



**Análise do efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* em condições simuladas de campo**

Secretaria de agricultura e abastecimento do Estado de São Paulo
Agência paulista de tecnologia dos agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentare Ambiental no
Agronegócio

Análise do efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
em condições simuladas de campo

Isabella Barboza de Almeida

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio. Área de concentração:
Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

SÃO PAULO
2021

Isabella Barboza de Almeida

Análise do efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em condições simuladas de campo

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:
Dra. Márcia Cristina Mendes

Co-orientador:
Dra. Ana Maria Cristina R. P. F. Martins

SÃO PAULO
2021

Eu **Isabella Barboza de Almeida**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Almeida, Isabella Barboza de.

Análise do efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em condições simuladas de campo. / Isabella Barboza de Almeida. - São Paulo, 2021.

76 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021D.IA002

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Márcia Cristina Mendes.

Versão do título para o inglês: Evaluation of *Metarhizium anisopliae* as a biocontrol agent against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* under simulated field conditions.

1. Controle biológico 2. Hibridização *in situ* 3. Histologia de carrapato

I. Almeida, Isabella Barboza de II. Mendes, Márcia Cristina III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2021/002

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Isabella Barboza de Almeida

Título: Análise do efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em condições simuladas de campo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 28/05/2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. Márcia Cristina Mendes Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Leonardo Costa Fiorini Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernanda Abreu Instituição: Empresa Biomip

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à
minha mãe e aos meus
avós, minhas maiores
inspirações.*

Agradecimentos

À **Dr. Márcia Cristina Mendes**, minha orientadora, por aceitar me orientar, por toda sua paciência, compreensão, sabedoria e apoio. Levarei seus ensinamentos para a vida. Obrigada por acreditar e confiar em mim e por todo seu auxílio.

À **Dr. Ana Maria Cristina R. P. F. Martins**, minha co-orientadora, por disponibilizar o laboratório, pela paciência de me ensinar novas técnicas e por todo o apoio. Obrigada por ter me acolhido.

Aos pesquisadores e colegas, **Fernanda C. Duarte, Leonardo C. Fiorini, Paulo Henrique S. Sampaio, Rogéria F. T. Oliveira, Marcelo S. Luz, Karina A. dos Anjos e Shirley B. da Silva** pela paciência, disposição e dedicação de cada um em me apoiar ao longo deste trabalho. Obrigada por me acolherem, pelas conversas, risadas e por todo carinho.

Aos estagiários, **Cauany, Deborah, Elianai, Lucas, Thais e Yandra** por me ajudarem nos experimentos, me aguentarem diariamente, estarem ao meu lado em todos os momentos e por deixarem meus dias mais leves. Obrigada, por se tornarem meus amigos.

À **Luara Lucena Cassiano**, pela paciência e dedicação em me ensinar novas técnicas, por me ajudar em todos os momentos de desespero, por todas as broncas e por todas as risadas. Você foi essencial na minha formação acadêmica. Muito obrigada.

À minha mãe **Silvia Regina Barboza de Souza Almeida**, por ser minha inspiração, por acreditar que a educação é o melhor caminho, por me proporcionar oportunidades de enriquecimento intelectual e pessoal e por sempre acreditar no meu potencial e me apoiar com todo amor do mundo. Obrigada por tudo, amo você imensamente!

Aos meus avós, **Maria Barboza de Souza e Primitivo Barbosa e Souza**, à minha dinda **Sueli Barbosa de Souza** e à minha tia **Mirian Barboza de Souza**, pelo total apoio a minha formação pessoal e profissional, pelo amor dedicado e por me proporcionarem felicidade na vida. Amo vocês.

Ao meu pai, **Eduardo de Almeida**, aos meus avós **Helena Nogueira de Almeida e Aldo de Almeida** e à minha madrinha **Tânia Moura Nicolosi**, minhas estrelinhas, pois sei que mesmo de longe estão acompanhando cada passo da minha vida.

Ao meu namorado, **Guilherme Gomes de Moraes Silva**, por todo apoio, por sempre me incentivar, por sempre estar presente e me acompanhando em toda execução deste trabalho e por encher minha vida de alegria. Obrigada por tudo.

Ao meu padrinho, **Edison Luiz Barbosa de Souza** e à **Roselene Crepaldi**, pelo incentivo e apoio à formação acadêmica, por acreditarem no meu potencial e por todo amor dedicado. Muito obrigada.

A todos os **amigos** e **familiares** que me incentivaram, apoiaram, que compartilharam das minhas alegrias e angústias, e que sempre estiveram disponíveis para me ajudar no que fosse necessário.

Ao **Instituto Biológico** e todos os **docentes** e **palestrantes** da pós-graduação, por ensinarem e dividirem conosco seus conhecimentos e suas experiências, foi uma caminhada de novos aprendizados e desafios. Obrigada por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Aos **funcionários da limpeza** e **porteiros** do **Instituto Biológico**, por cada bom dia, sorrisos e brincadeiras. Obrigada por tudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

(Martin Luther King)

ALMEIDA, Isabella Barboza. **Análise do efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em condições simuladas de campo.** 2021. 76 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2021.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasita bovinos transmitindo agentes infecciosos e gerando prejuízos estimados em 3,24 bilhões de dólares por ano. Embora o tratamento químico seja o principal meio de controle, há registros de populações resistentes a estes produtos em diversas regiões do Brasil. As perdas associadas aos animais de produção e à resistência aos carrapaticidas motiva a busca de estratégias alternativas de controle. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um promissor agente de controle biológico, iniciando a infecção através da penetração na cutícula do carrapato. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do fungo *M. anisopliae* no controle de *R. microplus* utilizando um protocolo inédito de teste em experimentação semi-campo. O experimento iniciou-se com a aplicação de uma emulsão de *M. anisopliae* (isolado IBCB 425) na concentração de 2×10^{13} conídios/hectare aplicada ao solo nos meses de outubro/novembro de 2019 e de março/abril de 2020. Dezoito fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, divididas em dois grupos (teste e controle) são acondicionadas em um tecido voal posteriormente selado. As 9 fêmeas de ambos os grupos permaneceram na pastagem durante 15 dias, período após o qual são recolhidas e mantidas em estufa B. O. D. para a postura de ovos. Idêntica deposição é repetida 3 vezes a cada 14 dias com ambos os grupos nas mesmas áreas. As fêmeas ingurgitadas de ambos os grupos são avaliadas em relação à infecção fúngica em cortes histológicos posteriormente corados com Hematoxilina e eosina (HE), Grocott e por hibridização *in situ* cromogênica com um oligonucleotídeo marcado com biotina. O conteúdo do solo de ácaros da subordem Oribatida foi avaliada antes e após o experimento como indicador da diversidade da mesofauna edáfica. Os resultados mostram que a eficácia do fungo permaneceu durante todos os trinta dias do experimento, sugerindo uma colonização estável do fungo na pastagem. As colorações de HE, Grocott e hibridização *in situ* cromogênica mostraram, respectivamente, alterações no sistema reprodutor das fêmeas, a presença de fungos nos tecidos internos do *R. microplus* e a identificação destes fungos como da espécie *M. anisopliae*. Organismos da mesofauna edáfica não sofreram interferência do fungo. Com base nestes resultados propomos o controle biológico do *R. microplus* com o fungo *M. anisopliae* (IBCB 425) com aplicações no pasto em intervalos de 30 dias na dosagem de 2×10^{13} conídios por hectare.

Palavras chave: Controle biológico; hibridização *in situ*; histologia de carrapato.

ALMEIDA, Isabella Barboza. **Evaluation of *Metarhizium anisopliae* as a biocontrol agent against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* under simulated field conditions** 2021. 76 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2021.

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizes bovines transmitting infectious agents and generating losses estimated at 3.24 billion dollars per year. Although chemical treatment is the most used control method, there are reports of resistant populations to these products in various regions of Brazil. The losses associated with farm animals and resistance to ticks motivates the search for alternative control strategies. The entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae* is a promising biological control agent, starting the infection by penetrating the tick cuticle. The aim of this work is to evaluate the action of the fungus *M. anisopliae* as a biocontrol agent over *R. microplus* using an unprecedented test protocol partially based on field experimentation. The experiment starts with the application of an emulsion of *M. anisopliae* (isolated IBCB 425) in the concentration of 2×10^{13} conids/hectare applied to the soil in the months of October / November 2019 and March / April 2020. Eighteen engorged females of *R. microplus*, divided into two groups (test and control) were packaged in a fine mesh subsequently sealed. The 9 females of both groups remain in the pasture for 15 days, after which they are collected and kept in a greenhouse B. O. D. for laying eggs. Identical procedure is repeated 3 times every 14 days with both groups in the same experimental area. Engorged females from both groups are evaluated for fungal infection in histological sections later stained with Hematoxylin and eosin (HE), Grocott and by in situ chromogenic hybridization with a biotin-labeled oligonucleotide. The soil content of mites of the suborder Oribatida was evaluated before and after the experiment as an indicator of the diversity of the edaphic mesofauna. The results show that the effectiveness of the fungus remained during all thirty days of the experiment, suggesting a stable colonization of the fungus in the pasture. The colorations of HE, Grocott and chromogenic in situ hybridization showed changes in the female reproductive system, the presence of fungi in the internal tissues of *R. microplus* and the identification of these fungi as *M anisopliae*, respectively. Organisms of the edaphic mesofauna did not suffer interference from the fungus. Based on these results, we propose the biological control of *R. microplus* with the fungus *M anisopliae* (IBCB 425) with applications in the pasture at intervals of 30 days in the dosage of 2×10^{13} conids per hectare.

Keywords: biological control; in situ; Hybridization; tick histology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Morfologia de <i>R. microplus</i> . A- Macho, vista dorsal; B- Macho, vista ventral; C- Fêmea, vista dorsal; D- vista ventral.....	24
Figura 2- Anatomia interna representativa de uma fêmea Ixodide. O lado esquerdo da figura mostra os órgãos internos após a remoção do intestino; o lado direito mostra a disposição do intestino que cobre a maioria dos demais órgãos. LG – fenda longitudinal (do ovário); MD – intestino médio; MS- estômago; Mal. T – túbulos de Malpighi; O – ovário; Ov – oviduto; PnT- inervações; Rec. S – saco retal; SGA – glândula salivar; SGG – glândula salivar; zona SD – duto salivar; Syn – singlanglio; TAG – glândula acessória tubular; Tr – traqueia; TrT – dutos da traqueia.	25
Figura 3- Distribuição geográfica do carrapato <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul, região delimitada entre as linhas paralelas em vermelho.	26
Figura 4- Representação do ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i>	27
Figura 5- Ciclo de infecção do fungo <i>M. anisopliae</i> no carrapato <i>R. microplus</i>	31
Figura 6- Local reservado no Instituto Biológico para a aplicação da solução fúngica.	35
Figura 7- Conjunto de marcadores de campo, em que cada marcador contém uma fêmea do carrapato <i>R. microplus</i>	36
Figura 8- Esquema da técnica implementada. Dia 0: Aplicação da solução fúngica e colocação das fêmeas ao solo. Dia 14: Retirada das fêmeas do solo e pesagem dos ovos. Dia 21: Avaliação da eclosão em B.O.D..	38
Figura 9 - Esquema da técnica implementada no experimento 2. Dia 0: Aplicação da solução fúngica e colocação das fêmeas da semana I ao solo. Dia 7: Colocação das fêmeas da semana II ao solo. Dia 14: Colocação das fêmeas da semana III ao solo, retirada das fêmeas da semana I do solo e pesagem dos ovos. Dia 21: Colocação das fêmeas da semana IV ao solo, retirada das fêmeas da semana II e pesagem dos ovos. Dia 28: Retirada das fêmeas da semana III, pesagem dos ovos e avaliação de eclosão da semana I. Dia 35: Retirada das fêmeas da semana IV, pesagem dos ovos e avaliação de eclosão da semana II. Dia 42: Avaliação de eclosão da semana III. Dia 49: Avaliação de eclosão da semana IV.	39
Figura 10 e 11 - Retirada de solo com profundidade de 5cm e largura de 10cm.	46

Figura 12- Média das temperaturas máximas e mínimas dos meses em que foi realizado os experimentos.	47
Figura 13- Média das umidades máximas e mínimas dos meses em que foi realizado os experimentos.	47
Figura 14- Dados de inibição de postura e eficácia do produto dos meses de outubro e novembro de 2019 e março e abril de 2020.	48
Figura 15- Fêmea do carrapato <i>R. microplus</i> coberta com fungo de coloração esverdeada retirada no mês de outubro de 2019.	49
Figura 16- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de junho de 2020.	51
Figura 17- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de julho de 2020.	51
Figura 18- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de outubro de 2020.	52
Figura 19- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de novembro de 2020.	52
Figura 20- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de janeiro de 2020.	53
Figura 21- Gráfico com as médias de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV dos meses de junho, julho, outubro e novembro de 2020 e janeiro de 2121.	54
Figura 22- Gráfico das médias de inibição de postura e eficácia do produto dos meses de junho, julho, outubro e novembro de 2020 e janeiro de 2121.	54
Figura 23- Gráfico com a contagem da população de ácaros oribatídeos do início do experimento ao final do experimento.	55
Figura 24- Cortes histológicos de fêmeas de carrapatos <i>de R. microplus</i> sendo A e B controles, e C, D e E submetidas ao tratamento fúngico com <i>M. anisopliae</i> coradas com hematoxilina e eosina em aumento 2,5x. A: Evidenciando a cutícula (cut) e grânulos de vitelo (gv) praticamente íntegros. B: Apresenta o cório preservado (ch). C e D: As estruturas em destaque mostram o ovócito (ov) em menor tamanho, podendo indicar a presença do fungo. E: Vacuolização (va),	

sem presença de ovócitos. Indicado com a seta o conteúdo vitelogênico escoando para o interior do abdômen.	56
Figura 25- Presença do fungo em fêmea do grupo controle (indicado pela seta). Aumento 20x.	57
Figura 26-Fêmea do grupo controle sem a presença do fungo. Aumento 20x.	57
Figura 27: Fotomicrografias de fêmeas de carrapatos <i>R. microplus</i> em aumento de 40x. A e B: Grupos controle da técnica de hibridização in situ (barra 5µm), sem marcações. C: grupo tratado com marcações em estruturas fúngicas (hifas) coradas em marrom indicados por setas. D: grupo tratado com marcações em estruturas fúngicas (conídios) coradas em marrom circuladas e E: Grupo tratado com marcações em estruturas fúngicas (hifas) coradas em marrom indicadas por setas.	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, modificado segundo Michalany (1990).

Quadro 2- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, segundo HistoKit Grocott®.

Quadro 3- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, segundo HistoKit Grocott®.

LISTA DE E SIGLAS SÍMBOLOS

ANOVA- Analise de Variância

B.O.D -Estufa incubadora - Demanda Bioquímica de Oxigênio

C1- Controle 1

C2- Controle 2

C3- Controle 3

C4 – Controle 4

C5- Controle 5

C6- Controle 6

C7 – Controle 7

C8- Controle 8

C9- Controle 9

Ch- corio

cm- Centímetro

Cut- cutícula

DAB- Diaminobenzidine

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EP- Eficácia reprodutiva

GV - Grânulos de vitelo

h- Horas

HE - Hematoxilina e eosina

IP- Inibição de postura

IR- Índice reprodutivo

LG - Fenda longitudinal

m - Metro

m² - metro quadrado

MaLT - Túbulos de Malphigi

MD - Intestino médio

mg – miligramas

ml- Mililitros

mm- Milímetro

MS - Estomago

O - Ovário

°C - Graus Celsius

OV - Oviduto

Ov- Ovócito

pH - Potencial Hidrogeniônico

PnT - Inervações

ReC. S - Saco retal

S1- Semana 1

S2- Semana 2

S3- Semana 3

S4- Semana 4

SGA - Glândulas salivar

SGG- Glândulas salivar : zona SD

Syn - Singlânglio

T1 – Tratado 1

T2- Tratado 2

T3- Tratado 3

T4- Tratado 4

T5- Tratado 5

T6- Tratado 6

T7- Tratado 7

T8 – Tratado 8

T9 – Tratado 9

TAG - glândula acessória tubular

TBST- Tampão tris tamponado salino/Tween

Tr - Traqueia

TrT - Duto da traqueia

UR - Umidade relativa

UV - Ultravioleta

v - Volume

Va- Vacuolização

μL - Microlitros

μm – micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Classificação e características gerais do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	23
3.2 Anatomia interna de <i>Rhipicephalus microplus</i>	24
3.4.1 Fase não parasitária	28
3.4.2 Fase parasitária	28
3.5 Prejuízos e controle	29
3.6 Controle biológico e a utilização de fungos	29
3.7 <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
3.8 Intempéries ambientais	32
3.9 Utilização do óleo na formulação fúngica	33
3.10 Biomonitoramento	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Local do experimento	35
4.2 Obtenção de carrapatos	35
4.3 Marcadores de campo	36
4.5 Aplicação dos fungos e solução controle	37
4.6 Experimento 1	37
4.7 Experimento 2	38
4.8 Análise dos dados	40
4.9 Histologia	40
4.9.1 Preparo das lâminas histológicas para coloração Hematoxilina Eosina (HE)	41
4.9.2 Preparo das lâminas histológicas para coloração Grocott	42
4.9.3 Preparo do material para Hibridização <i>in situ</i> Cromogênica	43
4.9.4 Análise Microscópica	45
4.10 Biomonitoramento	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Dados de Temperatura e Umidade	46
5.2 Experimento 1	47

5.3 Experimento 2	49
5.4 Biomonitoramento	55
5.5 Histologia	55
5.5.1 Coloração Hematoxilina e eosina	55
5.5.2 Coloração Grocott.....	57
5.5.3 Hibridização <i>in situ</i>	58
6 DISCUSSÃO	60
6.1 Teste semi-campo	60
6.2 Histologia	62
7 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos pertencem à classe Arachnida e possuem como características básicas a ausência de antenas e asas, presença de quelíceras e pedipalpos, quatro pares de pernas (exceto em larvas que apresentam apenas três pares) e o corpo dividido em cefalotórax e abdome, sendo que as segmentações abdominais se apresentam fundidas (ANDREOTTI *et al.*, 2016). Em sua maioria, são ectoparasitas de aves e mamíferos que podem transmitir agentes infecciosos e causar danos aos seus hospedeiros durante a hematofagia, sendo, portanto, de grande importância para a saúde pública e animal (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

A espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, é conhecida popularmente como “carrapato do boi”. No Brasil é possível encontrar esta espécie em elevados níveis nos bovinos durante o ano todo (FURLONG *et al.*, 2007).

Esta espécie necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, ou seja, possui um ciclo monoxeno. O ciclo é dividido em duas etapas: A fase parasitária, que compreende desde a fixação da larva no hospedeiro até atingir o estágio de vida adulta e a fase não parasitária, ou fase de vida livre, com início no desprendimento da teleógena do hospedeiro, sua queda ao solo para futura postura dos ovos e eclosão das larvas (FURLONG, 2005).

Dentre as doenças transmitidas por *R. microplus*, destacam-se a babesiose e a anaplasmose que podem provocar queda de desempenho dos animais, perda de peso, diminuição da produção de leite e moderada perda de apetite, podendo levar à morte. (KLAFKE *et al.*, 2018). De acordo com Fonseca (2005) devido as condições climáticas do Brasil favoráveis ao desenvolvimento do carrapato, há aumento das doenças parasitárias relacionadas à *R. microplus* ocasionando, segundo Grisi *et al.* (2014), prejuízos no país estimados em 3,24 bilhões de dólares por ano.

Devido ao parasitismo e aos danos causados em animais de produção, é de grande importância o controle desses carrapatos. O principal método utilizado é o controle químico, sendo empregado desde os anos quarenta. Sabe-se que o uso constante de carrapaticida leva à seleção de cepas resistentes (KOLLER *et al.*, 2019). Além disso, com o uso indiscriminado, o estabelecimento da resistência tende a ser acelerada, podendo, inclusive, causar problemas como contaminação ambiental e intoxicação de mamíferos (HIGA *et al.*, 2015; KLAFKE *et al.*, 2010; CASTRO-JANER *et al.*, 2010).

Sendo assim, métodos alternativos de controle estão sendo estudados para auxiliar os sistemas já implementados, dentre eles, pode-se destacar a utilização de fungos, considerada uma alternativa promissora no controle de carrapatos (SAMISH *et al.*, 2004; BEYS-DA-SILVA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2012).

A utilização de fungos apresenta benefícios como uma grande variabilidade genética, capacidade de agir sobre estágios diferentes da vida do hospedeiro, possui especificidade sobre espécies alvo, e por ser um inimigo natural, pode reduzir o impacto ambiental (ALVES, 1998; SAMISH *et al.*, 2004; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011).

O fungo *Metarhizium anisopliae* é considerado um agente de biocontrole por possuir a capacidade de causar doenças em um grande número de insetos, sendo um dos fungos mais utilizados para controle de pragas (MASCARIM; QUINTELA, 2013). O processo de infecção desta espécie inicia-se pelo contato dos conídios com a cutícula do carrapato onde começa a germinação, seguido da formação de hifas no interior do hospedeiro, que é assim colonizado. Após este processo, ocorre a exteriorização, a qual possibilita a disseminação de novos conídios no ambiente (CHANDLER *et al.*, 2000; ZIMMERMANN, 2007; BEYS-DA-SILVA, 2009).

Embora este fungo seja patogênico aos carrapatos e a alguns insetos, o risco de patogenicidade deste organismo em seres não-alvos é baixo, porém, para utilização desse método de controle, a seguridade de mamíferos, outros vertebrados e organismos benéficos devem ser relatadas, (ZIMMERMANN, 2007). Ácaros oribatídeos são comumente usados como bioindicadores por apresentarem alta longevidade, baixa fecundidade, desenvolvimento lento e baixa dispersão (GULVIK, 2007).

Os primeiros estudos utilizando fungos entomopatogênicos no controle do carrapato dos bovinos foram realizados por Bittencourt (2006), demonstrando o fungo como potencial para o controle biológico desta praga. Testes *in vitro* e *in vivo* já foram desenvolvidos para comprovação da eficácia da espécie *M. anisopliae* em concentração de 10^8 conídios/ml no controle de *R. microplus* (CAMARGO *et al.*, 2016).

Apesar do crescente número de estudos a respeito do controle biológico, pouco se sabe sobre os danos causados em seus órgãos internos. Garcia (2005) analisou os mecanismos de infecção do fungo *M. anisopliae*, imersos à suspensão contendo 10^8 conídios/ml do fungo, sobre o carrapato *R. sanguineus*, em todos estágios de vida (ovos, larvas, ninfas e adultos). Utilizou técnicas histológicas e microscopia eletrônica para evidenciar as alterações anatomopatológicas

nos indivíduos, observando a invasão do fungo no tegumento do carrapato e a difusão da colonização.

Em testes laboratoriais existem condições ótimas de temperatura e umidade controladas, que favorecem a germinação e infecção dos fungos, o que, muitas vezes, não ocorre no campo. Portanto, propõe-se neste estudo verificar a ação do fungo *M. anisopliae* sobre o *R. microplus* em condições semi-campo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a ação do fungo *M. anisopliae* no controle de *R. microplus* utilizando protocolo inédito de teste semi-campo.

2.2 Específicos

- Avaliar a inibição de postura e a eficácia proveniente do uso do fungo *M. anisopliae* no controle do *R. microplus*, através de um protocolo de teste semi-campo, no qual a exposição ao fungo ocorrerá a campo sobre as fêmeas ingurgitadas durante a totalidade de seu período de postura e sobre parte do período de incubação (marcadores), e em ambiente controlado, o restante da fase de incubação e a eclosão.
- Analisar alterações em estruturas reprodutivas das teleóginas utilizando técnica histológica de coloração Hematoxilina eosina.
- Analisar a presença de fungo nas estruturas internas das teleóginas através da técnica histológica de coloração Grocott
- Identificar as hifas do fungo *M. anisopliae* nos tecidos das fêmeas do carrapato *R. microplus* utilizando a técnica de hibridização *in situ*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Classificação e características gerais do carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *R. (B.) microplus* pertence ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). Inicialmente, esta espécie era denominada *Boophilus microplus*, porém Murrell e Barker (2003) sugeriram, através de análises moleculares, morfológicas e filogenéticas, que o gênero *Boophilus* passasse a ser um subgênero de *Rhipicephalus*, e assim todas as espécies de *Boophilus* pertencem ao gênero *Rhipicephalus*. Alterando a nomenclatura sem excluir a original, para facilitar as pesquisas científicas.

Indivíduos adultos desta espécie são relativamente pequenos comparados a outras espécies, alcançando 2 a 3 mm quando não ingurgitados e as fêmeas, 13mm quando ingurgitadas (FURLONG, 1993). As fêmeas adultas têm a terminação do corpo arredondado, enquanto os machos uma ponta aguda. O dimorfismo sexual é acentuado. Em ambos os sexos não há ornamentações. Já as ninfas têm corpo oval e mais largo na parte frontal (Figura 1) (GUIMARÃES *et al.*, 2001; WALL *et al.*, 2001). Os adultos possuem gnatossoma hexagonal, sendo curto e reto, hipostômio mais longo que os palpos. Não há presença de sulco anal e festões (GUIMARÃES *et al.*, 2001; FURLONG, 1993).

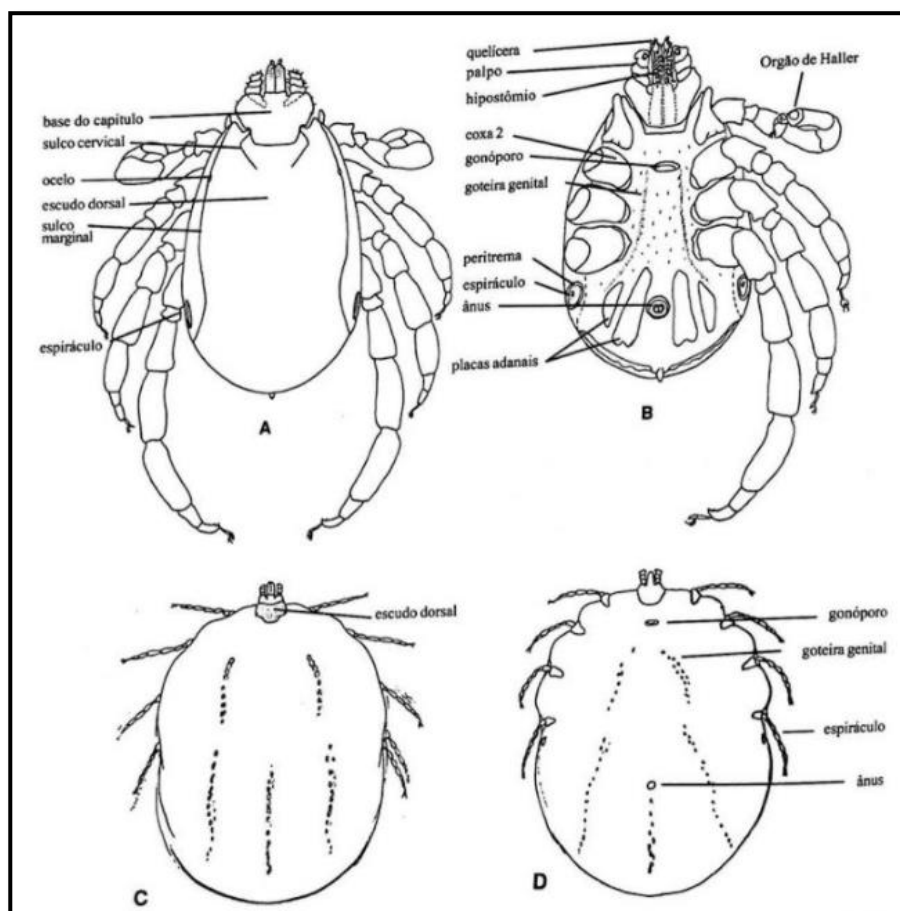


Figura 1- Morfologia de *R. microplus*. A- Macho, vista dorsal; B- Macho, vista ventral; C- Fêmea, vista dorsal; D- vista ventral. Fonte: GUIMARÃES *et al.* (2001).

3.2 Anatomia interna de *Rhipicephalus microplus*

A cavidade corporal dos carrapatos é uma hemocele aberta, todos os órgãos internos ocupam esta cavidade entre os músculos e traqueias (SONENSHINE, 1991; BALASHOV, 1972)

Os carrapatos possuem sistema nervoso central que está distribuído por cavidade corporal; sistema excretor com abertura anal ventral e presença de túbulos de Malpighi; sistema respiratório com abertura lateral composto por traqueias (as traqueias estão presentes apenas em ninfas e adultos) ; sistema digestório o qual possui intestino anterior, médio e posterior, que ocupa maior parte da cavidade corporal, cobrindo os órgãos internos dorsalmente; sistema reprodutor, o sistema reprodutor feminino é composto por ovário, ovidutos pareados, útero, vagina e receptáculo seminal e glândulas anexas (órgão de Gené) responsáveis por produzirem substância impermeabilizante que recobre o ovo; sistema circulatório aberto composto hemolinfa (formada por hemócitos, células circulantes e plasma), todos os órgãos e tecidos são

banhados pela hemolinfa; glândulas salivares, são responsáveis pelas reações hemostáticas e imuno-inflamatórias do hospedeiro e são as maiores glândulas do carrapato; corpo gorduroso possui a função de estocar reservas alimentares, metabolizar hormônios e outras moléculas mensageiras e detoxificar compostos tóxicos ao organismo. Em fêmeas ingurgitadas o ovário e o intestino são os principais órgãos (Figura 2) (GONZALES, 2002; SONENSHINE, 1991; BALASHOV, 1972).

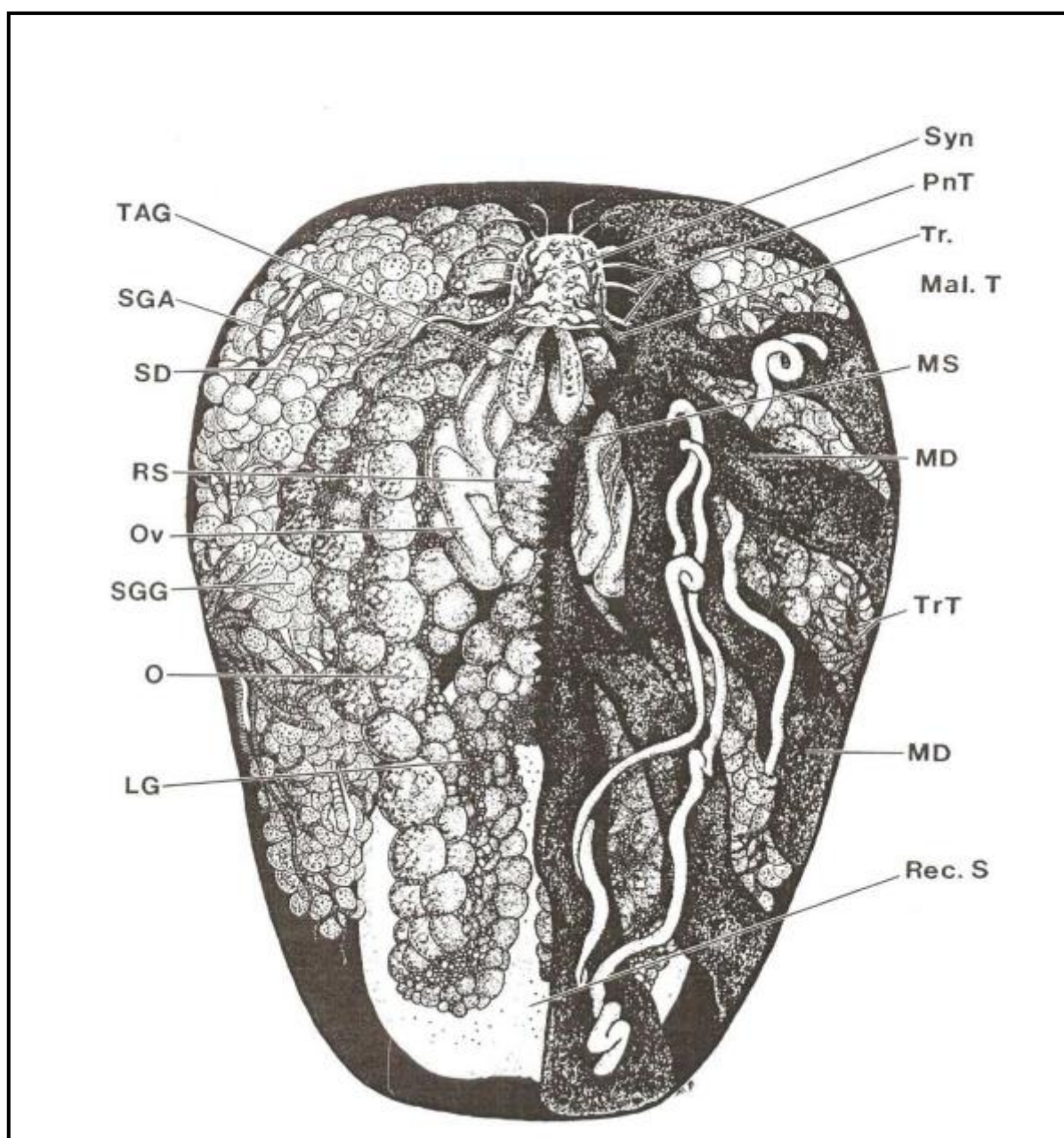


Figura 2: Anatomia interna representativa de uma fêmea Ixodidae. O lado esquerdo da figura mostra os órgãos internos após a remoção do intestino; o lado direito mostra a disposição do intestino que cobre a maioria dos demais órgãos. LG – fenda longitudinal (do ovário); MD – intestino médio; MS- estômago; Mal. T – túbulos de Malpighi; O – ovário; Ov – oviduto; PnT- inervações; Rec. S – saco retal; SGA – glândula salivar; SGG – glândula

salivar; zona SD – duto salivar; Syn – singlanglio; TAG – glândula acessória tubular; Tr – traqueia; TrT – dutos da traqueia. Fonte: Desenhado por Ms. M. Bloomfield, Norfolk, Virginia. Retirado de Sonenshine (1991).

3.3 Distribuição geográfica

R. microplus é originário da Ásia, possivelmente da Índia e Ilha de Java. A disseminação desta espécie ocorreu no século XVI com o início das expedições exploradoras, as quais transportavam mercadorias e animais, facilitando, assim, a dispersão dos carrapatos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Encontra-se distribuído entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul, ou seja, nas Américas Central e do Sul, África, sudoeste da Ásia, lugares com umidade e temperatura favoráveis para sobrevivência (Figura 3)(NUÑEZ *et al.*, 1982; POWELL, 1982).

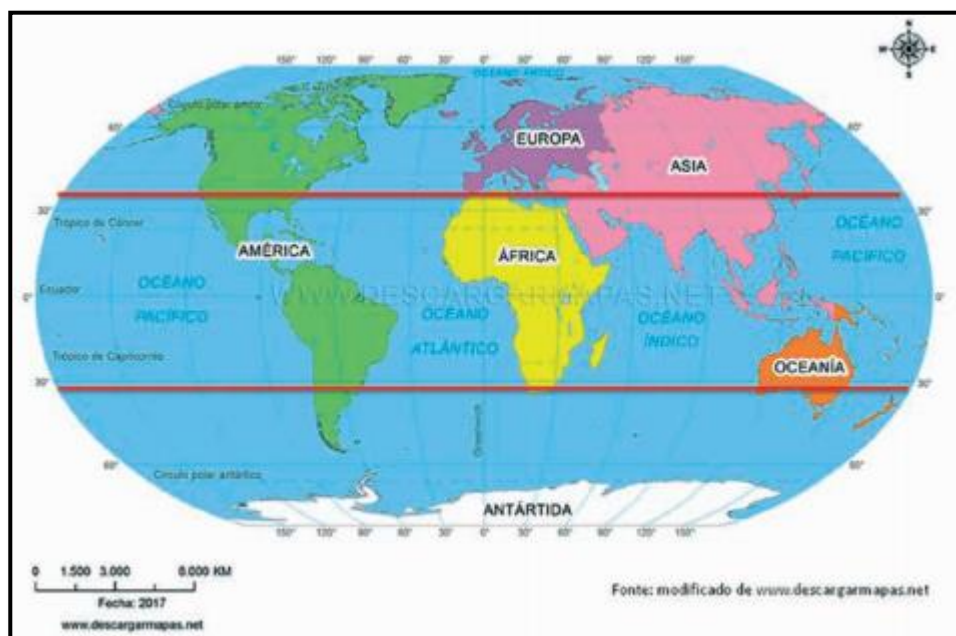


Figura 3- Distribuição geográfica do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul, região delimitada entre as linhas paralelas em vermelho. Fonte: GARCIA *et al.* (2019).

No Brasil, acredita-se ter sido introduzido pela região Sul, no início do século XVIII, através de uma importação de animais domésticos vinda do Chile, e teria se disseminado por todo país. Os níveis de infestações no país variam de acordo com as raças dos hospedeiros e conforme as condições climáticas (GONZALES, 1995).

3.4 Hospedeiros e ciclo de vida

R. microplus possui preferência parasitária por bovinos, com predileção às espécies *Bos taurus* e seus cruzamentos em relação ao *Bos indicus* (GONZALEZ, 1975) apesar de também poder parasitar diversos animais domésticos e silvestres (GUIMARÃES *et al.*, 2001). A duração do ciclo e a dinâmica populacional pode depender das condições climáticas e da resistência dos hospedeiros ao carrapato (FRANCIS *et al.*, 1964)

Para completar o ciclo de vida deste carrapato é necessário apenas um hospedeiro, sendo um ciclo monoxeno (SONENSHINE, 1991). Este ciclo é dividido em duas etapas: fase parasitária, a qual inicia-se com a fixação da larva no hospedeiro até atingir o estágio de vida adulta, e a fase não parasitária (também conhecida como fase de vida livre), com início no desprendimento da teleógena do hospedeiro e sua queda ao solo para futura postura dos ovos e eclosão das larvas (Figura 4)(FURLONG, 2005).

O crescimento populacional de *R. microplus* no ambiente depende das condições climáticas e do tipo de forrageira que constitui a pastagem (FURLONG, 1993). A maior parte dos carrapatos está na vegetação, sendo aproximadamente 95%, e apenas 5% no hospedeiro (POWELL, 1982)

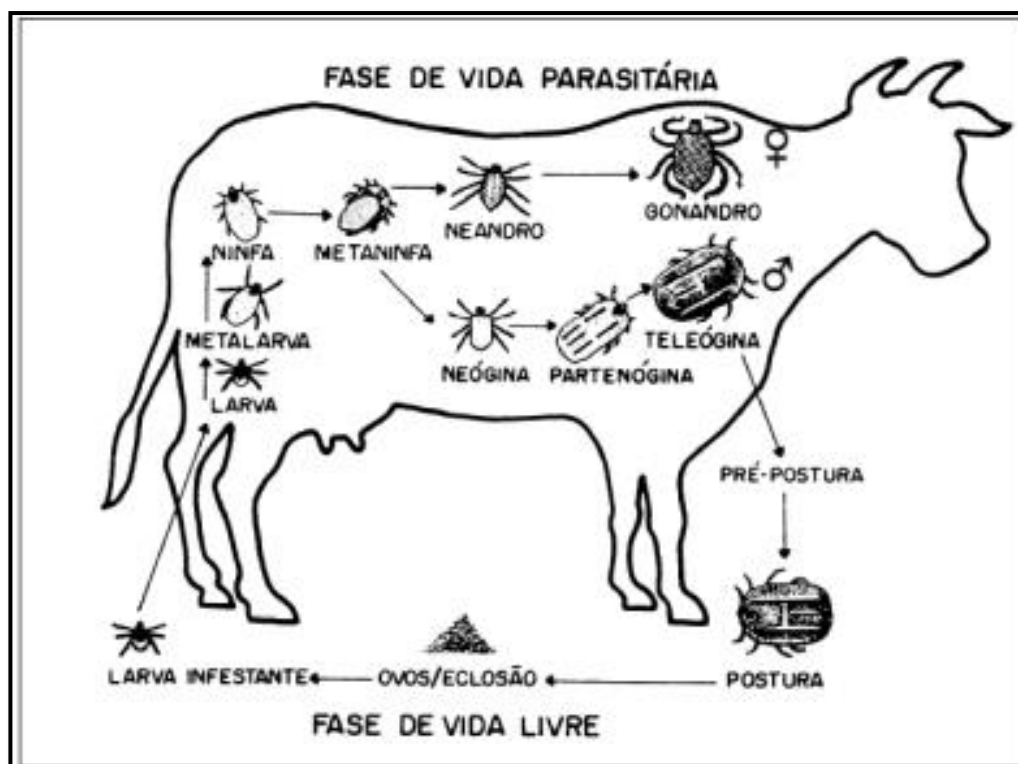


Figura 4- Representação do ciclo de vida do carrapato *R. microplus*. Fonte: GONZALES (1975).

3.4.1 Fase não parasitária

A fase não parasitária compreende um período em que o carrapato permanece no ambiente realizando a postura, na qual ocorre também a incubação, eclosão e maturação das larvas. A fêmea ingurgitada desce ao solo e após três dias inicia a postura. Em condições controladas (27°C e UR 80%) a duração da postura é de aproximadamente 15 dias, porém em ambientes em que há variações de temperatura e umidade este intervalo de tempo pode se estender (FARIAS, 1995). Após o fim da postura a massa de ovos possui 50% do peso inicial da fêmea (GONZALEZ, 1993).

As larvas eclodem e permanecem no solo até estarem prontas para se fixar ao hospedeiro, com a passagem deste, as larvas sobem ao topo das pastagens, movimento conhecido como geotropismo negativo, para assim infestar e se fixar ao animal (SONENSHINE, 1993).

As larvas então fixam-se nos hospedeiros geralmente no úbere, mamas, regiões do períneo, vulva e entre as pernas por serem regiões favoráveis ao seu desenvolvimento (WAGLAND, 1978). Em laboratório, a duração da fase não parasitária varia de 24 a 26,5 enquanto no ambiente foi de 35,2 a 61,7 dias (FARIAS *et al.*, 1995).

3.4.2 Fase parasitária

A fase parasitária inicia-se com a fixação da larva no hospedeiro, após fixada começam a se alimentar e fazem ecdise aproximadamente depois de oito dias, tornando-se ninfas. Na fase de ninfa começa a diferenciação sexual, e após aproximadamente 15 dias ocorre a ecdise para o estágio adulto (CAMPOS PEREIRA *et al.*, 2008).

Os machos adultos são menores que as fêmeas, e podem ser encontrados em todo corpo do hospedeiro, alimentando-se e fertilizando as fêmeas. Estas, depois de fecundadas, continuam sua alimentação por em média, 21 dias até se tornarem ingurgitadas (teleóginas), quando se desprendem do hospedeiro, caindo ao solo para realizar a postura (ANDREOTTI, 2010). Os machos podem permanecer no bovino por mais dias fecundando inúmeras fêmeas (GONZALES *et al.*, 1974)

3.5 Prejuízos e controle

Apesar da maior parte do ciclo de vida de *R. microplus* ser de vida livre, a fase parasitária é a que causa mais prejuízos. Devido à hematofagia, o hospedeiro pode tornar-se anêmico, o que consequentemente diminui o desempenho e causa perda de produtividade de carne e leite (GARCIA *et al.*, 2019).

Além disso, este carrapato transmite agentes patogênicos ao seu hospedeiro como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, causadores da tristeza parasitária bovina. A fixação do carrapato pode provocar irritação no hospedeiro deixando o animal predisposto a infecções secundárias como a míase, o que desvaloriza o couro (GARCIA *et al.*, 2019). Segundo estimativa de Grisi *et al.* (2014), os prejuízos econômicos causados pelo *R. microplus* no Brasil são superiores a 3 bilhões de dólares por ano.

No Brasil, as condições climáticas favorecem o aumento das doenças parasitárias relacionadas ao *R. microplus* (FONSECA, 2005). Portanto, para diminuir os danos causados, o controle dos carrapatos é indispensável. O principal método utilizado é o controle químico, sendo empregado desde os anos quarenta. Sabe-se que com a utilização constante desse método, ocorre a seleção de cepas resistentes (KOLLER *et al.*, 2019, FAZA *et al.*, 2013; HIGA *et al.*, 2015). Com o uso indiscriminado, o estabelecimento da resistência tende a ser acelerado, podendo inclusive, causar problemas como contaminação ambiental e intoxicação de mamíferos (SANTOS *et al.* 2018).

Considerando os pontos abordados, o controle deve ser integrado, abrangendo tanto o tratamento dos animais quanto a utilização de técnicas voltadas para redução da população de carrapatos que se encontram na fase não parasitária, como rotação de pastagem e controle biológico (VERISSIMO, 2013). É constante e extremamente necessária a pesquisa por controles alternativos do carrapato *R. microplus*, que diminuam ou dispensem o uso de carrapaticidas convencionais.

3.6 Controle biológico e a utilização de fungos

O controle biológico é um método alternativo de controle de pragas, utilizando inimigos naturais, como nematóides (MA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2018), parasitóides, bactérias (SAMISH *et al.*, 2004), vírus (ASSENGA *et al.*, 2005) e fungos (BEYS-DA-SILVA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2012). Segundo Samish *et al.* (2004) o controle biológico é uma alternativa promissora a ser empregada contra carrapatos.

Os fungos são responsáveis por causar grandes patologias em insetos e ácaros pragas, regulando naturalmente a população de artrópodes (MASCARIN; PAULI, 2010). Dentre as vantagens da utilização de fungos pode-se destacar a sua grande variabilidade genética a capacidade de agir em diferentes estágios de vida do hospedeiro, possuindo certa especificidade (ALVES, 1998; SAMISH *et al.*, 2004). Além disso, a produção de suas unidades de infecção em escala comercial se dá de maneira fácil, bem como sua aplicação à campo, possui um baixo valor e visa reduzir o impacto ambiental (ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011).

Dentre os fungos mais utilizados como ingredientes ativos de micoinseticidas no mundo destacam-se: *Beauveria bassiana* s. l., *Metarhizium anisopliae* s. l., *Isaria fumosorosea*, e *B. brongniartii*. (FARIA; WRAIGHT, 2007). Também já foi descrita a ação do fungo *Lecanicillium lecanii*, para artrópodes das classes Insecta e Arachnida (CHANDLER *et al.*, 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; ANGELO, 2010).

Em condições de laboratório, inúmeros estudos descrevem a virulência de fungos no controle de carrapatos ao redor do mundo como: *Dermacentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma cajennense* s.l., *R. appendiculatus*, *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. microplus*; os fungos das espécies pertencentes aos gêneros *Metarhizium* sp. e *Beauveria* sp. mostram-se potencialmente melhores. (BITTENCOURT *et al.*, 1994; FERNANDES *et al.*, 2004.; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; ANGELO *et al.*, 2010).

Além de testes em laboratório, existem alguns trabalhos a campo envolvendo o emprego de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos em aplicações diretamente no animal. (BAHIENSE, 2008; KAAYA, 2011; CAMARGO *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.* (2016) e na pastagem (GARCIA *et al.*, 2011; SAMISH *et al.*, 2014)

Vale destacar que o controle biológico vem para auxiliar e não substituir o controle químico, nutrindo a ideia de um manejo integrado (MESSIAS, 1989), sendo, inclusive, já estudada a sua aplicação conjunta com carrapaticidas convencionais (VERISSIMO, 2013)

3.7 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium sp. foi isolado pela primeira vez em 1879 por Metschnikoff e descrito e classificado como *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em 1883 por Sorokin, permanecendo assim até os dias atuais. No Brasil, o controle biológico utilizando *M. anisopliae* foi realizado pela

primeira vez em 1975 para controlar *Mahanarva spectabilis*, uma espécie de cigarrinha, e desde então seu uso é cada vez mais crescente (LIMA, 1989; ALVES, 1998).

M. anisopliae é um fungo filamentoso com distribuição mundial, sendo encontrado no solo, rizosfera, raízes de plantas, carcaças de artrópodes e infectando esses organismos, na condição saprofítica, endofítica ou infectante (ZIMMERMANN, 2007; SCHARANK; VAINSTEIN, 2010; ST. LEGER, 2008). É considerado um agente de biocontrole pela sua capacidade de causar doenças em grande número de insetos (MASCARIM; QUINTELA, 2013).

O processo de infecção de *M. anisopliae* inicia-se por contato. O esporo se liga à cutícula do hospedeiro e em condições favoráveis o conídio inicia o processo de germinação. Neste processo há formação do apressório, responsável pela pressão mecânica e química (ZIMMERMANN, 2007). Já dentro do corpo do hospedeiro, após a penetração da cutícula, ocorre a formação de hifas (blastosporos), que auxilia na degradação da hemolinfa do hospedeiro (Figura 5) (BEYS-DA-SILVA, 2009).

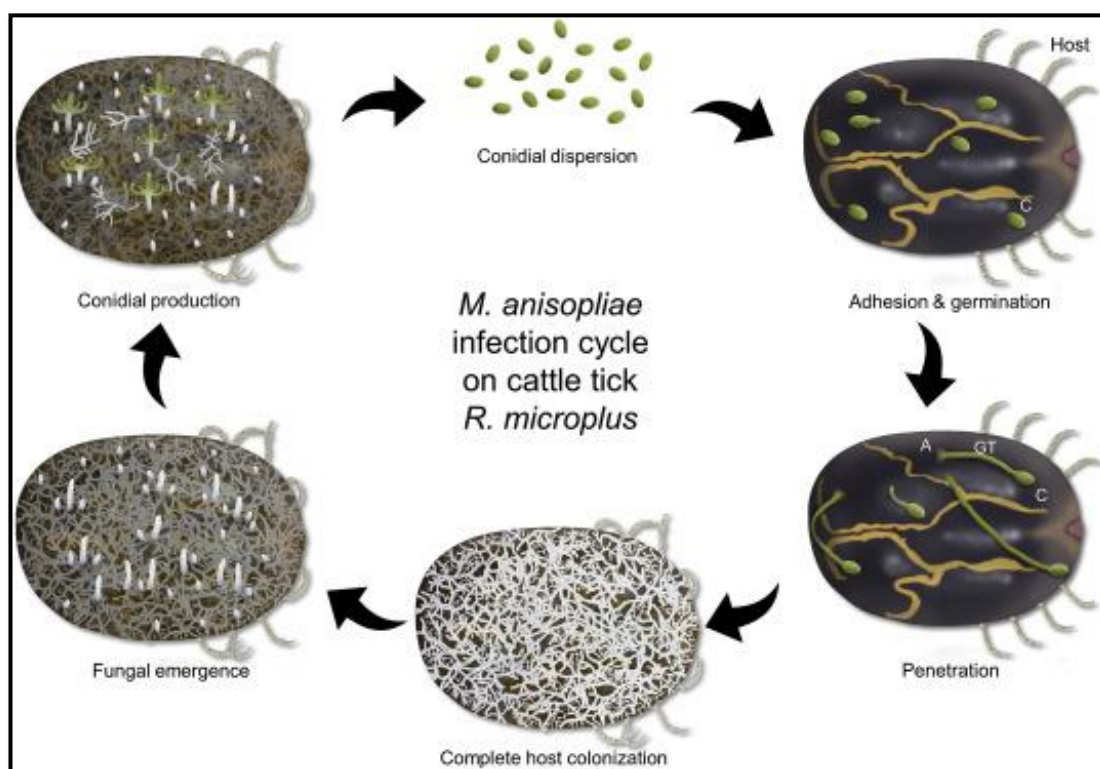


Figura 5- Ciclo de infecção do fungo *M. anisopliae* no carrapato *R. microplus*. Fonte: BEYS-DA-SILVA *et al.* (2020)

Após a colonização e desenvolvimento, há a exteriorização sobre o corpo do hospedeiro, disseminando novos conídios no ambiente e consequentemente novos hospedeiros, dando continuidade ao ciclo (CHANDLER *et al.*, 2000). Por sua vez, a exteriorização dos conídios

necessita de certa umidade, caso as condições ambientais estejam muito secas, o fungo pode continuar dentro do cadáver. O período de incubação depende da espécie do hospedeiro, de sua fase de vida, da temperatura e umidade do ambiente, assim como a virulência do isolado fúngico (ZIMMERMANN, 2007a).

Dentre os sintomas encontrados nos carrapatos causados pela patogenicidade do fungo pode-se destacar: alteração na taxa reprodutiva (ANGELO *et al.*, 2012), sensibilidade reduzida, movimentos descoordenados e paralisia (ALVES; FILHO, 1998).

3.8 Intempéries ambientais

O controle biológico utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* encontra-se em condições favoráveis na América Latina devido ao clima e a sua diversidade (MASCARIN, 2010). Entretanto, até mesmo em locais favoráveis a variabilidade dos fatores ambientais pode interferir diretamente na ação deste fungo (RODDAM; RATH, 1997). Dentre os fatores que mais afetam a germinação, a esporulação e a virulência destacam-se a temperatura, a umidade, a luz e o pH (BLANFORD; THOMAS, 1999).

As temperaturas altas podem ser limitantes para a atuação do patógeno, afetando diretamente no seu desenvolvimento, sobrevivência ou processo de infecção destes patógenos (GOETTEL; INGLIS, 2000). A temperatura ideal para aplicação de fungos entomopatogênicos a campo está entre a faixa de 20 a 30°C. Porém, em algumas partes de regiões tropicais existem isolados de *M. anisopliae* capazes de crescer em temperaturas acima de 35,8°C, portanto é necessário buscar a temperatura ideal para que haja a interação patógeno-hospedeiro (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007).

A umidade interfere tanto na eficácia quanto na sobrevivência do patógeno (ZIMMERMANN, 2007). A germinação ideal ocorre em taxas elevadas de umidade relativa (U.R.), próximas a 100% de UR (WALSTAD *et al.*, 1970). Entretanto, para alguns patógenos apenas a umidade fornecida pela camada microclimática formada ao redor da folha ou tegumento do inseto já é suficiente para sua germinação (WRAIGHT *et al.*, 2000). Altas temperaturas juntamente com umidade relativa baixa podem causar inviabilidade do conídio ou impedir a germinação sobre o carrapato (ZIMMERMANN, 2007).

A radiação ultravioleta (UV), provenientes da luz solar, pode reduzir a viabilidade de conídios no campo (RANGEL *et al.*, 2004). A exposição direta a radiação solar pode desnaturar ou atrasar a germinação dos fungos, afetando sua sobrevivência (BRAGA *et al.*, 2001; RANGEL *et al.*, 2004; ZIMMERMANN, 2007).

Outros fatores que influenciam na sobrevivência dos conídios estão diretamente relacionados ao solo, como, o tipo de solo, grau de compactação e pH (RATH, 1992). Deve -se levar em consideração que a água (da chuva), organismos já presentes no solo e as raízes das plantas também influenciam na sobrevivência do fungo, podendo diminuir a mobilidade dos esporos (KELLER; ZIMMERMANN, 1989).

Portanto, é indicado fazer a aplicação do fungo no solo no período final da tarde, quando a incidência de raios ultravioleta é menor e a temperatura mais amena (TONUS, 1999).

3.9 Utilização do óleo na formulação fúngica

Para diminuir a interferência do ambiente no controle biológico, óleos como adjuvantes das formulações fúngicas vêm sendo estudados. Alguns estudos têm mostrado que formulações de fungos entomopatogênicos preparadas em base oleosa obtiveram maior eficácia (BATEMAN *et al.*, 1993; SAMISH, 2014, CAMARGO, 2014).

As vantagens de se utilizar óleos vegetais são: a possibilidade de serem certificados e utilizados como produtos orgânicos; por serem viscosos, podem dar maior aderência à superfície da praga; não são inflamáveis, logo, são mais seguros; conferem certa proteção aos raios ultravioletas; são menos voláteis em comparação com os óleos minerais. Já os óleos minerais não podem ser certificados como naturais, podem ser inflamáveis e consequentemente menos seguros, e nem todos protegem contra radiação UV (ALVES; FARIA, 2010).

Os compostos oleosos têm demonstrado prolongar a sobrevivência dos conídios, diminuir a sensibilidade à radiação UV e evitar a dessecação quando comparados com soluções aquosas (PRIOR; JOLLANDS, 1988; INGLIS *et al.*, 1995; GÔLO, 2014). Há estudos em que confere ao conídio um efeito termo protetor (MC CLATCHIE *et al.* 1994; BARRETO *et al.* 2016; ALVES *et al.* 2016).

Camargo (2014), avaliou a eficácia de um produto comercial a base de *M. anisopliae* sobre diferentes percentuais de U.R. (30, 50, 70 e 90%) e pode verificar que suspensões aquosas e formulações oleosas foram mais eficazes no controle de *R. microplus* quando a 90% de U.R, porém quando analisada em 50%, apenas formulações oleosas mantinham o efeito controlador, evidenciando a interferência da umidade nos conídios não protegidos pelo adjuvante oleoso.

Desta forma, os óleos tornam-se boa alternativa na utilização como adjuvante em caldas de pulverização, além de aumentar a infectividade do fungo (ALVES *et al.*, 1998), e dispensar a incorporação de agentes molhantes ou adesivos (SAMISH, 2014).

3.10 Biomonitoramento

Apesar do efeito patogênico de *M. anisopliae* sobre carrapatos, é de extrema importância o conhecimento a respeito da segurança e do efeito deste fungo sobre organismos não-alvos. O estudo dos efeitos de *M. anisopliae* em mamíferos foi conduzido primeiramente por Schaerffenberg (1968), assim, outros estudos foram surgindo não apenas para a seguridade de mamíferos, como de outros vertebrados e organismos benéficos não-alvos. Em sua maioria, reportando baixo risco da utilização deste microrganismo (STEINHAUS, 1957; HEIMPEL, 1971; BURGESS, 1981; SHADDUCK, 1982; HALL, *et al.*, 1982; GOETTEL, *et al.*, 1990, 2001; LAIRD, *et al.*, 1990; SAIK *et al.*, 1990; SIEGEL; SHADDUCK, 1990; ZIMMERMANN, 1993, 2007a, 2007b; COOK *et al.*, 1996; GOETTEL; JARONSKI, 1997; VESTERGAARD *et al.*, 2003)

Zimmermann (2007) revisou o risco da aplicação de *M. anisopliae* em mamíferos, aves, peixes, invertebrados, relatando diversos estudos que garantem a seguridade deste agente para os diversos animais estudados.

Segundo Vestergaard (2003), não há como diminuir uma população praga sem que haja interferência em outros organismos do ecossistema. Ainda assim, os resultados de estudos em organismos não-alvos são considerados normais (ZIMMERMANN, 2007).

Os ácaros juntamente com os collembolos são os principais organismos da mesofauna edáfica, desempenhando importantes funções no ecossistema ao atuarem como decompositores e facilitadores de grupos de micro-organismos (GRIESANG *et al.*, 2016). A análise qualitativa dos grupos da mesofauna do solo permitirá fazer uma adequada avaliação da qualidade do meio edáfico (SOCARRÁS, 2013). De acordo com Gulvik (2007) a maioria dos ácaros oribatídeos com sua alta longevidade, baixa fecundidade, desenvolvimento lento e baixa dispersão pode ser considerado um forte bioindicador.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

Os experimentos foram realizados no Instituto Biológico de São Paulo. Duas parcelas (tratada e controle) com 1m² foram demarcadas na área externa, distantes 5m uma da outra (Figura 6).



Figura 6: Local reservado no Instituto Biológico para a aplicação da solução fúngica. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2020)

4.2 Obtenção de carrapatos

Carrapatos *R. microplus* foram obtidos da Fazenda Experimental do Polo Regional do Desenvolvimento Tecnológicos dos Agronegócios do Vale do Paraíba, sediado no município de Pindamonhangaba, região sudeste do Estado de São Paulo, cercado pela Serra da Mantiqueira e Serra do Quebra Cangalha, ramificação da Serra do Mar (latitude: 22° 55' 50"S, 45° 27' 22"W), com altitude entre 552m e 1954m, clima subtropical quente (média anual entre 17 e 20°C) inverno seco com baixa pluviosidade (CODIVAP, 2009)

As fêmeas de *R. microplus* foram coletadas diretamente dos animais, armazenadas em potes plásticos e transportadas para o Instituto Biológico de São Paulo.

4.3 Marcadores de campo

No Laboratório de Parasitologia Animal, as fêmeas de *R. microplus* foram lavadas em água corrente e pesadas, então separadas em grupos tratado e controle por alinhamento randômico visando a homogeneidade entre os grupos.

Foi desenvolvida uma nova técnica para avaliação da ação do fungo no carrapato seguindo o protocolo a seguir:

As fêmeas foram colocadas individualmente em tecido voal de tamanho 30x30cm e amarrados com barbante para posterior colocação em campo, estes sacos foram denominados marcadores. Foram 9 marcadores de campo para o grupo tratado e 9 para o grupo controle. Os grupos controle foram nomeados como “C1”, “C2”... “C9” enquanto os tratado como “T1”, “T2”... “T9” (Figura 7).



Figura 7- Conjunto de marcadores de campo, em que cada marcador contém uma fêmea do carrapato *R. microplus*. Fonte: ALMEIDA, I. B. (2020)

4.4 Procedência do fungo *M. anisopliae*

O fungo *M. anisopliae* (isolado IBCB 425) foi obtido pela Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, Campinas – SP e estão depositados na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu" e armazenados a aproximadamente 8°C.

4.5 Aplicação dos fungos e solução controle

O fungo *M. anisopliae* foi aplicado na concentração 2×10^{13} conídios por hectare. Para a preparação da solução foi utilizado formulação em pó com $2,2 \times 10^{10}$ conídios por grama, adicionando aproximadamente 30mg de emulsificante alimentício da marca Marvi (até formar uma mistura homogênea) e em seguida acrescentando aos poucos 950 ml de água e 50 ml de óleo vegetal. A solução controle foi preparada com 950 ml de água e 50 ml de óleo vegetal. Todo o volume preparado foi aplicado na área demarcada, homogeneamente.

As aplicações foram feitas utilizando bomba costal com bico em leque durante o período da tarde entre 17 e 18 horas. As aplicações foram realizadas no intervalo mínimo de 30 dias. Os marcadores foram dispostos nos locais reservados em quantidades iguais para o grupo tratado e controle. Os dados de temperatura e umidade foram adquiridos no site <https://bdmep.inmet.gov.br>.

4.6 Experimento 1

O experimento foi realizado nos meses de outubro e novembro de 2019 e março e abril de 2020. Neste período foram feitas aplicações com intervalos aproximados de 30 dias. Nove marcadores foram colocados em cada parcela (controle e tratado) após a aplicação (Figura 8).

Seguindo os dados de biologia para *R. microplus*, os marcadores permaneceram no solo por 15 dias, período de postura dos ovos, em seguida eram recolhidos para análise de postura e mortalidade.

As fêmeas que realizaram postura tiveram sua massa de ovos pesada individualmente e acondicionada em tubos de ensaio fechados com algodão úmido. Os tubos foram colocados em B.O.D. com umidade relativa de 80% e temperatura de 27°C por 15 dias (período de incubação) até a eclosão das larvas (Figura 8).

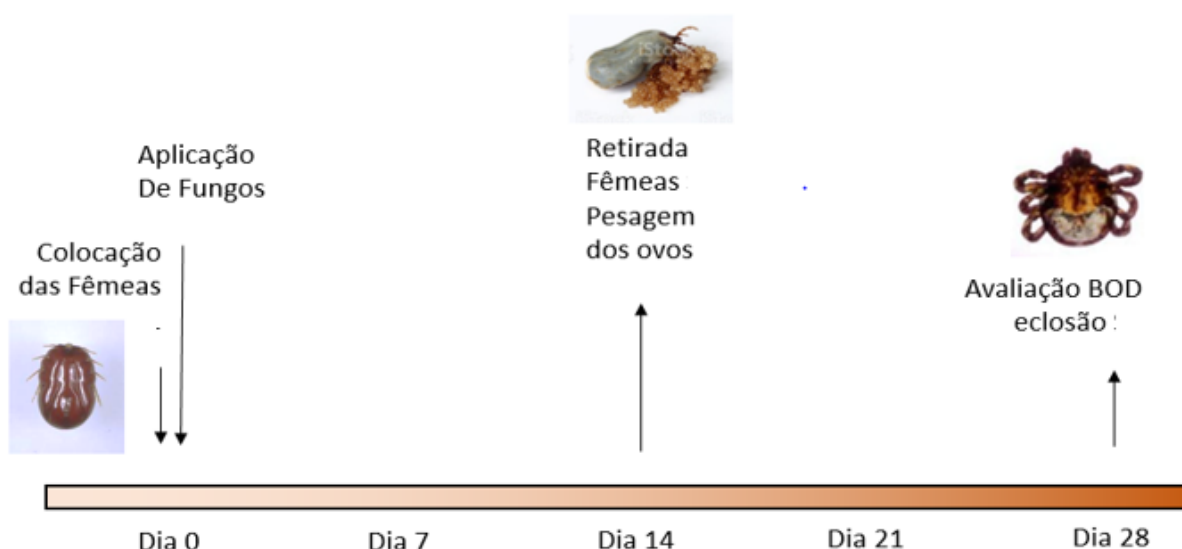


Figura 8- Esquema da técnica implementada no experimento 1. Dia 0: Aplicação da solução fúngica e colocação das fêmeas ao solo. Dia 14: Retirada das fêmeas do solo e pesagem dos ovos. Dia 21: Avaliação da eclosão em B.O.D.. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

4.7 Experimento 2

As aplicações foram realizadas nos meses de junho, julho, outubro e novembro de 2020 e janeiro de 2021, as soluções foram aplicadas apenas uma vez por mês, com intervalos de 30 dias aproximadamente. Os marcadores foram dispostos no solo semanalmente e simultaneamente nas parcelas controle e tratada nos cinco meses do experimento, sendo os da primeira semana dispostos logo após a aplicação. E foram identificados como “S1” “S2”... “S4” conforme a semana em que eram dispostos. Após 15 dias da sua colocação, esses marcadores foram retirados e analisadas as condições de postura e vida dos carrapatos. Fêmeas com postura tiveram sua massa de ovos pesada individualmente e acondicionada em tubos de ensaio fechados com algodão úmido e posteriormente os tubos foram colocados em B.O.D com umidade relativa de 80% e temperatura de 26.5°C por 15 dias até a eclosão das larvas (Figura 9).

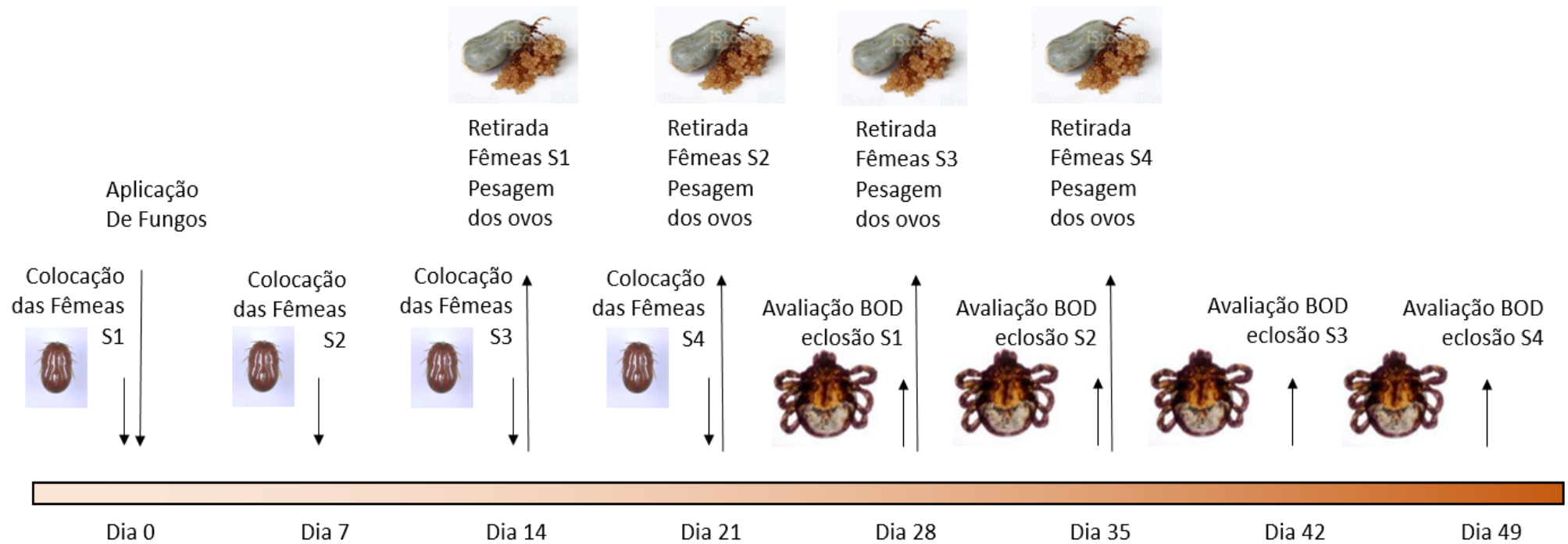


Figura 9- Esquema da técnica implementada no experimento 2. Dia 0: Aplicação da solução fúngica e colocação das fêmeas da semana I ao solo. Dia 7: Colocação das fêmeas da semana II ao solo. Dia 14: Colocação das fêmeas da semana III ao solo, retirada das fêmeas da semana I do solo e pesagem dos ovos. Dia 21: Colocação das fêmeas da semana IV ao solo, retirada das fêmeas da semana II e pesagem dos ovos. Dia 28: Retirada das fêmeas da semana III, pesagem dos ovos e avaliação de eclosão da semana I. Dia 35: Retirada das fêmeas da semana IV, pesagem dos ovos e avaliação de eclosão da semana II. Dia 42: Avaliação de eclosão da semana III. Dia 49: Avaliação de eclosão da semana IV. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

4.8 Análise dos dados

Foram calculadas a inibição de postura e o percentual de inibição segundo equações (1) e (2). A eficácia do tratamento foi realizada segundo as equações (3) e (4) adaptadas de Drummond *et al.* (1973).

Foi calculada a análise de variância (ANOVA) dos dados de inibição de postura e eficácia do produto dos meses de junho a janeiro e as semanas dos respectivos meses.

Cálculo Inibição de Postura:

$$Inibição = \frac{Peso\ dos\ Ovos}{Peso\ das\ fêmeas} \quad (1)$$

Cálculo Percentual de Inibição:

$$100 - \frac{Inibição\ de\ postura\ do\ tratado}{Inibição\ de\ postura\ do\ controle} * 100 \quad (2)$$

Cálculo de Índice Reprodutivo (IR):

$$IR = \frac{Peso\ da\ massa\ de\ ovos\ x\ \% \ de\ eclosão\ x\ 20.000}{Peso\ das\ fêmeas\ ingurgitadas} \quad (3)$$

Cálculo de Porcentagem de Eficácia (IE):

$$IE = \% \ de\ eficácia$$

$$IE = \frac{(IR\ controle - IR\ tratado) x 100}{IR\ controle} \quad (4)$$

4.9 Histologia

As fêmeas retiradas dos marcadores de campo foram colocadas em geladeira, seus tegumentos foram cuidadosamente perfurados com agulhas finas, para permitir melhor difusão

do fixador e foram colocadas em frascos contendo o fixador Dubosq Brasil por um período de 24h.

Após a fixação, as amostras foram alocadas em cassetes histológicos e colocadas em processador automático de tecidos (histotécnico – O Patologista) para a desidratação em banhos crescentes de álcoois diafanizadas em banhos de xilol e impregnação com parafina histológica. Logo após, foram incluídas em parafina histológica em moldes de silicone (MICHALANY, 1990).

Posteriormente as amostras foram seccionadas a 5 µm de espessura com auxílio de micrótomo HYRAX M 55Zeiss[®] para obtenção de secções representativas dos tecidos do ácaro infectado e do controle. Os cortes foram estendidos em banho-maria (60°C) e colocados em 3 lâminas histológicas tratadas previamente com gelatina ultrapura para realização da coloração de rotina HE e coloração de Grocott e 2 lâminas silanizadas para realização da hibridização *in situ*.

4.9.1 Preparo das lâminas histológicas para coloração Hematoxilina Eosina (HE)

As lâminas histológicas tratadas previamente com gelatina ultrapura foram colocadas em estufa 52°C overnight e iniciou-se a desparafinização em banhos de xilol, lavagem em álcool absoluto, hidratação em soluções hidro alcoólicas e posteriormente realizou-se, coloração de hematoxilina de Harris e Eosina, após as lâminas foram desidratadas em álcoois e diafanizadas em xilol modificado segundo Michalany (1990) (Quadro 1). Para a montagem da lâmina e lamínula, empregou-se com resina sintética Entellan (Merck®).

Quadro 1- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, modificado segundo Michalany (1990).

Reagente	Tempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	2 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente

Hematoxilina	8 minutos
Diferenciador de Hematoxilina	Imergir rapidamente
Eosina	5 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	1 minuto
Álcool absoluto II	1 minuto
Xilol I	1 minuto
Xilol II	1 minuto

Fonte: Adaptado de CASSIANO (2015)

4.9.2 Preparo das lâminas histológicas para coloração Grocott

As lâminas histológicas tratadas previamente com gelatina ultrapura foram colocadas em estufa 52°C overnight e iniciou-se a desparafinização em banhos de xilol, lavagem em álcool absoluto, hidratação em soluções hidro alcoólicas e posteriormente foram coradas seguindo o protocolo do kit comercial HistoKit Grocott® (EasyPath™) (Quadro 2). Para a montagem da lâmina e lamínula, empregou-se a resina sintética Entellan (Merck®).

Quadro 2- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, segundo HistoKit Grocott®.

Reagente	Tempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	2 minutos
Água destilada	Alguns segundos
Ácido crômico	10 minutos
Água corrente	3 minutos

Água destilada, Prata amoniacal e Bórax	40 minutos
Água destilada	Imergir rapidamente
Cloreto de Ouro	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Verde Luz	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	1 minuto
Álcool absoluto II	1 minuto
Xilol I	1 minuto
Xilol II	1 minuto

4.9.3 Preparo do material para Hibridização *in situ* Cromogênica

As lâminas silanizadas foram colocadas em estufa 52°C *overnight* e após iniciou-se a desparafinização em banhos de xilol, banhos em álcool absoluto, hidratação em soluções hidroalcoólicas e água.

A Hibridização *in situ* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Cassiano (2015) adaptado. Utilizou-se o kit GenPoint K0620 (DAKO) (Quadro 3).

Foi utilizado o protocolo com a recuperação antigênica usando banho maria a 96°C em tampão diluído (Dako® S1699) por 40 minutos. Após resfriamento completo das lâminas, foi realizada a digestão enzimática dos tecidos com proteinase K (Dako®) por 1 minutos em temperatura ambiente (300µl por lâmina). Foram realizadas duas lavagens em água destilada. Fez-se o bloqueio com peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio 10V a 3% em metanol por 20 minutos em temperatura ambiente e após lavagens com água destilada foram realizadas. Para identificação do DNA fúngico foi utilizada a sonda biotinilada específicas: F: 5'-TCTGAATTTTTTATAAGTAT-3'e R: 5'-AGGAGAGAGCTCGACGGTCA -3'

(BECHARA *et al.*, 2011) misturados a um tampão de diluição fornecido no kit (Dako® – kit cód. K0620).

A solução com a sonda e o tampão de diluição foram colocados sobre o tecido e coberto por uma lamínula (250µl por lâmina). As lâminas foram colocadas no hibridizador Dako® (desnaturação a 92°C e hibridização a 46°C) overnight (18h). Foi retirada a lamínula em tampão TBST (Tris tamponado salina/Tween) por 10 minutos. Após este período, foi realizado o banho de estringência em banho maria a 45°C, por 30 minutos em tampão fornecido pelo kit e, lavagem com TBST. O sistema de revelação utilizado foi por Estreptavidina primária em tampão diluente por 30 minutos em câmara úmida (150µl por lâmina). Depois duas gotas do reagente Biotinil Tiramida por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi colocado duas gotas de Estreptavidina secundária por 15 minutos. (Dako® – kit cód. K0620). Intercalando-se cada etapa descrita acima, foram realizadas duas lavagens com tampão TBST por 5 minutos.

O sistema de substrato-cromógeno utilizado foi o Liquid DAB+ Substrat Chromogen System (Dako® – cód. K3468), sendo feita incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem em água destilada e água corrente.

A contra coloração foi por meio da coloração com hematoxilina de Harris por 8 minutos.

Quadro 3- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, segundo HistoKit Grocott®.

Etapas	Reagente	Tempo
Desparafinização I	Xilol I	5 minutos
Desparafinização II	Xilol II	5 minutos
Hidratação I	Álcool absoluto	2 minutos
Hidratação II	Álcool 95°	2 minutos
Hidratação III	Álcool 80°	2 minutos
Hidratação IV	Álcool 70°	2 minutos
Recuperação antigênica	Tampão DAKO S1699	40 minutos
Digestão enzimática	Proteinase K	1 minutos
2 Lavagens	Água destilada	Imergir rapidamente
Bloqueio de Peroxidase endógena	Peróxido de hidrogênio 3% (10V) e metanol	20 minutos

2 lavagens	Água destilada	Imergir rapidamente
Aplicação do primer	Sondas e solução de hibridização	
Hibridizador		18 horas
2 lavagens	Tampão TBST	5 minutos
Banho de estringência	Solução de estringência	30 minutos
2 Lavagens	Tampão TBST	5 minutos
	Estreptavidina primária	30 minutos
2 lavagens	Tampão TBST	5 minutos
	Bionitil Tiramida	15 minutos
2 lavegens	Tampão TBST	5 minutos
	Estreptavidina secundária	15 minutos
Visualização	Liquid DAB e Dako-K3468	5 minutos
Lavagem	Água destilada	Diversas vezes
Contra-coloração	Hematoxilina de Harris	5 minutos

4.9.4 Análise Microscópica

As lâminas, controle e tratados, foram avaliadas quanto as diferenças estruturais celulares pela coloração HE; avaliadas pela presença ou não de fungos pela coloração Grocott e finalmente a identificação da espécie *M. anisopliae* pela hibridização *in situ* Cromogênica.

4.10 Biomonitoramento

Em outubro de 2019, no início do experimento, foi realizada uma coleta de solo dos locais reservados para o experimento, com profundidade de 5cm e largura de 10cm, as amostras foram submetidas à extratores do tipo *Berlese-Tullgren* (Figura 10 e 11). Em abril de 2021, ao final do experimento, foi realizada nova coleta de solo, que passaram pelo mesmo processo

descrito. Em ambas as coletas, foi realizada a triagem das amostras sendo os ácaros oribatídeos separados e contados.



Figura 10 e 11 - Retirada de solo com profundidade de 5cm e largura de 10cm. Fonte: ALMEIDA, I. B. (2020)

5 RESULTADOS

5.1 Dados de Temperatura e Umidade

A média das temperaturas e umidades máxima e mínima dos meses (outubro e novembro de 2019, março, abril, junho, julho, outubro e novembro de 2020 e janeiro de 2021) em que os experimentos foram realizados, estão representados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

É possível observar que as temperaturas variaram a máxima entre 23°C e 18°C e a mínima entre 22°C e 16°C. As maiores temperaturas foram no mês de janeiro de 2021 enquanto as menores no mês de julho de 2020.

As médias de umidade variaram entre 88 U.R. e 80 U. R. nas máximas e 83 U.R. 74 U.R. as mínimas. Sendo a maior em novembro de 2019 e a menor em julho de 2020.

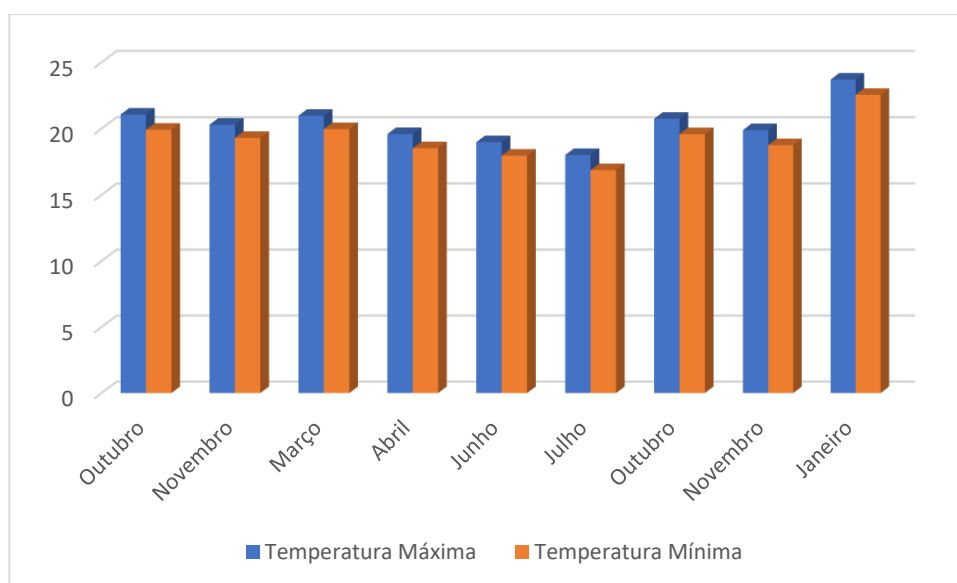


Figura 12- Média das temperaturas máximas e mínimas dos meses em que foi realizado os experimentos. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

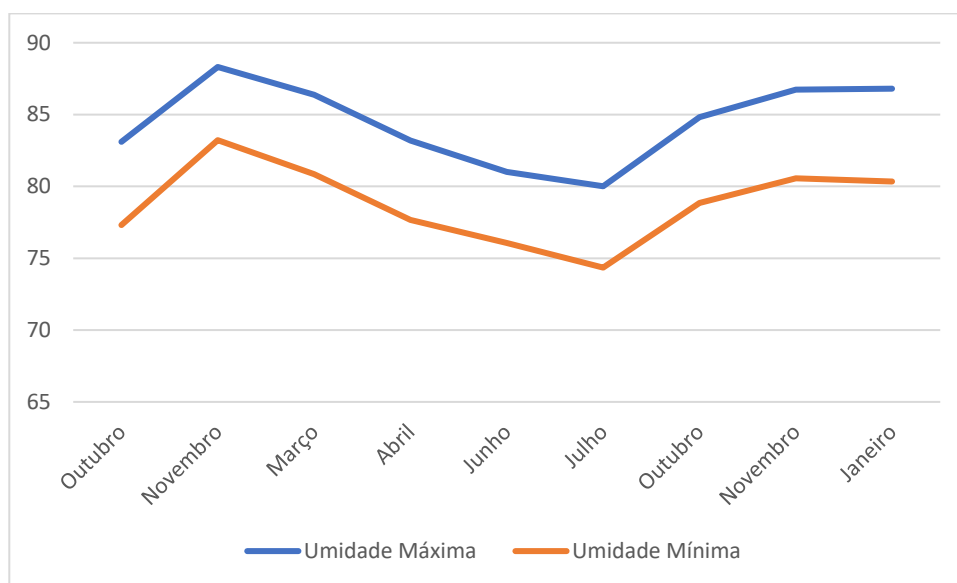


Figura 13- Média das umidades máximas e mínimas dos meses em que foi realizado os experimentos. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

5.2 Experimento 1

Os dados coletados dos marcadores de campo foram organizados na figura 14 contendo a inibição de postura e eficácia do produto dos meses de outubro e novembro de 2019 e março e abril de 2020.

No mês de novembro a inibição de postura foi de 32,7%, sendo menor que a do mês de março (47,63%), enquanto os dados de eficácia do produto foram de 66,13% e 88,05%,

respectivamente para os meses de novembro e março. Foi possível relacionar positivamente os dados de IP e EP (Figura 14).

Os resultados de postura e eclosão obtidos dos marcadores “controle” foram menores comparados ao grupo “tratado” nos meses de outubro e abril. Portanto, não foi possível calcular a inibição de postura e a eficácia do produto destes meses.

No mês de outubro 15 dias após a aplicação do *M. anisopliae* foi coletada uma fêmea coberta por fungos com coloração esverdeada (Figura 15).

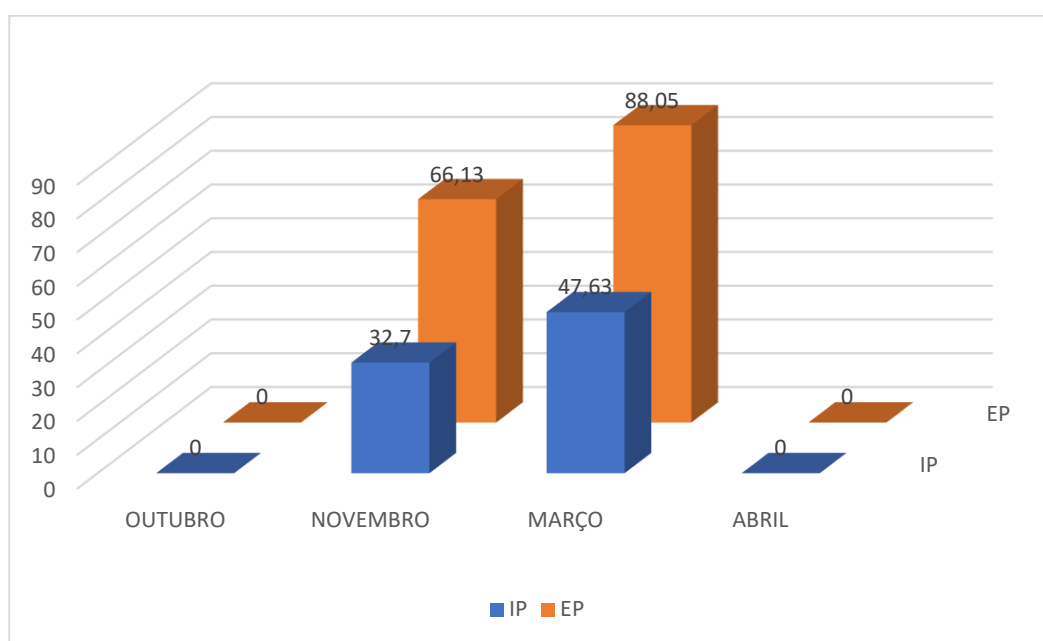


Figura 14- Dados de inibição de postura e eficácia do produto dos meses de outubro e novembro de 2019 e março e abril de 2020. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)



Figura 15- Fêmea do carrapato *R. microplus* coberta com fungo de coloração esverdeada retirada no mês de outubro de 2019. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2020).

5.3 Experimento 2

Os dados de inibição de postura e eficácia do produto dos meses de junho, julho outubro e novembro de 2020 e janeiro de 2021 estão representados nas figuras 16,17,18,19 e 20 (respectivamente).

Nota-se que em uma semana de cada mês a inibição de postura foi zero: semana I -junho 2020 (Figura 16), semana III - julho 2020 (Figura 17), semana IV - outubro 2020 (Figura 18) e semana III - novembro 2020 (Figura 19). Nestas semanas os dados de postura dos grupos controle foram inferiores aos dos grupos tratados, impossibilitando o cálculo da IP. Em junho de 2020, na semana I, também não foi possível calcular a eficácia do produto (Figura 16) uma vez que não houve eclosão.

Em junho de 2020, a maior porcentagem de inibição de postura foi na semana III (80,3%), enquanto o menor foi na semana II (45,24%). Em relação a eficácia do produto, as menores e maiores porcentagens também foram da semana II (87,97%) e III (98,27%).

Analisando os resultados do mês de julho de 2020, a semana II apresentou os melhores dados tanto de IP quanto de EP, sendo 100% para ambos. Na semana IV também se obteve 100% de EP, entretanto a IP foi de 79,08%. Pode-se notar que a semana I possui os dados semelhantes aos demais IP (78,41%) e EP (96,85%).

No mês de outubro de 2020, a maior porcentagem de eficácia foi na semana I (91,82%), já a menor foi na semana II (48,17%). A semana III a porcentagem de IP e de EP foram de 75%.

A semana IV do mês de novembro de 2020 foi a que obteve maior porcentagem de EP (97,64%) e IP (68,43%) e a semana I, a segunda maior, com 90,08% de EP e 42,63% de IP.

Janeiro de 2021 mostrou os maiores valores de EP comparado aos demais meses, apresentando-se entre 88,31% e 93,56%. A IP foi semelhante aos demais meses, variando entre 13,39% e 57,73%.

A figura 21 apresenta as médias de IP e EP semanais de todos meses. De um modo geral a IP (40,19% e 51,08%) e EP (72,25% e 88,59%) mantiveram-se constantes ao longo do mês, sendo que as maiores médias foram da semana IV, enquanto as menores na semana III.

A figura 22 apresenta os dados das médias de inibição de postura e eficácia do produto comparando todos os meses em que o experimento foi realizado. Maio IP foi encontrado no mês de julho, enquanto maio EP no mês de janeiro.

A análise de variância realizada entre as semanas I, II, III e IV dos meses de junho de 2020 à janeiro 2021 não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

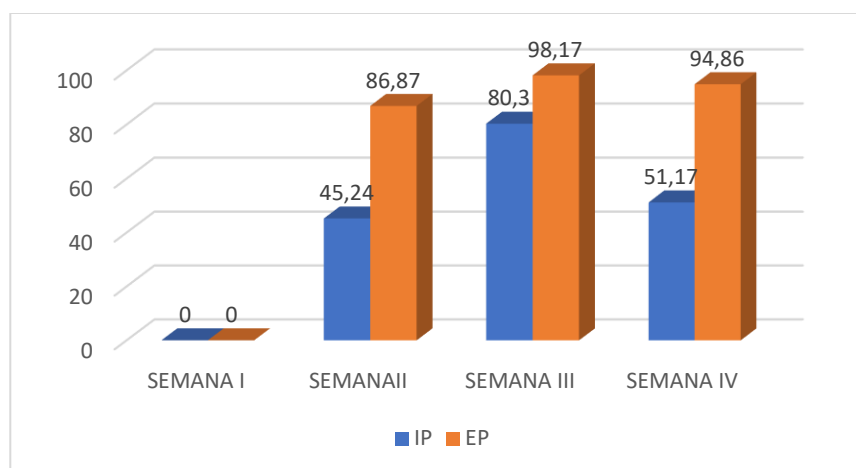


Figura 16- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de junho de 2020. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021).

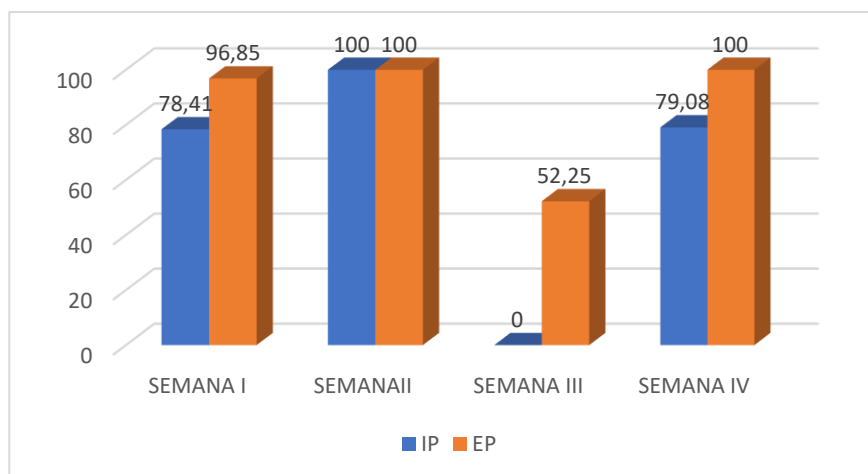


Figura 17- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de julho de 2020. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021).

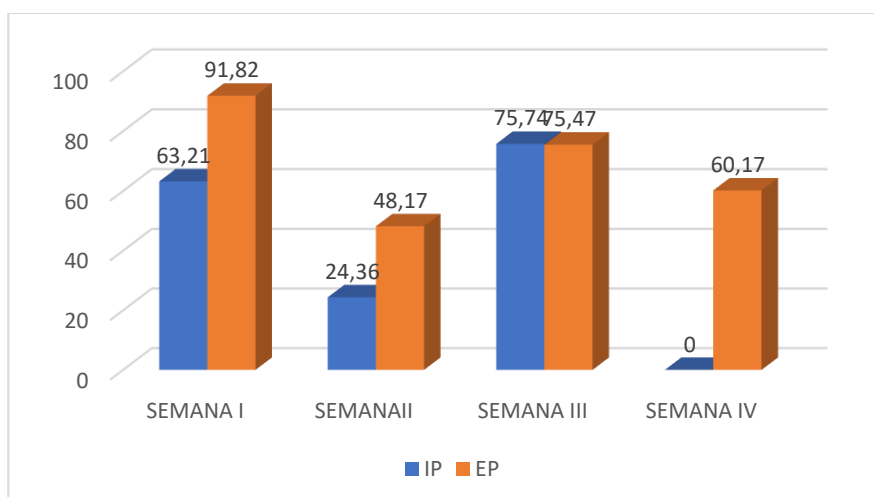


Figura 18- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de outubro de 2020. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021).

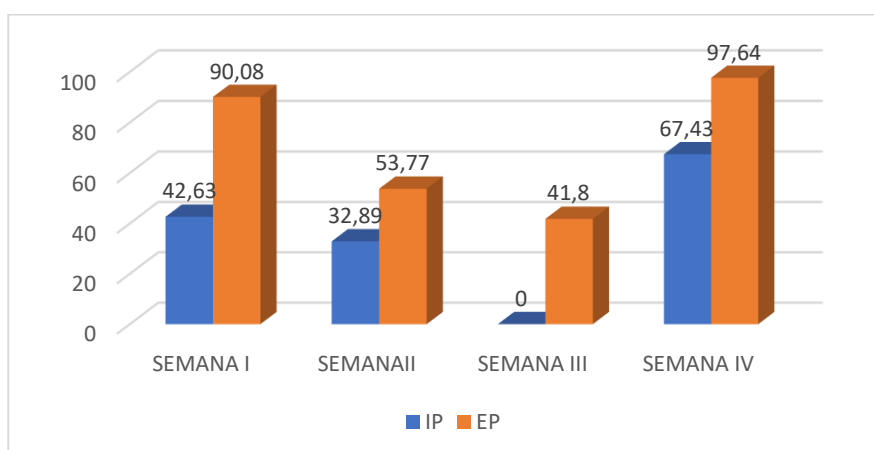


Figura 19- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de novembro de 2020. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021).

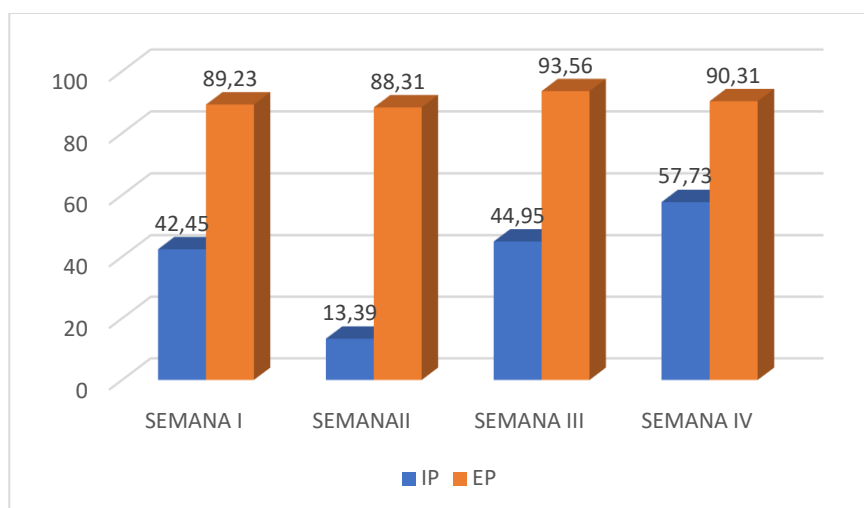


Figura 20- Gráfico com os dados de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV do mês de janeiro de 2020. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021).

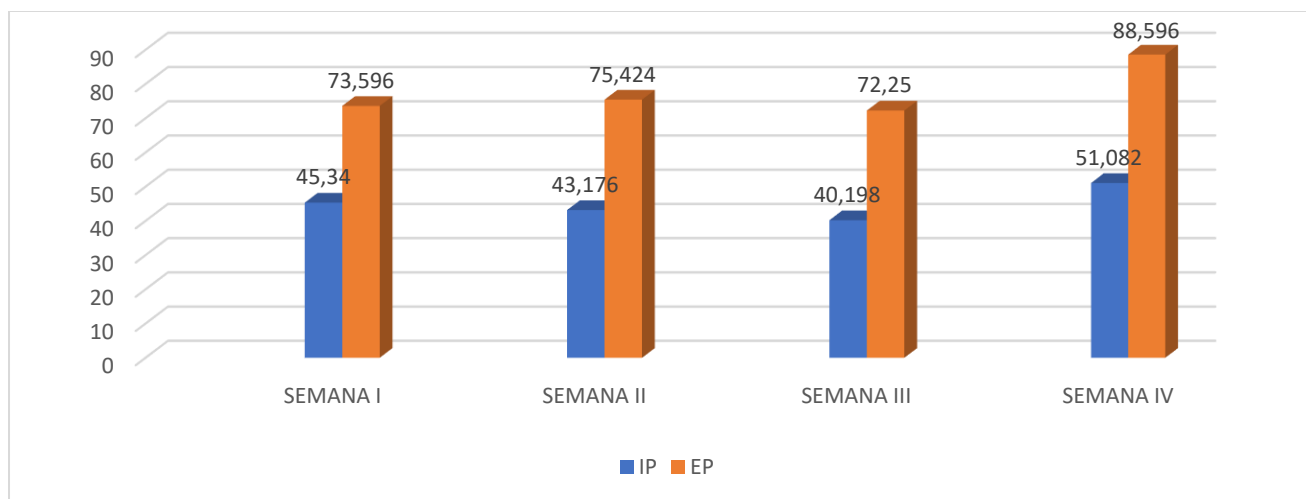


Figura 21- Gráfico com as médias de inibição de postura e eficácia do produto das semanas I, II, III e IV dos meses de junho, julho, outubro e novembro de 2020 e janeiro de 2121. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021).

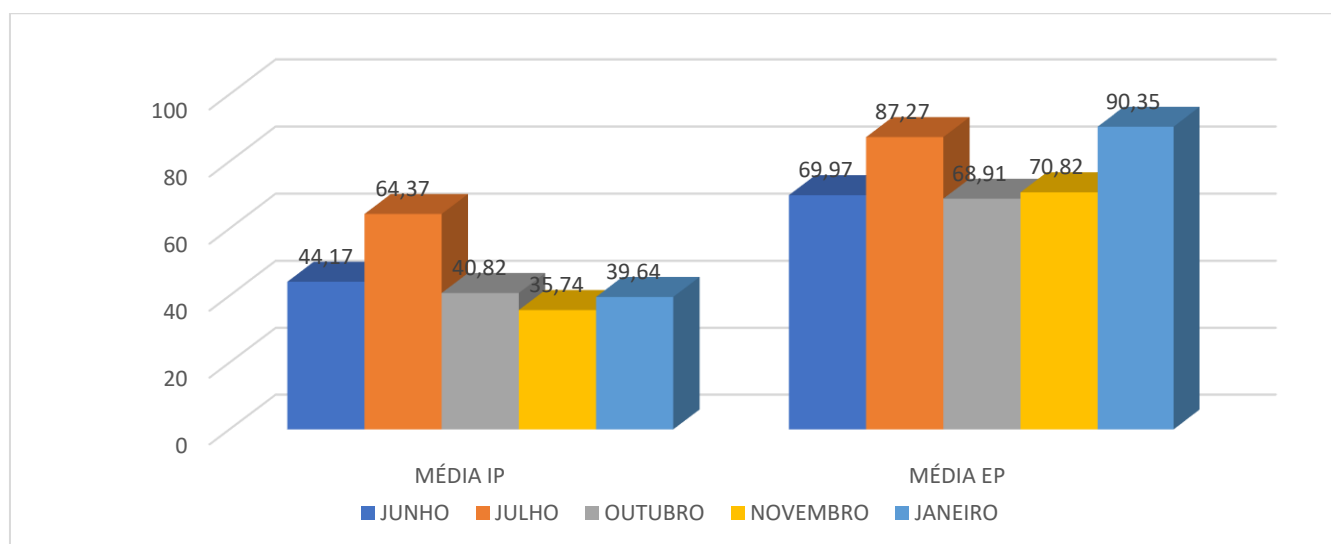


Figura 22- Gráfico das médias de inibição de postura e eficácia do produto dos meses de junho, julho, outubro e novembro de 2020 e janeiro de 2121. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021).

5.4 Biomonitoramento

Os dados de contagem dos oribatídeos estão representados na figura 23, em que mostra a quantidade de ácaros encontrados no solo no início do experimento (antes da aplicação fúngica) e ao final do experimento (após todas as aplicações).

Nota-se que houve queda na quantidade de indivíduos tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado, a redução na população foi de 77,15% e 78,73%, respectivamente.

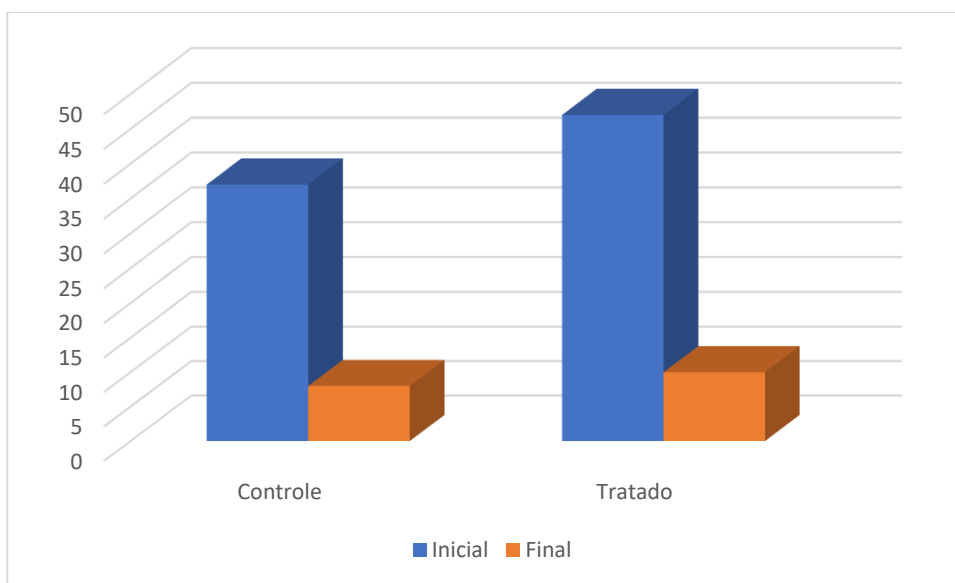


Figura 23- Gráfico com a contagem da população de ácaros oribatídeos do início do experimento ao final do experimento. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

5.5 Histologia

5.5.1 Coloração Hematoxilina e eosina

Pode-se observar na figura 24, quadros A e B (controles) o abdômen com a presença do ovário (ov), que está preenchido por grânulos de vitelo (gv) e com presença de corio preservado. O interior dos carrapatos não possui vacúolos, indicando a integridade destes. Já nos quadros C, D e E (tratados) não é possível observar os grânulos de vitelo (gv) como no controle. Sugere-se que houve uma fusão dos grânulos que provavelmente romperam-se, permanecendo dentro do ovócito apenas lipídio, carboidrato e proteína. Os ovócitos apresentam tamanho reduzido, podendo indicar a presença do fungo. Não é possível observar o corio. No quadro E, nota-se que o conteúdo vitolegênico escoou para o interior do abdômen (seta no quadro E), com ausência de ovócitos formando um grande vacúolo (va).

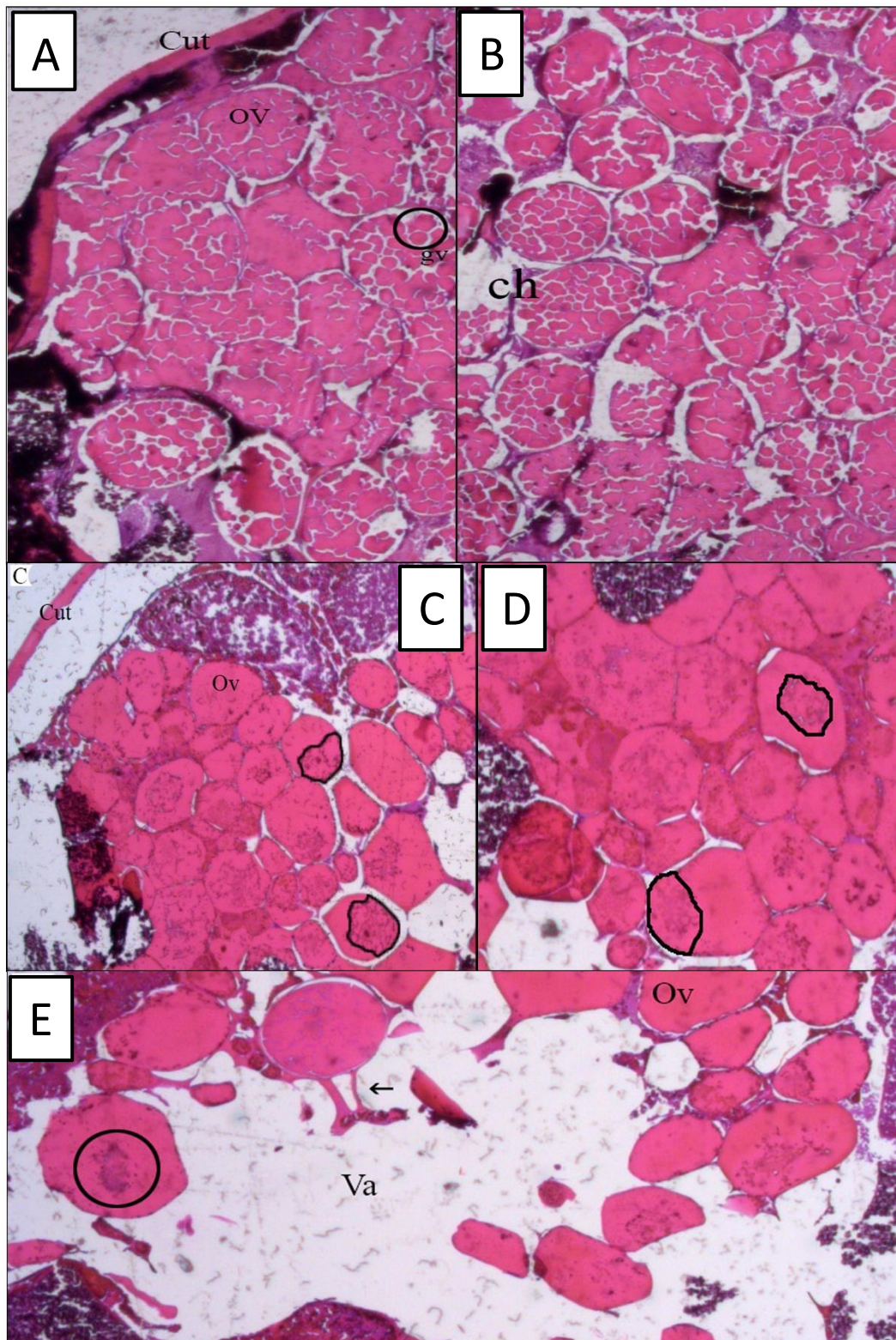


Figura 24- Cortes histológicos de fêmeas de carrapatos *de R. microplus* sendo A e B controles, e C, D e E submetidas ao tratamento fúngico com *M. anisopliae* coradas com hematoxilina e eosina em aumento 2,5x. A: Evidenciando a cutícula (cut) e grânulos de vitelo (gv) praticamente íntegros. B: Apresenta o cório preservado (ch). C e D: As estruturas em destaque mostram o ovócito (ov) em menor tamanho, podendo indicar a presença do fungo. E: Vacuolização (va), sem presença de ovócitos. Indicado com a seta o conteúdo vitelogênico escoando para o interior do abdômen. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

5.5.2 Coloração Grocott

É possível notar a estrutura hifal do fungo (Figura 25), fêmeas retiradas dos marcadores de campo pertencente ao grupo tratado, indicado pela seta, enquanto na Figura 26 não há a coloração correspondente a das estruturas fúngicas, de carrapatos do grupo controle.

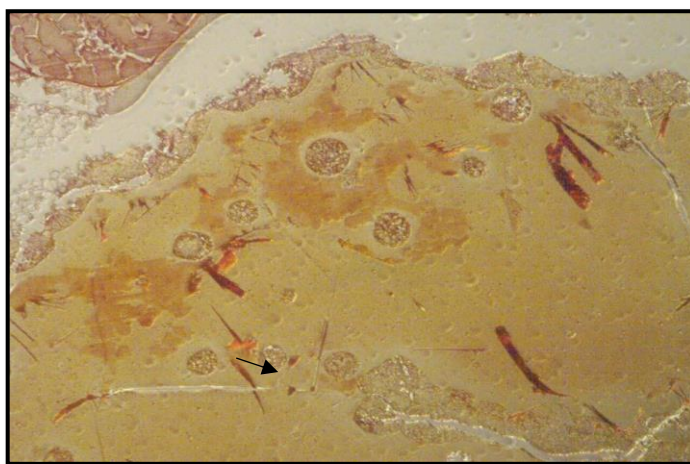


Figura 25- Presença do fungo em fêmea do grupo controle (indicado pela seta). Aumento 20x. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

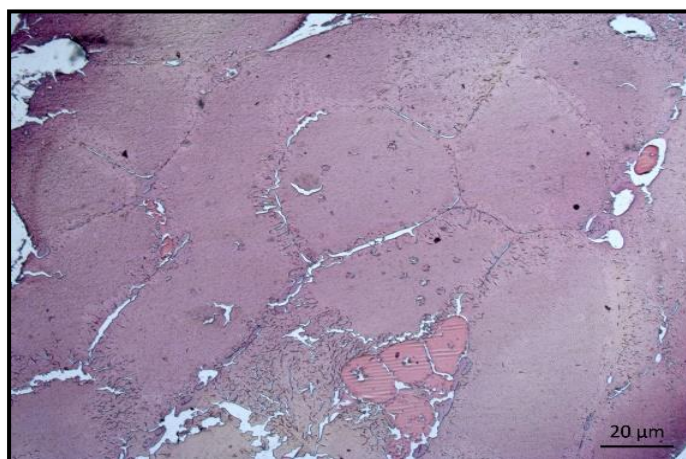


Figura 26-Fêmea do grupo controle sem a presença do fungo. Aumento 20x. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

5.5.3 Hibridização *in situ*

Na figura 27 (quadros A e B) estão os carrapatos do grupo controle. A totalidade do tecido está corado em roxo no quadro A, indicando a ausência do fungo. Já no quadro B, apesar do canto superior direito possuir uma cor mais escura, esta não está relacionada com o fungo.

Nos quadros C, D e E estão os carrapatos do grupo tratado. No quadro D, indicado por círculo, estão marcadas estruturas conidiais dos fungos. Enquanto nos quadros C e E, coradas em marrom e indicadas por setas, as estruturas em forma de hifa dos fungos.

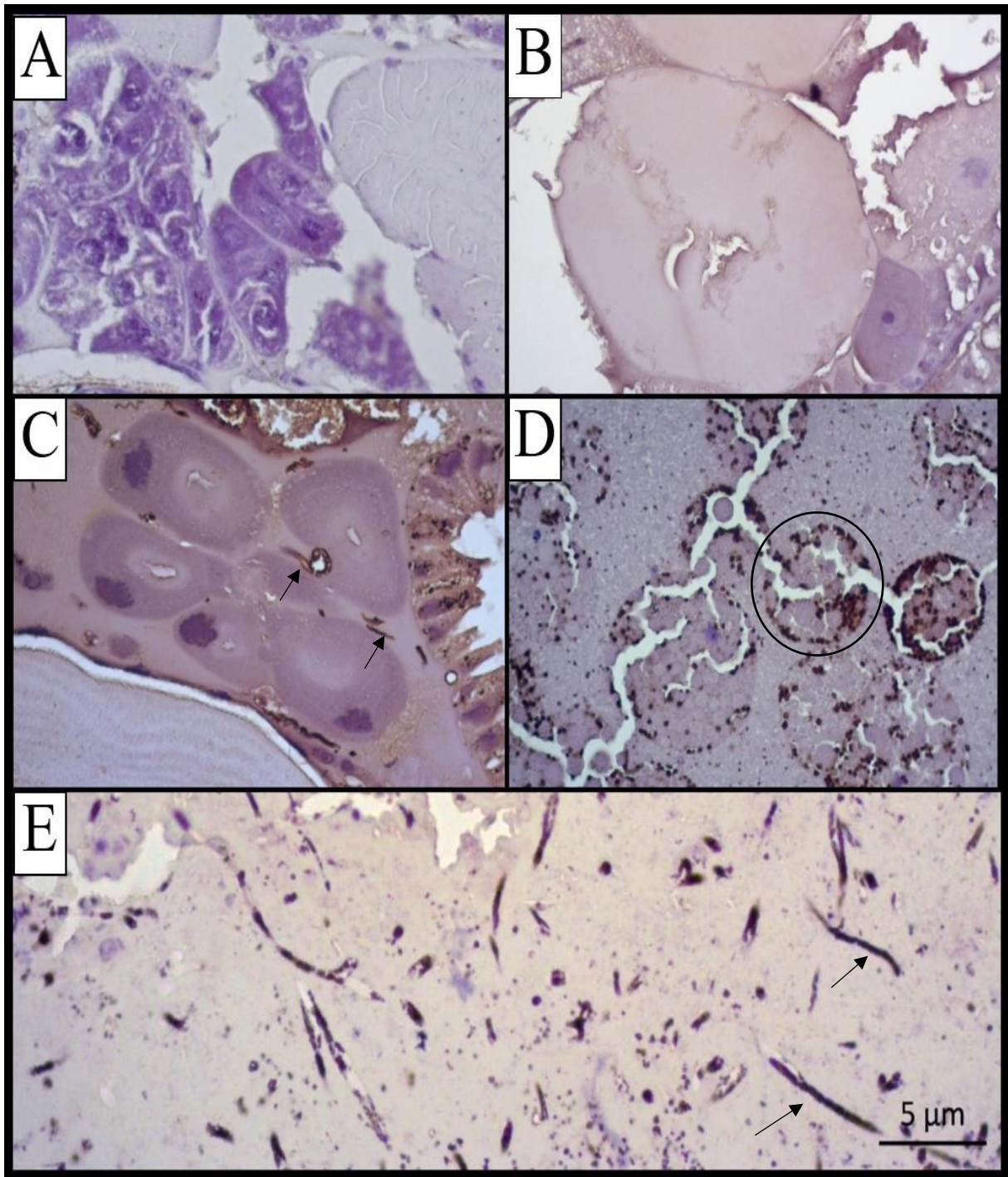


Figura 27: Fotomicrografias de fêmeas de carrapatos *R. microplus* em aumento de 40x. A e B: Grupos controle da técnica de hibridização *in situ* (barra 5µm), sem marcações. C: grupo tratado com marcações em estruturas fúngicas (hifas) coradas em marrom indicados por setas. D: grupo tratado com marcações em estruturas fúngicas (conídios) coradas em marrom circuladas e E: Grupo tratado com marcações em estruturas fúngicas (hifas) coradas em marrom indicadas por setas. Fonte: ALMEIDA, I.B. (2021)

6- DISCUSSÃO

6.1- Teste semi-campo

Diversos trabalhos demonstraram a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* em fêmeas ingurgitadas e larvas sob condições laboratoriais controladas (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; POLAR *et al.*, 2008; CAMARGO *et al.*, 2012; PERINOTTO *et al.*, 2013; MARCIANO *et al.*, 2013). O presente trabalho propôs um novo método de avaliação de eficácia no qual a exposição ao fungo ocorre a campo sobre as fêmeas ingurgitadas durante a totalidade de seu período de postura e sobre parte do período de incubação (marcadores), e em ambiente controlado, o restante da fase de incubação e a eclosão. Portanto, inclui-se pelo menos, sobre uma parte da fase não parasitaria do *R. microplus*, a influência das adversidades ambientais associada a ação patogênica do fungo. Apesar da parte final deste experimento se passar em ambiente controlado foi possível verificar a ação patogênica do fungo já que os dados obtidos demonstraram eficácia.

As temperaturas altas podem ser limitantes para a atuação do patógeno, afetando diretamente no seu desenvolvimento, sobrevida ou processo de infecção, assim como a umidade relativa baixa também interfere nas fases de germinação, penetração e disseminação dos fungos, a temperatura ideal para aplicação a campo está entre a faixa de 20 a 30°C (ALVES, 1998; GOETTEL; INGLIS, 2000). Ao analisarmos os dados de temperatura e umidade do presente trabalho, pode-se dizer que estes fatores não foram limitantes para a eficácia da solução fúngica, visto que os valores encontrados, apesar das pequenas variações, ainda se encontram em condições ideais.

Outro fator que pode ter contribuído para eficácia foi a utilização do óleo mineral na aplicação, pois estes protegem os conídios de dessecação, melhorando a eficiência dos fungos sobre a praga alvo (ALVES, 1998). A associação do fungo com os veículos oleosos foi capaz de manter o fungo viável por um período de até 60 dias após o tratamento (MARCIANO 2016)

Mediante aos resultados obtidos no experimento 1, de um modo geral, é possível verificar a ação do fungo *M. anisopliae* sobre os grupos tratados nos meses de novembro (2019) e março (2020) visto que a porcentagem de eficácia do produto foi alta variando de 66,13% a 88,05%.

Nos meses de outubro (2019) e abril (2020) os grupos tratados realizaram mais posturas comparadas ao grupo controle, impossibilitando o cálculo de inibição de postura. Porém, Farias *et al.* (1995) relataram que o período de postura das fêmeas pode ser maior quando expostas ao ambiente. Caso as fêmeas deste experimento ficassem expostas a mais tempo no solo, em ambos os grupos, a postura poderia ser maior. Portanto, fatores ambientais interferiram diretamente na postura destes grupos.

O baixo valor de eficácia obtido nos meses de outubro (2019) e abril (2020) está relacionado à ausência de eclosão, tanto nos grupos tratados quanto nos grupos controles, devido a alteração da temperatura da B.O.D., inviabilizando o desenvolvimento embrionário.

Bischoff *et. al* (2009) descreve o fungo *M. anisopliae* com as seguintes características: coloração branca em sua fase inicial, ficando amarela no desenvolvimento dos conídios e verde quando estes ficam maduros. Chandler *et al.*, (2000) afirma que a exteriorização dos conídios sob os cadáveres ocorre após a colonização e desenvolvimento no interior do hospedeiro. Essas características são possíveis de observar na figura 15, a qual a fêmea encontra-se coberta por fungo de coloração esverdeada, sugerindo a presença e ação de *M. anisopliae*. Apesar de haver mortalidade das fêmeas nos grupos controles não foi possível observar a presença de fungos através da coloração esverdeada.

A média da porcentagem de inibição de postura encontrada neste experimento está de acordo com ANGELO *et al.* (2012), que relata alteração na taxa reprodutiva, sintoma proveniente da ação patogênica do fungo *M. anisopliae* em carrapatos.

Camargo *et. al* (2016) realizaram um estudo sobre a eficácia da formulação fúngica a base de óleo mineral e o fungo *M. anisopliae* em aplicações diretas nos bovinos, obtendo um aumento de eficácia na segunda semana após o tratamento, atingindo picos de 90,53%. Contudo existem diferenças quanto ao tipo, dimensões e metodologias empregadas nos trabalhos que dificultam as comparações. No entanto, tendo em conta que 95% da população de *R. microplus* se encontra na pastagem, mesmo a menor média de eficácia neste trabalho (semana III com 72%), na qual as fêmeas foram colocadas no ambiente 15 dias após tratamento, significa maior eficiência no controle do carrapato comparado a eficiência de 90,53% obtida em aplicações diretas nos animais. Desta forma pode-se considerar que o tratamento das pastagens com fungos é mais eficiente do que realizados nos bovinos para o controle biológico do carrapato

A média de eficácia do produto na semana IV foi superior as demais chegando a 88%, sugerindo que houve a colonização do fungo na pastagem, sendo assim, durante 30 dias não houve queda de eficácia. Os dados obtidos destes experimentos servem como base para estabelecer o intervalo de aplicação dos fungos no pasto, visto que a eficácia se manteve alta durante todo o mês.

É possível dizer que o fungo não afetou organismos não alvo, pois apesar da diminuição da população, este fato aconteceu em ambos os grupos, não havendo influência do fungo sobre a mesofauna edáfica.

Com base nestes resultados pode-se sugerir o controle biológico do *R. microplus* com fungo *M. anisopliae* com aplicações no pasto em intervalos de 30 dias na dosagem de 2×10^{13} conídios por hectare.

6.2 Histologia

Os resultados dos testes histológicos apresentados neste estudo evidenciam as alterações morfológicas em ovários de *R. microplus* sob efeito do fungo *M. anisopliae*, em condições simuladas de campo. Estudos similares são escassos, possuindo maiores informações na literatura voltadas para o carrapato *R. sanguineus* (GARCIA *et al.* 2004, 2005, 2008).

Leemon e Jonsson (2016) realizaram um estudo relatando a ação da penetração do fungo *M. anisopliae* sob a cutícula do carrapato *R. microplus*. Para a visualização dos fungos foi utilizada a coloração com prata metenamina (GMS) da Grocott, os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados neste estudo referente a coloração do fungo. Porém houve diferença na contra-coloração. Neste trabalho a contra-coloração não ficou evidente, possivelmente pelo tempo de exposição ao corante.

Algumas alterações histológicas nos ovários das fêmeas encontradas neste estudo podem ser comparadas com as alterações causadas por outras formas de controle, como por exemplo as descritas por Sousa (2013) em carrapatos submetidos a tratamento com o extrato da planta *Melia azedarach*. Alterações e ausência dos grânulos, bem como a ausência do cório são características vistas em ambos os estudos.

Oliveira *et al.* (2008) foram os primeiros a testarem os efeitos de produtos químicos sintéticos no sistema reprodutor feminino. O estudo foi realizado com os carrapatos *R.*

sanguíneos imersos em fipronil. As alterações relatadas foram principalmente em relação ao número de oócitos afetados, número e tamanho dos vacúolos citoplasmáticos, a presença de figuras de mielina e microtúbulos citoplasmáticos e modificações nas organelas das células germinativas (OLIVEIRA et al., 2008, 2009, 2011). Dentre as modificações, as encontradas neste estudo foram apenas em relação ao tamanho dos vacúolos.

A técnica de Hibridização *in situ* foi empregada para detecção do DNA fúngico em tecidos de carrapatos, técnica utilizada para estas finalidades pela primeira vez no presente estudo.

Beninati *et al.* (2004) utilizaram a técnica de Hibridização *in situ* para marcar uma bactéria endossimbionte (*Candidatus Midichloria mitochondrii*) em tecidos do carrapato *Ixodes ricinus*, é notável a marcação das bactérias nos tecidos. A marcação ficou com a coloração semelhante às encontradas no presente estudo.

Já Bechara *et al.* (2011) detectaram o fungo *M. anisopliae* usando primers específicos em estágios imaturos infectados da mosca da fruta *Anastrepha fraterculus*, foi observado em microfotografias a presença do fungo na cutícula do hospedeiro em estruturas hifálicas estruturas conidiais, semelhante à do presente estudo (Figura 27). Dessa forma, sugere-se que os resultados obtidos neste estudo foram positivos para a presença do fungo *M. anisopliae* em tecidos do carrapato *R. microplus*.

Ao analisarmos os dados de inibição de postura dos experimentos 1 e 2 juntamente com os achados histológicos é possível afirmar que o fungo está presente nos tecidos e causam alterações no sistema reprodutor da fêmea de *R. microplus*.

7 CONCLUSÃO

- A eficácia do fungo permaneceu durante todos os trinta dias do experimento, sugerindo uma colonização estável do fungo na pastagem.
- As colorações de HE, Grocott e hibridização *in situ* cromogênica mostraram, respectivamente, alterações no sistema reprodutor das fêmeas, a presença de fungos nos tecidos internos do *R. microplus* e a identificação destes fungos como da espécie *M. anisopliae*.
- Organismos da mesofauna edáfica não sofreram interferência do fungo.
- Com base nestes resultados propomos o controle biológico do *R. microplus* com o fungo *M. anisopliae* (IBCB 425) com aplicações no pasto em intervalos de 30 dias na dosagem de 2×10^{13} conídeos por hectare.

8 REFERÊNCIAS

- ALVES, F. M.; BERNARDO, C. C.; PAIXÃO, F. R. S.; BARRETO, L. P.; LUZ, C.; HUMBER R. A.; FERNANDES, E. K. K. **Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: Viability (in vitro) and virulence (in vivo) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*.** Parasitology Research, v. 115, p. 1-11, 2016.
- ALVES, L. F. A.; FILHO, A. B. **Formulação de entomopatógenos - uma boa formulação é a base para o sucesso de um inseticida microbiano.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 1, p. 32-34, 1998.
- ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos.** DF: Embrapa Cerrado, p. 50, 2010
- ANDREOTTI R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil.** Dados eletrônicos-Embrapa Gado Corte. 2010;1(1):36
- ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.; GARCIA, M.. **CARRAPATOS: Protocolos e técnicas para estudo.** Brasília: Embrapa, 2016
- ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIENSE, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; MORAES, A. P. R.; TERRA, A. L. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*.** Veterinary Parasitology, v. 172, p. 317-322, 2010.
- ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; QUINELATO, S.; SÁ, F.A.; PONTES E.G.; BITTENCOURT V.R.E.P. **Neutral lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal infections** Parasitol. Res., 112 (2012), pp. 501-509, 10.1007/s00436-012-3159-4
- ASSENKA, S.P.; YOU, M.; SHY, C.H.; YAMAGISHI, J.; SAKAGUCHI, T.; ZHOU, J.; KIBE, M.K.; XUAN, X.; FUJISAKI K. **The use of a recombinant baculovirus expressing a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its potential application as a bioacaricide for tick control** Parasitol. Res., 98 (2005), pp. 111-118, 10.1007/s00436-005-0007-9
- BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination**

with Deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1149, p. 242–245, 2008.

BALASHOV, Y.S. **An atlas of ixodid tick ultrastructure: the female reproductive system.** Entomol. Soc. Am. Russ., 1938 p. 98-128

BARRETO, L. P.; LUZ, C.; MASCARIN, G. M.; ROBERTS, D. W.; ARRUDA, W.; FERNADES, E. K. K. **Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metharhizium anisopliae* s.l. on tick cuticle and artificial medium.** Jornal of Invertebrate Pathology, v. 138, p 94-103, 2016.

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

BECHARA, I. J., DESTÉFANO, R. H., BRESIL, C. & MESSIAS, C. L. **Histopathological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae).** Braz J Biol. 71 (1): 91-98, 2011

BENINATI, T., LO, N., SACCHI, L., GENCHI, C., NODA, H., & BANDI, C. **A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*.** Applied and environmental microbiology, 70(5), 2596–2602. doi:10.1128/aem.70.5.2596-2602.2004, 2004.

BEYS DA SILVA, W.O.; SANTI, L.; CORRÊA, A.P.F.; SILVA, L.A.D.; BRESCIANI, F.R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. **The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle** Fungal Biol., 114 (2010), pp. 911-916, [10.1016/j.funbio.2010.08.007](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.007)

BEYS-DA-SILVA, W. O. **O complexo lipolítico de *Metarhizium anisopliae* e sua relação com o processo de infecção de hospedeiros artrópodes.** 2009. 165p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BEYS-DA-SILVA, W.O.; ROSA, R.L.; BERGER, M.; COUTINHO-RODRIGUES, C.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A., BITTENCOURT, V. R. E. P; SANTI, L. **Updating the**

application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Exp Parasitol. (2020) 208:107812 10.1016/j.exppara.2019.107812

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

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

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. Revista Universidade Rural.Série Ciências da Vida, v. 16, p. 49–55, 1994.

BLANFORD, S.; THOMAS, M. B. Host thermal biology: the key to understanding host-pathogen interactions and microbial pest control?. Agricultural and Forest Entomology, v. 1, p. 195–202, 1999.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61° N to 54° S. J. Invertebrate Pathology, v. 78, p. 98–108, 2001.

BURGES, H. D. Safety: safety testing and quality control of microbial pesticides. In: Burges H. D. Microbial control of pests and plant diseases. Academic Press, 1981, p.737-767.

CAMARGO, M. G. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: testes em condições laboratoriais e a campo. (2014) 60 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. Veterinary Parasitology, v. 188, p. 140–147, 2012.

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

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.; ***Metarhizium anisopliae* para controle de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em condições de campo.** Veterinario. Parasitol. , 223 (2016) , pp. 38 - 42 , 10.1016 / j.vetpar.2016.04.014 Artigobaixar PDFVer registro no ScopusGoogle Scholar

CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M.B. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Chapter 3. In: CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. (Eds.). ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência.*** Medicina Veterinária, São Paulo, 2008.169 p.

CASSIANO, L. L. **Implementação de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de transmissão para pesquisa de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos.** Dissertação de Mestrado. Programa Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico de São Paulo. 2015.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J.R.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M.; SCHUMAKER, T.T.S. **Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays.** Veterinary Parasitology (Print), v. 173, p. 300-306, 2010.

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

COOK, R. J.; BRUCKART, W. L; COULSON, J. R.; GOETTEL, M. S.; HUMBER, R. A.; LUMSDEN, R. D.; MADDOX, J. V.; MCMANUS; M. L.; MOORE, L.; MEYER, S. F. **Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation.** Biological Control, v.7, p. 333-351, 1996

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. **Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types.** Biological Control, v. 43, p. 237–256, 2007.

FARIAS, N.A.; STOBBE, N.S.; CHRISTOVÃO, M. L.; PERRI, S.H.V.; COSTA, A.J.; **Influência das Condições Climáticas da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil,**

sobre os Estágios Não - Parasitários do Carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Rev Bras Parasitol Vet. 1995;4(2):67–77.

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

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

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; ALONSO-DÍAZ, M.A. **First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics**. Vet. Parasitol., 183 (2012), pp. 338-342, 10.1016/j.vetpar.2011.07.028

FLECHTMANN, C. A. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p.

FONSECA, A.H.; PEREIRA, M.J.S.; GÓES M.H.B.; SILVA J.X. **Distribuição espaço-temporal de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), analisada por geoprocessamento, no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Rev Bras Parasitol Vet. 2005;14(4):167

FRANCIS, J.; LITTLE, D.A. **Resistance of Droughtmaster Cattle To Tick Infestation and Babesiosis**. Aust Vet J. 1964;40(7):247–53.

FURLONG, J. **Carrapatos: soluções e problemas**. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 65p

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

FURLONG, J; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. **O carrapato dos bovinos e a resistência: temos que comemorar?** A Hora Veterinária, Porto Alegre, ano 27, n. 159, p. 1-7, 2007.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABO, M. P. J.; MOCHI, D. A.; SIMI, L. D.; CARVALHO, W. M.; TSURUTA, S. A.; BARBOSA, J. C. **Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil**. Veterinary Parasitology, v. 181, p. 267-273, 2011

GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. da S.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. **Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Brasília: Embrapa, 2019.

GOETTEL, M. S.; HAJEK, A. E.; SIEGEL, J. P.; EVANS, H. C. **Safety of fungal biocontrol agents**. In: Butt TM, Jackson C, Magan N. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Wallingford. UK: CABI International. 2001. p. 347-376.

GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D.; WRAIGHT, S. P. Fungi. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000. p. 255-282.

GOETTEL, M. S.; JARONSKI, S. T. **Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts**. Memoirs of the Entomological Society of Canada, v. 171, p. 83-99, 1997.

GOETTEL, M. S.; POPRAWSKI, T. J.; VANDENBERG, J. D.; LI, Z.; ROBERTS, D. W. **Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents**. In: Laird M, Lacey, L.A; Davidson, E.W. editors. Safety of microbial insecticides. Boca Raton, CRC Press. 1990. p. 209-232.

GOLO, P. S. *Metarhizium* spp.: **Caracterização de isolados com potencial para biocontrole de pragas**. 2014. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

GONZÁLES J.C., SILVA N.R., FRANCO N., PEREIRA I.H.O. **O Carrapato dos Bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): Revisão Histórica e Conceitual**. A Hora Veterinária. 2002;21(125):23–8.

GONZALES, J. C. **O controle dos carrapatos do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995.

GONZALES, J. C., Silva, N. R., Franco, N. (1974) **A vida livre do *Boophilus microplus***. Arq. Fac. Vet. UFRGS. RG. 3: 21-28.

GONZÁLES, J.C. **O Controle do Carrapato do Boi**. 1º ed. Porto Alegre: Edição do Autor; 1993. 80 p.

GRIESANG, F; SILVA, V.L.; WILDNER, L.P.; SORDI, R. **Influência do cultivo de adubos verdes na dinâmica populacional da mesofauna edáfica em área manejada sob plantio direto**. Revista Brasileira de Agroecologia, [S.l.], v. 11, n. 2, junho (2016). ISSN 1980-9735.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. **Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil**. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 23, p. 150-156, 2014.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001. 217 p.

GULVIK, M.E. Mites (Acari) **As Indicators of Soil Biodiversity and Land Use Monitoring: a Review**. – Pol. J. Ecol. 55(3): 415-440, 2007.

HALL, R. A.; ZIMMERMANN, G.; VEY, A. **Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides**. Entomophaga, v. 27, p. 121-127, 1982.

HEIMPEL, A. M. **Safety of insect pathogens for man and vertebrates**. In: BURGESS, H. D.; HUSSEY, N. W. Microbial control of insects and mites. London: Academic Press: 1971. p. 469-489.

HIGA, L.O. S; GARCIA, M.V; BARROS, J.C; KOLLER, W.W; ANDREOTTI, R. **Estado de resistência aos acaricidas do *Rhipicephalus microplus* no Brasil: uma visão da literatura** Med Chem 5 (7): 326-333.2015.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L. **Influence of ultravioletlight protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana***. Biological Control, v.5 p. 581–590, 1995.

KAAYA, G. P.; SAMISH, M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. **Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions**. Experimental and Applied Acarology, v. 55, p. 273-281, 2011.

KELLER, S.; ZIMMERMANN, G. **Mycopathogens of soil insects**. In: WILDING N, COLLINS, N. M; HAMMOND, P. M; WEBBER, J. F. Insect-fungus interactions. London: Academic Press. 1989. P. 239-270.

KLAFKE, G.M.; ALBUQUERQUE, T.A.; MILLER, R.J.; SCHUMAKER, T.T.S. **Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil**. Veterinary Parasitology (Print), v. 168, p. 97-104, 2010.

KLAFKE, G.M; LIS LE GALL, V; TORRES, T.T. **Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. SCiEnTifiC Reports 8:12401. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, 05508-090, São Paulo, Brazil.2018.

KOLLER, W.W.; HIGA, S.O.L.; ZIMMERMANN, P.N.; OSHIRO, M.L.; ANDREOTTI, R. **Resistência dos carrapatos aos acaricidas**, p. 148-150 Revista EMBRAPA. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinas, Campo Grande – MS, 2019.

LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990, 259p.

LIMA, E. A. L. A. **Aspectos taxonômicos e citológicos de Hiphomicetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos**. Memórias de Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, p. 17-20, 1989.

MA, M.; CHEN, Z., LIU, A.; REN, Q.; LIU, J.; LIU, Z.; LI, Y.; YIN, H.; GUAN, G.; LUO, J. **Biological parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) fed on rabbits, sheep, and cattle** Korean J. Parasitol., 54 (2016), pp. 301-305, 10.3347/kjp.2016.54.3.301

MASCARIM, G. M.; QUINTELA, E. D. **Técnica de Produção do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para Uso em Controle Biológico**. Documentos 289. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 17p.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa, MG: Epamig, 2010. p. 169–195.

MC CLATCHIE, G. V.; D. MOORE, R. P.; BATEMAN; C. PRIOR. **Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations**. Mycological Research, v. 98, p. 749-756, 1994.

MESSIAS, C. L. **Fungos, sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 84, supl. III, p. 57-59, 1989.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Gráfica-Editora Michalany, 1990. p.40-112

MOORHOUSE, D.E.; TATCHELL, R.J. **The feeding processes of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini): A study in host-parasite relations.** Part I. Attachment to the host. Parasitology. 1966;56:623–32.

MURREL, A.; BARKER, S. C. **Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae).** Systematic Parasitology, v. 56, p.169-172, 2003.

NUÑEZ, J. L.; MUÑOZ, C. M. E.; MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*: La Garrapata Común del Ganado Vacuno.** Buenos Aires: Hemisferio Sul, 1982. 184p

ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. **Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas.** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.6, n.2, p.79-82, mai. /Ago. Maringá, 2011.

PERINOTTO, W. M. S.; CAMARGO, M. G.; GÔLO, P. A.; ANGELO I. C.; QUINELATO, S.; MONTEIRO, C. M. O.; SÁ, F. A.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCIANO, A. F.; FIOROTTI J. P.; BITTENCOURT V. R. E. P. **Controle de *Dermacentor nitens* utilizando uma formulação comercial a base de *Metarhizium anisopliae*.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v. 35 (Supl.2), p. 35-42, 2013.

POLAR, P; MOORE, D; KAIRO, M. T. K.; RAMSUBHAG, A. **Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges.** Experimental and Applied Acarology, v. 46, p.119–148, 2008.

POWELL, R. T.; REID, T. J. **Project tick control.** Queensland Agricultural Journal, v. 108, p. 279-300, 1982.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P. **Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytesplutus* (Coleoptera : Curculionidae).** Journal of Invertebrate Pathology, v. 52 p. 66–72, 1988.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. **Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 87, p. 77- 83, 2004.

RATH, A. C.; KOEN, T. B.; YIP, H. Y. **The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture.** Mycological Research, v. 96, p. 378- 384, 1992.

Referências

ROCHA, U. R. **Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini).** Boletim Técnico da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, n. 3, 1984. 1-32 p.

RODDAM, L. F.; RATH, A. C. **Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 69, p. 285–288, 1997.

SAIK, J. E.; LACEY, L. A.; LACEY, C. M. **Safety of microbial insecticides to vertebrates domestic animals and wildlife.** In: LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. Safety of microbial insecticides. Boca Raton, FL: CRC Press. 1990. p. 115-132.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER I. **Biological control of ticks** *Parasitology*, 129 (2004), pp. S389-S403, 10.1017/s0031182004005219

SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. **Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions.** Veterinary Parasitology, v. 206, p. 258–266, 2014.

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

SHADDUCK, J. A.; ROBERTS, D. W.; LAUSE, S. **Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*. Preliminary results.** Environmental Entomology, v. 11, p. 189-192.

SIEGEL, J. P.; SHADDUCK, J. A. **Safety of microbial insecticides to vertebrates humans.** In: LAIRD, M; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. Safety of microbial insecticides. Boca Raton, CA: CRC Press: 1990. p. 101-113.

SINGH, N.K.; GOOLSBY, J.A.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; MILLER, R.J.; THOMAS, D.B.; KLAFKE, G.M.; TIDWELL, J.P.; RACELIS, A.E.; GREWAL, P.S.; PEREZ DE LEON, A.A. **Efficacy evaluation of six entomopathogenic nematode species against engorged females**

of southern cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Southwest. Entomol., 43 (1) (2018), pp. 1-17, 10.3958/059.043.0119

SOCARRÁS A., **Mesofauna edáfica: indicador biológico de la calidad del suelo.** Pastos y Forrajes vol.36 no.1 Matanzas ene. 2013.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks.** vol. 1. New York: Oxford University Press, 1991. 447 p.

SONENSHINE, D.E. **Biologic of Ticks.** New York: Oxford University Press; 1993. 316 p.

ST LEGER, R.J. **Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil** J. Invertebr. Pathol., 98 (2008), pp. 271-276, 10.1016/j.jip.2008.01.007

STEINHAUS, E. **Concerning the harmlessness of insect pathogens and the standardization of microbial control products.** Journal of Economic Entomology, v. 50, p. 715-720, 1957.

TONUS, M. **Manejo integrado controla cigarrinhas em pastagens.** Revista Balde Branco, São Paulo, n. 421, 1999.

VERÍSSIMO, C. J. **Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil.** Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 11, p. 14-23, 2013.

VERÍSSIMOC. J. **Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil.** Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 11, n. 1, p. 14-23, 1 jan. 2013.

VESTERGAARD S., CHERRY A, KELLER S, GOETTEL M. **Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents.** In: HOKKANEN, H. M. T.; HAJEK, A. E. Environmental impacts of microbial insecticides. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers. 2003. p. 3562.

WAGLAND, B.M. **Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals.** Aust J Agric Res. 1978;29(2):401-9.

WALL R, SHEARER D. **Veterinary Ectoparasites: Pathology, Biology and Control.** Second Edi. United Kingdom: Blackwell Science; 2001. p. 181-185.

WALSTAD, J. D.; ANDESON, R. F.; STAMBAUGH, W. J.; **Effects of environmental condition on to species of muscardini fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae***, Journal Invertebrate Pathology, v. 16:p. 221-226, 1970.

WRAIGHT, S. P.; CARRUTHERS, R. I.; JARONSKI, S. T.; BRADLEY, C. A.; GARZA, C. J.; GALAINI; WRAIGHT, S. **Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii***. Biological Control, v. 17, p. 203–217, 2000

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