista IPecege** 3(1):85–99.

COSTA, V.M.M.; RODRIGUES, A.L.; MEDEIROS, J.M.A.; LABRUNA, M.B.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. 2011. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 31(3):239–243.

COSTA, M.V.; RIBEIRO, M.F.B.; DUARTE, A.L.L.; MANGUEIRA, J.M.; PESSOA, A.F.A.; AZEVEDO, S.S.; BARROS, A.T.M.; RIET-CORREA, F.; LABRUNA, M.B. 2013. Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22(2):207–213.

COSTA, V.M.M.; RIBEIRO, M.F.B.; DUARTE, G.A.F.P.; SOARES, J.F.; AZEVEDO, S.S.; BARROS, A.T.M.; RIET-CORREA, F.; LABRUNA, M.B. 2018. Incidência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38(4):605–612.

CUNHA, R.C.; CABRAL, B.G.C.; LEITE, F.P.L.; ANDREOTTI, R. 2019. **Vacinas contra o carrapato-do-boi no Brasil**. p. 193-205. In: Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. eds. ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; KOLLER, W.W. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research** 104:134–150.

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

ESTRADA-PEÑA, A.; AYLLÓN, N.; LA FUENTE, J. 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. **Frontier in Physiology** 3(64):1–12.

EVANGELISTA, A.R.S. 2011. O processo de desmatamento do bioma caatinga: riscos e vulnerabilidades socioambientais no território de identidade do sisal, Bahia. **Revista Geográfica de América Central** 2:1–13.

- FAO. 2010. **Situação mundial dos recursos genéticos animais para agricultura e alimentação**. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a1260p/a1260p.pdf>>. Acesso em: março de 2019.
- FARIA, M.R.; WRIGHT, S.P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control** 43:237–256.
- FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.EN.; FOSTER, R.N.; ROBERTS, D.W. 2010. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control** 54:197–205.
- FERNANDEZ, C.M.M.; ROSA, M.F.; FERNANDEZ, A.C.A.M.; BORTOLUCCI, W.D.C.; FERREIRA, F.B.P.; LINDE, G.A.; COLAUTO, B.N.; SIMÕES, M.R.; LOBO, V.S.; GAZIM, Z.C. 2020. Essential oil and fractions isolated of Laurel to control adults and larvae of cattle ticks. **Natural Product Research** 34(5):731–735.
- FORTES, E. 2004. **Parasitologia Veterinária**. 4 edição. Editora Ícone, São Paulo, Brasil.
- GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. 2004. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural** 34(5):1513–1518.
- GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; MOCHI, D.A.; SIMI, L.D.; CARVALHO, W.M.; TSURUTA, S.A.; BARBOSA, J.C. 2011. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. **Veterinary parasitology** 181(2-4):267-273.
- GARCIA, M.V.; HIGA, L.O.S.; BARROS, J.C.; ANDREOTTI, R. 2016. **Protocolos sobre bioensaios para diagnóstico da resistência de *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas**. p. 179-193. In: Carrapatos protocolos e técnicas para estudo. eds. ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.
- GARCIA M.V.; RODRIGUES, V.S.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, K. 2019. **Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. p. 17-27. In: Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. eds. ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; KOLLER, W.W. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.
- GIGLIOTTI, R.; FORIM, M.R.; OLIVEIRA, H.N.; CHAGAS, A.C.S.; FERREZINI, J.; BRITO, L.G.; FALCOSKI, T.O.R.; ALBUQUERQUE, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S. 2011. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology** 181:309–315.
- GONÇALVES, P. M. 2000. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural** 30(1):187–194.
- GONÇALVES, R.C.; SILVA, A.A.; FERREIRA, A.O.L.; CHIACCHIO, A.B.; LOPES, R.S.; BORGES, A.S.; AMORIM, R.M. 2011. Tristeza parasitária em bovinos na região de Botucatu – SP: estudo retrospectivo de 1986-2007. **Semina: Ciências Agrárias** 32(1):307–312.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 23(2):150–156.
- GUIZZO, M.G.; ABREU, L.; MASUDA, A.; LOGULLO, C.; VAZ JUNIOR, I.S. 2012. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae** 40(1):01–12.
- GUIMARÃES, A.M.; CARVALHO, A.H.O.; DAHER, D.O.; ROCHA, C.M.B.M.; HIRSCH, C. 2011. Soroprevalência e fatores de risco para *Babesia bovis* em rebanhos leiteiros na região sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia** 35(4):826–832.
- GUIMARÃES, M.J.M.; LOPES, I.; OLDONI, H.; COELHO FILHO, M.A. 2016. Balanço hídrico para diferentes regimes pluviométricos na região de Cruz das Almas-BA. **Revista de Ciências Agrárias** 59(3):252–258.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, R. 2015. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal chemistry** 5(7):326–333.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, R. 2016. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 5(2):163–171.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; BONATTE JUNIOR, P. 2019. **Controle do carrapato-do-boi por meio de acaricidas**. p. 137–147. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; KOLLER, W.W. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.

IBGE. 2019. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019>>. Acesso em: novembro de 2020.

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

JONES, G.A. **Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese**. 2017. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

KAAYA, G.P.; HEDIMBI, M. 2012. The use of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as bio-pesticides for tick control. **International Journal of Agricultural Sciences** 2(6):245–250.

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B.D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; LA CANAL, L.H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M.O.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J.R. 2017. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases** 8(1):73–80.

KOLLER, W.W.; MATIAS, J. 2016. **Coleta, preservação e identificação de carrapatos**. p.3-33. In: Carrapatos protocolos e técnicas para estudo. eds. ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics** 33:159–174.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1–41.

MARCIANO, A.F.; PAULA, J.P.; SOUZA, L.A.; CAMARGO, M.G.; PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; SÁ, F.A.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2013. Eficiência *in vitro* de uma formulação oleosa de *Metarhizium anisopliae sensu lato* no controle de *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35(2):28–34.

MARCIANO, A.F.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; GÔLO, P.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; FREITAS, M.C.; ANGELO, I.C.; NOGUEIRA, M.R.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2015. *Metarhizium anisopliae*: influência do pH na atividade enzimática e no controle de *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 37(1):85–90.

MARCIANO, A.F. **Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): Uso de formulações oleosas de *Metarhizium* spp. em condições seminaturais**. 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

MARCIANO, A.F.; GOLO, P.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; CAMARGO, M.G.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T.A.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2020. *Metarhizium anisopliae sensu lato* (s.l.) oil-in-water emulsions drastically

reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass.

Medical and Veterinary Entomology 1:1–5.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, L. C.; VARGAS, M. I.; PATARROYO, J. H.; TAFUR, G. A.; MURTA, D. 2014. Resposta de linfonodos em bovinos inoculados a campo com a vacina recombinante rSBm7462 anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 34(6): 503-508.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; CASTILLO-HERRERA, G.A.; ROSARIO-CRUZ, R.; FLORES-FERNANDEZ, J.M.; LOPEZ-RAMIREZ, J.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; LUGO-CERVANTES, E.C. 2011. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology Research** 108:481–487.

MARTINS, R.; RUIZ, N.; FONSECA, R.N.; VAZ JUNIOR, I.S.; LOGULLO, C. 2018. The dynamics of energy metabolism in the tick embryo. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 27(3):259–266.

MCMANUS, C.; BARCELLOS, J.O.J.; FORMENTON, B.K.; HERMUCHE, P.M.; CARVALHO, O.B.; GUIMARÃES, R.F.; GIANEZINI, M.; DIAS, E.A.; LAMPERT, V.N.; ZAGO, D.; BRACINI NETO, J. 2016. Dynamics of Cattle Production in Brazil. **PLOS ONE** 11(1):01–15.

MONTEIRO, C.M.O.; PRATA, M.C.A. 2015. **Controle biológico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e desafios**. p. 46–68. In: Controle de carrapatos nas pastagens. eds. VERISSIMO, J.C. Nova Odessa, São Paulo.

MONTEIRO, S.G. 2017. **Parasitologia na medicina veterinária**. 2 edição. Editora Roca, Rio de Janeiro, Brasil.

MURIGU, M.M.; NANA, P.; WARUIRU, R.M.; NGA'NGA, C.J.; EKESI, S.; MANIANIA, N.K. 2016. Laboratory and field evaluation of entomopathogenic fungi for the control of amitraz-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus decoloratus*. **Veterinary parasitology** 225:12-18.

ORLANDELLI, R.C.; PAMPHILE, J.A. 2011. Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. **Revista de Saúde e Biologia** 6(2):79–82.

OTTATI-DE-LIMA, E.L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; GASSEN, M.H.; WENZEL, I.M.; ALMEIDA, A.M.B.; ZAPPELLINI, L.O. 2010. Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico** 77(4):651–659.

PARRA, J.R.P. 2014. Biological Control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola** 71(5):345–355.

PEDRASSANI, D.; REISDORFER, S. 2015. Avaliação da eficácia *in vitro* de carrapaticidas comerciais. **Archives of Veterinary Science** 20(1):17–29.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; KLAFKE, G.M. 2008. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência**. 1 edição. São Paulo: MedVet.

PEREIRA, C.D.; SOUZA, G.R.L.; BAFFI, M.A. 2010. **Carrapatos dos Bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas**. 1 edição. Embrapa, Planaltina, Distrito Federal.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M.G.; SÁ, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2012. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology** 130:257–260.

PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; QUINELATO, S.; MONTEIRO, C.M.O.; SÁ, F.A.; RODRIGUES, C.J.B.C.; MARCIANO, F.A.; PAULO, J.F.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2013a. Controle de *Dermacentor nitens* utilizando uma formulação

comercial a base de *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35(2):35–42.

PERINOTTO, W.M.S.; LANDULFO, G.A.; CAMARGO, M.G.; GÔLO, P.S.; ANGELO, I.C.; QUINELATO, S.; BARROS-BATTESTI, D.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2013b. Patogenicidade *in vitro* de *metarhizium anisopliae* s.l. sobre larvas e ninfas de *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35(2):43–47.

PERINOTTO, W.M.S.; GÔLO, P.S.; RODRIGUES, C.J.B.C.; SÁ, F.A.; SANTI, L.; SILVA, W.O.B.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A.; SALLES, C.M.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2014. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology** 203:189–196.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, C.I.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; QUINELATO, S.; SÁ, F.; RODRIGUES, C.J.B.C.; MARCIANO, A.F.; MONTEIRO, C.M.O.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2017. In vitro pathogenicity of different *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates in oil formulations against *Rhipicephalus microplus*. **Biocontrol Science and Technology** 27(3):01–10.

PINHEIRO, M.C.; SÁ-HUNGARO, I.J.; MARTINS, C.D.; RAIÁ, V.A.; FAMADAS, K.M. 2014. Capacidade de sobrevivência do embrião de *Rhipicephalus Microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) a alterações bruscas de temperatura. **Archives of Veterinary Science** 19(1):17–23.

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

RAYNAL, J.T.; SILVA, A.A.B.; SOUSA, T.J.; BAHIANSE, T.C.; MEYER, R.; PORTELA, R.W. 2013. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22(1):71–77.

RAYNAL, J.T.; BORGES, A.A.; BASTOS, B.L.; BAHIANSE, T.C.; MEYER, R.; PORTELA, R.W. 2018. Avaliação da eficiência de acaricidas sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no estado da Bahia. **PUBVET** 12(9):01–08.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Disponível em: <<http://www.r-project.org/index.html>>.

REHNER, S.A.; KEPLER, R.M. 2017. Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. **Journal of Invertebrate Pathology** 148:60–66.

RIDDELL, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia** 42:265–270.

ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.S. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. **Annals of Entomological Society of America** 10:19–76.

RODRIGUES, D.S.; LEITE, R.C. 2013. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 65(5): 1570–1572.

RODRIGUES, V.S.; ZIMMERMANN, N.P.; GARCIA, M.V.; PINA, F.T.B. 2016. **Métodos de contenção de animais para coleta de carrapatos**. p. 37-58. In: Carrapatos protocolos e técnicas para estudo. eds. ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.

ROSADO-AGUILAR, J.A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ALZINA-LOPÉZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR-CABALLERO, A.J. 2017. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary parasitology** 238:66-76.

SAN AW, K.M.; HUE, S.M. 2017. Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. **Journal Fungi** 3(30):01–20.

- SANJAYA, I.; OCAMPO, V.R.; CAOILI, B.L. 2013. Infection process of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in the *Tetranychus kanzawai* (Kishida) (Tetranychidae: Acarina). **Journal of Agricultural Science** 35(1):64–72.
- SANTI, L.; SILVA, W.O.B.; PINTO, A.F.M.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. 2010. *Metarhizium anisopliae* host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology** 114:312–319.
- SANTOS, F.C.C.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G. 2012. Efeito de diferentes concentrações de óleo e tintura de citronela sobre os parâmetros reprodutivos de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Semina: Ciências Agrárias** 33(3):1141-1147.
- SANTOS, V.T.; RIBEIRO, L.; FRAGA, A.; BARROS, C.M.; CAMPOS, E.; MORAES, J.; FONTENELE, M.R.; ARAÚJO, H.M.; FEITOSA, N.M.; LOGULLO, C.; FONSECA, R.N. 2013. The Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: The Establishment of a New Chelicerate Model System. **Genesis** 51(12):1–13.
- SANTOS, G.B.; GOMES, I.M.M.; SILVEIRA, J.A.G.; PIRES, PIRES, L.C.S.R.; AZEVEDO, S.S.; ANTONELLI, A.C.; RIBEIRO, M.F.B.; HORTA, M.C. 2017. Tristeza parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37(1):1–7.
- SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; SANTA ROSA, S.D. S.; DAS MERCÊS, N.B.; SERRA, T.M.; UZEDA, R.S.; REIS, I.M.A.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M. 2018. *In vitro* acaricide and anticholinesterase activities of *digitaria insularis* (Poaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary parasitology** 255:102-106.
- SARGISON, N.D. 2016. Keys to solving health problems in small ruminants: Anthelmintic resistance as a threat to sustainable nematode control. **Small Ruminant Research** 142:11–15.
- SCHUMACHER, V.; POEHLING, H.M. 2012. *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. **Fungal biology** 116(1):121-132.
- SILVA, S.J.; CARDOSO, C.M.; SANTOS, M.R.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V. 2018. Efeito da infecção de *Metarhizium anisopliae* sobre a atividade proteolítica presente em intestino de *Rhipicephalus microplus*. **Archives of Veterinary Science** 23(1):77–85.
- SILVEIRA NETO, O.J.; TAVEIRA, R.V.; AMARAL, A.G.; MARTINS, T.R.; OLIVEIRA, B.C. 2017. Avaliação da suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em bovinos leiteiros na região do Oeste Goiano, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 11(1):54–59.
- SIMI, L.D.; GARCIA, M.V.; RODRIGUES, V.S. 2019. **Panorama do controle biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) pelo uso de entomopatógenos**. p. 161-170. In: Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. eds. ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; KOLLER, W.W. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.
- SOUZA, F.A.L.; LIARTE, A.S.C.; CASTRO, K.N.C.; BESERRA, E.E.A.; BERNARDI, J.C.M.; SOUSA, G.V.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; SILVA, S.M.M.S. 2018. Dynamics of natural infection by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in dairy cattle from an enzootic instability area in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 27(1):2–6.
- SPAGNOL, F.H.; PARANHOS, E.B.; ALBUQUERQUE, G.R. 2010. Avaliação *in vitro* da ação de acaricidas sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** 11(3):731–736.
- TEIXEIRA, J.C.; HESPANHOL, A.N. 2014. A trajetória da pecuária bovina brasileira. **Caderno Prudentino de Geografia** 36(1):26–38.
- TULLOCH, M. 1976. The genus *Metarhizium*. **Transaction of the British Mycological Society** 66(3):407–411.
- VEGA, F.E., MEYLING, N.V., LUANGSA-ARD, J.J., BLACKWELL, M. 2012. **Fungal Entomopathogens**. p. 171-220. In: Insect Pathology. eds. VEGA, F., KAYA, H.K. 2 edição, Academic Press, San Diego, CA.

- VERÍSSIMO, C.J. 2013. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP** 11(1):14–23.
- VILELA, D.; RESENDE, J.C.; LEITE, J.B.; ALVES, E. 2017. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista Política Agrícola** 1:5–24.
- VILELA, V.L.R.; FEITOSA, T.F.; BEZERRA, R.A.; KLAFKE, G.M.; RIET-CORREA, F. 2020. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 11:1–6.
- WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U.A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G.M.; BEYSDA-SILVA, W.O.; MARTINS, J.R.; SCHRANK, A. 2015. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary parasitology** 207(3-4):302-308.
- ZIMMERMANN, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology** 17:879–920.

APÊNDICES

ITENS EXIGIDOS

PARTE EXTERNA	
CAPA	Obrigatório
PARTE INTERNA – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS	
FOLHA DE ROSTO	Obrigatório
FICHA CATALOGRÁFICA	Opcional
FOLHA DA COMISSÃO EXAMINADORA	Obrigatório
DEDICATÓRIA	Opcional
AGRADECIMENTOS	
EPÍGRAFE	
TÍTULO/RESUMO/PALAVRAS CHAVE	Obrigatório
TITLE/ABSTRACT/KEYWORDS	
LISTA DE ABREVIATURAS, FIGURAS, QUADROS E/OU TABELAS	Opcional
SUMÁRIO	Obrigatório
PARTE INTERNA – ELEMENTOS TEXTUAIS	
INTRODUÇÃO (com Hipótese e Objetivos)	Obrigatório
REVISÃO DE LITERATURA	
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS	
DISCUSSÃO	
CONCLUSÃO	
PARTE INTERNA – ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS	
REFERÊNCIAS	Obrigatório
APÊNDICES	
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	Opcional