



Controle integrado de *Amblyomma sculptum* em zonas rurais

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Controle integrado de *Amblyomma sculptum* em zonas rurais

SHIRLEY BATISTA DE ARAÚJO SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Melhoria da Qualidade no Processo de Produção Agropecuária

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Cristina Mendes

**São Paulo
2019**

Eu **Shirley Batista de Araújo Silva**, 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 03/06/2019

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

Silva, Shirley Batista de Araújo.
Controle integrado de *Amblyomma sculptum* em zonas rurais. / Shirley
Batista de Araújo Silva. - São Paulo, 2019.
186 p.
doi: 10.31368/PGSSAAA.2019D.SS007

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: Marcia Cristina Mendes.
Versão do título para o inglês: Integrated control of *Amblyomma sculptum* in rural
areas.

1. *Amblyomma sculptum* 2. Controle Integrado de Pragas 3. Controle Biológico
4. Fungos Entomopatogênicos 1. Silva, Shirley Batista de Araújo II. Mendes,
Marcia Cristina III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/BibL/2019/007



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252

CEP 04014-002 - São Paulo - SP

secretariapg@biologico.sp.gov.br



INSTITUTO BIOLÓGICO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Shirley Batista de Araújo Silva

Título: Controle integrado de *Amblyomma sculptum* em zonas rurais

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Cristina Mendes

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Melhoria da Qualidade no Processo de Produção Agropecuária

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

* Prof^a Dr^a Marcia Cristina Mendes

*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

*Prof. Dr. José Eduardo Marcondes Almeida

*Instituição: Instituto Biológico, Campinas

Assinatura:

*Prof^a Dr. Adriano Pinter dos Santos

*Instituição: Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN

Dedico este trabalho à Deus, por ser essencial na minha vida, autor do meu destino, seu fôlego de vida me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um mundo de possibilidades!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por Seu infinito amor, por me guiar, me proteger e sempre me carregar em seus braços nos momentos mais difíceis.

À **Lina Batista de Araújo**, minha querida e amada mãe, que sempre me conduziu pelos caminhos do bem, me ensinando a ser cada dia melhor. Sem seu apoio e seus esforços eu não teria chegado até aqui. Obrigada por todo amor, carinho, dedicação, cuidado e paciência, ser sua filha é um privilégio! Te amo imensamente!

Ao **Paulo Teixeira de Araújo**, meu amado pai, que mesmo de longe tem vibrado em todas as minhas conquistas. Obrigada por seu amor e carinho.

Ao **José Maria Silva**, meu querido e amado marido, por todo amor, carinho, paciência e compreensão. Por seu apoio incondicional, não apenas nessa etapa como em todos os momentos que precisei. Estar ao seu lado é o melhor presente que eu poderia receber!

À **Márcia Cristina Mendes**, minha querida orientadora, por aceitar me orientar e por toda sua paciência, compreensão e sabedoria. Obrigada por acreditar e confiar em mim e por todo seu auxílio.

À **Maria Judite Bittencourt Fernandes**, minha querida mãe no mundo científico, por todas as oportunidades que você me deu desde o início, pois sem elas eu não estaria aqui, e por tudo que me ensinou. Obrigada pela sua amizade, apoio, auxílio e por se preocupar comigo. Sou imensamente grata a você por tudo!

À **Silvia Regina Galleti**, pela paciência, conselhos e ensinamentos de sempre. Obrigada pela sua amizade e apoio em toda essa jornada.

À **Isabela Cristina Simoni**, por ter me recebido bem desde o primeiro dia. Obrigada pelos conselhos, amizade e ensinamentos.

Ao **Dr. José Eduardo Marcondes Almeida**, por compartilhar seus valiosos conhecimentos, por ter acreditado e confiado em mim para realização deste trabalho, por ter me apresentado este mundo tão incrível do controle microbiano, e por aceitar participar desta etapa da minha formação acadêmica. Obrigada pelo auxílio, paciência e pelos ensinamentos de sempre!

Ao **Dr. Adriano Pinter dos Santos**, por aceitar participar desta etapa da minha formação acadêmica. Obrigada pelo apoio e ensinamentos.

Ao **Dr. Flávio Vieira Meirelles** e **Dr. Arlindo Saran Netto** Prefeitos do Campus Campus USP “Fernando Costa”, por terem aberto as portas para execução de parte deste trabalho. Obrigada pela confiança e por estarem a disposição para o que fosse preciso.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), por me apoiar e estar a disposição sempre.

Ao **André Valente de Sá**, do Campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, pelo total apoio que me concedeu. Obrigada pela paciência, confiança e ensinamentos.

A todos do Laboratório de Parasitologia Animal, minha segunda casa, **Paulo Henrique Sampaio, Fernanda Calvo Duarte e Leonardo Costa Fiorini**, pela paciência, disposição e dedicação de cada um em me apoiar nas coletas, nas revisões e correções deste trabalho, sem vocês não teria chegado até aqui, sou eternamente grata, assim como as demais meninas: **Elizabeth Sposito Filha, Edna Clara Tucci e Sueli Moda de Oliveira** por me receberem bem desde o meu primeiro dia. Todos são muito queridos e especiais para mim. Obrigada por fazerem meus dias mais leves, pelas conversas e risadas e por todo carinho, vocês são maravilhosos.

Aos estagiários **Felipe, Isabella, Thaís e Kauane**, por me ajudarem nas contagens, pelo apoio nas coletas, pela paciência e disposição. Obrigada por tudo.

À **Toyobo do Brasil**, na pessoa do **Dr. Minoru M. Takahashi**, Diretor Executivo da Divisão Salto, pelo fornecimento dos fungos para realização dos experimentos a campo, e por sempre se colocarem a disposição me auxiliando em tudo que precisei.

Ao **Excelentíssimo Sr. Prefeito da Estância Turística de Salto, José Geraldo Garcia**, pela oportunidade de ampliar o presente estudo no âmbito do Programa de Controle Integrado do Carrapato do Município de Salto.

À querida **Elizabeth González Patiño**, pela análise estatística, pela paciência e por dividir seus conhecimentos.

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. Vocês são muito especiais e tornaram meus dias ainda mais felizes. Obrigada por tudo.

Ao **Valmir Antônio Costa e Matheus Alves de Siqueira** do Instituto Biológico de Campinas, pela realização das micrografias. Obrigada por me apoiarem e estarem a disposição sempre.

Aos **alunos da pós-graduação** do Instituto Biológico 2017-2019, pelo companheirismo, amizade e convivência nesses dois anos.

Aos meus pastores **Renato de Jesus Oliveira, Denise dos Santos D. Oliveira** e toda **família da Igreja P. Visão da Promessa**, pelas orações, ensinamentos, conselhos e por vibrarem a cada conquista minha. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao **Manoel Lino Silva e Leidivan Cazimiro Silva**, meus queridos cunhados, e seus três filhos, meus queridos sobrinhos, por serem presentes em minha vida e por todos os momentos que passamos juntos. Obrigada por todo apoio e por serem parte dessa família que eu amo!

À **Yasmin Ferreira Batista**, minha querida sobrinha, por todo amor e carinho. Pela confiança, amizade e por todas as risadas, que não são poucas. Obrigada por fazer parte da minha vida, pois sem você ela não seria tão colorida e animada.

Ao **Douglas V. dos Santos** e a querida **Marlene de Oliveira dos Santos** minha mãe de consideração por terem me recebido tão bem desde sempre e terem me acolhido como se fosse da família. Obrigada pela amizade, paciência, carinho, conversas, risadas, auxílio e por se preocuparem comigo. Sou imensamente grata à vocês por tudo!

À **Karina Araújo dos Anjos**, minha pequena grande amiga, meu presente ao iniciar o mestrado. Obrigada por trilhar esse caminho comigo. Obrigada pelas nossas conversas,

inclusive na madrugada, pelas aulas e trabalhos que compartilhamos. Que a sua presença seja sempre constante e a nossa amizade eterna.

À **Roselenny Batista de Araújo, Vanessa Batista de Araújo e Rogério Batista de Santana**, meus queridos irmãos, por serem base em toda a minha caminhada, por todo carinho e amor que vocês me proporcionam mesmo de longe. Obrigada por fazerem parte da minha vida em todos os momentos. Amo vocês imensamente.

À **Janne Batista de Araújo**, minha querida e amada irmã, sei que de onde estiver esta torcendo e vibrando por cada conquista minha. Saudades eternas, um dia nos encontraremos.

À **Rosângela de Sales S. Rodrigues**, pela paciência, disposição e pelo apoio na formatação deste trabalho, assim como, **Jackeline Almeida de Mello e Maria Francisca Carvalho dos Santos**, minhas queridas “elementas” e irmãs, por toda amizade e apoio. Agradeço pelas voltas que a vida deu e fez com que nos encontrássemos na Biomedicina. Não importa o momento, se é bom ou ruim, estamos e estaremos sempre unidas. Obrigada por torcerem sempre por mim e estarem presente em mais essa etapa.

À toda **Família Santana**, pelo amor, carinho, apoio, e incentivo de todos os dias. Obrigada por estarem presentes sempre e por vibrarem em todas as minhas conquistas. Amo vocês imensamente!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pela concessão da bolsa.

E a todos que contribuíram e compartilharam dessa jornada comigo direta ou indiretamente. Muito obrigada!

*“A fé transforma as
dificuldades em possibilidades”*

*“Porque melhor é a sabedoria
do que os rubis, e de tudo o que se
possa ambicionar, absolutamente
nada se compara a ela”*

(Provérbios 8:11)

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | iii |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| CAPÍTULO 1 | v |
| CAPÍTULO 2 | v |
| CAPÍTULO 3 | v |
| CAPÍTULO 4 | vii |
| CAPÍTULO 5 | viii |
| LISTA DE TABELAS | x |
| CAPÍTULO 2 | x |
| CAPÍTULO 3 | x |
| CAPÍTULO 4 | xi |
| CAPÍTULO 5 | xii |
| LISTA DE SIGLAS, UNIDADES E ABREVIATURAS | xiii |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.2 OBJETIVOS | 4 |
| 1.2.1 GERAL..... | 4 |
| 1.2.2 ESPECÍFICOS..... | 4 |
| 1.3 REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 1.3.1 GÊNERO <i>Amblyomma</i> | 5 |
| 1.3.1.1 Biologia e hospedeiros do <i>Amblyomma sculptum</i> | 6 |
| 1.3.1.2 Importância para a saúde humana e animal | 6 |
| 1.3.1.3 Controle | 9 |
| 1.3.2 MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS..... | 10 |
| 1.3.3 CONTROLE DE PRAGAS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS..... | 12 |
| 1.3.3.1 Fungo <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin | 12 |
| 1.3.3.2 Fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff.) Sorokin | 14 |
| 1.3.3.3 Estudos sobre o controle biológico de carrapatos de interesse veterinário | 15 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 17 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 2 – MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS – FAZENDA DA PONTE – ITU | 28 |
| RESUMO | 28 |
| 2.1 INTRODUÇÃO | 29 |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 2.2.1 AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS – FAZENDA DA PONTE - ITU | 31 |
| 2.2.2 AVALIAÇÃO DA INFESTAÇÃO | 31 |
| 2.2.3 COLETAS E CONTAGENS DE CARRAPATOS | 33 |
| 2.2.4 MANEJO DOS ANIMAIS | 35 |
| 2.2.5 TESTE DE BIOCARRAPATICIDOGAMA | 35 |
| 2.2.6 TREINAMENTO DOS FUNCIONÁRIOS | 36 |
| 2.2.7 MANUTENÇÃO DOS GRAMADOS | 37 |
| 2.2.8. MONITORAMENTO | 38 |
| 2.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 38 |
| 2.3 RESULTADOS | 39 |
| 2.3.1 PARASITOS CAPTURADOS | 39 |
| 2.3.2 HOSPEDEIROS PRESENTES NA PROPRIEDADE | 39 |
| 2.3.3 PRODUTO QUÍMICO INDICADO | 40 |
| 2.3.4 DETERMINAÇÃO DE LOCAIS PARA CAPTURA DE CARRAPATOS | 40 |
| 2.3.5 MEDIDAS DE MANEJO DAS PASTAGENS E DOS ANIMAIS | 42 |
| 2.3.6 AVALIAÇÃO DO <i>Amblyomma sculptum</i> DOS NÍVEIS DE INFESTAÇÃO – PARÂMETROS TEMPORAIS E ESPACIAIS | 43 |
| 2.4 DISCUSSÃO | 48 |
| 2.5 CONCLUSÕES | 51 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |
| CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE <i>Amblyomma sculptum</i> (Ácari: Ixodidae) - CAMPINAS – SP | 54 |
| RESUMO | 54 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 56 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS | 57 |
| 3.2.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE DOS FUNGOS <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Beauveria bassiana</i> PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Amblyomma sculptum</i> EM CONDIÇÕES DE CAMPO | 57 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2.1.1 | Demarcação da área experimental | 57 |
| 3.2.1.2 | Coletas de carrapatos | 58 |
| 3.2.1.3 | Aplicação dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> | 58 |
| 3.2.1.4 | Marcadores | 61 |
| 3.3 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 64 |
| 3.4 | RESULTADOS | 65 |
| 3.4.1 | ARMADILHAS | 65 |
| 3.4.1.1 | Análise descritiva dos testes nas parcelas tratadas com diferentes dosagens | 65 |
| 3.4.1.2 | Análise geral dos testes totais nas parcelas tratadas com diferentes dosagens | 68 |
| 3.4.1.3 | Ajuste de modelos estatísticos | 73 |
| 3.4.2 | MARCADORES | 76 |
| 3.4.2.1 | Análise descritiva dos testes com marcadores | 77 |
| 3.4.2.2 | Análise geral dos testes totais com marcadores | 79 |
| 3.4.2.3 | Ajuste de modelos para marcadores | 84 |
| 3.5 | DISCUSSÃO | 88 |
| 3.6 | CONCLUSÕES | 92 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |
| | CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DO FUNGO <i>Beauveria bassiana</i> NA DOSE DE 5×10¹³ CONÍDIOS/HA EM TESTE A CAMPO NO CONTROLE DE <i>Amblyomma sculptum</i> (Acari: Ixodidae) - Campinas – SP | 98 |
| | RESUMO | 98 |
| 4.1 | INTRODUÇÃO | 99 |
| 4.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 100 |
| 4.2.1 | LOCAL DO EXPERIMENTO | 100 |
| 4.2.2 | DEMARCAÇÃO DA ÁREA PARA APLICAÇÃO DO FUNGO <i>B. bassiana</i> | 100 |
| 4.2.3 | COLHEITAS DE CARRAPATOS | 101 |
| 4.2.4 | APLICAÇÃO DO FUNGO <i>B. bassiana</i> | 101 |
| 4.2.5 | MONITORAMENTO | 101 |
| 4.2.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 102 |
| 4.3 | RESULTADOS | 103 |
| 4.4 | DISCUSSÃO | 116 |
| 4.5 | CONCLUSÕES | 119 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 120 |

| | |
|--|-----|
| CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE MANEJO INTEGRADO COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Beauveria bassiana</i> PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Amblyomma sculptum</i> NO CAMPUS USP DE PIRASSUNUNGA – SÃO PAULO | 123 |
| RESUMO | 123 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 124 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 126 |
| 5.2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO..... | 126 |
| 5.2.2 AVALIAÇÃO DE INFESTAÇÃO | 126 |
| 5.2.3 PALESTRA DE CAPACITAÇÃO | 126 |
| 5.2.4 COLETA DE CARRAPATOS..... | 127 |
| 5.2.5 APLICAÇÃO DOS FUNGOS <i>B. bassiana</i> E <i>M. anisopliae</i> | 128 |
| 5.2.6 MONITORAMENTO | 129 |
| 5.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 129 |
| 5.3 RESULTADOS | 131 |
| 5.3.1 ANIMAIS ENCONTRADOS NA PROPRIEDADE | 141 |
| 5.3.2 PASTAGENS E ANIMAIS..... | 142 |
| 5.4 DISCUSSÃO | 148 |
| 5.5 CONCLUSÕES | 153 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 154 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 158 |

ARAÚJO, S.B. CONTROLE INTEGRADO DE *Amblyomma sculptum* EM ZONAS RURAIS. São Paulo. 2019. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

Amblyomma sculptum, conhecido como carrapato-estrela no Brasil em sua fase adulta, pertence ao complexo *A. cajennense*, sendo capaz de parasitar diversos hospedeiros inclusive o homem. Esta espécie apresenta grande importância na saúde pública e veterinária pela capacidade de transmitir uma variedade de patógenos aos seus hospedeiros, principalmente *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa Brasileira. O presente trabalho teve como objetivos estabelecer um sistema de controle integrado do carrapato *A. sculptum* na Fazenda da Ponte, no município de Itu – SP, e desenvolver testes de campo com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (isolado IBCB 425) e *Beauveria bassiana* (isolado IBCB 66) contra carrapatos do gênero *Amblyomma*. Os testes de campo com fungos foram realizados na Fazenda Mato Dentro do CAPSA/ IB, Campinas - SP; e no Campus “Fernando Costa” da Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP. Adotou-se um sistema de controle integrado dos carrapatos na Fazenda da Ponte, através do manejo dos animais, gramados e pasto. Foram avaliados seis locais mensalmente quanto à infestação de carrapatos no período de junho de 2015 a julho de 2017. Devido ao manejo adotado, houve redução de infestação do carrapato *A. sculptum*. No experimento realizado na Fazenda Mato Dentro foram demarcadas dois conjuntos de parcelas de 6m por 6m e os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram aplicados nas doses de 5×10^{11} , 5×10^{12} e 5×10^{13} conídios/ha, enquanto que as parcelas testemunhas receberam apenas água. Adicionalmente, três marcadores contendo 10 ninfas e outros três com 10 adultos foram postos em cada parcela. Estes marcadores foram recuperados no primeiro dia após tratamento e os demais a cada semana. Armadilhas de dióxido de carbono foram lançadas e a mortalidade dos indivíduos capturados foi avaliada nos dias 1, 3 e 10. A mortalidade foi significativa para todas as doses testadas quando comparadas ao controle. A CL_{50} para o fungo *B. bassiana* foi de $8,19 \times 10^{12}$ conídios/ha para adultos e $1,69 \times 10^{12}$ conídios/ha para ninfas, enquanto que para o fungo *M. anisopliae* a CL_{50} foi de $5,93 \times 10^{12}$ conídios/ha para adultos e $3,82 \times 10^{12}$ conídios/ha para ninfas. A dosagem de 5×10^{13} conídios/ha promoveu a maior mortalidade dos carrapatos na avaliação do décimo dia. Com relação aos indivíduos capturados nas parcelas tratadas com *B. bassiana*, foram obtidos percentuais de

mortalidade de 92,9% para adultos e 96% para ninfas. Para *M. anisopliae*, a mortalidade foi de 89,2% para adultos e 80% para ninfas. Os marcadores se revelaram um bom modelo para avaliação da eficácia, obtendo-se mortalidade acima de 96,3% para adultos e 100% para ninfas para ambos os fungos. Um segundo estudo foi realizado na Fazenda Mato Dentro de março de 2017 a março de 2018, utilizando a dosagem de 5×10^{13} conídios/ha para o fungo *B. bassiana* contra *A. sculptum*. Na área de experimento, foram demarcadas duas parcelas de 144 m². A mortalidade foi avaliada de acordo com o experimento anterior. O décimo dia após a captura foi o melhor dia para avaliação de mortalidade. O pico de mortalidade ocorreu ao redor de 30 dias decorridos da aplicação do fungo *B. bassiana*. A dosagem de 5×10^{13} conídios/ha do fungo *B. bassiana* foi efetiva contra *A. sculptum*, controlando todos os estágios de desenvolvimento do parasito no campo, com percentuais de mortalidade acima de 70% nos períodos de chuva. *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram utilizados num terceiro teste realizado no Campus “Fernando Costa”, de novembro de 2017 a novembro de 2018. Ambos os fungos foram aplicados em piquetes de 1,0 ha na concentração de 2×10^{13} conídios/ha, enquanto o controle foi pulverizado com o volume correspondente de água. Armadilhas de dióxido de carbono foram lançadas numa base mensal e a mortalidade foi verificada de acordo com a metodologia prévia. A mortalidade para *B. bassiana* foi de, 91,7%, 56,9% e 63,0% para carrapatos adultos, ninfas e larvas, respectivamente; enquanto que para *M. anisopliae* foi de 100%, 56,9% e 100% para carrapatos adultos, ninfas e larvas, respectivamente. Neste teste os fungos foram suspensos em água com o auxílio de um emulsificante alimentício. Esta formulação revelou-se prática e efetiva para aplicação no campo para ambos os fungos. Ambos os isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* demonstraram ter potencial entomopatogênico e foram eficazes para utilização a campo no controle de *A. sculptum*.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*. Controle Integrado de Pragas. Controle Biológico. Fungos Entomopatogênicos.

ARAÚJO, S.B. INTEGRATED CONTROL OF *Amblyomma sculptum* IN RURAL AREAS. São Paulo. 2019. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

Amblyomma sculptum, known as star tick in Brazil during its adult phase, belongs to the *A. cajennense* complex and is capable of parasitizing several hosts, including humans. This species has great importance in public health and veterinary medicine due to its ability to transmit a variety of pathogens to its hosts, specially *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of Brazilian Spotted Fever. The current work had as objectives establishing an integrated control system of the *A. sculptum* tick in the da Ponte farm, in the municipality of Itu – SP, and developing field trials with the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (isolate IBCB 425) and *Beauveria bassiana* (isolate IBCB 66) against ticks of the genus *Amblyomma*. Field trials with fungi were conducted at the Mato Dentro farm of CAPSA/ IB, Campinas – SP, and the “Fernando Costa” Campus of the University of São Paulo, Pirassununga - SP. An integrated tick control system was adopted in the da Ponte farm, my means of management of animals, lawns and pastures. Six locations were evaluated monthly for tick infestation in the period from June 2015 to July 2017. Due to the management adopted, there was a reduction of the infestation of the tick *A. sculptum*. In the trial conducted at the Mato Dentro farm, two sets of four 6m by 6m parcels were demarcated and the fungi *M. anisopliae* e *B. bassiana* were applied at 5×10^{11} , 5×10^{12} and 5×10^{13} conidia/ha, while the control parcels received only water. In addition to that, three markers containing 10 nymphs and another three with 10 adult ticks were laid on each parcel. These markers were recovered on the first day after treatment and on a weekly basis days thereafter. Carbon dioxide tick traps were laid and the mortality of captured individuals was evaluated on days 1, 3 and 10. Mortality was significant for all dosages tested when compared to the control. LC_{50} for *B. bassiana* was 8.19×10^{12} conidia/ha for adult ticks and 1.69×10^{12} conidia/ha for nymphs, while for *M. anisopliae* LC_{50} was 5.93×10^{12} conidia/ha for adult ticks e 3.82×10^{12} conidia/ha for nymphs. The dosage of 5×10^{13} conidia/ha promoted the greatest tick mortality at the 10th day evaluation. Regarding individuals captured on the parcels treated with *B. bassiana*, mortality percentiles of 92.9% for adult ticks and 96% for nymphs were obtained. For *M. anisopliae*, mortality was 89.2% for adult ticks and 80% for nymphs. Markers proved to be a good model to evaluate efficacy, obtaining mortality above 96.3% for

adult ticks and 100% for nymphs for both fungi. A second trial was conducted at the Mato Dentro farm from March 2017 to March 2018, using *B. bassiana* at the dosage of 5×10^{13} conidia/ha against *A. sculptum*. At the experimental area, two 144 m² parcels were demarcated. Mortality was evaluated according to the previous trial. The 10th day after capture was the best day to observe mortality. Tick mortality peaked around 30 days after the application of *B. bassiana*. The dosage of 5×10^{13} conidia/ha of the fungus *B. bassiana* was effective against *A. sculptum*, controlling all developmental stages of the parasite in the field, with mortality percentiles above 70% during the rainy season. Both *B. bassiana* and *M. anisopliae* were used in a third trial conducted at the “Fernando Costa” Campus, from November 2017 to November 2018. Both fungi were applied on 1.0 ha paddocks at the concentration of 2×10^{13} conidia/ha, while the control paddock was sprayed with the corresponding volume of water. Carbon dioxide tick traps were laid at a monthly basis and mortality was checked according to the previous methodology. Mortality for *B. bassiana* was 91.7%, 56.9% and 63.0% for adult ticks, nymphs and larvae, respectively; while for *M. anisopliae* it was 100%, 56.9% and 100% for adult ticks, nymphs and larvae, respectively. In this trial, fungi were suspended in water with the aid of a food emulsifier. This formulation was practical and effective for field application for both fungi. Both isolates of the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* exhibited entomopathogenic potential and were effective to be used on the field for the control of *A. sculptum*.

Keywords: *Amblyomma sculptum*. Integrated Pest Control. Biological control. Entomopathogenic fungi.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Mapa do Brasil demonstrando a distribuição geográfica de *Amblyomma cajennense* sensu strictu, *Amblyomma cajennense* sensu lato e *Amblyomma sculptum* 5

Figura 2 - Casos confirmados de Febre Maculosa Brasileira no estado de São Paulo.....8

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Lesões cutâneas decorrentes da fixação de um grande número de carrapatos nos membros inferiores.....29

Figura 2 - Fazenda da Ponte – Itu – SP.....31

Figura 3 - Locais onde foram feitas vistorias Fazenda da Ponte – Itu – SP32-33

Figura 4 - Armadilha para atração de carrapatos.....34

Figura 5 - Armadilhas acondicionadas em sacos plásticos, A; Contagem de larvas, ninfas e adultos, B; Identificação dos carrapatos, C.....34-35

Figura 6 - Treinamento de funcionários - Itu -SP.....37

Figura 7 - Gramados altos em torno das casas - Itu -SP.....37

Figura 8 - Número estimado de larvas, ninfas e adultos do carrapato estrela nos locais rotulados de A a F no período entre junho de 2015 e julho de 2017.....45-46

Figura 9 - Equinos recolocados na área “rio”, Itu – SP.....46

Figura 10 - Números médios estimados de larvas, ninfas e adultos do carrapato estrela na fazenda entre junho de 2015 e julho de 2017.....47

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, Campinas – SP.....57

Figura 2 - Área demarcada para aplicação de diferentes dosagens de fungos.....58

Figura 3 - Preparação de fungos para aplicação.....59

| | |
|---|----|
| Figura 4 - Aplicação por pulverização utilizando bomba costal..... | 60 |
| Figura 5 - Armadilhas atrativas para captura de carrapatos..... | 60 |
| Figura 6 – Contagem de carrapatos..... | 61 |
| Figura 7 – Parasitos em tubo de ensaio com algodão umedecido..... | 61 |
| Figura 8 – Marcadores de ninfas e adultos..... | 62 |
| Figura 9 – Marcadores sendo colocados em áreas demarcadas..... | 63 |
| Figura 10 – Carrapatos adultos colocados em tubo de ensaio..... | 63 |
| Figura 11 – Frequência absoluta dos indivíduos tratados com o fungo <i>Beauveria bassiana</i> | 66 |
| Figura 12 – Frequência absoluta dos indivíduos tratados com o fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> | 67 |
| Figura 13 – Distribuição do número de indivíduos vivos por avaliação e parcela tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 68 |
| Figura 14 – Distribuição do número de indivíduos, adultos e ninfas vivas, por avaliação e parcela tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 70 |
| Figura 15 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos, adultos e ninfas, tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 72 |
| Figura 16 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos, adultos e ninfas, tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 73 |
| Figura 17 – Ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos adultos e ninfas tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 76 |
| Figura 18 – Ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos adultos e ninfas tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 76 |
| Figura 19 – Presença de predadores em área de experimento A e B, identificado com círculo e seta em vermelho. Marcador com sinais de perfuração pela ação de predadores C..... | 77 |
| Figura 20 – Perfil de frequência absoluta dos indivíduos, tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 78 |
| Figura 21 – Perfil de frequência absoluta dos indivíduos, esquerda adultos vivos e a direita ninfas vivas, tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 79 |
| Figura 22 – Distribuição do número de indivíduos vivos por avaliação sem discriminar por parcela tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 80 |

| | |
|--|----|
| Figura 23 – Distribuição do número de indivíduos vivos por avaliação sem discriminar por parcela tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 80 |
| Figura 24 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 83 |
| Figura 25 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 84 |
| Figura 26 – ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos marcadores adultos e marcadores ninfas tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 87 |
| Figura 27 – Ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos marcadores adultos e marcadores ninfas tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 87 |

CAPÍTULO 4

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Área demarcada para aplicação do fungo <i>B. bassiana</i> , A. Área demarcada para controle, B..... | 100 |
| Figura 2 – Perfil da proporção de indivíduos vivos (adultos, ninfas e larvas) por teste na segunda e terceira avaliação..... | 105 |
| Figura 3 – Dispersão com curva de tendência da taxa de mortalidade por dia referente aos indivíduos, adultos, ninfas e larvas, segundo os dias decorridos entre a aplicação do tratamento e a última avaliação..... | 107 |
| Figura 4 – Perfil da proporção de indivíduos mortos (adultos, ninfas e larvas) por mês na segunda e terceira avaliação..... | 109 |
| Figura 5 – Precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento..... | 110 |
| Figura 6 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de adultos mortos por precipitação e temperatura..... | 111 |
| Figura 7 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de ninfas mortas por precipitação e temperatura..... | 112 |
| Figura 8 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de larvas mortas por precipitação e temperatura..... | 112 |
| Figura 9 – Formigueiro formado na área onde foi aplicado o tratamento com <i>B. bassiana</i> ... | 114 |
| Figura 10 – Adulto recuperado da área experimental, observada após o décimo dia de avaliação <i>in vitro</i> , morto e colonizado com o fungo <i>B. bassiana</i> | 115 |

Figura 11 – Ninfa recuperada da área experimental, observada após o décimo dia de avaliação *in vitro*, morta e colonizada com o fungo *B. bassiana*.....115

CAPÍTULO 5

Figura 1 – Palestra de capacitação de funcionários e estagiários - Campus Pirassununga....127

Figura 2 – Armadilhas no piquete.....127

Figura 3 – Aplicação dos fungos entomopatogênicos por pulverizador de barras.....128

Figura 4 – Perfil da proporção de indivíduos mortos (adultos, ninfas e larvas) por mês na segunda e terceira avaliação.....134

Figura 5 – Dispersão com curva de tendência da taxa de mortalidade por dia referentes aos indivíduos, adultos, ninfas e larvas, segundo os dias decorridos entre a aplicação do tratamento e a última avaliação.....135

Figura 6 – Precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento.....136

Figura 7 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de adultos mortos por precipitação e temperatura.....138

Figura 8 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de ninfas mortas por precipitação e temperatura.....139

Figura 9 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de larvas mortas por precipitação e temperatura.....139

Figura 10 – Equinos infestados por *Amblyomma sculptum*.....142

Figura 11 – Piquetes com pasto alto, usados como alimentação para os equinos.....143

Figura 12 – Caminho aberto na cerca por capivaras, A; presença de fezes de capivaras dentro dos piquetes.....143

Figura 13 – Predadores se alimentando de carrapatos nas armadilhas.....144

Figura 14 – Equinos jovens brincando com as armadilhas.....144

Figura 15 – Éguas prenhes e ou paridas.....145

Figura 16 – Aberturas de tatus, 6 meses aproximadamente após ser feita a aplicação dos fungos entomopatogênicos, piquete área *B. bassiana*.....146

Figura 17 – Formação de formigueiros, 6 meses aproximadamente após ser feita a aplicação dos fungos entomopatogênicos, nas áreas *B. bassiana*, e área *M. anisopliae*.....146

Figura 18 – Ninfa recuperada do Campus Pirassununga – SP, observada após o décimo dia de avaliação *in vitro*, morta e colonizada com o fungo *B. bassiana*.....147

Figura 19 – Ninfa recuperada do Campus Pirassununga – SP, observada após o décimo dia de avaliação, *in vitro*, morta e colonizada com o fungo *M. anisopliae*.....147

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Número de carrapatos e espécies encontradas em vida livre na Fazenda da Ponte..... | 39 |
| Tabela 2 - Levantamento preliminar de infestação de carrapatos <i>Amblyomma sculptum</i> | 41 |
| Tabela 3 - Número de larvas, ninfas e adultos de <i>Amblyomma sculptum</i> encontradas nos diferentes locais de avaliação nos anos de 2015 a 2017..... | 42 |
| Tabela 4 - Estimativa do nível de infestação de larvas, ninfas e adultos de <i>A. sculptum</i> nos seis pontos de avaliação na Fazenda da Ponte - Itu nos anos de 2015 a 2017..... | 43 |
| Tabela 5 - Análise descritiva da média do total bruto de adultos, ninfas e larvas capturados nas armadilhas ao longo de todo experimento..... | 47 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Número de carrapatos e espécies encontradas em vida livre nas áreas demarcadas para experimento de determinação da dose de fungos entomopatogênicos, no período de outubro de 2016 a dezembro de 2016..... | 65 |
| Tabela 2 - Total de indivíduos capturados, adultos, ninfas e larvas, por colheita após aplicação com os fungos <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> | 66 |
| Tabela 3 - Mortalidade de adultos nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo <i>B. bassiana</i> nas diferentes parcelas..... | 69 |
| Tabela 4 - Mortalidade de ninfas nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo <i>B. bassiana</i> nas diferentes parcelas..... | 69 |
| Tabela 5 - Mortalidade de adultos nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo <i>M. anisopliae</i> nas diferentes parcelas..... | 70 |
| Tabela 6 - Mortalidade de ninfas nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo <i>M. anisopliae</i> nas diferentes parcelas..... | 71 |
| Tabela 7 - Distribuição da porcentagem de mortalidade total dos carrapatos, adultos e ninfas, avaliados no décimo dia após tratamento com o fungo <i>B. bassiana</i> | 74 |
| Tabela 8 - Distribuição da porcentagem de mortalidade total dos carrapatos, adultos e ninfas, avaliados no décimo dia após tratamento com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 74 |

| | |
|--|----|
| Tabela 9 - Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 75 |
| Tabela 10 - Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 75 |
| Tabela 11 - Distribuição da mortalidade dos marcadores de adultos tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 81 |
| Tabela 12 - Distribuição da mortalidade dos marcadores de ninfas tratadas com o fungo <i>B. bassiana</i> | 82 |
| Tabela 13 - Distribuição da mortalidade dos marcadores de adultos tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 82 |
| Tabela 14 - Distribuição da mortalidade dos marcadores de ninfas tratadas com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 82 |
| Tabela 15 - Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 86 |
| Tabela 16 - Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo <i>M. anisopliae</i> | 86 |

CAPÍTULO 4

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Datas das colheitas realizados ao longo de um ano para a confirmação da dosagem do fungo <i>Beauveria bassiana</i> | 103 |
| Tabela 2 - Distribuição da mortalidade das colheitas de adultos, ninfas e larvas, tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 104 |
| Tabela 3 - Distribuição da taxa de mortalidade diária de adultos, ninfas e larvas por colheitas tratados com o fungo <i>B. bassiana</i> | 106 |
| Tabela 4 - Distribuição da proporção de mortalidade mensal dos indivíduos adultos, ninfas e larvas referente ao controle e tratamento na última avaliação..... | 108 |
| Tabela 5 - Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de adultos na primeira, segunda e terceira avaliação..... | 110 |
| Tabela 6 - Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de ninfas na primeira, segunda e terceira avaliação..... | 110 |
| Tabela 7 - Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de larvas na primeira, segunda e terceira avaliação..... | 111 |

Tabela 8 - Ajuste do modelo Poisson ao número de adultos mortos até a terceira avaliação... 113

Tabela 9 - Ajuste do modelo Poisson ao número de ninfas mortas até a terceira avaliação..... 113

Tabela 10 - Ajuste do modelo Poisson ao número de larvas mortas até a terceira avaliação.... 114

CAPÍTULO 5

Tabela 1 – Número de carrapatos e espécies encontradas em vida livre nas áreas demarcadas para experimento com aplicação de fungos entomopatogênicos, no período de novembro de 2017 a novembro de 2018..... 131

Tabela 2 – Resultados da distribuição da mortalidade de adultos..... 132

Tabela 3 – Resultados da distribuição da mortalidade de ninfas..... 133

Tabela 4 – Resultados da distribuição da mortalidade de larvas..... 133

Tabela 5 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de adultos na primeira, segunda e terceira avaliação..... 137

Tabela 6 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de ninfas na primeira, segunda e terceira avaliação..... 137

Tabela 7 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de larvas na primeira, segunda e terceira avaliação..... 137

Tabela 8 – Ajuste do modelo Poisson ao número de adultos mortos até a terceira avaliação... 140

Tabela 9 – Ajuste do modelo Poisson ao número de ninfas mortas até a terceira avaliação..... 141

Tabela 10 – Ajuste do modelo Poisson ao número de larvas mortas até a terceira avaliação... 141

LISTA DE SIGLAS, UNIDADES E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| AIC | Critério de informação Akaike |
| B.O.D. | Biochemical Oxygen Demand |
| CL | Concentração Letal |
| CIP | Controle Integrado de Pragas |
| COL. | Colheita |
| CM² | Centímetro quadrado |
| CM | Centímetro |
| CO₂ | Dióxido de Carbono |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| FMB | Febre Maculosa Brasileira |
| G | Gramma |
| HA | Hectare |
| H | Hora |
| LOG | Logarítimo |
| MIP | Manejo Integrado de Pragas |
| M² | Metro Quadrado |
| M | Metro |
| MIN. | Minuto |
| ML | Mililitro |
| MM | Milimetro |
| N | Número |
| PREC. | Precipitação |
| TEM. | Temperatura |
| TNT | Tecido Não Tecido |
| TRV | Teste de Razão de Verossimilhança |
| °C | Grau Celsius |
| % | Porcento |

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são parasitos capazes de infestar diferentes classes de vertebrados, incluindo anfíbios, aves, mamíferos e répteis, tanto silvestres como domésticos, e também os seres humanos. Existem cerca de 900 espécies de carrapatos descritas no mundo. A subordem Ixodida compreende três famílias: Argasidae e Ixodidae, com vasta distribuição geográfica em todos os continentes, e Nuttalliellidae, restrita à Região Afrotropical (MANS et al., 2011; GUGLIELMONE; NAVA, 2014).

Os parasitos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) são representados por 135 espécies distribuídas mundialmente. Destas, 33 espécies são encontradas no Brasil, distribuindo-se geograficamente em regiões tropicais e subtropicais (GUGLIELMONE; NAVA, 2014).

Com base em estudos morfológicos e genéticos, verificou-se que no Brasil há pelo menos duas espécies do Complexo *Amblyomma cajennense*: o *Amblyomma cajennense sensu stricto* e o *Amblyomma sculptum*, sendo esta última encontrada no estado de São Paulo (NAVA et al., 2014; MARTINS, 2014).

A. sculptum é conhecido como “carrapato-estrela” no estágio adulto e pode parasitar diversos animais e também o homem. Porém, os equinos, capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e antas (*Tapirus terrestris*) estão entre os principais hospedeiros para todos os estágios parasitários deste carrapato (PACHECO et al., 2009; KRAWCZAK et al., 2014). *A. sculptum* apresenta baixa especificidade, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo e seus diferentes estágios de desenvolvimento aparecem de forma bem marcada nas diferentes estações do ano (OLIVEIRA et al., 2003).

O impacto da interferência humana, o declínio da biodiversidade e as mudanças climáticas vêm promovendo o intercâmbio de patógenos entre a população de animais domésticos, silvestres e o ser humano (AGUIRRE et al., 2002; DASZAK, 2004).

Neste cenário, os carrapatos do complexo *cajennense* estão associados à transmissão de uma grande variedade de agentes infecciosos como fungos, vírus, bactérias e protozoários aos seus diferentes hospedeiros (SONENSHINE; ROE, 2014; MENEZES, 2017), podendo também ser vetores da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB),

enfermidade reconhecida pela alta letalidade nas Américas (LABRUNA, 2009; LABRUNA et al., 2011). Em qualquer uma das fases de desenvolvimento do carrapato (larva, ninfa e adulto) ocorre a transmissão da riquetsia por meio de suas glândulas salivares (DEL FIOLE et al., 2010). Segundo a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, entre 2007 e 2019, foram registrados 795 casos de FMB, totalizando 424 óbitos em razão desta doença (Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2019).

Em função da importância desses carrapatos, devido ao parasitismo nos animais de produção e aos riscos de transmissão de doenças ao homem, tem-se empregado o tratamento dos hospedeiros primários com carrapaticidas químicos para o seu controle. Segundo Bittencourt (1997), o controle químico dos carrapatos leva ao aparecimento de populações resistentes e impacta o meio ambiente. Seu uso exclusivo é pouco viável em termos práticos e econômicos, sendo indicado o emprego de métodos alternativos dentro de um sistema de controle integrado (BARROS; EVANS, 1989).

O manejo integrado de pragas (MIP) abrange a combinação de uma série de medidas de controle que se complementam, sendo necessária uma abordagem multidisciplinar, que deve considerar aspectos de ecologia, parasitologia, genética, imunologia, química, economia e sociologia para sua aplicação (NARI, 1995).

Dentro de um programa de controle integrado para o carrapato-estrela, se faz necessário aplicar uma série de medidas, incluindo a capacitação dos recursos humanos atuantes na propriedade, o manejo adequado de áreas de pastagens, das instalações e dos animais, a aplicação de produtos carrapaticidas de um grupo químico adequado de forma estratégica e, em caso de se ter disponibilidade, pode-se utilizar também alguma forma de controle biológico como, por exemplo, fungos entomopatogênicos.

A atividade patogênica dos fungos das espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* vem sendo estudada e caracterizada em ensaios de laboratório, apresentando resultados satisfatórios e demonstrando patogenicidade para várias espécies de carrapatos como, por exemplo, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BITTENCOURT et al., 1992; BITTENCOURT, 1997; MONTEIRO et al., 1998), *Amblyomma cooperi*, (REIS et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004), *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005) e *Rhipicephalus sanguineus* (GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005; PRETTE et al., 2005).

Testes de campo, por outro, são raros e, até o momento, limitaram-se ao estudo da ação de *Metarhizium anisopliae* visando o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nas pastagens (GARCIA, 2008).

Isto posto, pretende-se demonstrar que, quando utilizadas de maneira coordenada, as medidas de MIP ou a utilização de fungos entomopatogênicos podem mitigar consideravelmente o parasitismo por carrapatos do gênero *Amblyomma* e, conseqüentemente, reduzir a níveis toleráveis os perigos para a saúde animal e humana decorrentes da presença desses carrapatos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GERAL

✓ Estabelecer um sistema de controle integrado do carrapato *Amblyomma sculptum* em zonas rurais, exemplificadas por três áreas experimentais, quais sejam: Fazenda da Ponte, localizada no município de Itu - SP; Fazenda Mato Dentro, localizada no município de Campinas - SP; e no Campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo, localizado no município de Pirassununga - SP.

1.2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar uma estratégia de manejo adequada para cada propriedade estudada.
- ✓ Testar os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* contra carrapatos do gênero *Amblyomma* em experimentos de campo.

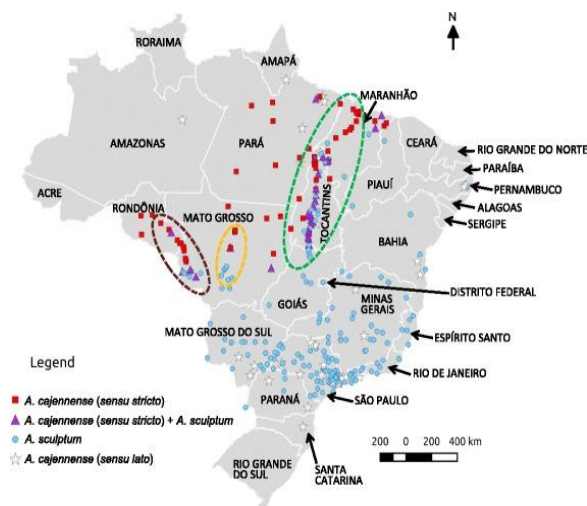
1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 GÊNERO *Amblyomma*

Amblyomma cajennense sensu lato (FABRICIUS, 1787) é uma das espécies deste gênero, tendo sido primeiramente descrita na cidade de Caiena, na Guiana Francesa. Nesta região geográfica neotropical ele se distribui desde o sul dos Estados Unidos, Américas Central e do Sul, até a Argentina (NAVA et al., 2014; BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Nava et al., (2014) reavaliaram o tema com base em estudos morfológicos e genéticos de diferentes populações de *A. cajennense* no continente americano e estabeleceram o Complexo *Amblyomma cajennense*, contendo seis espécies. Foi proposta a seguinte classificação: *A. cajennense* sensu stricto; *A. mixtum*, KOCH, 1844; *A. sculptum*, BERLESE, 1888; *A. interandinum* n.sp; *A. patinoi* n.sp e *A. tonelliae* n.sp. Neste contexto, foi verificado que no Brasil existem pelo menos duas espécies do Complexo *Amblyomma cajennense*: o *A. cajennense* sensu stricto, restrita aos estados do Pará, Rondônia, Mato Grosso, Maranhão e Tocantins; e *A. sculptum*, encontrado nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e parte das regiões Sul e Nordeste (Figura 1) (RODRIGUES et al., 2015; MARTINS, 2016).

Figura 1 - Mapa do Brasil demonstrando a distribuição geográfica de *Amblyomma cajennense* sensu strictu, *Amblyomma cajennense* sensu lato e *Amblyomma sculptum*. A linha tracejada mostra as localidades das três expedições de campo para coletas de carrapatos, sendo a primeira expedição em verde, a segunda em marrom e a terceira em laranja, de acordo com estudo realizado por Martins et al., 2016.



Fonte: MENEZES (2017).

1.3.1.1 Biologia e hospedeiros do *Amblyomma sculptum*

O *A. sculptum* apresenta baixa especificidade, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo e seus diferentes estágios de desenvolvimento ocorrem em estações distintas. A reprodução acontece apenas uma vez por ano e apresenta picos definidos para as populações de larvas, ninfas e adultos, com maior predomínio de estágios imaturos nos meses mais frios e secos, e de estágios adultos nos meses mais quentes e chuvosos (OLIVEIRA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2015).

Os adultos de *A. sculptum* são prevalentes na primavera e verão, enquanto que as larvas são no outono e no inverno, e as ninfas no inverno e primavera (SZABÓ et al., 2013; FRANCO, 2018). As fêmeas desta espécie podem diminuir a desidratação do corpo, pois tem capacidade de adentrar no solo, mais especificamente perto das raízes das plantas, até uma profundidade de 5 cm. Isto ocorre quando as condições ambientais são desfavoráveis, por exemplo, temperaturas baixas, redução do fotoperíodo e dos níveis de umidade relativa do ar. Este comportamento acontece para garantir sua sobrevivência por longos períodos no ambiente (OLIVEIRA et al., 2000; FRANCO, 2018).

1.3.1.2 Importância para a saúde humana e animal

Os ecossistemas naturais encontram-se cada vez mais ameaçados pela crescente pressão humana sobre eles causando fragmentação, redução e destruição de grandes áreas nativas em virtude do desmatamento, queimadas, poluição dos rios e oceanos (SANDERSON et al., 2002; PIGNATTI, 2004; FOLEY et al., 2005).

Da mesma forma que as populações de animais domésticos e o homem estão cada vez mais adentrando em áreas naturais, os animais silvestres têm se aproximado de fazendas e periferias de áreas urbanas em busca de alimento e abrigos, e isso tem contribuído para dispersão de seus patógenos (VANAKE; GOMPPER, 2009; SIQUEIRA, 2017).

A adaptação de agentes de potencial patogênico a novas situações e a novos hospedeiros podem promover mudanças no aspecto epidemiológico de inúmeros patógenos e também acarretar novas doenças e outras que já eram consideradas controladas (ABDUSSALAM, 1959; MANGINI; SILVA, 2006; SIQUEIRA, 2017).

Alguns animais domésticos são criados em regime de confinamento, porém isso não os deixa livres de um contato com animais silvestres considerados como invasores em áreas onde não são nativas, mas que foram introduzidas pelo homem (LYLES; DOBSON, 1993; HUDSON et al., 2002).

A situação mais comumente relatada é quando a espécie introduzida transporta seus parasitas ao qual entra em contato com espécies nativas (TOMPKINS et al., 2011). Outra condição muito comum são animais que são criados de forma livre que exibem crescente interação com as espécies silvestres (HUDSON et al., 2002; SIQUEIRA, 2017).

Esta interação entre ecossistemas distintos possibilita o intercâmbio de agentes com diversos níveis de patogenicidade para cada espécie em ambos os ecossistemas (LOGIUDICE et al., 2003; MANGINI; SILVA, 2006).

Os carrapatos do complexo *cajennense* são reconhecidos como espécies de maior distribuição entre os estados brasileiros e são de grande importância para a saúde animal e saúde pública (RODRIGUES et al., 2015). Estão associados à transmissão de uma grande variedade de patógenos como fungos, vírus, bactérias e protozoários aos seus diferentes hospedeiros (SONENSHINE; ROE, 2014; MENEZES, 2017).

Algumas espécies de Ixodidae, podem se disseminar entre 2 a 10 m do lugar em que foram soltos, enquanto que larvas e ninfas são limitadas a poucos centímetros de distância (PEREZ et al., 2008; FRANCO, 2018).

Em relação à saúde pública esses carrapatos podem ser vetores da bactéria *Rickettsia rickettsii* causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB), reconhecida pela alta letalidade nas Américas (LABRUNA, 2009; LABRUNA et al., 2011). Devido à ocorrência de transmissão transovariana e perpetuação transestadial são responsáveis pela manutenção da *R. rickettsii* na natureza (SOARES, 2011), permitindo aos carrapatos continuar infectado por toda a sua vida e também por gerações consecutivas após uma infecção primária (LABRUNA et al., 2011). A transmissão aos seres humanos acontece pela picada de carrapatos infectados com a bactéria *R. rickettsii* e não ocorre por transmissão direta, pois se trata de uma doença infecciosa e não contagiosa (PINTER et al., 2016; FRANCO, 2018)

Segundo a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (2019), entre 2007 e 2019 foram registrados 795 casos de FMB, totalizando 424 óbitos em razão desta doença (Figura 2).

Figura 2 - Casos confirmados de Febre Maculosa Brasileira no estado de São Paulo.**Casos confirmados autóctones de FMB no ESP por ano de IS de 1985 a 2019* e letalidade**

| Ano inicio sintomas | No. de casos | no. de óbitos | Letalidade |
|---------------------|--------------|---------------|------------|
| 1985 | 3 | 1 | 33,3 |
| 1986 | 5 | 4 | 80,0 |
| 1987 | 3 | 1 | 33,3 |
| 1988 | 3 | 3 | 100,0 |
| 1989 | 1 | 0 | 0,0 |
| 1990 | 0 | 0 | 0,0 |
| 1991 | 0 | 0 | 0,0 |
| 1992 | 1 | 0 | 0,0 |
| 1993 | 5 | 1 | 20,0 |
| 1994 | 3 | 1 | 33,3 |
| 1995 | 4 | 4 | 100,0 |
| 1996 | 6 | 3 | 50,0 |
| 1997 | 2 | 1 | 50,0 |
| 1998 | 13 | 6 | 46,2 |
| 1999 | 2 | 0 | 0,0 |
| 2000 | 16 | 2 | 12,5 |
| 2001 | 14 | 11 | 78,6 |
| 2002 | 9 | 4 | 44,4 |
| 2003 | 29 | 12 | 41,4 |
| 2004 | 37 | 11 | 29,7 |
| 2005 | 53 | 16 | 30,2 |
| 2006 | 37 | 13 | 35,1 |
| 2007 | 32 | 11 | 34,4 |
| 2008 | 44 | 16 | 36,4 |
| 2009 | 63 | 26 | 41,3 |
| 2010 | 60 | 25 | 41,7 |
| 2011 | 71 | 35 | 49,3 |
| 2012 | 73 | 43 | 58,9 |
| 2013 | 57 | 31 | 54,4 |
| 2014 | 72 | 55 | 76,4 |
| 2015 | 91 | 56 | 61,5 |
| 2016 | 64 | 37 | 57,8 |
| 2017 | 61 | 31 | 50,8 |
| 2018 | 103 | 56 | 54,4 |
| 2019 | 4 | 2 | 50,0 |
| Total | 1037 | 516 | 49,8 |

Fonte: Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2019.

Quando a bactéria *Rickettsia* infecta os seres humanos, tem sua localização e multiplicação em células endoteliais pequenas e vasos sanguíneos de porte médio, com período de incubação que varia de dois a quatorze dias, com média de sete dias, após a picada do carrapato. Os sintomas são inespecíficos e podem ser similares aos de outras doenças como, por exemplo, leptospirose e dengue. Entre os sintomas estão febre alta, dor de cabeça, mialgia, náusea, vômito, anorexia, dor abdominal e diarreia. Também podem aparecer máculas e erupções cutâneas, podendo evoluir para febre, com a presença de pápulas ou petéquias após três dias. Porém, estes sinais podem não ocorrer em alguns pacientes, o que dificulta o diagnóstico (PAROLA et al., 2005; ARAÚJO et al., 2015; FRANCO, 2018).

A taxa de mortalidade está diretamente ligada ao diagnóstico rápido e início imediato de tratamento adequado. Quando isto não acontece, dada a dificuldade de diagnóstico, o desconhecimento pela população e até mesmo por desinformação dos serviços de saúde, o número de óbitos pode chegar a 80% dos casos não tratados (ARAÚJO et al., 2015; FRANCO, 2018).

Estes carrapatos também podem transmitir um dos agentes que provocam borreliose, similar à Doença de Lyme, ambas as doenças acometem os seres humanos (BARROS-BATTESTI et al., 2006; MENEZES, 2017).

Estudos realizados em laboratório confirmaram a capacidade dos carrapatos do gênero *Amblyomma* na transmissão do protozoário *Theileria equi*, responsável pelo desenvolvimento de teileriose em equinos, doença endêmica em grandes partes do mundo (SCOLES; UETI, 2013; MENEZES, 2017).

1.3.1.3 Controle

No Brasil, de uma forma geral, o controle dos carrapatos tem sido feito através de produtos químicos principalmente à base de organofosforados, amidinas e piretróides sintéticos. Para o controle do carrapato-estrela tem sido comumente indicado o piretróide deltametrina. Porém, segundo Barros-Battesti et al., (2006) há necessidade de maiores concentrações de produto químico, que podem chegar 1,8 vezes o valor recomendado para o carrapato do boi. Além disso, intervalos menores entre banhos estratégicos devem ser observados para se obter um resultado satisfatório.

Segundo Bittencourt (1997), o controle químico dos carrapatos leva ao aparecimento de populações resistentes e impacta o meio ambiente. Seu uso exclusivo é pouco viável em termos práticos e econômicos, sendo indicado o emprego de métodos alternativos dentro de um sistema de controle integrado (BARROS; EVANS, 1989).

1.3.2 MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization, 2018), Manejo Integrado de Pragas (MIP) consiste numa consideração cuidadosa de todas as técnicas de controle de pragas disponíveis e subsequente integração de medidas apropriadas que desestimulem o desenvolvimento de populações de pragas e mantenham os pesticidas e outras intervenções em níveis que sejam economicamente justificados, reduzindo ou minimizando os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. O MIP enfatiza o crescimento de uma cultura saudável, com o mínimo de perturbação possível aos agroecossistemas e incentiva os mecanismos naturais de controle de pragas.

A metodologia convencional para o controle de pragas nas atividades agropecuárias reside na aplicação em larga escala de acaricidas e inseticidas de amplo espectro. No entanto, com o passar do tempo foi observado que essa prática era imprópria, gerando contaminação e desequilíbrio no agroecossistema, causando o aparecimento de pragas resistentes, ressurgimento de pragas previamente controladas, surtos epidêmicos de pragas de importância secundária, diminuição da população de insetos benéficos, efeitos deletérios para os animais selvagens, domésticos e o homem, e acúmulo de resíduos tóxicos no solo, água e alimentos (ZAMBOLIM; JUNQUEIRA, 2004; CARVALHO, 2012).

Em 1972, foi ratificado pela FAO o termo Controle Integrado de Pragas (CIP), reservado com exclusividade para insetos, para Manejo Integrado de Pragas (MIP), com a proposta de inclusão de todos os organismos com ação conflitante ao interesse do homem, como insetos, patógenos, plantas daninhas e animais vertebrados (WAQUIL et al., 2002).

Nari (1995) definiu o MIP como a combinação de uma série de medidas de controle que se complementam, sendo necessária uma abordagem multidisciplinar para sua aplicação (ecologia, parasitologia, genética, imunologia, química, economia, sociologia).

Segundo Apple (1977), existe certa resistência dos produtores na adoção do MIP, pois os mesmos não querem trocar a praticidade e segurança de um calendário fixo de pulverizações por um conjunto de ações que exigem mais atenção e trabalho (envolvendo o risco de perderem feriados e fins de semana) e também, não fazer o monitoramento de seus campos periodicamente à procura de possíveis pragas, para quantificação da incidência e diversidade de insetos e dos possíveis danos causados pelas pragas.

Embora alguns conceitos e ações aparentem lógica para os pesquisadores, para os agricultores podem parecer incoerentes. O sucesso do MIP depende da adesão dos produtores às estratégias estabelecidas (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

O MIP já vem sendo aplicado em diversos países para várias culturas, onde os agricultores têm condições de fazer previsões quanto à ocorrência de possíveis problemas fitossanitários, aplicando estratégias de monitoramento que se adequem com níveis aceitáveis para decisão de adoção ou não de estratégias de controle. Estudos realizados nos Estados Unidos indicaram como principais estímulos de adoção do MIP, as vantagens econômicas e a resistência a inseticidas. E como obstáculos técnicos, apontados como de maior dificuldade, estão os relacionados a financiamento, educação, organização social, monitoramento e a determinação dos níveis de ação (PEDIGO, 2001; CARVALHO et al., 2012).

Guedes et al., (2000) estabeleceram as seguintes etapas de planejamento de MIP: avaliação do ecossistema, tomada de decisão e implantação dos métodos de controle. No conhecimento de pragas-chave e os possíveis períodos críticos da cultura em vista ao ataque de pragas, é necessário o conhecimento do histórico da área e da cultura, da possibilidade de previsão da ocorrência e estabelecimento de pragas, em relação aos fatores ecológicos e métodos que podem ser adotados sem utilização de produtos químicos.

É essencial reconhecer as espécies que podem causar danos e seus principais inimigos naturais, assim sendo, o conceito de pragas em agricultura, tem relação com efeitos econômicos produzidos, termo dado no sentido numérico, baseado em evidências, onde uma determinada população de insetos, danifique a produção com seus estragos. Sendo assim, a presença do inseto na cultura, não implica necessariamente em prejuízo econômico (GALLO et al., 2002; GUEDES et al., 2000).

Para implementação de métodos de controle as seguintes etapas devem ser seguidas para que haja êxito em sua implantação como: definir a área onde será implantado o MIP; reconhecer e identificar as pragas-chave que causam danos; identificar seus inimigos naturais; avaliar os fatores climáticos que interferem na flutuação populacional da praga e dos inimigos naturais e acompanhá-las durante o ciclo da cultura; determinar os níveis de dano econômico, de controle e tomada de decisão. Assim, o produtor poderá optar pelo sistema mais adequado, abrangendo um ou mais métodos de controle, envolvendo táticas como: métodos culturais, controle mecânico, físico, legislativo, biológico, químico, manipulação genética de pragas, controle alternativo (produtos biorracionais) e avaliação (COSTA et al., 2008; SIQUEIRA, 2017).

1.3.3 CONTROLE DE PRAGAS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Segundo Perinotto (2010), o controle microbiano pode ser definido basicamente como a intervenção humana no comportamento natural de microrganismos, para controlar e/ou combater as chamadas pragas parasitárias, observadas tanto na agricultura quanto em medicina veterinária.

O controle microbiano pode ser usado como medida estratégica para controle de pragas por possuir fatores favoráveis como, por exemplo: alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, ausência de toxicidade aos mamíferos, diminuição de aparecimento de resistência, capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente. Sendo assim, entende-se que a redução de populações de insetos indesejados, isto é, pragas, pode alcançar níveis toleráveis com menores prejuízos. Além disso, outra vantagem do controle biológico é que o mesmo fornece a possibilidade de associação de microrganismos com formulações medicamentosas, o que pode reduzir os resíduos ou toxicidade para animais e ambiente (ALVES, 1998; PERINOTTO, 2010; BARROS et al., 2010).

Os fungos entomopatogênicos são capazes de penetrar diretamente pela cutícula do artrópode, não necessitando necessariamente de ingestão pelo hospedeiro para iniciar a infecção e são considerados promissores como método alternativo ao controle químico dos carrapatos. Dependendo das condições ambientais (temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta), condições nutricionais e da suscetibilidade do hospedeiro, pois, em quase todos os casos, os fungos têm capacidade de infectar todos os estágios do carrapato (ALVES, 1998; ZAPPELINI, 2009).

A variabilidade genética dos fungos permite, através de técnicas adequadas, à seleção de isolados fúngicos com maior virulência, mais especificidade e com tolerância a condições climáticas, possibilitando sua utilização como inseticidas microbianos (ALVES, 1998; PERINOTTO, 2010).

1.3.3.1 Fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Em 1835, Agostino Bassi provou que o fungo *Beauveria bassiana* é o agente da doença “Muscardine Branca”, importante para o bicho da seda (*Bombyx mori* – Lineu, 1758)

confirmando a natureza infecciosa do ataque ao inseto pelo fungo. *B. bassiana* é classificada como um fungo deuteromiceto, da classe dos hifomicetos assexuados, e sua reprodução se dá através da produção de conídios (ALVES, 1998; PERINOTTO, 2010). Entretanto, com utilização da biologia molecular, esta espécie foi reagrupada como um fungo sexuado (REHNER, 2005).

Segundo MacLeod (1954), *Beauveria bassiana* é o fungo entomopatogênico mais encontrado em insetos mortos no ambiente natural, infectando aproximadamente 200 espécies de insetos de diferentes ordens.

O fungo *B. bassiana* é amplamente estudado para controle biológico de muitas espécies de insetos, e tornou-se conhecido internacionalmente quando foi utilizado para o controle do besouro do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata* - Say, 1824) pela antiga União Soviética em 1970 (SAMSINAKOVA, 1966; IGNOFFO, 1975).

No Brasil, este fungo foi utilizado para controle de cupins nas pastagens, com resultados de eficiência de controle que chegou a 100% para ninhos pequenos, demonstrando ser uma alternativa eficiente, ecológica e econômica (ALVES, 1998; ZAPPELINI, 2009). Além disso tem sido comercializado, especialmente para o controle de ácaros do mamão, broca-do-café e *Praeionchthya praelonga* em menor escala (FARIA; MAGALHÃES, 2001; CASTILHO et al., 2017).

A germinação de *B. bassiana* ocorre através dos conídios 12 horas após inoculação, a penetração comumente ocorre pelo tegumento através de ação mecânica e efeitos enzimáticos. Depois de 72 horas de inoculação, o hospedeiro está colonizado com grande quantidade de conidióforos e conídios. A capacidade de disseminação de propágulos é aumentada se as condições de temperatura, umidade relativa e radiação forem favoráveis (ALVES, 1998).

A germinação dos conídios, crescimento vegetativo e esporulação deste fungo ocorre em temperatura ideal entre 23 a 28°C, e pode suportar temperaturas de até 45°C (ALVES; LECUONA, 1998; PERINOTTO, 2010).

Entretanto a maior virulência e desenvolvimento do fungo *B. bassiana* ocorre em temperatura ótima de 25° C, as temperaturas abaixo do ótimo são menos prejudiciais à patogenicidade dos fungos. Em determinados casos, pode ocorrer o aumento do tempo letal, sem afetar a mortalidade total, ao passo que as temperaturas acima do ótimo podem ocasionar a diminuição da sua patogenicidade (ROBERTS; CAMPBELL, 1977; PERINOTTO, 2010).

1.3.3.2 Fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff.) Sorokin

Outro agente de controle biológico de pragas muito utilizado é o fungo *Metarhizium anisopliae*, caracterizado por infectar mais de 300 espécies de insetos. Tem ampla distribuição na natureza e é encontrado com facilidade no solo. Foi descrito pela primeira vez por Metschnikoff em 1879. Este autor utilizou o fungo para o controle microbiano de larvas do besouro *Anisopliae austríaca* (Herbst, 1783) O fungo foi classificado por Sorokin em 1883, recebendo a denominação de *Metarhizium anisopliae*. Este agente pertence à classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae (ALVES, 1998; PERINOTTO, 2010).

M. anisopliae é alvo de muitos estudos e é produzido no Brasil por empresas privadas e usinas de açúcar e álcool (ALVES; LOPES, 2008; CASTILHO et al., 2017). Atualmente estão registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) 19 produtos à base de *M. anisopliae*, aprovados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha-das-raízes), *Notozulia entreriana* (Berg) e *Deois flavopicta* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) (cigarrinhas-das-pastagens) em cultura de cana-de-açúcar e em pastagens (AGROFIT, 2018; CASTILHO et al., 2017).

O mecanismo de ação do *M. anisopliae*, tem início pela adesão, que depende da presença de enzimas esterases e proteases, seguindo-se a germinação de conídios que alteram o tegumento do inseto. Em seguida ocorre a penetração da hifa através da cutícula, facilitando a nutrição e a germinação do fungo (St. LEGER et al., 1991; PERINOTTO, 2010).

Segundo Alves (1998), no tubo germinativo do inseto acontece dilatação da hifa, ocorrendo atividade metabólica em decorrência da produção de proteases, lipases e quitinases. Esta estrutura é chamada de apressório. No processo de penetração estão envolvidos fatores físicos, tais como a pressão da hifa, que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas, e fatores químicos, que consistem na liberação destas enzimas que facilitam a penetração mecânica. Após isso, tem início à colonização do hospedeiro, ocorrendo a proliferação das hifas, liberando as dextruxinas e citocalasinas, toxinas que causam paralização ou morte do inseto. Com a morte do hospedeiro, as hifas crescem invadindo os órgãos internos do mesmo e o micélio sai do corpo do artrópode, produzindo novos esporos que, conseqüentemente, poderão ser difundidos para infecção de outros indivíduos (ALVES, 1998; PERINOTTO, 2010).

1.3.3.3 Estudos sobre o controle biológico de carrapatos de interesse veterinário

O controle biológico em condições laboratoriais utilizando os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* tem apresentado resultados satisfatórios, demonstrando patogenicidade para várias espécies de carrapatos, como *Rhipicephalus (B.) microplus* (BITTENCOURT et al., 1992; MONTEIRO et al., 1998; POSADAS E LECUONA., 2009; CAMARGO et al., 2012; PERINOTTO et al., 2012; SUN et al., 2013; BERNARDO et al., 2018), *Amblyomma cooperi* (REIS et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004; LOPES et al., 2007), *Amblyomma parvum* (GARCIA et al., 2018) *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005), *Rhipicephalus sanguineus* (GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005; PRETTE et al., 2005; CAFARCHIA et al., 2015), *Dermacentor nitens* (PERINOTTO et al., 2013) e *Haemaphysalis longicornis*. (ZHENDONG et al., 2019).

Em adição aos estudos *in vitro*, Bittencourt et al., (2003) testaram formulações contendo 10^7 e 10^9 conídios/ml do fungo *M. anisopliae* contra larvas de 15 dias de idade de *Rhipicephalus (B.) microplus*, num modelo que utilizava canteiros de braquiária medindo 1m^2 . Cada canteiro foi infestado artificialmente com 10.000 larvas de carrapato, recebendo o tratamento correspondente no volume de 60 ml. Os autores relataram ação reduzida de controle, com percentuais de eficácia total da ordem de 37,84% e 53,78% ao fim da terceira repetição, respectivamente.

Num modelo similar com canteiros, Basso et al., (2005) conseguiram alcançar uma redução de 87% a 94% na população de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* utilizando uma suspensão da cepa E9 de *M. anisopliae* contendo $1,8 \times 10^8$ conídios/ml aplicada num volume de 200ml/m^2 .

Garcia (2008) avaliou a aplicação da cepa E9 de *M. anisopliae* na pastagem contra *R. (B.) microplus*, utilizando uma suspensão contendo 10^7 conídios/ml aplicada num volume médio de 66,7 mL por metro quadrado de pasto, concluindo que o tratamento não resultou na redução do número de larvas infectantes na pastagem e nem do número de fêmeas ingurgitadas sobre os bovinos.

Segundo Zimmermann (2007 a; b), os fungos entomopatogênicos isolados de artrópodes são, em sua grande maioria, seguros para o meio ambiente e para o homem. O autor afirma que ainda não foi relatado nenhum caso de pessoas que tenham adoecido ou morrido por infecção de fungos entomopatogênicos.

Segundo Alves (1998), um dos principais fatores que impedem o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos em mamíferos é sua elevada temperatura corporal. Os fungos têm seu crescimento favorecido em temperaturas menores do que 30°C e diminui em temperaturas maiores do que 35°C. Este fato, a princípio, assegura que os fungos não causem infecção em humanos.

Sendo observados fatores como: eficácia, baixo custo, diminuição de resíduos químicos nos alimentos e no meio ambiente, preservação dos inimigos naturais e aumento da biodiversidade nos ecossistemas, assim como a segurança para o homem e para outros organismos que não sejam alvo, a utilização de fungos entomopatogênicos apresenta evidentes vantagens em relação aos pesticidas químicos (ALVES, 1998; ZAPPELINI, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUSSALAM, M. Significance of ecological studies of wild animal reservoirs of zoonoses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 21(2), p.179, 1959.

AGROFIT. Disponível em <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acessado em 30 de agosto de 2018.

AGUIRRE, A. A., OSTFELD, R. S., TABOR, G. M., HOUSE, C., & PEARL, M. C. **Conservation medicine: ecological health in practice**. Oxford University Press, New York, 2002.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. **Controle microbiano de insetos**. 2^a. Ed. Piracicaba: FEALQ, p.289, 1998.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, p. 414, 2008.

ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. **Epizootiologia aplicada ao controle microbiano** In: Controle microbiano de insetos. 2^a ed. Piracicaba, SP: FEALQ, p. 97-170. 1998.

APPLE, J.L. The theory of disease management. **Plant disease: an advanced treatise. How disease is managed**. Academic Press, New York, v.1, p. 79-101, 1977.

ARAÚJO, R.P.; NAVARRO, M.B.M.A.; CARDOSO, T.A.O. Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 23(4), p. 354-361, 2015.

BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesq. Vet. Bras**, v.9, p. 17-21, 1989.

BARROS, N.M.; VARGAS, L.R.B.; SCHRANK, A.; BOLDO, J.T.; SPECHT, A. Fungos como agentes de controle de pragas. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2^a ed. Caxias do Sul: Ed UCS, v.01, p. 491-531, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, SP, Brasil. Vox/ICTTD-3/ Butantan, 223p, 2006.

BASSO, L. M. D. S.; MONTEIRO, A. C.; BELO, M. A. D. A.; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.40, n.6, p.595-600, 2005.

BERGAMIN FILHO, A. AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico**. São Paulo, SP, Brasil. Ceres, p. 289, 1996.

BERNARDO, C. C., BARRETO, L. P., E SILVA, C. DE S. R., LUZ, C., ARRUDA, W., & FERNANDES, É. K. K. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9(5), p. 1334–1342, 2018.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A. F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n.2, p.197-202, 1992.

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

BITTENCOURT VREP, BAHIENSE TC, FERNANDES EKK, SOUZA EJ Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1883) (Acari: Ixodidae). **Rev Bras Parasitol Vet** v. 12, p.38–42, 2003.

CAFARCHIA, C., IMMEDIATO, D., IATTA, R., RAMOS, R., LIA, R., PORRETTA, D., OTRANTO, D. Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Parasites & Vectors**, v. 8(1), p. 80, 2015.

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(1-2), p. 140–147, 2012.

CASTILHO, R. C.; BARILLI, D. R.; TRUZI, C. C. **Tópicos em Entomologia Agrícola – X**, Jaboticabal, SP: Multipress, v.1, n. 1, p. 206 e 226, 2017.

CARVALHO, N. L.; BARCELLOS, A. L. Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Rev. Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v (5), n°5, p. 749 – 766, 2012.

COSTA E.C., D'AVILA, M., CANTARELLI E.B., MURARI A.B., MANZONI C.G. **Entomologia florestal**. Santa Maria, Ed. UFSM, p. 240, 2008.

DASZAK, P., TABOR, G. M., KILPATRICK, A., EPSTEIN, J. O. N., & PLOWRIGHT, R. Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026 (1), p. 1-11, 2004.

DEL FIOL, F.S.; JUNQUEIRA, F.M.; ROCHA, M.C.P.; TOLEDO, M.I.; FILHO, S.B. Febre maculosa no Brasil. **Rev. Panam. Salud Publ.**, v.27, p. 461–466, 2010.

FRANCO, C. S. **A influência dos fatores ambientais na ocorrência de carrapatos (Arthropoda, Acari, Ixodidae) e *Rickettsia* em área de transmissão e área de predisposição para a febre maculosa brasileira**. 2018. 67 p. Tese (Doutorado em em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2018.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de Fungos Entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 22, p. 1-4, 2001.

FOLEY, J. A., DEFRIES, R., ASNER, G. P., BARFORD, C., BONAN, G., CARPENTER, S. R., et al., Global consequences of land use. **Science**, v. 309 (5734), p. 570-574, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em

<<http://fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en>>, acessado em 06 de agosto de 2018.

GALLO, D. et al., (in memoriam). **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, Esalq, 920p, 2002.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1513-1518, 2004.

GARCIA, M. V. MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; PRETTE, N.; BECHARA, G. H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.368- 372, 2005.

GARCIA, M. V. **Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* em pastagens visando o controle do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos**. 2008. 58p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Jaboticabal, São Paulo, 2008.

GARCIA, M. V., RODRIGUES, V. S., MONTEIRO, A. C., SIMI, L. D., HIGA, L. O. S., MARTINS, M. M., PRETTE, N., MOCHI, D. A., ANDREOTTI, R., SZABÓ, M. P. J. In vitro efficacy of *Metarhizium anisopliae* sensu lato against unfed *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 76 (4), p. 507-512, 2018.

GUEDES, J.C. COSTA, I.D. CASTIGLIONI, E. **Bases técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: Ed. UFSM/CCR/DFS, 248p, 2000.

GUGLIELMONE A. A, NAVA S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names- with notes on confusions and misidentifications. **Zootaxa**, v. 3767, p. 1-256, 2014.

HUDSON, P. J., RIZZOLI, A. P., GRENFELL, B. T., HEESTERBEEK, J. A. P., & DOBSON, A. P. **Ecology of wildlife diseases**. Oxford University Press, New York, 2002.

IGNOFFO, C. M. Entomopathogens as insecticides. **Environmental Letters**, London, v. 8, p. 24-40, 1975.

KRAWCZAK, F.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; NUNES, F.P.; SOARES, J.F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasite Vectors**, v. 7, p. 1–7, 2014.

LABRUNA M.B., KAMAKURA O., MORAES-FILHO J., HORTA M.C., PACHECO R.C. Rocky mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15 (3), p. 459-460, 2009.

LABRUNA M.B., SOARES H.S., CABRERA R.R., SOARES J.F., MARTINS T.F. Cross-mating experiments with geographically diferente populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol**, v. 54, p. 41–49, 2011.

LYLES, A. M., & DOBSON, A. P. Infectious disease and intensive management: population dynamics, threatened hosts, and their parasites. **Journal of zoo and wildlife medicine**, v. 24 (3), p. 315-326, 1993.

LOGIUDICE, K., OSTFELD, R. S., SCHMIDT, K. A., & KEESING, F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100 (2), p. 567-571, 2003.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.

MAC LEOD, D. M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 32, p. 818-893, 1954.

MANGINI, P. R., & SILVA, J. C. R. Medicina da conservação: aspectos gerais. Cubas. **Tratado de Animais Selvagens–medicina veterinária**. São Paulo, SP, Brasil, Ed. Roca, p. 1258-1268, 2006.

MANS, B. J., de KLERK, D., PIENAAR, R., LATIF, A. A. (2011). *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. **PLoS ONE**, v. 6 (8), e23675, 2011.

MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.159, n.4, p.527-532, 2005.

MARTINS, T. F. **Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil**. 2014. 113p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARTINS, M. M. **Fauna, sazonalidade e riquetsias de carrapatos em área do Cerrado goiano**. 2016. 85p. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MENEZES, K. M. F. **Reconstrução tridimensional do lobo olfativo do carrapato *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)**. 2017. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área de Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.2, p.109-112, 1998.

NARI A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Vet Parasitol.** V. 57, p. 153-65, 1995.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the Taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the Description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and Reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 252–276, 2014.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on

pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, p.295-301, 2000.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 412–416, 2003.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA M. B. Survey of Rickettsia spp in the Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around de world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18(4), p. 719-756, 2005.

PEDIGO, L.P. **Entomology and pest management**. 4^a ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 742p. 2001.

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A.F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.H.B.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; ARRUDA-SANTOS, A.D.; MÁXIMOESPÍNDOLA, C.P.; BARROS-BATTESTI, D.M. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17(4), p. 210-217, 2008.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C.; GARCIA, M. V.; SOARES, V. E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.855-861, 2005.

PERINOTTO, W. M. S. **Ação de *Beauveria Bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes localidades**. 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias – Área de Parasitologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

PERINOTTO, W. M. S., ANGELO, I. C., GOLO, P. S., QUINELATO, S., CAMARGO, M. G., SÁ, F. A., & BITTENCOURT, V. R. E. P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130(3), p. 257–260, 2012.

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

PIGNATTI, M. G. Saúde e ambiente: as doenças emergentes no Brasil. **Ambiente & sociedade**, v. 7 (1), p. 133-144, 2004.

PINTER, A.; COSTA, C.S.; HOLCMAN, M.M.; CAMARA, M.; LEITE, R.M. A Febre Maculosa Brasileira na região metropolitana de São Paulo. **BEPA**, v. 13(151), p. 3-47, 2016.

POSADAS, J. B., & LECUONA, R. E. Selection of Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the Microbial Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. V. 46(2), p. 284–291, 2009.

REHNER, S. A. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. **Insect-fungal Association Ecology and Evolution**. Oxford University Press, New York, 2005.

REIS, R. C. S.; CHACON, S. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, (1883) na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908) (Acari-Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.2, p.68-70, 2003.

REIS, R.C.S., MELO, D. R., BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56 (6), p. 788-791, 2004.

ROBERTS, D. W.; CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. In: Ignoffo, C.M.; Hostetter, D.L. **Environmental stability of microbial insecticides**. New York: Entomological Society of America. 3 ed. p.10, 1977.

RODRIGUES, V. S.; PINA, F. T. B.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância. **Comunicado técnico Embrapa 132**, Brasília, Distrito Federal, 2015.

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg) Pic. Iako Parasit Klistete *Ixodes ricinus* L. **Zool. Listv**, v. 6, p. 229-230, 1957.

SANDERSON, E. W., JAITEH, M., LEVY, M. A., REDFORD, K. H., WANNEBO, A. V., & WOOLMER, G. The human footprint and the last of the wild. **BioScience**, v. 52 (10), p. 891-904, 2002.

SOARES, J. F. **Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira: avaliação das transmissões transovariana e transtadial, efeito na infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados**. 2011. 62p. Dissertação (Mestrado Ciências – Área de Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2011.

SZABÓ, M.P.J.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-9, 2013

SCOLES, G.A., UETI, M.W. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. **Parasites & Vectors**, v. 6 (1), p. 306, 2013.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/fmaculosa/fmb8519_cautoctone_ano_obito.pdf>, acessado em 17 de maio de 2019.

SIQUEIRA, S. M. **Fluxo de carrapatos entre ambientes e animais na fazenda Capim Branco**. 2017. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SONENSHINE, D.E., ROE, R.M. **Biology of ticks**. 2^a ed. Oxford University Press, New York, v. 1 e 2, 539p, 2014.

ST. LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C.; Penetrations events during infection of host cuticle by *M. anisopliae*. **Journal of invertebrate Pathology**. v. 58, p.168-179, 1991.

SUN, M., REN, Q., GUAN, G., LI, Y., HAN, X., MA, C., LUO, J. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. **Parasitology International**, v. 62(5), p. 412–415, 2013.

TOMPKINS, D. M., DUNN, A. M., SMITH, M. J., & TELFER, S. Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. **Journal of Animal Ecology**, v. 80 (1), p. 19-38, 2011.

VANAK, A. T., GOMPPER, M. E. Dogs *Canis familiaris* as carnivores: their role and function in intraguild competition. **Mammal Review**, v. 39 (4), p. 265-283, 2009.

WAQUIL, J. M. Manejo integrado de pragas: Revisão histórica e perspectiva. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Meio ambiente a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo. **Anais**. Florianópolis - SC, p.4, 2002.

ZAMBOLIM, L.; JUNQUEIRA, N.T.V. Manejo integrado de doenças da mangueira. **Manga: produção integrada, industrialização e comercialização**. Eds. ROZANE, D. E.; DAREZZO, R. J.; AGUIAR, R. L.; AGUILERA, G. H. A.; ZAMBOLIM, L. Viçosa, 2004.

ZAPPELINI, L. O. **Seleção de Isolados dos Fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* Visando o Controle da Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Área Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo, SP, 2009.

ZHENDONG, H., GUANGFU, Y., ZHONG, Z., & RUILING, Z. *Phylogenetic relationships and effectiveness of four *Beauveria bassiana* sensu lato strains for control of *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae)*. **Experimental and Applied Acarology**. V. 77, p.83-92, 2019.

ZIMMERMANN G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Sci Technol.** V.17, p. 879-920, 2007a.

ZIMMERMANN G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocon Sci and Technol.** V. 17, p. 553-596, 2007b.

CAPÍTULO 2 – MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS – FAZENDA DA PONTE – ITU

RESUMO

Em virtude de alta infestação por carrapatos do complexo *cajennense*, parasitos de grande importância em razão da transmissão da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira, adotou-se um sistema de controle integrado dos carrapatos numa propriedade rural localizada no município de Itu - SP, margeando o rio Tietê. Na propriedade, os animais domésticos mantinham contato com uma população de capivaras. Os locais determinados para avaliações (A, B, C, D, E e F) levaram em conta critérios como altos níveis de infestação e presença constante dos humanos. Esses locais foram avaliados mensalmente de junho de 2015 a junho de 2016, e a cada dois meses de julho de 2016 a julho de 2017. Os funcionários foram instruídos quanto à diversidade de carrapatos existentes no local, à biologia, à ecologia, ao controle dos mesmos, sobre a importância de manter os gramados baixos e sobre a necessidade de segregar os animais domésticos das capivaras. Foram capturados 1.721 carrapatos em vida livre, todos do gênero *Amblyomma*, sendo 450 larvas, seguidas por 1.090 ninfas e 181 adultos. Dos adultos coletados, apenas um foi identificado como *Amblyomma dubitatum* e o restante como *Amblyomma sculptum*. Os resultados comprovaram a eficácia da aplicação do MIP no controle do carrapato *A. sculptum*.

2.1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos do complexo *cajennense* estão associados à transmissão de uma ampla variedade de patógenos como fungos, bactérias, vírus e protozoários aos seus diferentes hospedeiros (SONENSHINE; ROE, 2014; MENEZES, 2017), podendo também ser vetores da bactéria *Rickettsia rickettsii* causadora da Febre Maculosa Brasileira, reconhecida pela alta letalidade nas Américas (LABRUNA, 2009; LABRUNA et al., 2011).

Como exemplo da gravidade das lesões, podemos observar na imagem a seguir (Figura 1) as características das reações alérgicas e tóxicas que acontecem comumente após fixação do carrapato no hospedeiro, em decorrência das substâncias que são secretadas pela saliva do carrapato, pela penetração e permanência do aparato bucal, causando inflamação (HADDAD JR et al., 2018).

Figura 1 – Lesões cutâneas decorrentes da fixação de um grande número de carrapatos nos membros inferiores.



Fonte: Concedida pelo proprietário da Fazenda da Ponte-ITU.

Em função da importância do controle desses carrapatos devido ao parasitismo nos animais de produção e aos riscos de transmissão de doenças ao homem, tem-se empregado o tratamento carrapaticida especialmente sobre os hospedeiros primários. Segundo Bittencourt (1997) o controle químico dos carrapatos leva ao aparecimento de populações resistentes e

impacta o meio ambiente. Seu uso exclusivo é pouco viável em termos práticos e econômicos, sendo indicado o emprego de métodos alternativos dentro de um sistema de controle integrado (BARROS; EVANS, 1989).

Baseado no conceito de MIP descrito em FAO, 2018, foi estabelecida atividades visando o programa de controle integrado para o carrapato-estrela, dentre elas estão uma série de medidas, incluindo a capacitação dos recursos humanos atuantes na propriedade, o manejo adequado de áreas de pastagens, das instalações e dos animais e a aplicação de produtos carrapaticidas de um grupo químico adequado de forma estratégica.

O presente trabalho teve por objetivo aplicar os conceitos de manejo integrado em uma propriedade rural.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS – FAZENDA DA PONTE - ITU

O trabalho foi realizado na Fazenda da Ponte (Figura 2), localizada no município de Itu (23° 15' 57" Sul, 47° 17' 57" Oeste), estado de São Paulo, no período de junho de 2015 a julho de 2017. A propriedade se caracteriza pela presença de vários animais domésticos e silvestres, principalmente a capivara e por margear o rio Tietê.

Figura 2 – Fazenda da Ponte – Itu – SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

2.2.2 AVALIAÇÃO DA INFESTAÇÃO

Foi feita vistoria da fazenda e, logo depois, foram colocadas armadilhas em diferentes pontos definidos como: casa, capela, baia, riacho, mina, trilha da mina, rio, piquete e cachoeira,

(Figura 3) para verificar os locais com altos níveis de infestações, o que determinou os pontos estratégicos de avaliação mensal para o programa de controle integrado durante o primeiro ano e uma avaliação bimestral no segundo ano.

Figura 3 – Locais onde foram feitas vistorias, em frente à casa principal, onde possuía mata ciliar, A e B; Distribuição dos bovinos e equinos, C e D; Atrás da casa principal, E e F; Garagem, G; Caminho onde localizava a capela, H; Caminho da mina de água, I; Piquetes e baia, J; Caminho da cachoeira, Itu - SP.





Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

2.2.3 COLETAS E CONTAGENS DE CARRAPATOS

Para a coleta de carrapatos foram utilizadas armadilhas em cortes retangulares de pano sintético branco, à base de polipropileno e viscosa (Figura 4), popularmente conhecido como “tnt”, com aproximadamente 350 cm² de área cada, no centro dos panos foi colocado 100g de gelo seco para que o CO₂ (liberado durante a sublimação) atraísse os carrapatos e após 1h foram recolhidas, conforme técnica adaptada de Gray (1985).

Figura 4 – Armadilha para atração de carrapatos



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

Os panos foram acondicionados em sacos plásticos (Figura 5-A), lacrados, devidamente identificados, e encaminhados ao laboratório para contagem das ninfas, larvas e adultos (Figura 5-B). Em seguida foi feita a identificação das espécies encontradas na propriedade de carrapatos adultos, através de microscópio estereoscópio lupa (Figura 5-C) usando a chave proposta por GUIMARÃES et al., (2001).

Figura 5 – Armadilhas acondicionadas em sacos plásticos, A; Contagem de larvas, ninfas e adultos, B; Identificação dos carrapatos, C.





Fonte: ANJOS, K. A., 2018.

2.2.4 MANEJO DOS ANIMAIS

Avaliou-se a disposição dos piquetes, baias e outras instalações que abrigavam animais domésticos, bem como as áreas de abrigo e circulação de animais silvestres, determinando a implantação de mudanças estratégicas de manejo.

Foi adotado regime de banhos para os equinos, com carrapaticida adequado, logo no início dos trabalhos as pulverizações foram feitas semanalmente entre agosto e outubro de 2015. Posteriormente, passou-se a utilizar pulverizações semanais de abril a julho.

Os bovinos foram tratados, com carrapaticida indicado pelo teste do biocarrapaticidograma, sendo que os banhos foram realizados nos meses de outubro a março, sendo que os intervalos seguiram a determinação conforme o produto selecionado.

2.2.5 TESTE DE BIOCARRAPATICIDOGAMA

Foram coletadas aproximadamente 200 teleóginas dos bovinos, que foram acondicionadas em recipiente seco e limpo e levadas para o laboratório. Foram utilizados produtos carrapaticidas comerciais nas diluições indicadas em suas bulas. Os carrapatos foram

lavados em água corrente e secados em papel toalha. Foram separados 3 frascos contendo 10 teleóginas para cada produto e controle, as fêmeas foram pesadas e em seguida imersas nos produtos carrapaticidas durante 5 min. Após este processo as teleóginas foram retiradas da solução e secas em papel toalha e transferidas para placas de Petri devidamente identificadas e foram mantidas em estufa tipo B.O.D. a temperatura de 28°C e 80% de umidade durante 15 dias.

Após esse período os ovos foram pesados e colocados em tubos de ensaios identificados tampados com algodão umedecido e mantidos na estufa na mesma temperatura e umidade citada acima, durante 15 dias para a eclosão das larvas, em seguida foi feita a avaliação da porcentagem de eclosão de cada tubo. Os cálculos para avaliação das taxas de eficácia dos produtos foram feitos de acordo com Drummond et al., (1973).

2.2.6 TREINAMENTO DOS FUNCIONÁRIOS

Foi feito treinamento dos funcionários (Figura 6) capacitando-os quanto as diversidades de carrapatos existentes na propriedade, à biologia, ecologia, e controle dos mesmos. Receberam orientações em relação a FMB, principalmente quanto aos sintomas da doença e os devidos procedimentos

Também foram orientados a fazer o roçado nas áreas, ao redor das baias, lago e próximo à entrada da trilha para a cachoeira a cada 30 dias.

Figura 6 – Treinamento de funcionários - Itu -SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

2.2.7 MANUTENÇÃO DOS GRAMADOS

Os funcionários foram instruídos a fazerem regularmente a manutenção dos gramados, deixando-os sempre baixos, no entorno das casas e demais instalações, a cada 30 dias de dezembro a março dos anos de experimento (Figura 7).

Figura 7 – Gramados altos em torno das casas - Itu -SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

2.2.8. MONITORAMENTO

O monitoramento foi realizado mensalmente entre junho de 2015 a junho de 2016 e bimestral entre julho de 2016 a julho de 2017, com a colocação de armadilhas nos pontos de maior infestação previamente identificados. As armadilhas eram recolhidas e depositadas em sacos plásticos corretamente identificados e levados para o laboratório para a contagem dos carrapatos e identificação dos mesmos.

2.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir do número de carrapatos adultos, ninfas e larvas encontradas, foram comparados períodos e pontos entre si, de acordo com o número de eventos e com o modelo de Poisson com excesso zero em uma abordagem Bayesiana (MAZIN et al., 2008). O cálculo foi feito utilizando o programa Winbugs com o Gibbs para obter estimativas dos parâmetros do modelo.

Os parâmetros foram estimados usando o algoritmo de Gibbs-Sampling e Metropolis-Hastings. Quinze mil amostras foram geradas e cinco mil desses quinze mil foram descartados (“burn in samples”) para excluir o efeito dos valores iniciais utilizados no algoritmo de simulação. Além disso, interações consecutivas 100a; 200a; 300a, e assim por diante. Foram considerados, resultando em uma amostra final de 100 cadeias simuladas para cada parâmetro. A convergência do algoritmo foi verificada através de gráficos temporais das amostras geradas, utilizando técnicas padrão disponíveis na literatura (GELMAN; RUBIN, 1992).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 PARASITOS CAPTURADOS

Na Tabela 1 estão os dados referentes ao total de carrapatos coletados em armadilhas de CO₂, nas visitas realizadas no período de julho de 2015 a julho de 2017. Foram capturados 1.721 carrapatos em vida livre, sendo todos do gênero *Amblyomma*. Dos carrapatos coletados, 450 eram larvas, seguidas por 1.090 ninfas e 181 adultos. Dos adultos coletados, apenas um foi identificado como *Amblyomma dubitatum*, enquanto o restante foi identificado como *Amblyomma sculptum*.

Com relação ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram coletadas aproximadamente 200 fêmeas ingurgitadas dos bovinos presentes na propriedade para realização do teste de biocarrapaticidograma.

Tabela 1 – Número de carrapatos e espécies encontradas em vida livre na Fazenda da Ponte no município de Itu, São Paulo em julho 2015 a julho de 2017.

| Espécie de carrapato | Larva | Ninfa | Adultos | Total |
|-----------------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
| <i>Amblyomma spp.</i> | 450 | | | 450 |
| <i>Amblyomma sculptum</i> | | 1090 | 180 | 1270 |
| <i>A. dubitatum</i> | 0 | 0 | 1 | 1 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

2.3.2 HOSPEDEIROS PRESENTES NA PROPRIEDADE

Os animais domésticos presentes na propriedade incluíam cães, equinos, bovinos, galinhas e patos. A fauna silvestre era representada pelas capivaras e por diversas espécies aviárias. Observou-se que os equinos estavam infestados por *A. sculptum* e os bovinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Nos cães não foram encontrados carrapatos e, segundo

funcionários, estes já vinham sendo tratados com carrapaticida. Nos animais silvestres não se fez investigação quanto à infestação por carrapatos.

2.3.3 PRODUTO QUÍMICO INDICADO

Após teste de biocarrapaticidograma indicou-se para os bovinos o carrapaticida contendo uma combinação de piretróides e organofosforados, quais sejam, fenthion, cipermetrina e clorpirifós. Foi recomendado que se efetuassem os banhos conforme indicação do fabricante.

Em razão do grau de infestação por *A. sculptum*, indicou-se para os cavalos tratamento com carrapaticida à base de deltametrina. Logo no início dos trabalhos as pulverizações foram feitas semanalmente entre agosto e outubro de 2015. Posteriormente, passou-se a utilizar o esquema preconizado em literatura com pulverizações semanais de abril a julho.

2.3.4 DETERMINAÇÃO DE LOCAIS PARA CAPTURA DE CARRAPATOS

Na tabela 2 são apresentados os nove locais de captura de carrapatos escolhidos para avaliação preliminar do nível de infestação.

Tabela 2 – Levantamento preliminar de infestação de carrapatos *Amblyomma sculptum* em diferentes pontos da fazenda da Ponte

| Local | Larvas | Ninfas | Adultas |
|------------------|--------|--------|---------|
| Casa | 1 | 0 | 0 |
| Capela | 1 | 0 | 0 |
| Baia | 1 | 2 | 35 |
| Riacho | 26 | 110 | 6 |
| Trilha mina | 1 | 2 | 2 |
| Mina | 0 | 0 | 0 |
| Rio | 2 | 104 | 0 |
| Piquet | 5 | 3 | 8 |
| Trilha cachoeira | 4 | 1 | 7 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

Depois desta coleta foram selecionados seis locais para captura de carrapatos e monitoramento do grau de infestação da propriedade, com vistas à mensuração da eficácia das medidas de manejo integrado propostas. Estes locais foram identificados como: “baia - A”, “piquete - B”, “riacho - C”, “cachoeira - D”, “equino - F” (pasto onde foram realocados os cavalos) e “rio - E” (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de larvas, ninfas e adultos de *Amblyomma sculptum* encontradas nos diferentes locais de avaliação nos anos de 2015 a 2017

| Data/Local | A | | | B | | | C | | | D | | | E | | | F | | |
|------------|----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|-----|----|-----|-----|---|
| | L | N | A | L | N | A | L | N | A | L | N | A | L | N | A | L | N | A |
| 07/15 | 48 | 0 | 6 | 1 | 0 | 4 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | 2 | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| 08/15 | 1 | 2 | 35 | 5 | 3 | 8 | 1 | 1 | 0 | 4 | 1 | 7 | 2 | 104 | 0 | 26 | 110 | 6 |
| 09/15 | 3 | 8 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 315 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 10/15 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 218 | 14 | 2 | 7 | 0 |
| | | | | 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| 12/15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 02/16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 04/16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 05/16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 06/16 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 245 | 17 | 0 |
| 07/16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 50 | 1 | 0 | 78 | 1 | 0 |
| 09/16 | 0 | 6 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 29 | 52 | 2 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 9 |
| 11/16 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | 1 |
| 01/17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 02/17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 03/17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 05/17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 07/17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Locais identificados como: “baia - A”, “piquete - B”, “riacho - C”, “cachoeira - D”, “rio - E” e “equino - F” (pasto onde foram realocados os cavalos) .

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

2.3.5 MEDIDAS DE MANEJO DAS PASTAGENS E DOS ANIMAIS

As diferentes espécies domésticas foram segregadas. Os equinos foram realocados, saindo da área à beira do rio para um novo local de pastagem (identificado como “equinos”), de modo que os mesmos fossem mantidos fora do contato com outros animais, especialmente as capivaras, visto serem ambos hospedeiros primários do *A. sculptum*.

A área à beira do rio era caracterizada pela presença constante de capivaras e possuía vegetação rasteira. Nesta área foi adotada a medida de roçamento, mantendo a vegetação sempre baixa para reduzir os abrigos à disposição do *A. sculptum*. Neste local, já se encontrava instalada uma cerca elétrica, que o separava das demais áreas da fazenda. Entretanto, antes da introdução das medidas de manejo integrado, esta área era frequentada por todos os animais domésticos mantidos na propriedade, criando uma promiscuidade que favorecia a infestação

por *A. sculptum*. Assim sendo, ativou-se a cerca elétrica e todos os animais domésticos foram removidos dali.

Todas as áreas gramadas da propriedade passaram a ser mantidas sempre baixas, através de roçamento a cada 30 dias.

2.3.6 AVALIAÇÃO DO *Amblyomma sculptum* DOS NÍVEIS DE INFESTAÇÃO – PARÂMETROS TEMPORAIS E ESPACIAIS

A Tabela 4 indica os tamanhos populacionais estimados em seus diferentes estágios de desenvolvimento, nos seis locais de coleta estabelecidos para a avaliação dos níveis de infestação correspondentes aos anos de 2015, 2016 e 2017.

Tabela 4 – Estimativa do nível de infestação de larvas, ninfas e adultos de *A. sculptum* nos seis pontos de avaliação na Fazenda da Ponte - Itu nos anos de 2015 a 2017. Locais na fazenda que foram avaliados: A – Baia; B – Piquete; C – Riacho; D – Cachoeira; E – Rio; F – Equino. IC: Intervalo de confiança.

| Ano | Local | Larvas | | | Ninfas | | | Adultos | | | Total | | |
|------|-------|------------|--------|-------|------------|--------|--------|------------|--------|-------|------------|--------|--------|
| | | Estimativa | IC 95% | | Estimativa | IC 95% | | Estimativa | IC 95% | | Estimativa | IC 95% | |
| 2015 | A | 10,20 | 7,66 | 13,17 | 2,00 | 1,02 | 3,45 | 8,09 | 5,87 | 10,75 | 20,52 | 16,81 | 24,70 |
| | B | 3,42 | 2,06 | 5,32 | 5,18 | 3,46 | 7,48 | 4,05 | 2,58 | 6,06 | 13,08 | 10,16 | 16,51 |
| | C | 1,31 | 0,57 | 2,55 | 0,29 | 0,04 | 1,00 | 0,48 | 0,13 | 1,27 | 2,04 | 1,07 | 3,51 |
| | D | 0,75 | 0,24 | 1,77 | 0,26 | 0,04 | 0,91 | 6,56 | 4,60 | 8,96 | 7,65 | 5,49 | 10,35 |
| | E | 11,04 | 8,32 | 14,19 | 127,00 | 117,00 | 137,10 | 4,26 | 2,70 | 6,29 | 142,50 | 132,40 | 153,00 |
| | F | 5,51 | 3,74 | 7,85 | 23,23 | 19,27 | 27,60 | 1,22 | 0,51 | 2,43 | 30,07 | 25,52 | 35,11 |
| 2016 | A | 0,07 | 0,00 | 0,39 | 0,90 | 0,40 | 1,69 | 0,15 | 0,02 | 0,49 | 0,97 | 0,46 | 1,78 |
| | B | 0,15 | 0,02 | 0,56 | 0,18 | 0,03 | 0,62 | 0,16 | 0,03 | 0,56 | 0,42 | 0,14 | 1,01 |
| | C | 0,03 | 0,00 | 0,29 | 1,20 | 0,60 | 2,13 | 0,13 | 0,02 | 0,49 | 1,34 | 0,70 | 2,28 |
| | D | 0,13 | 0,02 | 0,51 | 0,15 | 0,02 | 0,56 | 0,37 | 0,11 | 0,90 | 0,63 | 0,24 | 1,31 |
| | E | 0,84 | 0,36 | 1,63 | 6,20 | 4,62 | 8,14 | 0,78 | 0,33 | 1,55 | 2,42 | 1,51 | 3,68 |
| | F | 34,21 | 30,41 | 38,49 | 33,92 | 30,03 | 38,17 | 3,90 | 2,66 | 5,41 | 72,38 | 66,56 | 78,46 |
| 2017 | A | 0,05 | 0,00 | 0,41 | 0,00 | 0,00 | 0,30 | 0,11 | 0,00 | 0,55 | 0,13 | 0,00 | 0,59 |
| | B | 0,03 | 0,00 | 0,37 | 0,00 | 0,00 | 0,30 | 0,07 | 0,00 | 0,48 | 0,09 | 0,00 | 0,52 |
| | C | 0,02 | 0,00 | 0,32 | 0,00 | 0,00 | 0,27 | 0,29 | 0,05 | 0,94 | 0,32 | 0,06 | 1,01 |
| | D | 0,02 | 0,00 | 0,32 | 0,00 | 0,00 | 0,26 | 0,22 | 0,03 | 0,84 | 0,21 | 0,03 | 0,78 |
| | E | 0,19 | 0,02 | 0,78 | 0,00 | 0,00 | 0,16 | 0,23 | 0,03 | 0,82 | 0,47 | 0,11 | 1,29 |
| | F | 0,20 | 0,02 | 0,82 | 0,00 | 0,00 | 0,29 | 0,70 | 0,22 | 1,65 | 0,96 | 0,36 | 2,08 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

Nos gráficos a seguir (Figura 8), foram comparados os números absolutos de carrapatos em seus diferentes estágios de desenvolvimento que foram encontrados nos seis locais de coleta para avaliação do nível de infestação. Os dados foram agrupados em dois períodos anuais correspondentes ao primeiro e ao segundo ano de experimento, que foram de julho de 2015 a junho de 2016 e de julho de 2016 a junho de 2017, respectivamente, de acordo com o ciclo anual do *Amblyomma sculptum*.

O local identificado como A era um pasto em frente a um estábulo de alvenaria para cavalos, que não estava em uso porque o rebanho da fazenda era mantido em outro lugar. O chão estava coberto de grama comum. Mesmo que este local não fosse usado como abrigo de animais regularmente, ainda estava aberto para cavalos que passavam. Para este local foi adotado o roçamento da vegetação. Os carrapatos capturados nos anos de 2016 e 2017 foram significativamente reduzidos em relação a 2015 não sendo capturados nenhum adulto ou larva.

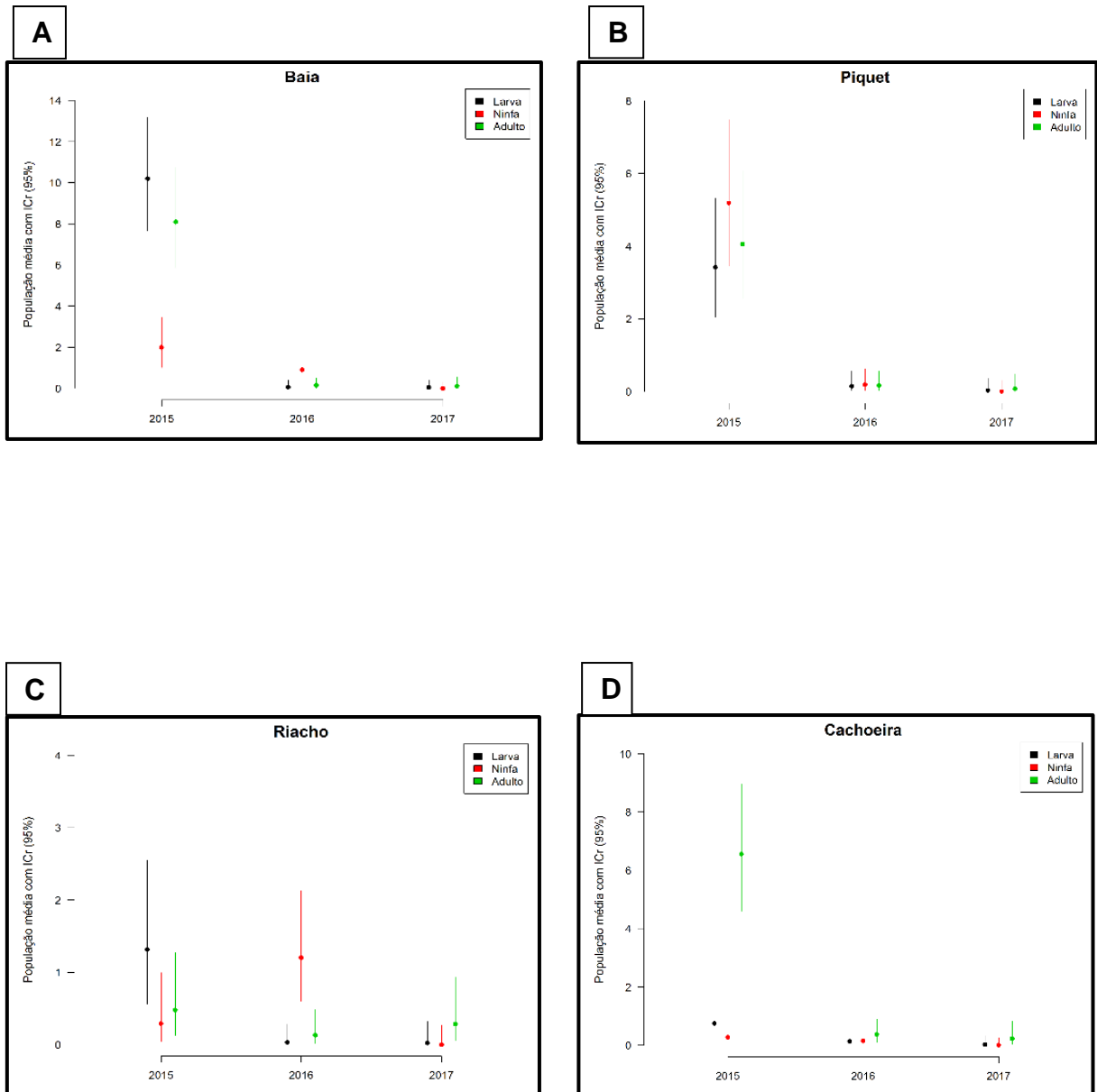
O local rotulado C geralmente apresentava baixos níveis de infestação ao longo de todo o tempo do procedimento experimental. No entanto, o número de ninfas e adultos aumentou, sem capturas de larvas nos anos de 2016 e 2017.

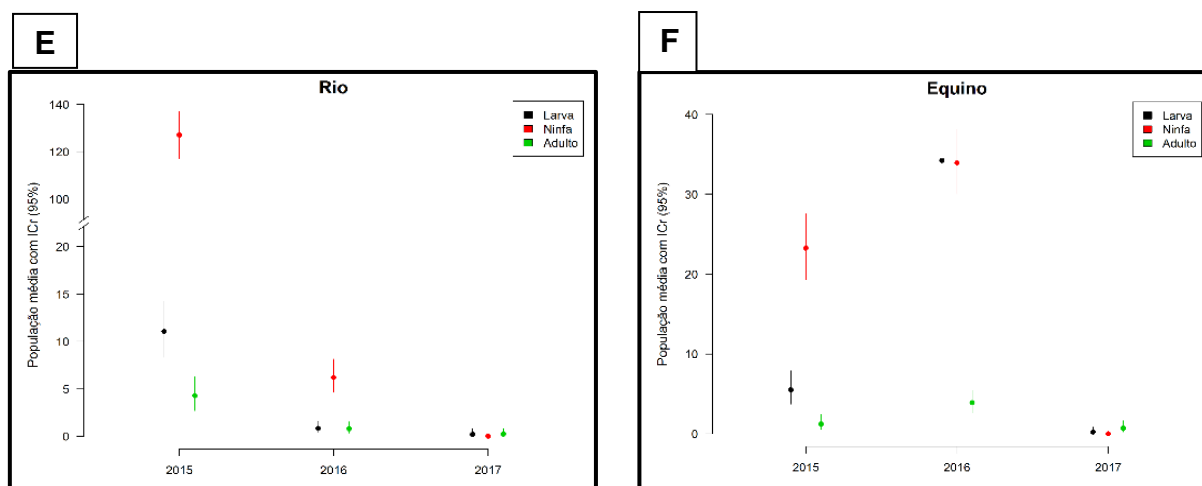
Nos locais classificados como A e D, não havia animais presentes regularmente, mas ambos os locais eram usados como passagem por cavalos. Portanto, a única ação recomendada para esses locais era manter o gramado baixo. Ambos os locais mostraram reduções significativas nos níveis de infestação. Nos anos de 2016 e 2017, nenhuma larva foi capturada nesses locais.

Um grande número de carrapatos foi capturado em 2015 no local de coleta denominado E. Todos os estágios de desenvolvimento do carrapato estavam presentes, mas a maior proporção dos espécimes foi representada por ninfas. Nos anos de 2016 e 2017, houve decréscimos notáveis nessas populações. Alguns animais foram retirados deste local, e o mesmo manejo de roçamento citado acima foi recomendado. A presença de animais foi limitada apenas às capivaras.

Os equinos foram mantidos dentro da área que lhes foi reservada (local F) e receberam tratamento acaricida semanal nos meses de agosto a outubro de 2015 e de abril a julho nos anos de 2016 e 2017. Porém em uma das visitas de monitoramento, observou-se uma falha no manejo proposto. Nesta ocasião, os cavalos que previamente estavam isolados foram reintroduzidos no local ocupado pelas capivaras, onde tiveram novo contato com o estoque de parasitos mantido pelos roedores (Figura 9). Desta forma, houve redução na quantidade de ninfas e larvas, acompanhado de um aumento no número de carrapatos adultos.

Figura 8 – Número estimado de larvas, ninfas e adultos do carrapato estrela nos locais rotulados de A a F no período entre junho de 2015 e julho de 2017. * ICR – Intervalo de credibilidade.





Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

Figura 9 – Equinos recolocados na área “rio”, Itu - SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

A Tabela 5, apresenta uma análise descritiva das médias dos totais brutos de adultos, ninfas e larvas capturados nas armadilhas ao longo de todo período experimental. Observa-se uma intensa redução do número de indivíduos.

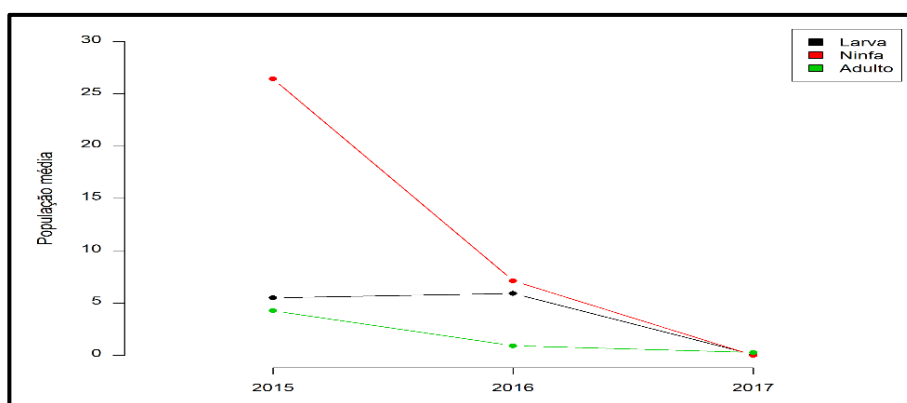
Tabela 5 – Análise descritiva da média do total bruto de adultos, ninfas e larvas capturados nas armadilhas ao longo de todo experimento.

| Tempo | População média | | |
|------------|-----------------|--------|--------|
| | Adultos | Ninfas | Larvas |
| 2015 (n=5) | 4,27 | 26,43 | 5,50 |
| 2016 (n=8) | 0,92 | 7,13 | 5,92 |
| 2017 (n=5) | 0,27 | 0,00 | 0,07 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

A Figura 10 mostra a diferença média estimada da população entre os locais ao longo do tempo.

Figura 10 – Números médios estimados de larvas, ninfas e adultos do carrapato estrela na fazenda entre junho de 2015 e julho de 2017.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados evidenciam a eficácia da proposta de manejo integrado sugerida pela FAO (2018). Desde as primeiras coletas na Fazenda da Ponte, foi observada a abundância de capivaras na beira do rio e, conseqüentemente, um número maior de carrapatos neste ponto de amostragem, enquanto que a quantidade de carrapatos capturados era costumeiramente um pouco menor nas outras áreas de coleta. A área na beira do rio se caracterizava por mato alto e pela presença de diversos animais domésticos e selvagens, especialmente capivaras e equinos. Os achados sugerem que há um papel do equino na dispersão desses carrapatos para as demais áreas da fazenda, pouco frequentadas pelas capivaras. Uma situação similar foi descrita por Siqueira (2017), que demonstrou abundância de *A. sculptum* em uma área florestal, identificando-a como fonte de infestação. A autora notou que animais que frequentavam essa área eram responsáveis por carrear os parasitos para locais mais distante da fonte de infestação.

No início dos trabalhos experimentais na Fazenda da Ponte, os equinos foram encontrados sendo mantidos sem nenhum tipo de tratamento químico e em contato direto com as capivaras, o que pode explicar a elevada carga parasitária de carrapatos do gênero *Amblyomma* dispersa pela propriedade, concordando com LABRUNA et al., (2004), que registrou alta carga de carrapatos quando os equinos não recebiam tratamento com carrapaticidas. LABRUNA et al., (2004) propuseram que em áreas com alto grau de infestação os banhos carrapaticidas sejam feitos de abril a outubro e que após um ano de controle, quando a carga parasitária estiver reduzida, os banhos sejam feitos de abril a julho, em razão da praticidade, menores custos de mão-de-obra, menor consumo de carrapaticidas, e menor exposição dos animais, do homem e meio ambiente a produtos químicos. Esta foi a estratégia adotada no presente trabalho. No primeiro ano, utilizamos os banhos carrapaticidas de agosto a outubro. Após observarmos a diminuição da carga parasitária, foram adotados os banhos de abril a julho, para o segundo ano em diante, demonstrando a eficácia da estratégia proposta.

O presente trabalho também indicou como medida de manejo para a fazenda, a manutenção de toda área de gramado bem roçada e baixa, o que se revelou uma medida eficaz, obtendo-se diminuição das infestações no segundo ano com exceção do local identificado como “equino”. LABRUNA et al., (2001) constataram que altas infestações por carrapatos do complexo *Amblyomma* nos equinos estão fortemente dependentes da presença de pastos sujos. LABRUNA et al., (2004) demonstraram que pastos sujos proporcionam condições favoráveis

de microclima, colaborando para sobrevivência e desenvolvimento destes carrapatos no ambiente.

Houve um grande aumento de carrapatos capturados nas avaliações do local “equino” no segundo ano. Entretanto, atribui-se tal fato a uma falha no manejo proposto na propriedade. Em uma das visitas de monitoramento, os equinos foram encontrados novamente na beira do rio, local onde se encontrava as capivaras. Este incidente da reintrodução dos equinos na área na beira do rio parece guardar relação com o relato de LABRUNA et al. (2004). Os autores afirmaram que, mesmo quando o controle de carrapatos é obtido com banhos estratégicos nos equinos de forma intensiva, condições favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos permitem sua perpetuação no ambiente. Desta forma, parte da população poderia ser mantida alimentando-se em algumas espécies de animais silvestres, possibilitando a sua sobrevivência, podendo assim nunca ser extinta da área. No caso da Fazenda da Ponte, é possível entender que a população de capivaras era responsável pela manutenção dos parasitos numa condição análoga à de pasto sujo.

Observa-se que as contagens das capturas efetuadas na área denominada “rio” mantiveram-se sem aumento ao longo do segundo ano de trabalho, apesar do incidente da reintrodução temporária dos equinos. Tal achado parece indicar que é o contato entre capivaras e equinos que promove um aparente incremento da população parasitária. Após o episódio, não se notou aumento da população de carrapatos na beira do rio. Por outro lado, quando a tropa de equinos retornou à pastagem previamente designada, verificou-se crescimento do número de parasitos capturados naquele ponto específico, ao contrário da tendência que se notava nos demais pontos de coleta.

Embora no começo deste trabalho os bovinos estivessem na beira do rio, juntos com os demais animais domésticos e silvestres, não foi observada infestação destes pelos carrapatos adultos do gênero *Amblyomma* corroborando com o que foi descrito por Siqueira (2017), que sugeriu também a preferência desta espécie por hospedeiros primários.

Foi encontrado somente um indivíduo da espécie *A. dubitatum*, capturado no ponto de coleta denominado “equinos”. Siqueira (2017) também achou esta espécie em números reduzidos nos pastos e em números significativamente menores do que de *A. sculptum*. A espécie *A. dubitatum* tem como hospedeiro primário a capivara (LABRUNA et al., 2004), animal que era constantemente observado na fazenda. Este carrapato está associado a ambientes mais úmidos e alagáveis (SZABÓ et al., 2007; QUEIROGAS et al., 2012), mas em nossa amostragem, ao longo de dois anos, não resultou na captura de nenhum outro indivíduo, mesmo em áreas que, teoricamente, são preferidas por *A. dubitatum*.

Apesar do modelo não ter sido delineado especificamente para mensurar o papel da interação entre cavalos e capivaras na potencialização da infestação pelo *A. sculptum*, os resultados obtidos sugerem fortemente que a segregação dessas espécies é uma medida importante e necessária em programas de manejo integrado do carrapato em áreas rurais.

2.5 CONCLUSÕES

Na Fazenda da Ponte o controle integrado de pragas se revelou eficaz na redução da infestação por *A. sculptum*, porém o seu sucesso está diretamente ligado ao comprometimento dos funcionários da propriedade quanto à sua execução.

Nas áreas onde ocorria o contato entre capivaras e equinos se constatavam as maiores cargas parasitárias, mesmo quando os equinos já tinham sido tratados com carrapaticida químico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.9, p. 17-21, 1989.

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

DRUMMOND R.O; ERNST, S.E; TREVINO, J.L; GLADNEY, W.J. GRAHAM Oh1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **J Econ Entomol**; v. 66(1): 130-133, 1973.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em <<http://fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en>>, acessado em 06 de agosto de 2018.

GELMAN, A.; RUBIN, D. B. Inference from iterative simulation using multiple sequences. **Stat. Sci., Hyward**, v.7, n.4, p.457-472, 1992.

GRAY, J.S. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. **Experimental and Applied Acarology**, v. 1, p. 35-44, 1985.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitas de Importância Veterinária. São Paulo: **Editora Plêiade/FAPESP**, p.52-104, 2001.

HADDAD JR V, HADDAD MR, SANTOS M, CARDOSO JLC. Skin manifestations of tick bites in humans. **An Bras Dermatol**, v. 93(2), p. 251–255, 2018.

LABRUNA, M.B.; KEBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H; DE WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p.1-14, 2001.

- LABRUNA, M.B.; LEITE, R..C.; GOBESSO, A.A.O.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Rev. Ciência Rural**, v. 34, p.195-200, 2004.
- LABRUNA M.B., KAMAKURA O., MORAES-FILHO J., HORTA M.C., PACHECO R.C. Rocky mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15 (3), p. 459-460, 2009.
- LABRUNA M.B., SOARES H.S., CABRERA R.R., SOARES J.F., MARTINS T.F. Cross-mating experiments with geographically diferente populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol.**, v. 54, p. 41–49, 2011.
- MAZIN, S. C.; OLIVEIRA, M. S.; MARTINEZ, E. Z.; ACHCAR, J. A.; RAMOS, S. G. Uso de um modelo bayesiano de Poisson com excesso de zeros na análise de dados de lesões miocárdicas em recém-nascidos com cardiopatias congênitas complexas. **Rev. Bras. Biom., São Paulo**, v.26, (4), p.113-123, 2008.
- MENEZES, K. M. F. **Reconstrução tridimensional do lobo olfativo do carrapato *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)**. 2017. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área de Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- QUEIROGAS V. L, DEL CLARO K, NASCIMENTO AR, SZABÓ MP. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. **Exp Appl Acarol**, v. 57(1): 75-82, 2012.
- SZABÓ , M.P.J.; OLEGÁRIO, M.M.; SANTOS, A.L.Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, p. 73-84, 2007.
- SIQUEIRA, S. M. **Fluxo de carrapatos entre ambientes e animais na fazenda Capim Branco**. 2017. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- SONENSHINE, D.E., ROE, R.M. **Biology of ticks**. 2ª ed. Oxford University Press, New York, v. 1 e 2, 539p, 2014.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Amblyomma sculptum* (Ácari: Ixodidae) - CAMPINAS – SP

RESUMO

Amblyomma sculptum pertence ao complexo *Amblyomma cajennense*, tem grande importância na saúde pública pois, esta espécie está relacionada à transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente da Febre Maculosa Brasileira. Os fungos entomopatogênicos *Beauveria* e *Metarhizium* estão entre os mais utilizados no controle de pragas e já tem demonstrado patogenicidade frente a diversos artrópodes em condições de laboratório, podendo se revelar eficaz como método de controle microbiano a campo. O presente estudo teve como objetivo determinar a dose dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* contra *Amblyomma sculptum* em estudo de campo. O experimento foi realizado no gramado ao redor da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico de Campinas – SP. Foram demarcadas áreas de 6m por 6m intercaladas por um espaço de um metro para cada tratamento. Foram utilizados os fungos *M. anisopliae* (isolado IBCB 425) e *B. bassiana* (isolado IBCB 66), aplicados em suspensões aquosas nas doses de 5×10^{11} , 5×10^{12} e 5×10^{13} conídios por 10.000m^2 , além da parcela testemunha que recebeu apenas água. Também foram utilizados marcadores onde foram colocados carrapatos (10 ninfas ou 10 adultos), cada área de tratamento recebeu 3 marcados, que foram recuperados no primeiro dia após tratamento e os demais a cada 7 dias. A mortalidade dos indivíduos capturados foi avaliada nos dias 1, 3 e 10. Os dados foram submetidos a uma análise estatística utilizando o software livre R (R, 2019). Das dosagens testadas, todas resultaram em mortalidade significativa em comparação ao controle. A CL_{50} para o fungo *B. bassiana* foi de aproximadamente $8,19 \times 10^{12}$ conídios/ha para adultos e $1,69 \times 10^{12}$ conídios/ha para ninfas, enquanto que para o fungo *M. anisopliae* para produzir a mesma proporção de mortalidade estes valores são de $5,93 \times 10^{12}$ conídios/ha para adultos e $3,82 \times 10^{12}$ conídios/ha para ninfas. A dosagem de 5×10^{13} conídios/ha promoveu a maior mortalidade dos carrapatos na avaliação do décimo dia. Com relação aos indivíduos capturados nas parcelas tratadas com *B. bassiana*, foram obtidos percentuais de mortalidade da ordem de 92,9% para adultos, 96% para ninfas, para o fungo *M. anisopliae*, a mortalidade alcançou valores de 89,2% para adultos e 80% para ninfas. Os marcadores se revelaram um bom modelo para avaliação da eficácia, obtendo-se mortalidade acima de 96,3% para adultos e 100% para ninfas para ambos os fungos.

Esses resultados sugerem fortemente que os fungos entomopatogênicos testados no presente estudo podem se tornar uma importante ferramenta para o controle de ixodídeos a campo.

3.1 INTRODUÇÃO

Amblyomma. sculptum pertencente ao complexo *A. cajennense*, apresenta baixa especificidade podendo parasitar diversos animais domésticos e silvestres, inclusive o homem, entretanto, os equinos, capivaras e antas estão entre os principais hospedeiros para todos os estágios parasitários deste carrapato (PACHECO et al., 2009; KRAWCZAK et al., 2014), que apresenta grande importância, pois pode transmitir uma diversidade de organismos patogênicos aos seus diferentes hospedeiros, incluindo o agente causador da febre maculosa brasileira (SONENSHINE; ROE, 2014).

Os fungos entomopatogênicos compreendem cerca de 90 gêneros e 700 espécies, destes, *Beauveria* e *Metarhizium* estão entre os mais utilizados no controle de pragas. Eles são capazes de penetrar diretamente pela cutícula do parasita, não necessitando necessariamente de ingestão pelo hospedeiro para iniciar a infecção. Além disso, seu uso é viável por não serem nocivos ao homem e outros animais, sendo considerados promissores como método alternativo ao controle químico dos carrapatos, pois a capacidade de produzir infecção letal em todos os estágios de desenvolvimento de diferentes espécies de carrapatos já foi bem documentada na literatura científica em testes *in vitro* (BITTENCOURT, 1997; ALVES, 1998; ZAPPELINI, 2009).

Os experimentos de campo com aplicação dos fungos entomopatogênicos contra carrapatos limitam-se até o momento pelo trabalho de Garcia (2008). Desta forma, o presente estudo utilizando diferentes dosagens de conídios em aplicação a campo contra *Amblyomma sculptum* permitirá uma maior compreensão de seus efeitos frente a variáveis ambientais e ecológicas. Este conhecimento é essencial e pode ser uma valiosa ferramenta no controle de carrapatos a campo num futuro próximo.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a dose dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* contra *Amblyomma sculptum* em estudo de campo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 DETERMINAÇÃO DA DOSAGEM DOS FUNGOS *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana* PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Amblyomma sculptum* EM CONDIÇÕES DE CAMPO

O ensaio foi realizado no gramado ao redor da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, localizado no município de Campinas (22° 54' 23.2" Sul, 47° 00' 54.5" Oeste), estado de São Paulo (Figura 1), local onde é frequente a presença de capivaras e as pessoas são constantemente atacadas pelos carrapatos.

Figura 1 – Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, Campinas - SP



Fonte: GOOGLE MAPS, 2018

3.2.1.1 Demarcação da área experimental

A área experimental consiste de uma plantação de *Brachiaria decumbens*, na qual foram demarcadas com estacas fincadas na terra, parcelas de aproximadamente 6m por 6m intercaladas por um espaço de um metro, conforme a figura 2.

Figura 2 – Área demarcada para aplicação de diferentes dosagens de fungos (Campinas – SP).



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

3.2.1.2 Coletas de carrapatos

Para a coleta de carrapatos foram utilizadas armadilhas em cortes retangulares de pano sintético branco, à base de polipropileno e viscose, popularmente conhecido como “tnt”, com aproximadamente 0,7 m² de área cada. No centro dos panos colocou-se cerca de 100g de gelo seco para que o CO₂ liberado durante a sublimação atraísse os carrapatos (GRAY, 1985).

3.2.1.3 Aplicação dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*

Os fungos *M. anisopliae* (isolado IBCB 425) e *B. bassiana* (isolado IBCB 66) foram cedidos 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".

Para cada fungo foram utilizadas quatro parcelas, nas quais foram aplicadas suspensões aquosas preparadas nas doses de 5×10^{11} , 5×10^{12} e 5×10^{13} conídios por 10.000m², além da

parcela testemunha que recebeu apenas água (Figura 3). O cálculo do volume de suspensão a ser aplicado em cada parcela foi efetuado de acordo com a carga do pulverizador costal manual. Na parcela controle foi aplicado o mesmo volume de água. A aplicação dos fungos foi efetuada a partir das 17h com pulverizador costal manual (Figura 4).

Antes da aplicação dos fungos entomopatogênicos foi realizada uma avaliação de infestação por captura de carrapatos, usando seis armadilhas atrativas de tecido sintético branco e gelo seco por parcela e recolhidas após 1h (Figura 5).

Após aplicação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram realizadas cinco colheitas consecutivas, no intervalo de aproximadamente sete dias. A avaliação de cada colheita foi feita por parcela, com a captura de carrapatos usando a técnica de Gray (1985). As armadilhas eram recolhidas cerca de 40 minutos depois de lançadas. O gelo seco eventualmente restante era desprezado e os panos eram acondicionados em sacos plásticos, fechados com lacres, devidamente identificados e encaminhados ao laboratório. No Laboratório os carrapatos foram identificados, contados e separados em adultos, ninfas e larvas (Figura 6), em seguida, colocados em tubos de ensaio tampados com algodão umedecido e levados à estufa tipo B.O.D à temperatura de 28°C e 80 % de umidade (Figura 7). Após a contagem (avaliação 1), a mortalidade dos indivíduos capturados foi avaliada no decorrer de 3 dias (avaliação 2) e 10 dias (avaliação 3).

Figura 3 – Preparação de fungos para aplicação (Campinas – SP).



Figura 4 – Aplicação por pulverização utilizando bomba costal (Campinas – SP).



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2017.

Figura 5 – Armadilhas atrativas para captura de carrapatos (Campinas – SP).



Fonte: ANJOS, K. A., 2017.

Figura 6 – Contagem de carrapatos



Fonte: ANJOS, K. A., 2017.

Figura 7 – Parasitos em tubo de ensaio com algodão umedecido



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2017.

3.2.1.4 Marcadores

Os marcadores foram produzidos com tecido de filó de 20 cm por 20 cm onde foram colocados carrapatos (10 ninfas ou 10 adultos), sendo em seguida fechados com barbantes (Figura 8). Esses carrapatos foram obtidos usando armadilhas atrativas em local fora da área demarcada para o experimento e sem contato prévio com fungos entomopatogênicos.

Em todas as áreas demarcadas (nas doses de 5×10^{11} , 5×10^{12} , 5×10^{13} conídios por 10.000m^2 e parcela controle) foram colocados três marcadores com ninfas e três com adultos conforme a figura 9, A e B. Quinze minutos após a aplicação dos fungos foi retirado o primeiro marcador das áreas tratadas e controle. Os marcadores restantes foram recolhidos a cada sete dias. Os carrapatos coletados dos marcadores foram colocados em tubo de ensaio (Figura 10, A e B), tampado com algodão umedecido e levados à estufa tipo B.O.D à temperatura de 28°C e 80 % de umidade. A mortalidade foi avaliada nos dias 1 (avaliação 1), 3 (avaliação 2) e 10 (avaliação 3).

Figura 8 – Marcadores de ninfas e adultos (Campinas – SP).



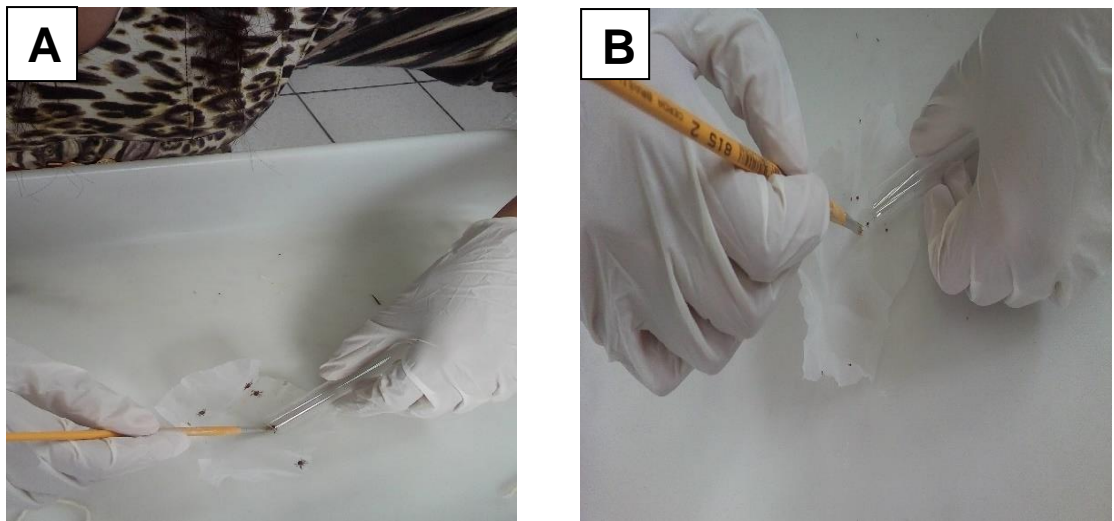
Fonte: ANJOS, K A., 2017.

Figura 9 – Marcadores sendo colocados em áreas demarcadas A e B (Campinas – SP).



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2017.

Figura 10 – Carrapatos adultos colocados em tubo de ensaio, A. Ninfas colocadas em tubos de ensaio, B.



Fonte: ANJOS, K. A., 2017.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística considerou os resultados por colheita, somando o número de indivíduos de cada categoria capturados nas armadilhas a cada ocasião. Calculou-se também o número total de indivíduos de cada categoria capturados somando as cinco colheitas.

Considerando as somatórias de adultos e ninfas capturados nas cinco colheitas, foram obtidos gráficos de perfil que mostram a mortalidade dos indivíduos nas três avaliações. Para visualizar a distribuição dos adultos e ninfas vivas segundo as avaliações no laboratório e as parcelas tratadas com diferentes dosagens dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foram construídos gráficos “boxplot”.

Para análise geral do efeito das dosagens dos fungos aplicadas nas respectivas parcelas, foram somados os resultados de captura de ninfas e adultos das seis armadilhas das cinco colheitas efetuadas. Os resultados de ninfas e adultos foram tratados separadamente.

A partir desta análise geral, foi possível investigar a existência de associação entre o tratamento e a mortalidade no último dia de avaliação usando a estatística de correlação Q_{CS} , na qual são considerados escores para as variáveis ordinais (GIOLO, 2017). Para esta situação, as dosagens dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram consideradas como variáveis ordinais, ao passo que a mortalidade foi considerada uma variável dicotômica (morto, vivo).

Aplicou-se o teste não-paramétrico de Friedman, considerando o nível de significância de 0,05 e tomando como hipótese nula a equivalência das avaliações em relação aos indivíduos vivos para todos os tratamentos.

Com o objetivo de determinar uma concentração adequada para o controle dos carrapatos, foram testados vários modelos para dados binários considerando como variável resposta se o indivíduo coletado morreu ou não até a terceira avaliação em função das dosagens de conídios utilizadas. Os dados foram convertidos em logaritmo na base 10.

Os modelos testados foram logístico, probito, complemento log-log e Cauchy. Estes modelos foram ajustados para total de adultos e ninfas tratados com ambos os fungos. Também foram realizados os testes de razão de verossimilhança (TRV) e o critério de informação de Akaike (AIC), ambos propostos na literatura para seleção de modelos (PAULA, 2013; GIOLO, 2017). Estimou-se a concentração letal mediana (CL_{50}) para cada um dos modelos ajustados, que corresponde à dose de conídios necessária para se obter uma mortalidade em torno de 50% dos indivíduos capturados. Utilizou-se o software livre R (R, 2019) para análise estatística dos dados.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 ARMADILHAS

Na Tabela 1 estão os dados referentes ao total de carrapatos capturados em armadilhas de CO₂ nas áreas demarcadas para experimento, nas visitas realizadas no período de outubro de 2016 a dezembro de 2016. Coletou-se um total de 527 carrapatos em vida livre, todos do gênero *Amblyomma*. Dos carrapatos coletados, 154 eram larvas, seguidas por 173 ninfas e 198 adultos. Dos adultos coletados, apenas dois indivíduos foram identificados como *Amblyomma dubitatum*, sendo o restante identificado como *Amblyomma sculptum*.

Tabela 1 – Número de carrapatos e espécies encontradas em vida livre nas áreas demarcadas para experimento de determinação da dose de fungos entomopatogênicos, no período de outubro de 2016 a dezembro de 2016.

| | <i>Amblyomma</i> spp | <i>Amblyomma sculptum</i> | <i>A. dubitatum</i> | Total |
|----------------|----------------------|---------------------------|---------------------|-------|
| Larvas | 154 | - | - | 154 |
| Ninfas | - | 173 | - | 173 |
| Adultos | - | 196 | 2 | 198 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

3.4.1.1 Análise descritiva dos testes nas parcelas tratadas com diferentes dosagens

Os dados referentes aos indivíduos capturados são apresentados na tabela 2. A maior coleta de adultos e ninfas ocorreu nas parcelas tratadas com o fungo *M. anisopliae*. Larvas foram capturadas somente na última colheita e apenas nas parcelas tratadas com *B. bassiana*.

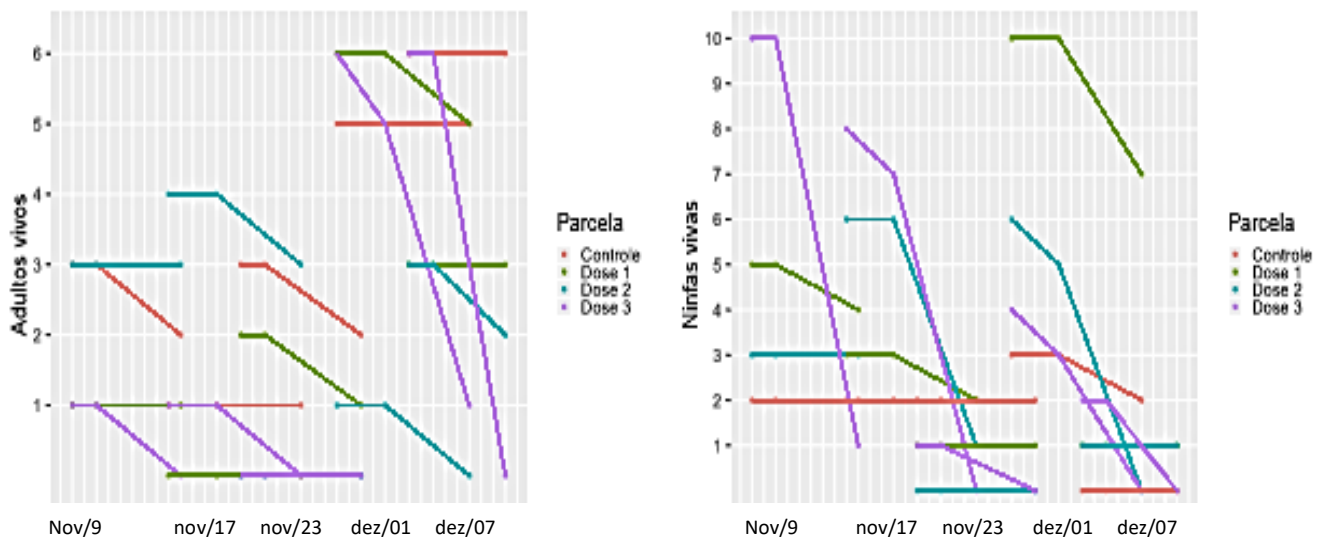
Tabela 2 – Total de indivíduos capturados, adultos, ninfas e larvas, por colheita após aplicação com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*

| <i>Beauveria bassiana</i> (IBCB 66) | | | | <i>Metarhizium anisopliae</i> (IBCB 425) | | | |
|-------------------------------------|--------|-------|-------|--|--------|-------|-------|
| Colheita | Adulto | Ninfa | Larva | Colheita | Adulto | Ninfa | Larva |
| 1 | 8 | 20 | 0 | 1 | 56 | 35 | 0 |
| 2 | 6 | 19 | 0 | 2 | 49 | 23 | 0 |
| 3 | 5 | 4 | 0 | 3 | 15 | 24 | 0 |
| 4 | 18 | 23 | 0 | 4 | 17 | 15 | 0 |
| 5 | 18 | 4 | 154 | 5 | 6 | 6 | 0 |
| Total | 55 | 70 | 154 | Total | 143 | 103 | 0 |
| Média | 11 | 14 | - | Média | 28,6 | 20,6 | - |
| Mediana | 8 | 19 | - | Mediana | 17 | 23 | - |
| Desvio p. | 6,5 | 9,2 | - | Desvio p. | 22,3 | 10,8 | - |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Após aplicação do fungo *B. bassiana*, foram realizadas 5 colheitas de carrapatos nas áreas tratadas, sendo a primeira no dia 9 de novembro e a quinta no dia 7 de dezembro de 2016 (Figura 11).

Figura 11 – Perfil de frequência absoluta dos indivíduos tratados com o fungo *Beauveria bassiana*.



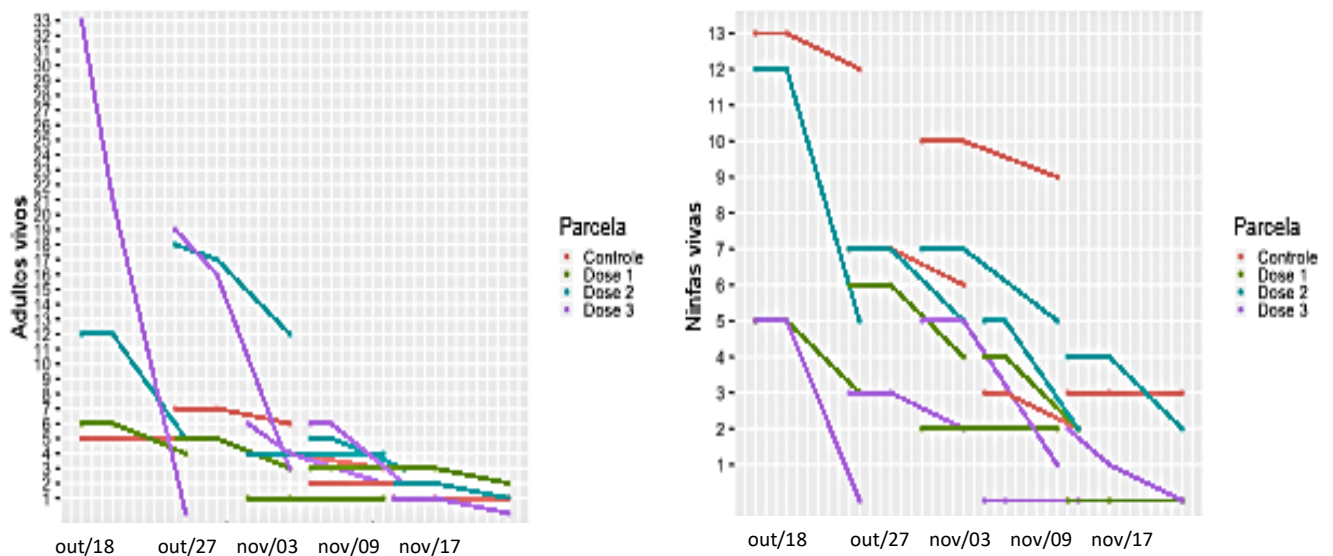
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Em relação aos adultos pode-se observar na figura 11 que o número máximo obtido nas capturas foi de 6 adultos na quarta e quinta colheita. Nenhum adulto foi capturado na segunda colheita na parcela tratada com a dose 1, nem na terceira colheita na parcela tratada com a dose 3. Dos adultos capturados na parcela controle e na parcela tratada com a dose 1 houve só uma morte em duas das cinco colheitas. No caso da dose 2 houve uma morte em três colheitas. Já com a dose 3 todos os indivíduos morreram até a terceira avaliação exceto na quarta colheita, com sobrevivência de um indivíduo decorridos 10 dias.

Em relação às ninfas, foram capturadas no máximo 10 indivíduos na primeira colheita na parcela tratada com dose 3 e na quarta colheita na parcela tratada com dose 1. As ninfas controle capturadas permaneceram vivas, ocorrendo apenas uma morte por ocasião da quarta colheita. Das tratadas com a dose 1, morreram 3 até a terceira avaliação. Das tratadas com a dose 2 na terceira avaliação, todas morreram na quarta colheita, na terceira colheita só uma ninfa sobreviveu e nas demais colheitas não houve mortalidade.

Dos gráficos de perfil para as colheitas com o fungo *M. anisopliae* pode-se observar uma maior variação na mortalidade de ninfas do que na de adultos nas cinco colheitas (Figura 12).

Figura 12 – Perfil de frequência absoluta dos indivíduos tratados com o fungo *Metarhizium anisopliae*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

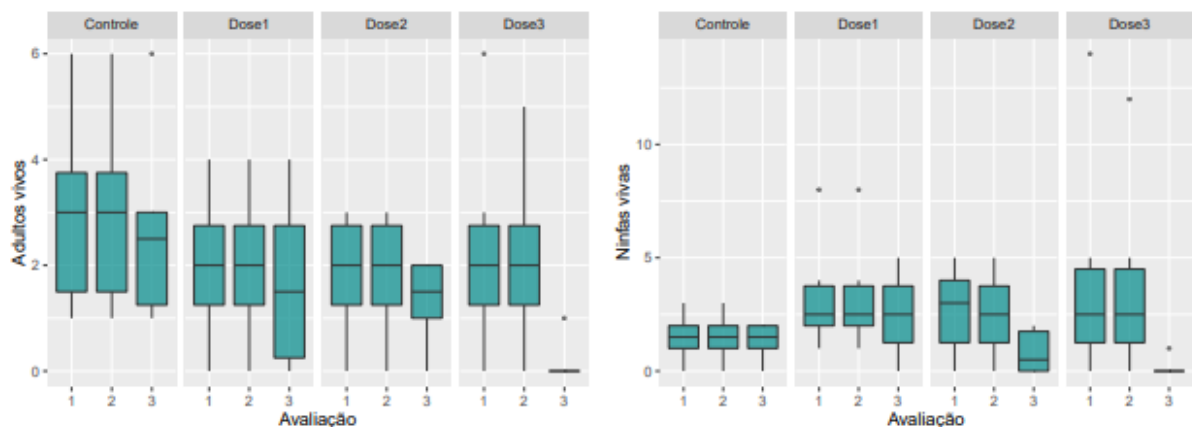
Em relação aos adultos a variação mais destacada aconteceu na segunda colheita realizada em 27 de outubro, sendo que, na parcela tratada com a dose 2 foram capturados 18 adultos, com sobrevivência de 12 carrapatos até a terceira avaliação. Na parcela tratada com a dose 3 foram capturados 19 adultos resultando em 3 sobreviventes até o final da terceira avaliação. Dos adultos capturados na parcela controle registrou-se apenas uma morte, ao passo que, dos capturados na parcela tratada com dose 1 observou-se no máximo duas mortes; com a dose 2 houve no máximo 6 mortes e com a dose 3 ocorreram 16 mortes até a terceira avaliação.

Em relação às ninfas, a dose 2 foi a mais homogênea sendo que nas cinco colheitas morreram entre 2 e 3 ninfas. A dose 3 apresentou maior mortalidade na segunda colheita, na qual morreram 4 indivíduos de um total de 5 capturados. No controle houve no máximo uma ninfa morta e com a dose 1 no máximo 2 ninfas mortas.

3.4.1.2 Análise geral dos testes totais nas parcelas tratadas com diferentes dosagens

Na Figura 13 observa-se diferenças entre adultos e ninfas, porém um comportamento similar entre parcelas tratadas com o fungo *B. bassiana*. Nos adultos o valor mediano de vivos diminuiu na terceira avaliação em todas as parcelas com maior ênfase na dose 3. Já para as ninfas a mediana se mantém para o controle e na dose 1 nas três avaliações e diminuiu nas dosagens 2 e 3 na terceira avaliação.

Figura 13 – Distribuição do número de indivíduos vivos por avaliação e parcela tratados com o fungo *B. bassiana*



As tabelas 3 e 4 apresentam a associação entre o tratamento e a mortalidade para todas as parcelas. Calculou-se ainda o coeficiente de correlação que mede a intensidade de associação linear entre as duas variáveis, o valor negativo indica que o número de vivos diminui à medida que aumenta a dose. A maior intensidade foi verificada para as ninfas tratadas com *B. bassiana* (-0,674). Cabe ressaltar que na interpretação do coeficiente de correlação quanto mais próximo de -1 mais forte é uma possível associação linear.

Tabela 3 – Mortalidade de adultos nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo *B. bassiana* nas diferentes parcelas.

| Parcela | Mortos | | | Resumo total | | Coletados |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-------------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos n (%) | Vivos n (%) | |
| Controle | 0 | 0 | 2 | 2 (11,1) | 16 (88,9) | 18 |
| Dose 1 | 0 | 0 | 2 | 2 (16,7) | 10 (83,3) | 12 |
| Dose 2 | 0 | 0 | 3 | 3 (27,3) | 8 (72,7) | 11 |
| Dose 3 | 0 | 1 | 12 | 13 (92,9) | 1 (7,1) | 14 |
| Total | 0 | 1 | 19 | 20 (36,4) | 35 (63,6) | 55 |

$Q_{CS} = 20,665$ $p < 0,001$. Coeficiente de correlação -0,619

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 4 – Mortalidade de ninfas nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo *B. bassiana* nas diferentes parcelas.

| Parcela | Mortos | | | Resumo total | | Coletados |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos (%) | Vivos (%) | |
| Controle | 0 | 0 | 1 | 1 (11,1) | 8 (88,9) | 9 |
| Dose 1 | 0 | 0 | 5 | 5 (25,0) | 15 (75,0) | 20 |
| Dose 2 | 0 | 1 | 10 | 11 (68,8) | 5 (31,3) | 16 |
| Dose 3 | 0 | 2 | 22 | 24 (96,0) | 1 (4,0) | 25 |
| Total | 0 | 3 | 38 | 41 (58,6) | 29 (41,4) | 70 |

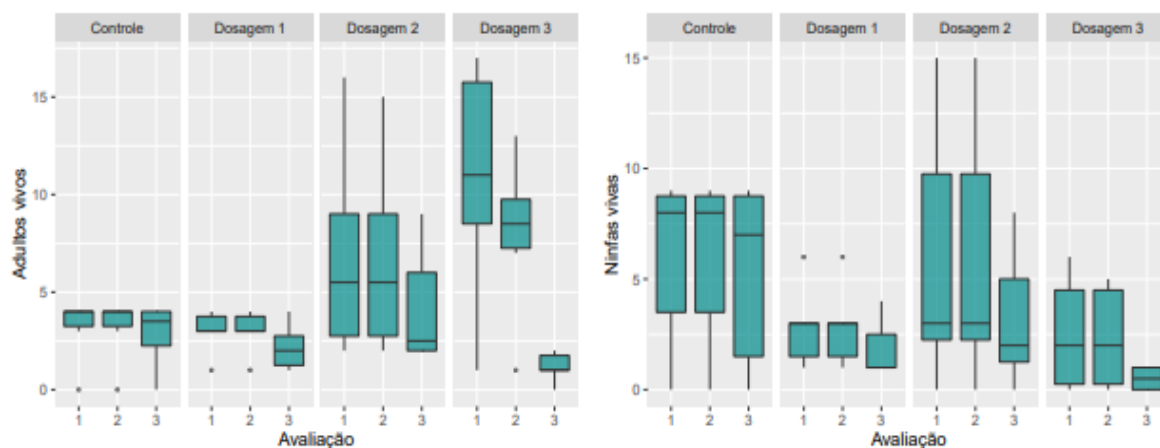
$Q_{CS} = 31,318$ $p < 0,001$. Coeficiente de correlação -0,674

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Em relação aos indivíduos tratados com o fungo *M. anisopliae* (Figura 14), observa-se diversos comportamentos entre adultos e ninfas vivas, sendo que os controles apresentam uma

distribuição constante de vivos nas três avaliações. As dosagens 2 e 3 são similares do ponto de vista da diminuição mediana do número de vivos na última avaliação.

Figura 14 – Distribuição do número de indivíduos, adultos e ninfas vivas, por avaliação e parcela tratados com o fungo *M. anisopliae*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Encontrou-se associação entre o tratamento e a mortalidade para todas as parcelas (Tabelas 5 e 6). Calculou-se ainda o coeficiente de correlação que mede a intensidade de associação linear entre as duas variáveis, o valor negativo indica que o número de vivos diminui à medida que aumenta a dose. A menor intensidade foi verificada para as ninfas tratadas com *M. anisopliae* (-0,466). Cabe ressaltar que na interpretação do coeficiente de correlação quanto mais próximo de -1 mais forte é uma possível associação linear.

Tabela 5 – Mortalidade de adultos nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo *M. anisopliae* nas diferentes parcelas.

| Parcela | Mortos | | | Resumo total | | |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados |
| Controle | 0 | 0 | 2 | 2 (10,5) | 17 (89,5) | 19 |
| Dose 1 | 0 | 0 | 5 | 5 (27,8) | 13 (72,2) | 18 |
| Dose 2 | 0 | 1 | 15 | 16 (39,0) | 25 (61,0) | 41 |
| Dose 3 | 0 | 16 | 42 | 58 (89,2) | 7 (10,8) | 65 |
| Total | 0 | 17 | 64 | 81 (56,6) | 62 (43,4) | 143 |

$QCS = 49,189$ $p < 0,001$. Coeficiente de correlação -0,589

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 6 – Mortalidade de ninfas nos dias 1, 3 e 10 tratados com fungo *M. anisopliae* nas diferentes parcelas.

| Parcela | Mortos | | | Resumo total | | Coletados |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-----------|-----------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos (%) | Vivos (%) | |
| Controle | 0 | 0 | 4 | 4 (11,1) | 32 (88,9) | 36 |
| Dose 1 | 0 | 0 | 6 | 6 (35,3) | 11 (64,7) | 17 |
| Dose 2 | 0 | 0 | 16 | 16 (45,7) | 19 (54,3) | 35 |
| Dose 3 | 0 | 1 | 11 | 12 (80,0) | 3 (20,0) | 15 |
| Total | 0 | 1 | 37 | 38 (36,9) | 65 (63,1) | 103 |

$Q_{CS} = 22,166$ $p = 0,003$. Coeficiente de correlação -0,466

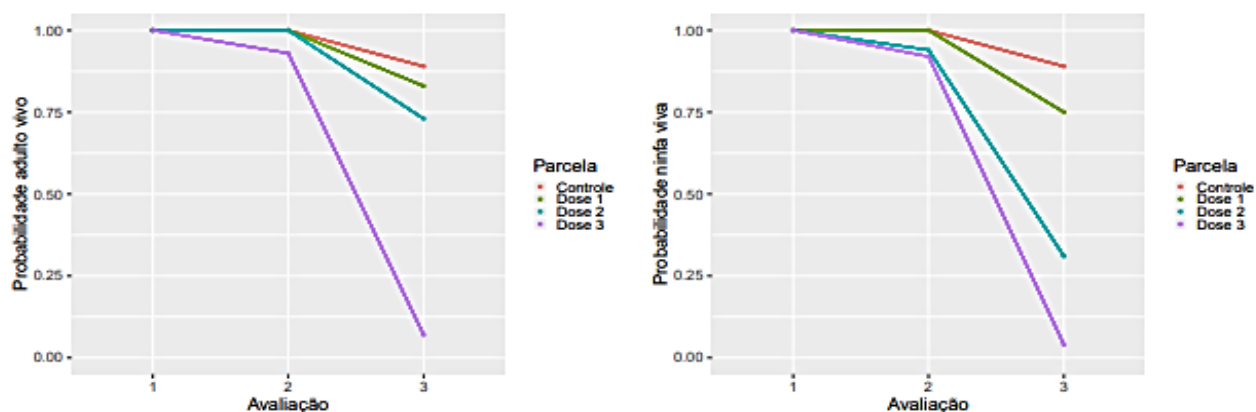
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A evolução da proporção da mortalidade de adultos e ninfas tratados com os dois fungos pode ser descrita por meio de gráficos de perfil, independentemente do número de carrapatos capturados. A seguir são apresentados os gráficos de perfil para o fungo *B. bassiana* e para o fungo *M. anisopliae*. De forma geral estes gráficos corroboram a intensidade da relação linear (negativa) entre o tratamento e a proporção de indivíduos vivos descrita anteriormente (conforme os coeficientes de correlação) sendo que até a terceira avaliação constatou-se uma menor proporção de indivíduos vivos tratados com o fungo *B. bassiana* do que com o fungo *M. anisopliae*.

Os carrapatos tratados com o fungo *B. bassiana* (Figura 15), a mortalidade de carrapatos adultos no controle foi mínima nas avaliações subsequentes à captura. Nas doses 1 e 2, apesar de ocorrer mortalidade, esta foi pouco expressiva em todas as avaliações. No entanto, a diferença com a dose 3 é pronunciada. Em relação à mortalidade das ninfas, não se observam grandes diferenças na eficácia do tratamento entre as dosagens 2 e 3, principalmente na segunda avaliação, já para o controle e a dose 1 a mortalidade é similar.

O teste não paramétrico de Friedman, com nível de significância de 0,05, demonstrou que houve diferenças significativas entre os tratamentos. Para os adultos tratados com o o fungo *B. bassiana* o valor de p foi 0,023 e, segundo uma análise post-hoc, as diferenças se encontraram entre a terceira e as avaliações prévias, entre a primeira e a segunda não houve diferenças. Para as ninfas tratadas com o fungo *B. bassiana* obteve-se o valor de p de 0,024 encontrando-se diferenças nas três avaliações. A análise confirma o observado na Figura 15.

Figura 15 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos, adultos (esquerda) e ninfas (direita), tratados com o fungo *B. bassiana*.

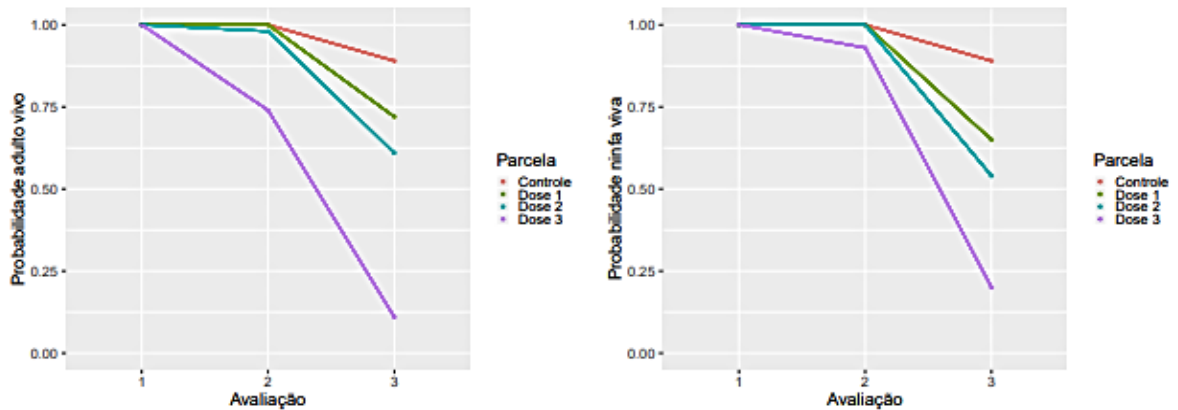


Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Para os carrapatos tratados com o fungo *M. anisopliae* (Figura 16), observa-se um comportamento similar da mortalidade entre adultos e ninfas sendo que os indivíduos do grupo controle se mantiveram vivos em sua maioria até a terceira avaliação. Os achados sugerem que as dosagens 1 e 2 apresentam maior eficácia para ninfas do que para adultos. No entanto, a diferença com a dose 3 é pronunciada. Com a dose 3 a proporção de ninfas que sobreviveram até a terceira avaliação (30%) é levemente maior que os adultos (22%).

O teste não paramétrico de Friedman, com nível de significância de 0,05, demonstrou que houve diferenças significativas entre os tratamentos. Para as ninfas tratadas com o fungo *M. anisopliae* o valor de p foi 0,023 e, segundo uma análise post-hoc, as diferenças se encontraram entre a terceira e as avaliações prévias, entre a primeira e a segunda não houve diferenças. Para adultos tratados com o fungo *M. anisopliae* obteve-se o valor de p de 0,024 encontrando-se diferenças nas três avaliações, confirmando o observado na Figura 16.

Figura 16 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos, adultos (esquerda) e ninfas (direita), tratados com o fungo *M. anisopliae*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

3.4.1.3. Ajuste de modelos estatísticos

Para determinar uma concentração adequada para o controle dos carrapatos, foram ajustados modelos para dados binários, ou seja, a ideia é modelar a probabilidade da ocorrência da morte dado o tratamento, que pela magnitude do mesmo, é usual considerar o logaritmo na base 10, assim, para a primeira dosagem de 5×10^{11} conídios por hectare, tem-se $\log_{10}(5 \times 10^{11}) = 11,699$. Os modelos ajustados foram logístico, probito, complemento log-log e Cauchy.

A seguir esta apresentado a distribuição da mortalidade de todos os indivíduos tratados com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 – Distribuição da porcentagem de mortalidade total dos carrapatos, adultos e ninfas, avaliados no décimo dia após tratamento com o fungo *B. bassiana*.

| Tratamento | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados |
|--------------------|------------|-----------|-----------|
| Controle | 3 (11,1) | 24 (88,9) | 27 |
| 5×10^{11} | 7 (21,9) | 25 (78,1) | 32 |
| 5×10^{12} | 14 (51,9) | 13 (48,1) | 27 |
| 5×10^{13} | 37 (94,9) | 2 (5,1) | 39 |
| Total | 61 (44,8) | 54 (51,2) | 125 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 8 – Distribuição da porcentagem de mortalidade total dos carrapatos, adultos e ninfas, avaliados no décimo dia após tratamento com o fungo *M. anisopliae*.

| Tratamento | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados |
|--------------------|------------|------------|-----------|
| Controle | 6 (10,9) | 49 (89,1) | 55 |
| 5×10^{11} | 11 (31,4) | 24 (68,6) | 35 |
| 5×10^{12} | 32 (42,1) | 44 (57,9) | 76 |
| 5×10^{13} | 70 (87,5) | 10 (12,5) | 80 |
| Total | 119 (48,4) | 127 (51,6) | 246 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Com os dados das tabelas 7 e 8 se obtiveram as estimativas dos modelos mencionados para a mortalidade total de adultos e ninfas sendo que os resultados dos ajustes estão apresentados nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

O valor mediano corresponde à concentração que se espera que produza 50% de mortalidade. Em todos os ajustes a inclusão do tratamento na modelagem é significativa, em todas as situações obtendo-se um valor de p menor que 0,05, tal valor p é baseado no teste de razão de verossimilhança (TRV), no qual quanto maior o valor obtido, melhor o resultado. Em relação ao critério de informação de Akaike (AIC), o melhor modelo é aquele com menor AIC.

Os resultados dos dados de estimativa para o intercepto obtidos nas tabelas 9 e 10 para o fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae* demonstram que o melhor modelo de ajuste foi o de Cauchy (adultos -23,682 e ninfas -24,192) e (adultos -24,163 e ninfas -4,355) respectivamente.

Portanto, note-se que a concentração letal mediana varia entre adultos e ninfas para os fungos, *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo necessários aproximadamente $8,19 \times 10^{12}$ e $5,93 \times 10^{12}$ conídios/ha para produzir em torno de 50% de mortalidade de adultos e $1,69 \times 10^{12}$,

$3,82 \times 10^{12}$ conídios/ha para produzir a mesma proporção de mortalidade de ninfas respectivamente.

Tabela 9 – Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo *B. bassiana*.

| Ajuste para adultos | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|--------|---------|-------|--------------------------------|-----------------------|
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -2,540 (0,891) | 0,201 (0,074) | 11,660 | <0,001 | 30,51 | 12,64 | $4,33 \times 10^{12}$ |
| Probito | -1,402 (0,425) | 0,111 (0,037) | 11,370 | <0,001 | 30,80 | 12,63 | $4,26 \times 10^{12}$ |
| Clog-log | -2,761 (0,921) | 0,192 (0,074) | 12,465 | <0,001 | 29,71 | 12,50 | $3,15 \times 10^{12}$ |
| Cauchy | -23,682 (11,555) | 1,834 (0,899) | 21,185 | <0,001 | 20,99 | 12,91 | $8,19 \times 10^{12}$ |
| Ajuste para ninfas | | | | | | | |
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -4,603 (2,604) | 0,418 (0,206) | 18,355 | <0,001 | 33,73 | 11,03 | $1,06 \times 10^{11}$ |
| Probito | -1,850 (0,776) | 0,181 (0,062) | 17,361 | <0,001 | 34,72 | 10,22 | $1,66 \times 10^{10}$ |
| Clog-log | -6,531 (2,513) | 0,526 (0,195) | 23,247 | <0,001 | 28,83 | 11,72 | $5,29 \times 10^{11}$ |
| Cauchy | -24,192 (8,905) | 1,979 (0,725) | 33,671 | <0,001 | 18,41 | 12,23 | $1,69 \times 10^{12}$ |

$\hat{\beta}_0$: estimativa para o Intercepto e $\hat{\beta}_1$: estimativa para $x_i = \log_{10}$ (conídios)

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 10 – Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo *M. anisopliae*

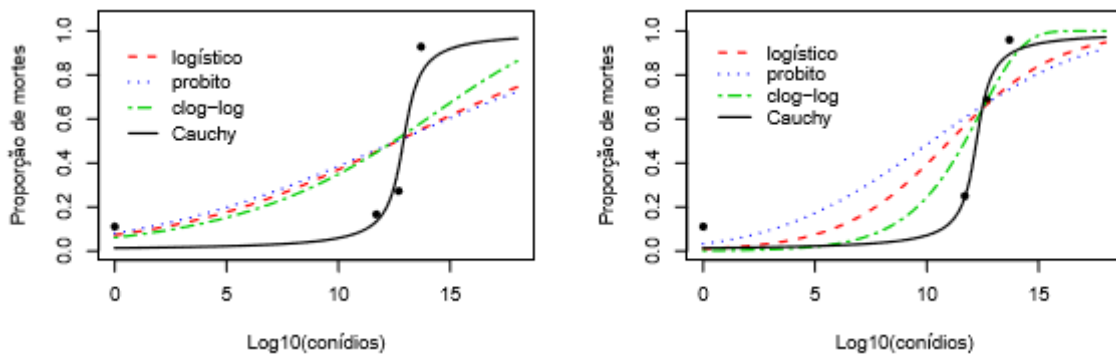
| Ajuste para adultos | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|--------|---------|-------|--------------------------------|-----------------------|
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -3,433 (1,227) | 0,310 (0,095) | 31,067 | <0,001 | 48,81 | 11,08 | $1,20 \times 10^{11}$ |
| Probito | -1,667 (0,479) | 0,157 (0,038) | 30,121 | <0,001 | 49,75 | 10,59 | $3,91 \times 10^{10}$ |
| C log-log | -4,531 (1,569) | 0,353 (0,119) | 35,840 | <0,001 | 44,03 | 11,79 | $6,18 \times 10^{11}$ |
| Cauchy | -24,163 (7,127) | 1,892 (0,556) | 52,865 | <0,001 | 27,01 | 12,77 | $5,93 \times 10^{12}$ |
| Ajuste para ninfas | | | | | | | |
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -2,210 (0,554) | 0,179 (0,048) | 19,829 | <0,001 | 22,49 | 12,35 | $2,26 \times 10^{12}$ |
| Probito | -1,277 (0,283) | 0,104 (0,025) | 19,695 | <0,001 | 22,63 | 12,32 | $2,10 \times 10^{12}$ |
| C log-log | -2,301 (0,533) | 0,157 (0,044) | 20,249 | <0,001 | 22,07 | 12,35 | $2,25 \times 10^{12}$ |
| Cauchy | -4,355 (2,211) | 0,346 (0,175) | 21,481 | <0,001 | 20,84 | 12,58 | $3,82 \times 10^{12}$ |

$\hat{\beta}_0$: estimativa para o Intercepto e $\hat{\beta}_1$: estimativa para $x_i = \log_{10}$ (conídios)

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

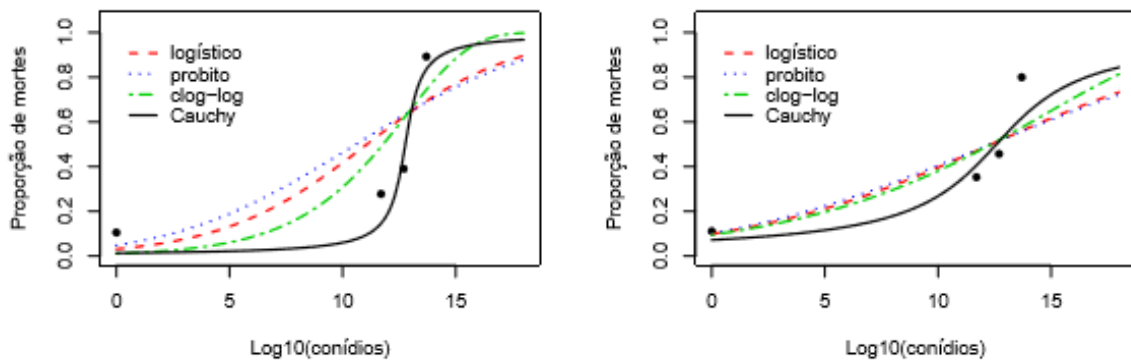
A seguir estão apresentados os gráficos correspondentes aos ajustes dos modelos para adultos e ninfas que exibem as probabilidades observadas e preditas pelos modelos ajustados, para os dados analisados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Figuras 17 e 18).

Figura 17 – Ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos adultos (esquerda) e ninfas (direita) tratados com o fungo *B. bassiana*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 18 – Ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos adultos (esquerda) e ninfas (direita) tratados com o fungo *M. anisopliae*.



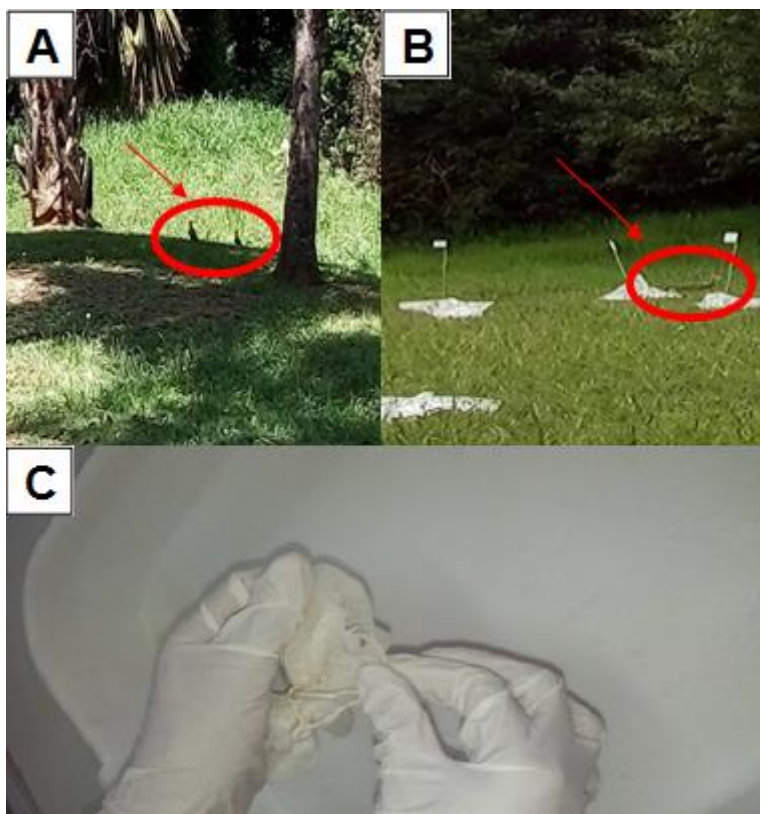
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

3.4.2 MARCADORES

As análises abaixo mostram a mortalidade do número de indivíduos dos marcadores, sendo a avaliação 1 correspondente ao primeiro dia após aplicação dos fungos entomopatogênicos. A avaliação 2 se refere ao terceiro dia após a aplicação, e a avaliação 3 corresponde ao décimo dia após a aplicação. A dose 1 foi da ordem de 5×10^{11} conídios/ha; a dose 2 correspondia a 5×10^{12} conídios/ha e a dose 3 foi de 5×10^{13} conídios/ha. Os números de

carrapatos não estão homogêneos entre os marcadores porque houve perda dos mesmos pela ação de predadores (Figura 19 A, B e C).

Figura 19 – Presença de predadores em área de experimento A e B, identificado com círculo e seta em vermelho. Marcador com sinais de perfuração pela ação de predadores C



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

3.4.2.1 Análise descritiva dos testes com marcadores

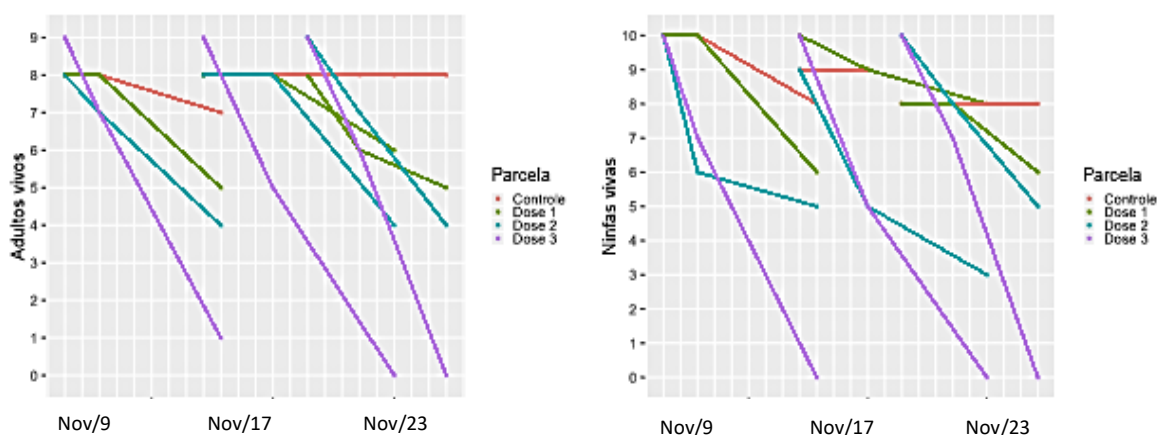
Para o fungo *B. bassiana* foram obtidos gráficos de perfil considerando os dados de cada um dos testes para os marcadores, que mostram a mortalidade dos indivíduos nas três avaliações. Os marcadores foram recuperados nas datas de, 09 de novembro, 17 de novembro e 23 de novembro do ano de 2016.

Pode -se observar uma maior queda no número de indivíduos vivos na parcela da dose 3 nas três recuperações de marcadores permanecendo assim até a última avaliação com somente

um adulto vivo. Em relação aos adultos observa-se também que as doses 1 e 2 apresentaram um desempenho similar nas três recuperações de marcadores, enquanto que o controle permaneceu quase constante, exceto na primeira recuperação na qual ocorreu a morte de um adulto na terceira avaliação.

Ao observar o gráfico das ninfas o desempenho das doses 1 e 2 apresenta diferenças somente nas duas primeiras recuperações. A parcela da dose 3, tanto nos adultos quanto nas ninfas, foi a menos afetada pela ação dos predadores (Figura 20).

Figura 20 – Perfil de frequência absoluta dos indivíduos, tratados com o fungo *B. bassiana*.

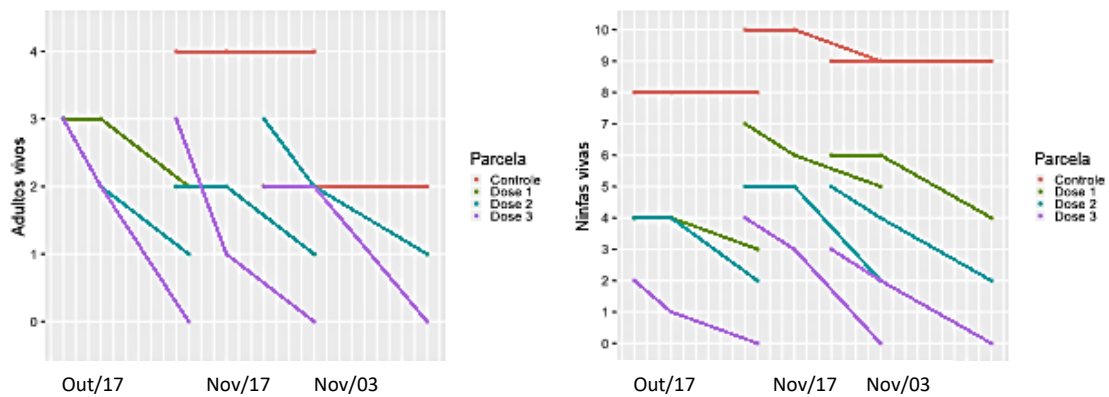


Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Em relação ao fungo *M. anisopliae* foram obtidos gráficos de perfil para os marcadores, que mostram a mortalidade dos indivíduos nas três avaliações. Os marcadores foram recuperados nas datas de, 18 de outubro, 27 de outubro e 03 de novembro do ano de 2016.

É visível o efeito dos predadores, o que poderia viciar o efeito do tratamento. No entanto observa-se que na parcela da terceira dose não houve sobreviventes, nem de adultos nem de ninfas, até a terceira avaliação. A dose 2, teve um desempenho adequado logo que, no final das avaliações houve somente um adulto e duas ninfas vivas nas três recuperações. A parcela do controle foi estável em todos os casos, exceto na segunda recuperação dos marcadores com ninfas (Figura 21).

Figura 21 – Perfil de frequência absoluta dos indivíduos, esquerda adultos vivos e a direita ninfas vivas, tratados com o fungo *M. anisopliae*.

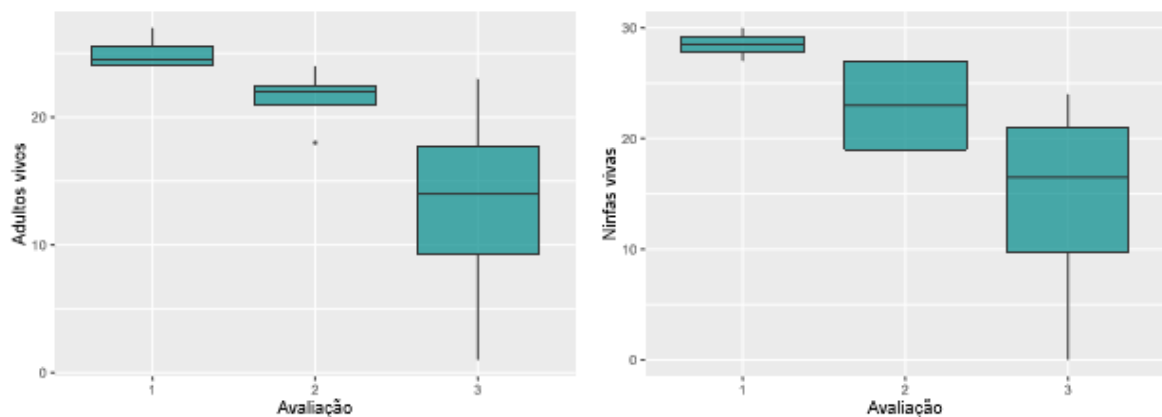


Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

3.4.2.2 Análise geral dos testes totais com marcadores

Para esta parte da análise foram somados os resultados das três recuperações de marcadores de cada fungo, com a finalidade de aferir o comportamento geral nas três avaliações. Foram construídos “boxplots” para a distribuição dos indivíduos presentes nos marcadores recuperados nas parcelas tratadas com *B. bassiana* (figura 22), bem como para adultos e ninfas dos marcadores recuperados das parcelas tratadas com *M. anisopliae* (Figura 23). Aplicou-se o teste não paramétrico de Friedman e calculou-se um valor de p da ordem de 0,022 tanto para os marcadores contendo adultos, como para os marcadores contendo ninfas.

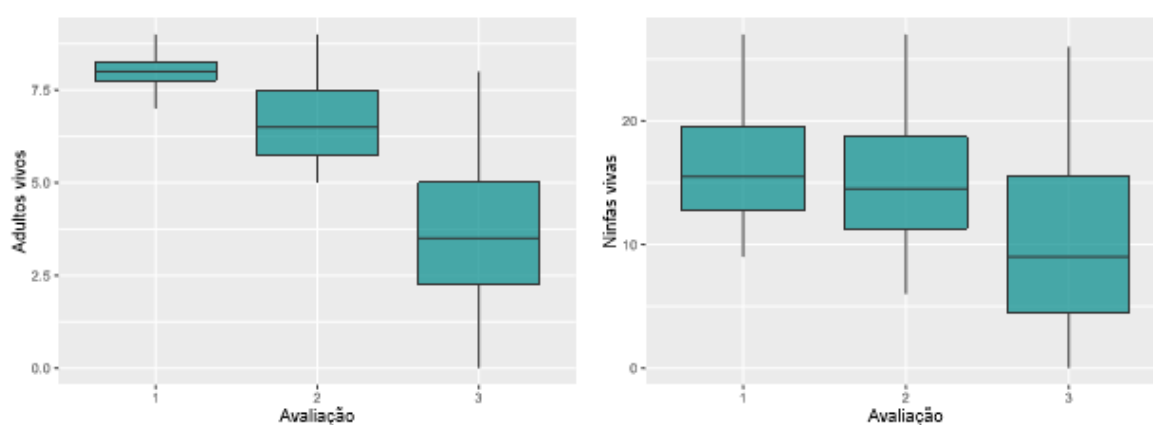
Figura 22 – Distribuição do número de indivíduos vivos por avaliação sem discriminar por parcela tratados com o fungo *B. bassiana*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Com relação aos marcadores tratados com o fungo *M. anisopliae*, o valor de p foi de 0,024 para adultos e de 0,022 para as ninfas (segundo o teste de Friedman) indicando diferenças entre as avaliações dos indivíduos vivos, dado o tratamento. Tais diferenças podem ser observadas segundo os gráficos, em que os valores medianos dos indivíduos vivos diminuem conforme a avaliação, com uma maior expressão entre a segunda e terceira avaliação (Figura 23).

Figura 23 – Distribuição do número de indivíduos vivos por avaliação sem discriminar por parcela tratados com o fungo *M. anisopliae*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

O comportamento da mortalidade dos marcadores tratados com o fungo *B. bassiana* é resumido na tabela 11 para adultos e na tabela 12 para ninfas. Similarmente, os marcadores tratados com o fungo *M. anisopliae* estão na tabela 13 para adultos e na tabela 14 para ninfas. A partir de tais tabelas foi possível investigar a existência de associação entre o tratamento e a mortalidade no último dia de avaliação usando a estatística de correlação (QCS) na qual são considerados escores para as variáveis ordinais (GIOLO, 2017). Para esta situação foi considerado o tratamento como uma variável ordinal e a mortalidade como dicotômica (morto, vivo).

Conforme os resultados apresentados nas tabelas 11, 12, 13 e 14, encontrou-se associação entre o tratamento e a mortalidade para todas as parcelas. Calculou-se também o coeficiente de correlação que mede a intensidade de associação linear entre as duas variáveis. O valor negativo indica que o número de vivos diminui à medida que aumenta a dose. A maior intensidade verificou-se para os marcadores contendo adultos tratados com *B. bassiana* (-0,668) e a menor intensidade para os marcadores contendo ninfas tratadas com *B. bassiana* (-0,606).

Cabe ressaltar que na interpretação do coeficiente de correlação, quanto mais próximo de -1, mais forte é uma possível associação linear.

Também pode-se observar nas tabelas citadas acima, as proporções pontuais das perdas de marcadores devido à ação dos predadores em cada parcela. Os marcadores de ninfas foram os menos afetados, somente a parcela da terceira dosagem do fungo *B. bassiana* teve 10% de perda e as parcelas de controle e segunda dosagem do fungo *M. anisopliae* tiveram 3,3% de perda. No entanto, os marcadores de adultos tratados com o fungo *M. anisopliae* foram os mais afetados com perdas em todas as parcelas, que foram superiores a dois terços da amostra.

Tabela 11 – Distribuição da mortalidade dos marcadores de adultos tratados com o fungo *B. bassiana*

| Parcela* | Mortos | | | Resumo total | | | |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-----------|-----------|------------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados | Perdas (%) |
| Controle | 0 | 0 | 1 | 1 (4,2) | 23 (95,8) | 24 | 6 (20,0) |
| Dose 1 | 0 | 2 | 6 | 8 (33,3) | 16 (66,7) | 24 | 6 (20,0) |
| Dose 2 | 0 | 3 | 10 | 13 (52,0) | 12 (48,0) | 25 | 5 (16,7) |
| Dose 3 | 0 | 9 | 17 | 26 (96,3) | 1 (3,7) | 27 | 3 (10,0) |
| Total | 0 | 14 | 34 | 48 (48,0) | 52 (52,0) | 100 | 20 (16,7) |

* Dose 1 = 5×10^{11} conídios. Dose 2 = 5×10^{12} conídios. Dose 3 = 5×10^{13} conídios.

$Q_{CS} = 44,240$ $p < 0,001$. Coeficiente de correlação -0,668

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 12 – Distribuição da mortalidade dos marcadores de ninfas tratadas com o fungo *B. bassiana*

| Parcela* | Mortos | | | Resumo total | | | |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-----------|-----------|------------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados | Perdas (%) |
| Controle | 2 | 2 | 3 | 5 (17,2) | 24 (82,8) | 29 | 1 (3,3) |
| Dose 1 | 2 | 1 | 9 | 10 (33,3) | 20 (66,7) | 30 | 0 (0,0) |
| Dose 2 | 0 | 10 | 6 | 16 (55,2) | 13 (44,8) | 29 | 1 (3,3) |
| Dose 3 | 0 | 11 | 19 | 30 (100,0) | 0 (0,0) | 30 | 0 (0,0) |
| Total | 4 | 24 | 37 | 61 (51,7) | 57 (48,3) | 118 | 2 (1,7) |

* Dose 1 = 5×10^{11} conídios. Dose 2 = 5×10^{12} conídios. Dose 3 = 5×10^{13} conídios.

$Q_{CS} = 43,038$ $p < 0,001$. Coeficiente de correlação -0,606

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 13 – Distribuição da mortalidade dos marcadores de adultos tratados com o fungo *M.anisopliae*.

| Parcela* | Mortos | | | Resumo total | | | |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-----------|-----------|------------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados | Perdas (%) |
| Controle | 0 | 0 | 1 | 1 (1,1) | 8 (88,9) | 9 | 21 (70,0) |
| Dose 1 | 2 | 0 | 5 | 5 (55,6) | 4 (44,4) | 9 | 21 (70,0) |
| Dose 2 | 2 | 2 | 5 | 7 (70,0) | 3 (30,0) | 10 | 20 (66,7) |
| Dose 3 | 1 | 3 | 6 | 9 (100,0) | 0 (0,0) | 9 | 21 (70,0) |
| Total | 5 | 5 | 17 | 22 (59,5) | 15 (40,5) | 37 | 83 (69,2) |

* Dose 1 = 5×10^{11} conídios. Dose 2 = 5×10^{12} conídios. Dose 3 = 5×10^{13} conídios.

$Q_{CS} = 14,396$ $p < 0,001$. Coeficiente de correlação -0,632

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 14 – Distribuição da mortalidade dos marcadores de ninfas tratadas com o fungo *M.anisopliae*.

| Parcela* | Mortos | | | Resumo total | | | |
|----------|--------|-------|--------|--------------|-----------|-----------|------------|
| | Dia 1 | Dia 3 | Dia 10 | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados | Perdas (%) |
| Controle | 3 | 0 | 4 | 4 (13,3) | 26 (86,7) | 30 | 0 (0,0) |
| Dose 1 | 13 | 1 | 17 | 18 (60,0) | 12 (40,0) | 30 | 0 (0,0) |
| Dose 2 | 16 | 1 | 23 | 24 (80,0) | 6 (20,0) | 30 | 0 (0,0) |
| Dose 3 | 18 | 3 | 24 | 27 (100,0) | 0 (0,0) | 27 | 3 (10,0) |
| Total | 50 | 5 | 68 | 73 (62,4) | 44 (37,6) | 117 | 3 (2,5) |

* Dose 1 = 5×10^{11} conídios. Dose 2 = 5×10^{12} conídios. Dose 3 = 5×10^{13} conídios.

$Q_{CS} = 47,982$ $p < 0,001$. Coeficiente de correlação -0,643

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

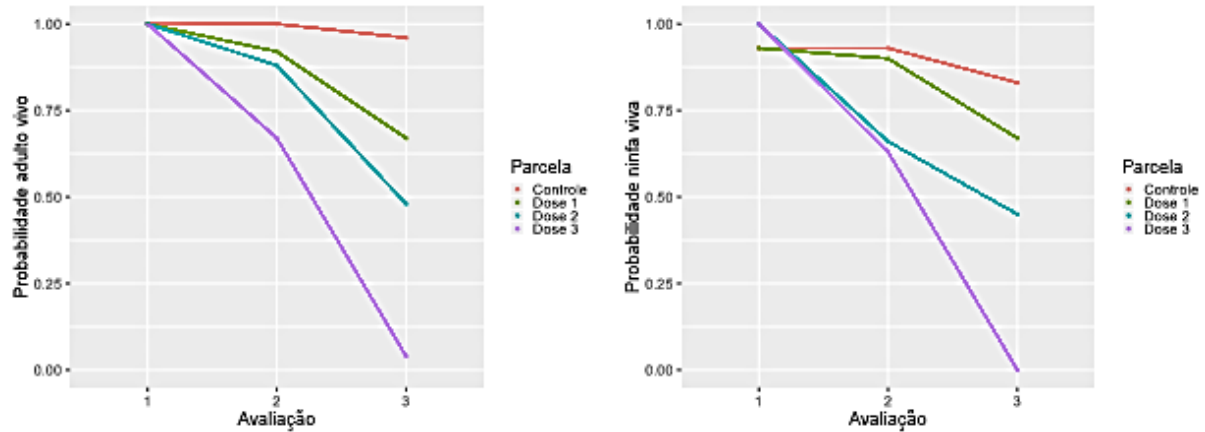
Os gráficos de perfil para os marcadores recuperados das parcelas tratadas com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são apresentados nas figuras 24 e 25 respectivamente.

Nestes gráficos está descrita a evolução da proporção de vivos a cada avaliação corroborando com a intensidade da relação linear negativa entre o tratamento e a proporção de indivíduos vivos descrita anteriormente, conforme os coeficientes de correlação calculados. Observou-se também que nem todos começaram em 1,0, indicando que logo na primeira avaliação houve indivíduos mortos.

Para os marcadores tratados com o fungo *B. bassiana*, observou-se que no controle a mortalidade de carrapatos adultos e ninfas foi mínima nas avaliações subsequentes a coleta. Na dose 2, sobreviveram aproximadamente 50% dos indivíduos, até a terceira avaliação. Para as ninfas observa-se que as dosagens 2 e 3 apresentaram quase o mesmo efeito na primeira e

segunda avaliação, enquanto nas parcelas de controle e dose 1, houve um desempenho similar (Figura 24).

Figura 24 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos tratados com o fungo *B. bassiana*



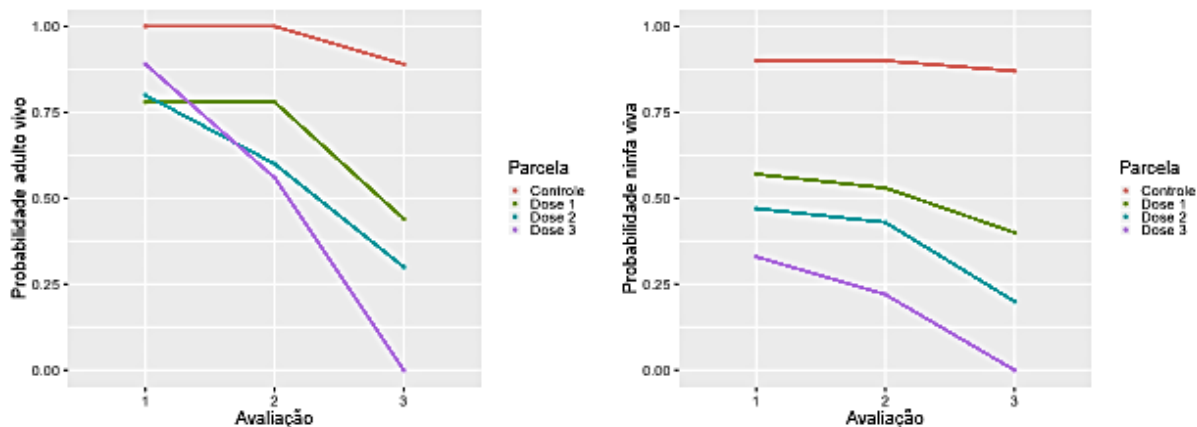
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Para os marcadores tratados com o fungo *M. anisopliae* observou-se um comportamento diferente da mortalidade em relação aos tratados com *B. bassiana*, sendo que em todas as parcelas de marcadores de adultos e ninfas houve mortalidade logo na primeira avaliação exceto adultos do controle (somente este grupo começa em 1,0, ou seja, todos os coletados estavam vivos na primeira avaliação).

No caso dos adultos houve maior proporção de mortos nas dosagens 1 e 2 na primeira avaliação (aproximadamente 25% dos coletados), sendo que no final das avaliações sobreviveram aproximadamente 30% dos adultos na dose 2 e 44% dos adultos na dose 1. No entanto, não houve sobreviventes adultos da dose 3. Cabe lembrar aqui que os marcadores adultos do tratamento *M. anisopliae* tiveram as maiores perdas de indivíduos.

Nos marcadores de ninfas a expressão de mortalidade fica evidente para todas as parcelas desde a primeira avaliação, inclusive das ninfas no controle. A maior proporção de mortalidade observa-se na parcela da dose 3, correspondendo a pouco mais de 60%, seguida da dose 2, que se manteve acima da mediana. Visualmente observa-se uma grande diferença entre o controle e a dose 1 (Figura 25).

Figura 25 – Perfil da proporção dos indivíduos vivos tratados com o fungo *M. anisopliae*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

3.4.2.3 Ajuste de modelos para marcadores

Com o objetivo de determinar uma concentração adequada para o controle dos carrapatos, foram ajustados vários modelos para dados binários considerando como variável resposta se o indivíduo coletado morreu ou não até a terceira avaliação em função do tratamento e dos conídios utilizados. A ideia é modelar a probabilidade da ocorrência de morte dado o tratamento, que pela magnitude do mesmo, é usual considerar o logaritmo na base 10, assim, para a primeira dosagem de 5×10^{11} conídios têm-se $\log_{10}(5 \times 10^{11}) = 11,699$.

Os modelos ajustados foram logístico, probito, complemento log-log e Cauchy, estes modelos foram ajustados separadamente para adultos e ninfas tratados com ambos os fungos.

Foram obtidos o teste de razão de verossimilhança (TRV) e o critério de informação de Akaike (AIC), critérios propostos na literatura para seleção de modelos.

Foi estimada a concentração letal mediana (CL_{50}) para cada um dos modelos ajustados e a dose de conídios necessária para obter uma mortalidade em torno de 50%.

Os ajustes correspondentes dos modelos para marcadores adultos e ninfas são apresentados nas tabelas 15 e 16, para os tratamentos com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente.

De um modo geral, pode-se observar nas tabelas de todos os ajustes que a inclusão do tratamento na modelagem é significativa, em todas as situações, obtendo-se um valor de p menor que 0,05, tal valor p é baseado no TRV. Considerando todos os critérios de seleção de

modelos observa-se que para indivíduos tratados com o fungo *B. bassiana* o melhor modelo corresponde ao Cauchy, pois possui maior TRV e menor AIC.

Assim, segundo o modelo de Cauchy, para o fungo *B. bassiana* são necessários aproximadamente $2,30 \times 10^{12}$ conídios/ha para produzir em torno de 50% de mortalidade de adultos e $1,51 \times 10^{12}$ conídios/ha para produzir a mesma proporção de mortalidade em ninfas (Tabela 15).

Em relação aos marcadores tratados com o fungo *M. anisopliae* o melhor modelo corresponde ao complemento log log, pois possui maior TRV e menor AIC. Assim, segundo o modelo de complemento log-log, do fungo *M. anisopliae* são necessários aproximadamente $3,34 \times 10^9$ conídios/ha para produzir em torno de 50% de mortalidade de adultos e $4,87 \times 10^8$ conídios/ha para produzir a mesma proporção de mortalidade em ninfas, vale lembrar aqui que o tamanho de amostra destes marcadores ficou diminuída por causa de predadores (Tabela 16).

Tabela 15 – Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo *B. bassiana*

| Ajuste para adultos | | | | | | | |
|---------------------|------------------------|-----------------------|---------------|-------------------|--------------|--------------------------------|---|
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -5,126 (2,176) | 0,445 (0,172) | 38,852 | < 0,001 | 32,73 | 11,51 | $3,23 \times 10^{11}$ |
| Probita | -2,152 (0,621) | 0,196 (0,050) | 37,382 | < 0,001 | 34,20 | 10,97 | $9,26 \times 10^{10}$ |
| C log-log | -6,430 (2,224) | 0,509 (0,173) | 43,381 | < 0,001 | 28,20 | 11,92 | $8,32 \times 10^{11}$ |
| Cauchy | -16,716 (5,827) | 1,352 (0,466) | 49,804 | < 0,001 | 21,77 | 12,36 | $2,30 \times 10^{12}$ |
| Ajuste para ninfas | | | | | | | |
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -1,941 (0,553) | 0,200 (0,047) | 26,239 | < 0,001 | 47,34 | 9,70 | $5,06 \times 10^9$ |
| Probita | -1,121 (0,292) | 0,118 (0,025) | 26,074 | < 0,001 | 47,50 | 9,49 | $3,09 \times 10^9$ |
| C log-log | -2,207 (0,556) | 0,179 (0,045) | 28,446 | < 0,001 | 45,13 | 10,26 | $1,81 \times 10^{10}$ |
| Cauchy | -11,851 (4,080) | 0,973 (0,330) | 34,012 | < 0,001 | 39,56 | 12,18 | $1,51 \times 10^{12}$ |

$\hat{\beta}_0$: estimativa para o Intercepto e $\hat{\beta}_1$: estimativa para $x_i = \log_{10}$ (conídios)

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 16 – Estimativas dos ajustes dos modelos para adultos e ninfas tratados com o fungo *M. anisopliae*

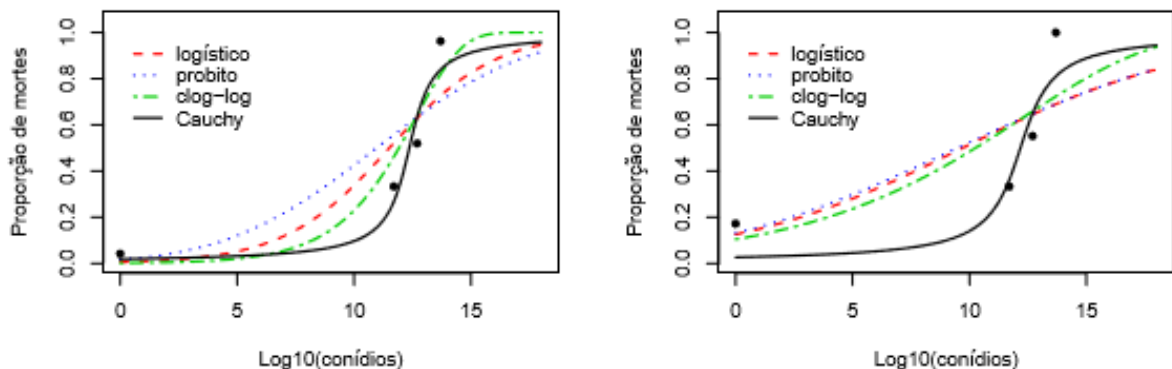
| Ajuste para adultos | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|---------|--------------|--------------------------------|-----------------------|
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -2,388 (1,184) | 0,279 (0,100) | 14,073 | < 0,001 | 16,25 | 8,55 | $3,55 \times 10^8$ |
| Probito | -1,355 (0,586) | 0,163 (0,051) | 14,088 | < 0,001 | 16,23 | 8,30 | $1,98 \times 10^8$ |
| C log-log | -2,649 (1,209) | 0,240 (0,097) | 14,928 | < 0,001 | 15,39 | 9,52 | $3,34 \times 10^9$ |
| Cauchy | -9,731 (8,176) | 0,853 (0,677) | 14,822 | < 0,001 | 15,50 | 11,41 | $2,54 \times 10^{11}$ |
| Ajuste para ninfas | | | | | | | |
| Modelo | $\hat{\beta}_0$ (e.p) | $\hat{\beta}_1$ (e.p) | TVR | Valor p | AIC | $\log_{10}(\widehat{CL}_{50})$ | \widehat{CL}_{50} |
| Logístico | -2,092 (0,578) | 0,276 (0,051) | 48,052 | < 0,001 | 27,30 | 7,57 | $3,70 \times 10^7$ |
| Probito | -1,216 (0,300) | 0,164 (0,027) | 48,277 | < 0,001 | 27,08 | 7,40 | $2,50 \times 10^7$ |
| C log-log | -2,313 (0,573) | 0,224 (0,046) | 50,646 | < 0,001 | 24,71 | 8,69 | $4,87 \times 10^8$ |
| Cauchy | -5,382 (3,281) | 0,524 (0,269) | 47,645 | < 0,001 | 27,71 | 10,26 | $1,83 \times 10^{10}$ |

$\hat{\beta}_0$: estimativa para o Intercepto e $\hat{\beta}_1$: estimativa para $x_i = \log_{10}$ (conídios)

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

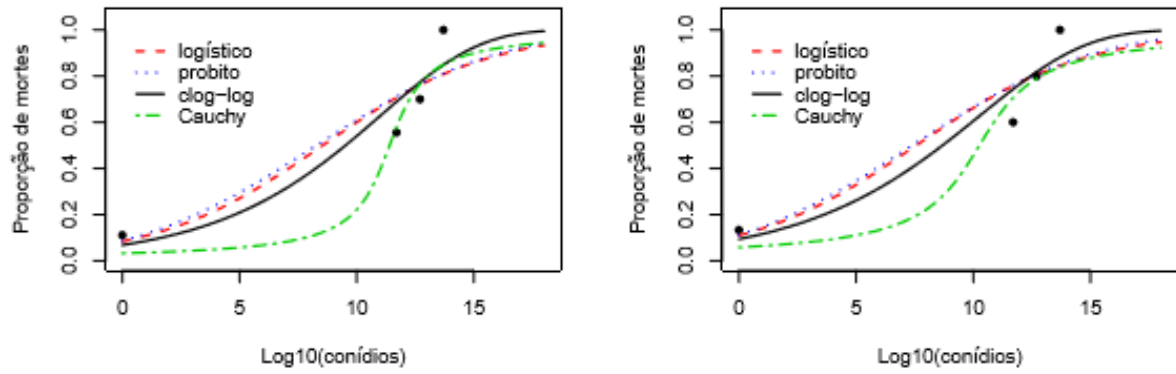
A seguir, são apresentados os gráficos do ajuste dos modelos, os quais exibem as probabilidades observadas e previstas pelos modelos ajustados. Para os indivíduos que foram tratados com o fungo *B. bassiana* o modelo Cauchy se mostrou o melhor ajuste (Figura 26). Enquanto que para os indivíduos tratados com o fungo *M. anisopliae* o melhor modelo, representado pela linha preta contínua corresponde ao complemento clog log (Figura 27).

Figura 26 – Ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos marcadores adultos (esquerda) e marcadores ninfas (direita) tratados com o fungo *B. bassiana*.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 27 – Ajuste dos modelos logístico, probito, complemento loglog e Cauchy dos marcadores adultos (esquerda) e marcadores ninfas (direita) tratados com o fungo *M. anisopliae*



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

3.5 DISCUSSÃO

Segundo descrição de Martins et al., (2016) no Brasil a espécie *Amblyomma sculptum* é a mais frequentemente encontrada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, parte das regiões Sul e Nordeste, associada a áreas de cerrado, Ramos et al., (2014) e Siqueira (2017) também registraram a associação do *A. sculptum* com formações florestais.

O *A. sculptum* tem como hospedeiros primários a anta, o cavalo, a capivara e o porco, sendo este último incluído há pouco tempo nesta lista, a partir do trabalho de Osava et al., (2016). Esta espécie de carrapato em suas formas imaturas pode parasitar uma grande variedade de hospedeiros selvagens e domésticos (LABRUNA et al., 2005, RAMOS et al., 2016). Entretanto, cumpre destacar que este trabalho foi realizado na Região Metropolitana de Campinas - SP, área que já sofreu grande influência da ação do homem.

Encontrou-se *A. sculptum* em abundância nas áreas demarcadas para estes experimentos. A manutenção desta população de carrapatos é feita pelo hospedeiro primário, a capivara. O grupo de capivaras que circulava em torno dos gramados e área de experimento se abrigam na mata ciliar dos mananciais da fazenda Mato Dentro, Caminas – SP, onde funciona a Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal.

Amblyomma dubitatum tem como hospedeiro primário a capivara (LABRUNA et al., 2004) e está associada a ambientes mais úmidos e alagáveis (SZABÓ et al., 2007, QUEIROGAS et al., 2012). Neste trabalho, foram capturados apenas dois indivíduos adultos de *A. dubitatum*, apesar das características de ambiente e hospedeiro primário serem parecidas com as descritas pelos autores, não foi achado mais nenhum indivíduo ao longo de todo período experimental. Tal achado reflete as observações de Martins et al., (2016) quanto à frequência das espécies do gênero *Amblyomma* na área estudada.

Quando se almeja determinar estratégias de manejo integrado de pragas, implementando como um elemento de agregação de etapas o controle microbiano, a seleção de isolados de organismos entomopatogênicos é de fundamental importância para o sucesso do programa adotado. Isto posto, é essencial que haja um banco de isolados conservado apropriadamente e com variabilidade genética comprovada. Cumprido este requisito é possível selecionar agentes que sejam promissores para o programa de controle de uma determinada praga (BARCI et al., 2009).

A variabilidade genética, assim como a virulência e patogenicidade dos isolados de *B. bassiana* (IBCB 66) e *M. anisopliae* (IBCB 425) da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu" do Instituto Biológico já foi comprovada frente a diversas pragas de interesse agrícola e veterinário (ALMEIDA et al., 1997; TAMAI et al., 2002; BARCI et al., 2009). Estes isolados já vêm sendo utilizados em diversos produtos comerciais registrados pelo Ministério da Agricultura para o controle de diferentes pragas de interesse agrônômico (Agrofit, MAPA, 2018).

Barci et al., (2009) testaram a cepa de *B. bassiana* (IBCB 66) contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em testes *in vitro*, analisando comparativamente dados de mortalidade acumulada. Este isolado ficou entre os cinco melhores e também foi demonstrado que apresenta maior potencial para utilização a campo, tendo em vista o controle de *R. (B.) microplus*, além de ter a característica de uma melhor produção massal.

Garcia et al., (2018) testaram a cepa de *M. anisopliae* (IBCB 425) contra *Amblyomma parvum* em suspensão de $1,0 \times 10^9$ conídios/ml e obteve 100% de mortalidade no 11º dia pós tratamento. Também se demonstrou mortalidade de 90% no 4º dia após infecção.

A patogenicidade do fungo *M. anisopliae* foi verificada em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* em testes *in vitro* na concentração 10^8 conídios/mL, demonstrando mortalidade de 96,6% (Bittencourt, 1992). Reis et al., (2004) também relataram percentual de mortalidade superior a 90% para o carrapato-estrela nesta mesma concentração, utilizando isolados de *M. anisopliae*. Para isolados de *B. bassiana*, Bittencourt et al., (1997) descreveram uma mortalidade acima de 80% contra *R. (B.) microplus* na mesma concentração de 10^8 conídios/mL em testes *in vitro*. Achados similares foram descritos por Reis et al., (2004) frente ao carrapato-estrela em testes *in vitro* na mesma concentração. Neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho, tanto o fungo *B. bassiana* quanto o *M. anisopliae*, demonstraram potencial patogênico para a espécie de carrapato *A. sculptum*, causando mortalidade em todos os estágios, indicando assim, ter potencial no emprego em programas de controle do carrapato *A. sculptum*.

Lopes et al., 2007 realizaram estudo utilizando produtos comerciais dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana in vitro*, contra ninfas de *Amblyomma cajennense*, e obtiveram 100% de mortalidade nas concentrações 3×10^7 e 5×10^7 conídios /ml no 6º dia de avaliação e 40% de mortalidade na concentração 4×10^7 conídios /ml no 10º dia de avaliação respectivamente.

No mesmo sentido, Fernandes (2007) obteve mortalidade significativa no décimo dia pós-tratamento em estudo da ação de 60 isolados fúngicos de *B. bassiana*, contra larvas de *R. (B.) microplus*, num modelo *in vitro*.

Estes achados relatados na literatura fundamentaram a decisão de efetuar uma avaliação no décimo dia após a colheita dos carrapatos no campo, visto tratar-se do instante que ocorre a maior mortalidade dos parasitos expostos aos fungos entomopatogênicos.

A análise estatística reforça essa decisão e sugere que é possível abandonar a avaliação intermediária feita no terceiro dia pós colheita.

Os estudos “*in vitro*” fornecem importante evidência acerca da eficiência potencial dos fungos entomopatogênicos para o controle de ixodídeos. Entretanto, a transposição de tais resultados para o campo é tema mais complexo.

Bittencourt et al., (2003) testaram formulações contendo 10^7 e 10^9 conídios/ml do fungo *M. anisopliae*, cepa ESALQ 959, contra larvas de 15 dias de idade de *Rhipicephalus (B.) microplus*, num modelo que utilizava canteiros de *Brachiaria decumbens* medindo 1m^2 . Cada canteiro foi infestado artificialmente com 10.000 larvas, recebendo o tratamento correspondente no volume de 60 ml. Os autores obtiveram ação reduzida de controle quando pulverizadas no campo, com percentuais de eficácia total da ordem de 37,84 e 53,78 ao fim da terceira repetição, respectivamente.

Por outro lado, num modelo similar com canteiros, Basso et al., (2005) conseguiram alcançar uma redução de 87% a 94% na população de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* utilizando uma suspensão da cepa E9 de *M. anisopliae* contendo $1,8 \times 10^8$ conídios/ml aplicada num volume de 200ml/m^2 .

Com relação aos autores que trabalharam com o modelo de canteiros, nota-se que Bittencourt et al., (2003) utilizaram uma dose inferior aquela estudada por Basso et al., (2005). Ademais os dois grupos estudaram apenas uma dose o que limita a análise dos resultados.

Garcia (2008) avaliou a aplicação da cepa E9 de *M. anisopliae* na pastagem contra *R. (B.) microplus*, utilizando uma suspensão contendo 10^7 conídios/ml aplicada num volume médio de 66,7 mL por metro quadrado de pasto, concluindo que o tratamento não resultou na redução do número de larvas infectantes na pastagem e nem do número de fêmeas ingurgitadas sobre os bovinos.

No presente trabalho, optou-se por explorar o conhecimento agrônômico consolidado, aplicando-o num modelo de determinação de dose. Assim sendo, foram escolhidas três dosagens, separadas por intervalos decimais, para mensuração de seu efeito a partir de medidas repetidas no tempo. Desta sorte, foi possível comprovar que há um efeito significativo quando da aplicação de suspensões dos fungos entomopatogênicos estudados.

O efeito da dosagem foi bem caracterizado no presente estudo, corroborando os relatos de diferentes autores. Por exemplo, Zappellini (2009) ao utilizar isolados de *B. bassiana* em

lagartas de *Diatraea saccharalis*, observou que a correlação positiva com a concentração de conídios foi dada através do aumento da mortalidade concomitantemente à elevação das concentrações de conídios. Neste trabalho obteve-se resultados semelhantes, a medida que se aumentou a concentração de conídios, houve o aumento da mortalidade para ambos os fungos testados.

Além disso, o modelo adotado permitiu o cálculo da CL_{50} para *Amblyomma sculptum*. Os estudos da área vegetal oferecem grande riqueza de dados com relação a este quesito. Wenzel et al., (2006) testou a patogenicidade do mesmo isolado IBCB 66 de *B. bassiana* em lagartas de *D. saccharalis*, descrevendo concentração letal 50% ($1,58 \times 10^7$ conídios/mL). Loureiro et al., (2005) observaram para ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar pulverizadas com *M. anisopliae* que a CL_{50} foi em torno de $1,2 \times 10^7$ conídios/mL

Para Reis et al., (2001) ao avaliar a virulência de três isolados de *M. anisopliae* e dois isolados de *B. bassiana* em adultos do carrapato *A. cajennense*, num modelo *in vitro*, apontaram que as maiores mortalidades foram ocasionadas com valores de CL_{90} em torno de $1,02 \times 10^{10}$ e $1,32 \times 10^{11}$ conídios/mL para *B. bassiana* e $6,69 \times 10^9$; $3,77 \times 10^{10}$ e $6,7 \times 10^{10}$ conídios/mL para *M. anisopliae*.

Neste trabalho realizado a campo, pode se observar que a concentração letal mediana varia entre adultos e ninfas. Para o fungo *B. bassiana* são necessários aproximadamente $8,19 \times 10^{12}$ conídios/ha para produzir em torno de 50% de mortalidade de adultos e $1,69 \times 10^{12}$ conídios/ha para produzir a mesma proporção de mortalidade em ninfas. Em relação ao fungo *M. anisopliae* estes valores são de $5,93 \times 10^{12}$ conídios/ha para adultos e $3,82 \times 10^{12}$ conídios/ha para ninfas.

Note-se que o melhor modelo matemático é indicado pelo próprio pacote estatístico “R”, baseando-se no teste de razão de verossimilhança (TRV) e no critério de informação de Akaike (AIC). Embora tenha se obtido um valor de p significativo em todos os modelos estudados, aqueles que apresentaram o maior valor no TRV e menor valor no AIC são os que se ajustam de forma mais adequada. Deste modo, os resultados obtidos com o fungo *B. bassiana* foram apresentados segundo o modelo Cauchy, enquanto que para o fungo *M. anisopliae*, o melhor modelo correspondeu ao clog log.

Os dados produzidos neste trabalho sugerem fortemente que a utilização dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (IBCB 66) e *M. anisopliae* (IBCB 425) aplicados a campo tem a capacidade de promover o controle de todas as fases de vida do *Amblyomma sculptum*, quebrando o ciclo do parasito, quando aplicado de forma estratégica.

3.6 CONCLUSÕES

Das dosagens testadas, todas resultaram em mortalidade significativa em comparação ao controle, sugerindo fortemente que os fungos entomopatogênicos testados neste estudo podem se tornar uma importante ferramenta para o controle de ixodídeos a campo.

A concentração letal para produzir 50% de mortalidade para o fungo *B. bassiana* foi de aproximadamente $8,19 \times 10^{12}$ conídios/ha para adultos e $1,69 \times 10^{12}$ conídios/há para ninfas, enquanto que para o fungo *M. anisopliae* para produzir a mesma proporção de mortalidade estes valores são de $5,93 \times 10^{12}$ conídios/ha para adultos e $3,82 \times 10^{12}$ conídios/ha para ninfas.

Dentre as dosagens que foram estudadas no presente trabalho, a dosagem de 5×10^{13} conídios/ha promoveu a maior mortalidade dos carrapatos na avaliação do décimo dia. Com relação aos indivíduos capturados nas parcelas tratadas com *B. bassiana*, foram obtidos percentuais de mortalidade da ordem de 92,9% para adultos ($p < 0,001$) e 96% para ninfas ($p < 0,001$). No caso do *M. anisopliae*, a mortalidade alcançou valores de 89,2% para adultos ($p < 0,001$) e 80% para ninfas ($p = 0,003$).

Os marcadores se revelaram um bom modelo para avaliação da eficácia dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, apesar das perdas pela ação de predadores, podendo evidenciar a interação significativa entre dosagem e mortalidade. Obteve-se uma mortalidade de 96,3% para adultos ($p < 0,001$) e 100% para ninfas ($p < 0,001$) dos marcadores recuperados das parcelas tratadas com *B. bassiana*. Nos marcadores recuperados das parcelas tratadas com *M. anisopliae* a mortalidade atingiu 100% para adultos ($p < 0,001$) e 100% para ninfas ($p < 0,001$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Disponível em <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acessado em 30 de agosto de 2018.

ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). **Journal of Applied Entomology**, v. 121, (9/10), p. 539-543, 1997.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. **Controle microbiano de insetos**. 2^a. Ed. Piracicaba: FEALQ, p.289, 1998.

BARCI, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. D. C.; ZAPPELINI, L. O.; PRADO, A. P. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 18, (1), p. 7-13, 2009

BASSO LMS, MONTEIRO AC, BELO MAA, SOARES VE, GARCIA MV, MOCHI DA
Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesq Agr Bras**, v. 40, p.595–600, 2005.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A. F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n.2, p.197-202, 1992.

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

BITTENCOURT VREP, BAHIENSE TC, FERNANDES EKK, SOUZA EJ. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1883) (Acari: Ixodidae). **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 12, p. 38–42, 2003.

FERNANDES, E. K. K. **Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus***. 2007. 150p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

GARCIA, M. V. **Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* em pastagens visando o controle do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos**. 2008. 58p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Jaboticabal, São Paulo, 2008.

GARCIA, M. V., RODRIGUES, V. S., MONTEIRO, A. C., SIMI, L. D., HIGA, L. O. S., MARTINS, M. M., PRETTE, N., MOCHI, D. A., ANDREOTTI, R., SZABÓ, M. P. J. In vitro efficacy of *Metarhizium anisopliae* sensu lato against unfed *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 76 (4), p. 507-512, 2018.

GOOGLE EARTH-MAPAS. **Http://mapas.google.com**. Consulta realizada em 10, setembro de 2018.

GIOLO, SUELY R. Introdução à análise de dados categóricos com aplicações, **Ed Blucher. ABE Projeto Fisher**, 2017.

GRAY, J.S. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. **Experimental and Applied Acarology**, v. 1, p. 35-44, 1985.

KRAWCZAK, F.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; NUNES, F.P.; SOARES, J.F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasite Vectors**, v. 7, p. 1–7, 2014.

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Rev. Ciência Rural**, v. 34, p.195-200, 2004.

LABRUNA, M.B.; JORGE, R.S.P.; SANA, D.A.; JÁCOMO, A.T.A.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M.; FERRO, C.; PEREZ, S.A.; SILVEIRA, L.; SANTOS JR, T.S.; MARQUES, S.R.; MORATO, R.G.; NAVA, A.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; GOMES, A.A.B.; CONFORTI, V.A.; AZEVEDO, F.C.C.; PRADA, C.S.; SILVA, J.C.;

BATISTA, A.F.; MARVULO, M.F.V.; MORATO, R.L.G.; ALHO, C.J.R.; PINTER, A.; FERREIRA, P.M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, V. 36, p. 149-163, 2005.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha-da-raiz da cana-deaçúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 000-000, 2005.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.

MARTINS, M. M. **Fauna, sazonalidade e riquetsias de carrapatos em área do Cerrado goiano**. 2016. 85p. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA M. B. Survey of *Rickettsia* spp in the Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, 2009.

PAULA, GILBERTO A. Modelos de regressão com apoio computacional, **Instituto de Matemática e Estatística, IME-USP**, 2013.

QUEIROGAS V. L, DEL CLARO K, NASCIMENTO AR, SZABÓ MP. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. **Exp Appl Acarol**, v. 57(1): 75-82, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em < <http://www.R-project.org>>, Acessado em 28 de fevereiro de 2019.

RAMOS, V. N., OSAVA, C. F., PIOVEZAN, U., & SZABÓ, M. P. Ticks on humans in the Pantanal wetlands, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5(5), p. 497-499, 2014.

RAMOS, V.N., PIOVEZAN, U., FRANCO, A.H.A., RODRIGUES, V.S., NAVA, S., SZABÓ, M.P.J. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. **Exp Appl Acarol**, v. 68, p. 227-240, 2016.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.R.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Amblyoma* sp. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 544-547, 2001.

REIS, R.C.S., MELO, D. R., BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56 (6), p. 788-791, 2004.

SZABÓ, M.P.J.; OLEGÁRIO, M.M.; SANTOS, A.L.Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, p. 73-84, 2007.

SIQUEIRA, S. M. **Fluxo de carrapatos entre ambientes e animais na fazenda Capim Branco**. 2017. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SONENSHINE, D.E., ROE, R.M. **Biology of ticks**. 2ª ed. Oxford University Press, New York, v. 1 e 2, 539p, 2014.

TAMAI, M. A. et al. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 77-84, 2002.

WENZEL, I.M.; GIOMETTI, F.H.C.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 259-261, abr./jun., 2006

ZAPPELINI, L. O. **Seleção de Isolados dos Fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* Visando o Controle da Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Área Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo, SP, 2009.

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DO FUNGO *Beauveria bassiana* NA DOSE DE 5×10^{13} CONÍDIOS/HA EM TESTE A CAMPO NO CONTROLE DE *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) - Campinas – SP

RESUMO

O *Amblyomma sculptum* tem grande importância na saúde pública, pois pode ser vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii* causadora da Febre Maculosa Brasileira. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (IBCB 66) a campo. O experimento foi realizado no período de março de 2017 a março de 2018, no gramado ao redor da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, Campinas – SP. Na área de experimento, foram demarcadas parcelas totalizando uma área de 144 m². Foi utilizada suspensão aquosa de 5×10^{13} conídios por hectare. A mortalidade dos indivíduos capturados foi avaliada nos dias 1 (avaliação 1), 3 (avaliação 2) e 10 (avaliação 3). Os dados foram submetidos a uma análise estatística utilizando o software livre R (R, 2019). O isolado utilizado no presente estudo do fungo *B. bassiana* (IBCB 66) demonstrou ter potencial patogênico para utilização a campo. A manutenção da população de carrapatos era feita pelo hospedeiro primário, a capivara. O melhor dia para avaliação de mortalidade *in vitro* dos carrapatos capturados do campo após aplicação de tratamento foi o décimo dia. O pico de mortalidade ocorreu ao redor de 30 dias decorridos da aplicação do fungo *B. bassiana* até a última avaliação. A dosagem de 5×10^{13} conídios por hectare para o fungo *B. bassiana* contra *Amblyomma sculptum* demonstrou-se eficaz para o controle deste ectoparasito a campo em todos os estágios de desenvolvimento, com percentual de mortalidade acima de 70% nos períodos de chuva.

4.1 INTRODUÇÃO

Amblyomma sculptum é conhecido popularmente como “carrapato-estrela” em sua fase adulto e está presente na maioria dos estados brasileiros, inclusive o Estado de São Paulo (ARAGÃO, 1936; MARTINS et al., 2016).

Os equinos, capivaras e antas estão entre os hospedeiros primários para todos os estágios parasitários, porém, devido sua baixa especificidade, animais silvestres e domésticos, inclusive os seres humanos, podem servir como hospedeiros para este ectoparasita (LABRUNA et al., 2001).

Para que a população desses carrapatos se estabeleça, pelo menos um dos animais primários deve estar presente na área, estes são considerados primordiais para ocasionar a multiplicação da população principalmente da fase adulta de *A. sculptum* (SOUZA et al., 2006).

A transmissão aos seres humanos acontece pela picada de carrapatos infectados com a bactéria *R. rickettsii*, em qualquer uma das fases de vida do vetor, quer seja larva, ninfa ou adulto, e não ocorre por transmissão direta, pois se trata de uma doença infecciosa e não contagiosa (PINTER et al., 2016; FRANCO, 2018)

A revisão de literatura não recuperou trabalhos direcionados especificamente ao controle do *Amblyomma sculptum* no campo. Apesar dos resultados com fungos entomopatogênicos descritos sob condições de laboratório para o gênero *Amblyomma*, como por exemplo, *Amblyomma cooperi* (REIS et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004; LOPES et al., 2007), *Amblyomma parvum* (GARCIA et al., 2018) *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005), indicarem sua eficácia, os mesmos ainda não foram reproduzidos a campo.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (IBCB 66) a campo, na dose de 5×10^{13} conídios/ha, ao longo de um ano, em parcelas demarcadas no gramado ao redor da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, localizado no município de Campinas, com a presença da capivara como hospedeiro primário.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

A aplicação do fungo *B. bassiana* foi realizada na Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, localizado no município de Campinas (22° 54' 23.2" Sul, 47° 00' 54.5" Oeste), Estado de São Paulo, em duas áreas distintas nesse local, caracterizado pela presença de animais domésticos como cães e gatos, presença de animais silvestres como capivaras e macacos, e também frequentado por seres humanos.

4.2.2 DEMARCAÇÃO DA ÁREA PARA APLICAÇÃO DO FUNGO *B. bassiana*

A área experimental consiste de uma plantação de *Brachiaria decumbens*, na qual foram demarcadas com estacas fincadas na terra, parcelas de aproximadamente 12m por 12m, totalizando uma área de 144 m² (Figura 1 A e B).

Figura 1 – Área demarcada para aplicação do fungo *B. bassiana*, A. Área demarcada para controle, B (Campinas – SP).



4.2.3 COLHEITAS DE CARRAPATOS

Para a coleta de carrapatos foram utilizadas armadilhas em cortes retangulares de pano sintético branco, à base de polipropileno e viscose popularmente conhecido como “tnt”, com aproximadamente 0,7 m² de área cada. No centro dos panos colocou-se cerca de 100g de gelo seco para que o CO₂ liberado durante a sublimação atraísse os carrapatos (GRAY, 1985). Foram utilizadas 18 armadilhas para cada área demarcada, tratada e controle.

4.2.4 APLICAÇÃO DO FUNGO *B. bassiana*

O fungo *B. bassiana* (IBCB 66) foi cedido 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.

Para área que recebeu o tratamento foram preparadas suspensões na dosagem de 5x10¹³ conídios/ha e a área controle recebeu apenas água. Tanto a aplicação do fungo como a aplicação de água (controle) foi efetuada a partir das 17h com pulverizador costal manual.

4.2.5 MONITORAMENTO

O monitoramento foi realizado aproximadamente a cada 15 dias no período de março de 2017 a março de 2018. As armadilhas atrativas eram colocadas nas áreas experimentais (controle e tratado) e recolhidas após 40 minutos aproximadamente, sendo acondicionadas em sacos plásticos corretamente identificados, que eram rapidamente lacrados e levados para o laboratório para a identificação e contagem dos carrapatos. Em seguida, os parasitos eram colocados em tubos de ensaio tampados com algodão umedecido e levados à estufa tipo B.O.D à temperatura de 28°C e 80 % de umidade. A mortalidade dos indivíduos capturados foi avaliada nos dias 1 (avaliação 1), 3 (avaliação 2) e 10 (avaliação 3).

4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculados os dados da proporção de mortalidade na terceira avaliação das colheitas realizadas ao longo do período experimental após tratamento com o fungo *B. bassiana*. Foram construídos gráficos de perfil da proporção de vitalidade dos indivíduos adultos, ninfas e larvas considerando a segunda e a terceira avaliação. A primeira avaliação foi desprezada uma vez que todos os indivíduos capturados se encontravam vivos.

Também foi calculada a distribuição da taxa de mortalidade diária por colheita dos indivíduos (Adultos, ninfas e larvas), que corresponde ao número de indivíduos mortos por dias decorridos desde a aplicação do tratamento (mortos/ dias). A partir destes dados foram construídos gráficos de dispersão com curva de tendência da taxa de mortalidade por dia referente aos indivíduos.

A distribuição da proporção de mortalidade mensal de adultos, ninfas e larvas foi determinada considerando tratamento, última avaliação, precipitação acumulada e temperatura. A partir destes dados foram construídos gráficos de perfil da proporção de indivíduos mortos por mês na segunda e terceira avaliação.

A partir das informações e dados meteorológicos obtidos do site (<https://www.cpa.unicamp.br>, SEPAGRE, 2019), contendo precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento foram obtidos gráficos de perfil.

A seguir foi calculada a soma absoluta dos resultados de todas as colheitas com porcentagem de vivos e mortos na primeira, segunda e terceira avaliação das parcelas tratadas e controle de adultos, ninfas e larvas. A partir destes dados, foram construídas matrizes com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de adultos, ninfas e larvas mortos por influência da precipitação e temperatura.

Os dados foram ajustados pelo modelo de Poisson. Utilizou-se o software livre R (R, 2019) para análise estatística dos dados.

4.3 RESULTADOS

A análise abaixo apresenta as vinte e duas colheitas e os dias entre as avaliações no período de março 2017 a fevereiro de 2018 (Tabela 1). Cada teste consiste no resultado total das 18 armadilhas na área de tratamento com o fungo *B. bassiana* na dose de 5×10^{13} conídios/ha e 18 armadilhas na área de controle que recebeu apenas água. As armadilhas foram colhidas após aplicação do fungo, com tempo mínimo de colheita de 10 dias e tempo máximo de 49 dias.

No dia da colheita, ou seja, na primeira avaliação, todos os indivíduos, adultos, ninfas e larvas, estavam vivos. A mortalidade foi registrada na segunda avaliação, em média aos $2,6 \pm 1,0$ (média \pm desvio padrão) dias e a terceira avaliação aos $10,3 \pm 2,3$ dias.

Tabela 1 – Datas das colheitas realizados ao longo de um ano para a confirmação da dosagem do fungo *Beauveria bassiana*.

| Colheita | Data 1* | Data 2* | Dias 1* | Dias 2* | Dias 3* | Dias 4* | Dias 5* |
|----------|----------|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 09/03/17 | 22/03/17 | 13 | 15 | 22 | 2 | 9 |
| 2 | 09/03/17 | 11/04/17 | 33 | 35 | 42 | 2 | 9 |
| 3 | 11/04/17 | 24/04/17 | 13 | 16 | 23 | 3 | 10 |
| 4 | 11/04/17 | 09/05/17 | 28 | 30 | 37 | 2 | 9 |
| 5 | 08/05/17 | 31/05/17 | 23 | 25 | 31 | 2 | 8 |
| 6 | 08/05/17 | 21/06/17 | 44 | 46 | 52 | 2 | 8 |
| 7 | 20/06/17 | 30/06/17 | 10 | 11 | 20 | 1 | 10 |
| 8 | 20/06/17 | 11/07/17 | 21 | 24 | 36 | 3 | 15 |
| 9 | 11/07/17 | 25/07/17 | 14 | 17 | 30 | 3 | 16 |
| 10 | 11/07/17 | 14/08/17 | 34 | 36 | 43 | 2 | 9 |
| 11 | 16/08/17 | 04/09/17 | 19 | 21 | 28 | 2 | 9 |
| 12 | 16/08/17 | 18/09/17 | 33 | 36 | 44 | 3 | 11 |
| 13 | 29/09/17 | 17/10/17 | 18 | 21 | 31 | 3 | 13 |
| 14 | 29/09/17 | 17/11/17 | 49 | 52 | 59 | 3 | 10 |
| 15 | 21/11/17 | 06/12/17 | 15 | 20 | 27 | 5 | 12 |
| 16 | 21/11/17 | 21/12/17 | 30 | 35 | 38 | 5 | 8 |
| 17 | 21/12/17 | 10/01/18 | 20 | 22 | 28 | 2 | 8 |
| 18 | 21/12/17 | 22/01/18 | 32 | 34 | 41 | 2 | 9 |
| 19 | 22/01/18 | 15/02/18 | 24 | 28 | 35 | 4 | 11 |
| 20 | 22/01/18 | 27/02/18 | 36 | 38 | 45 | 2 | 9 |
| 21 | 27/02/18 | 20/03/18 | 21 | 24 | 35 | 3 | 14 |
| 22 | 27/02/18 | 28/03/18 | 29 | 31 | 38 | 2 | 9 |
| | | Média | 25,4 | 28,0 | 35,7 | 2,6 | 10,3 |
| | | Desvio p. | 10,3 | 10,3 | 9,7 | 1,0 | 2,3 |
| | | Mín. | 10,0 | 11,0 | 20,0 | 1,0 | 8,0 |
| | | Máx. | 49,0 | 52,0 | 59,0 | | |

- * Data 1: Data de aplicação do tratamento.
- * Data 2: Data de coleta das armadilhas, 1a avaliação.
- * Dias 1: Dias entre aplicação do tratamento e 1a avaliação.
- * Dias 2: Dias entre aplicação do tratamento e 2a avaliação.
- * Dias 3: Dias entre aplicação do tratamento e 3a avaliação.
- * Dias 4: Dias entre a 1a e 2a avaliação.
- * Dias 5: Dias entre a 2a e 3a avaliação.

Os dados da proporção de mortalidade na terceira avaliação das colheitas realizadas ao longo do período experimental, foram tabulados e são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição da mortalidade das colheitas de adultos, ninfas e larvas, tratados com o fungo *B. bassiana*.

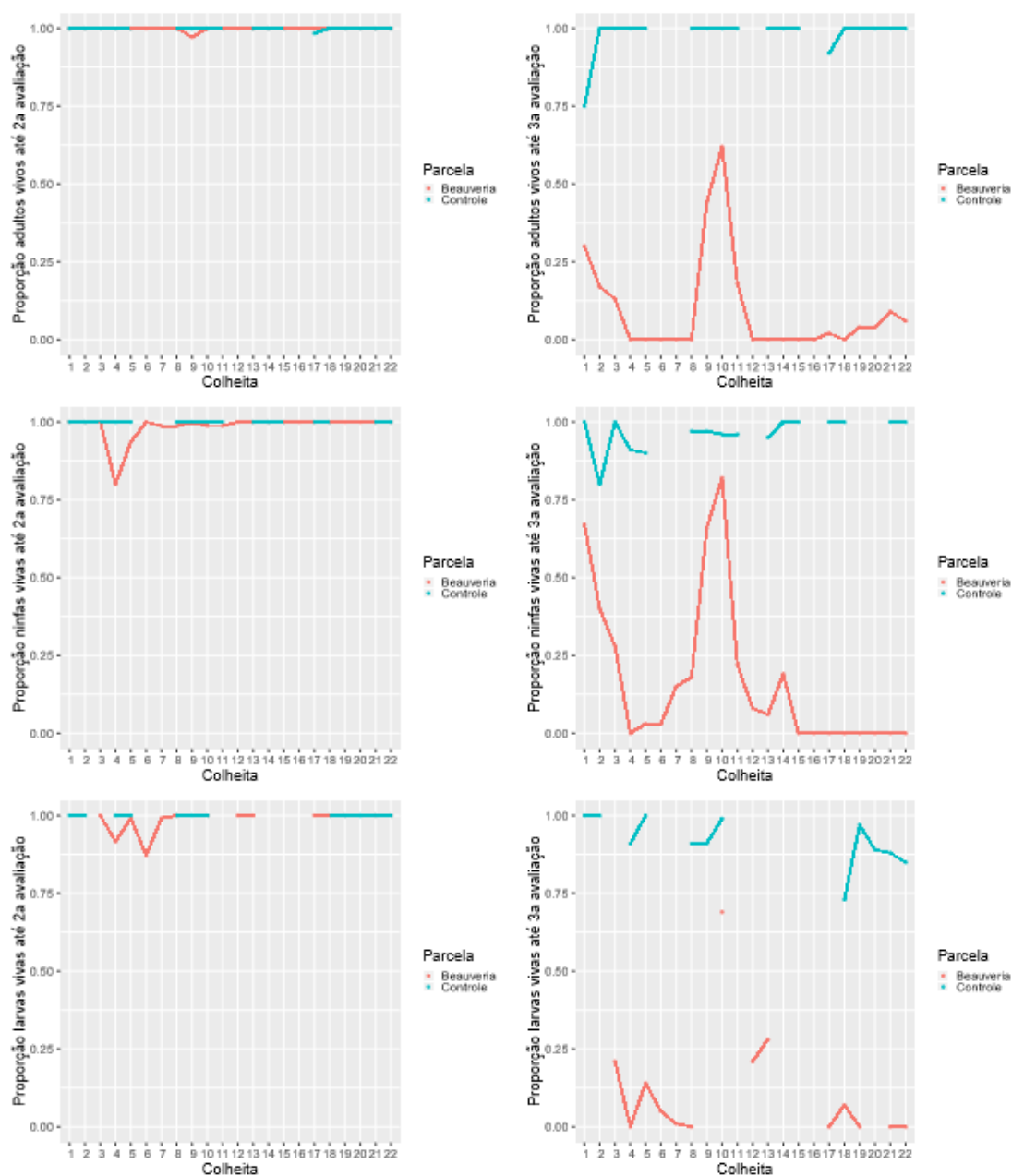
| Colheita | Adultos | | | | Ninfas | | | | Larvas | | | |
|----------|----------|----------|------------|------------|----------|----------|------------|------------|----------|----------|------------|------------|
| | Controle | | Tratamento | | Controle | | Tratamento | | Controle | | Tratamento | |
| | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) |
| 1 | 4 | 1 (25,0) | 10 | 7 (70,0) | 13 | 0 (0,0) | 3 | 1 (33,3) | 5 | 0 (0,0) | 0 | - |
| 2 | 5 | 0 (0,0) | 12 | 10 (83,3) | 5 | 1 (20,0) | 5 | 3 (60,0) | 1 | 0 (0,0) | 0 | - |
| 3 | 1 | 0 (0,0) | 16 | 14 (87,5) | 12 | 0 (0,0) | 18 | 13 (72,2) | 0 | - | 255 | 201 (78,8) |
| 4 | 2 | 0 (0,0) | 4 | 4 (100,0) | 11 | 1 (9,1) | 5 | 5 (100,0) | 11 | 1 (9,1) | 409 | 407 (99,5) |
| 5 | 1 | 0 (0,0) | 3 | 3 (100,0) | 83 | 8 (9,6) | 31 | 30 (96,8) | 3 | 0 (0,0) | 942 | 812 (86,2) |
| 6 | 0 | - | 1 | 1 (100,0) | 0 | - | 29 | 28 (96,6) | 0 | - | 63 | 60 (95,2) |
| 7 | 0 | - | 1 | 1 (100,0) | 0 | - | 375 | 319 (85,1) | 0 | - | 466 | 463 (99,3) |
| 8 | 2 | 0 (0,0) | 4 | 4 (100,0) | 76 | 2 (2,6) | 375 | 307 (81,9) | 11 | 1 (9,1) | 14 | 14 (100,0) |
| 9 | 2 | 0 (0,0) | 36 | 20 (55,6) | 76 | 2 (2,6) | 2165 | 744 (34,4) | 11 | 1 (9,1) | 0 | - |
| 10 | 4 | 0 (0,0) | 13 | 5 (38,5) | 265 | 10 (3,8) | 1574 | 285 (18,1) | 1014 | 12 (1,2) | 213 | 66 (30,9) |
| 11 | 14 | 0 (0,0) | 28 | 23 (82,1) | 366 | 13 (3,6) | 700 | 544 (77,7) | 0 | - | 0 | - |
| 12 | 0 | - | 1 | 1 (100,0) | 0 | - | 89 | 82 (92,1) | 0 | - | 117 | 93 (79,5) |
| 13 | 32 | 0 (0,0) | 39 | 39 (100,0) | 132 | 7 (5,3) | 188 | 177 (94,1) | 0 | - | 32 | 23 (71,9) |
| 14 | 6 | 0 (0,0) | 39 | 39 (100,0) | 8 | 0 (0,0) | 52 | 42 (80,8) | 0 | - | 0 | - |
| 15 | 3 | 0 (0,0) | 6 | 6 (100,0) | 6 | 0 (0,0) | 1 | 1 (100,0) | 0 | - | 0 | - |
| 16 | 0 | - | 3 | 3 (100,0) | 0 | - | 3 | 3 (100,0) | 0 | - | 0 | - |
| 17 | 61 | 5 (8,2) | 47 | 46 (97,9) | 2 | 0 (0,0) | 19 | 19 (100,0) | 0 | - | 9 | 9 (100) |
| 18 | 18 | 0 (0,0) | 18 | 18 (100,0) | 1 | 0 (0,0) | 11 | 11 (100,0) | 15 | 4 (26,7) | 30 | 28 (93,3) |
| 19 | 16 | 0 (0,0) | 51 | 49 (96,1) | 0 | - | 21 | 21 (100,0) | 98 | 3 (3,1) | 3 | 3 (100,0) |
| 20 | 6 | 0 (0,0) | 68 | 65 (95,6) | 0 | - | 12 | 12 (100,0) | 18 | 2 (11,1) | 0 | - |
| 21 | 4 | 0 (0,0) | 33 | 30 (90,1) | 4 | 0 (0,0) | 4 | 4 (100,0) | 8 | 1 (12,5) | 6 | 6 (100,0) |
| 22 | 13 | 0 (0,0) | 32 | 30 (93,8) | 2 | 0 (0,0) | 9 | 9 (100,0) | 20 | 3 (15,0) | 4 | 4 (100,0) |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Foram construídos gráficos de perfil da proporção de vitalidade dos indivíduos, adultos, ninfas e larvas das colheitas na segunda e terceira avaliação. Os gráficos com a terceira avaliação correspondem com os dados citados anteriormente na tabela 2, no entanto, não foram apresentados de forma tabulada os dados da segunda avaliação considerando que a maioria das proporções foram quase nulas (Figura 2).

Os dados demonstram mortalidade pouco expressiva na segunda avaliação para todas as fases do carrapato na área tratada, enquanto que a área controle, se mantém sem mortalidade. Na terceira avaliação ocorre uma maior mortalidade em todas as fases do carrapato em períodos de maior precipitação acumulada (mm), caracterizado como períodos de chuva, no entanto, nas colheitas feitas nos períodos de seca de menos precipitação acumulada, para adultos e ninfas, os indivíduos capturados permaneceram em sua maioria vivos.

Figura 2 – Perfil da proporção de indivíduos vivos (adultos, ninfas e larvas) por teste na segunda e terceira avaliação.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A seguir, a tabela 3 corresponde à distribuição da taxa de mortalidade diária por colheita dos indivíduos (Adultos, ninfas e larvas). A taxa corresponde ao número de indivíduos mortos por dias decorridos desde a aplicação do tratamento (mortos/ dias *). Pode se observar que para

todas as fases de vida do carrapato a melhor taxa de mortalidade é obtida por volta do trigésimo dia após tratamento.

Tabela 3 – Distribuição da taxa de mortalidade diária de adultos, ninfas e larvas por colheitas tratados com o fungo *B. bassiana*

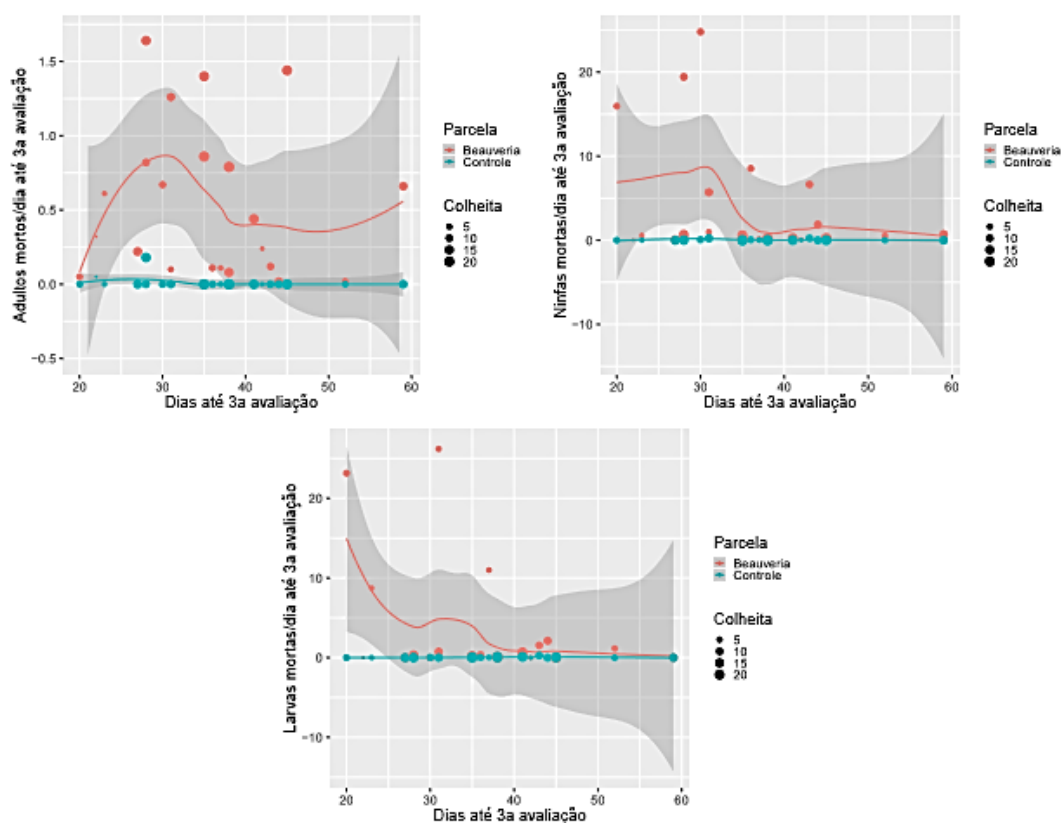
| Colheita | Dias * | Adultos | | Ninfas | | Larvas | |
|----------|--------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| | | Controle | Tratamento | Controle | Tratamento | Controle | Tratamento |
| 1 | 22 | 0,05 | 0,32 | 0,00 | 0,05 | 0,00 | - |
| 2 | 42 | 0,00 | 0,24 | 0,02 | 0,07 | 0,00 | - |
| 3 | 23 | 0,00 | 0,61 | 0,00 | 0,57 | - | 8,74 |
| 4 | 37 | 0,00 | 0,11 | 0,03 | 0,14 | 0,03 | 11,00 |
| 5 | 31 | 0,00 | 0,10 | 0,26 | 0,97 | 0,00 | 26,19 |
| 6 | 52 | - | 0,02 | - | 0,54 | - | 1,15 |
| 7 | 20 | - | 0,05 | - | 15,95 | 7 | 23,15 |
| 8 | 36 | 0,00 | 0,11 | 0,06 | 8,53 | 0,03 | 0,39 |
| 9 | 30 | 0,00 | 0,67 | 0,07 | 24,80 | 0,03 | - |
| 10 | 43 | 0,00 | 0,12 | 0,23 | 6,63 | 0,28 | 1,53 |
| 11 | 28 | 0,00 | 0,82 | 0,46 | 19,43 | - | - |
| 12 | 44 | - | 0,02 | - | 1,86 | - | 2,11 |
| 13 | 31 | 0,00 | 1,26 | 0,23 | 5,71 | - | 0,74 |
| 14 | 59 | 0,00 | 0,66 | 0,00 | 0,71 | - | - |
| 15 | 27 | 0,00 | 0,22 | 0,00 | 0,04 | - | - |
| 16 | 38 | - | 0,08 | - | 0,08 | - | - |
| 17 | 28 | 0,18 | 1,64 | 0,00 | 0,68 | - | 0,32 |
| 18 | 41 | 0,00 | 0,44 | 0,00 | 0,27 | 0,10 | 0,68 |
| 19 | 35 | 0,00 | 1,40 | - | 0,60 | 0,09 | 0,09 |
| 20 | 45 | 0,00 | 1,44 | - | 0,27 | 0,04 | - |
| 21 | 35 | 0,00 | 0,86 | 0,00 | 0,11 | 0,03 | 0,17 |
| 22 | 38 | 0,00 | 0,79 | 0,00 | 0,24 | 0,08 | 0,11 |

* Dias: Dias entre aplicação do tratamento e 3ª avaliação.

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A representação gráfica dos dados tabulados é apresentada na figura 3. Note-se o pico de mortalidade ao redor de 30 dias decorridos da aplicação do fungo *B. bassiana* até a última avaliação.

Figura 3 – Dispersão com curva de tendência da taxa de mortalidade por dia referente aos indivíduos, adultos, ninfas e larvas, segundo os dias decorridos entre a aplicação do tratamento e a última avaliação.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A distribuição da proporção de mortalidade mensal dos indivíduos (adultos, ninfas e larvas) considerando tratamento, ultima avaliação, precipitação acumulada e temperatura são observados na tabela 4. Note-se que a menor proporção de mortalidade dos adultos, ninfas e larvas tratados, acontece do mês de julho de 2017 com valores de 51,0%, 27,5% e 30,9% respectivamente.

Tabela 4 – Distribuição da proporção de mortalidade mensal dos indivíduos adultos, ninfas e larvas referente ao controle e tratamento na última avaliação.

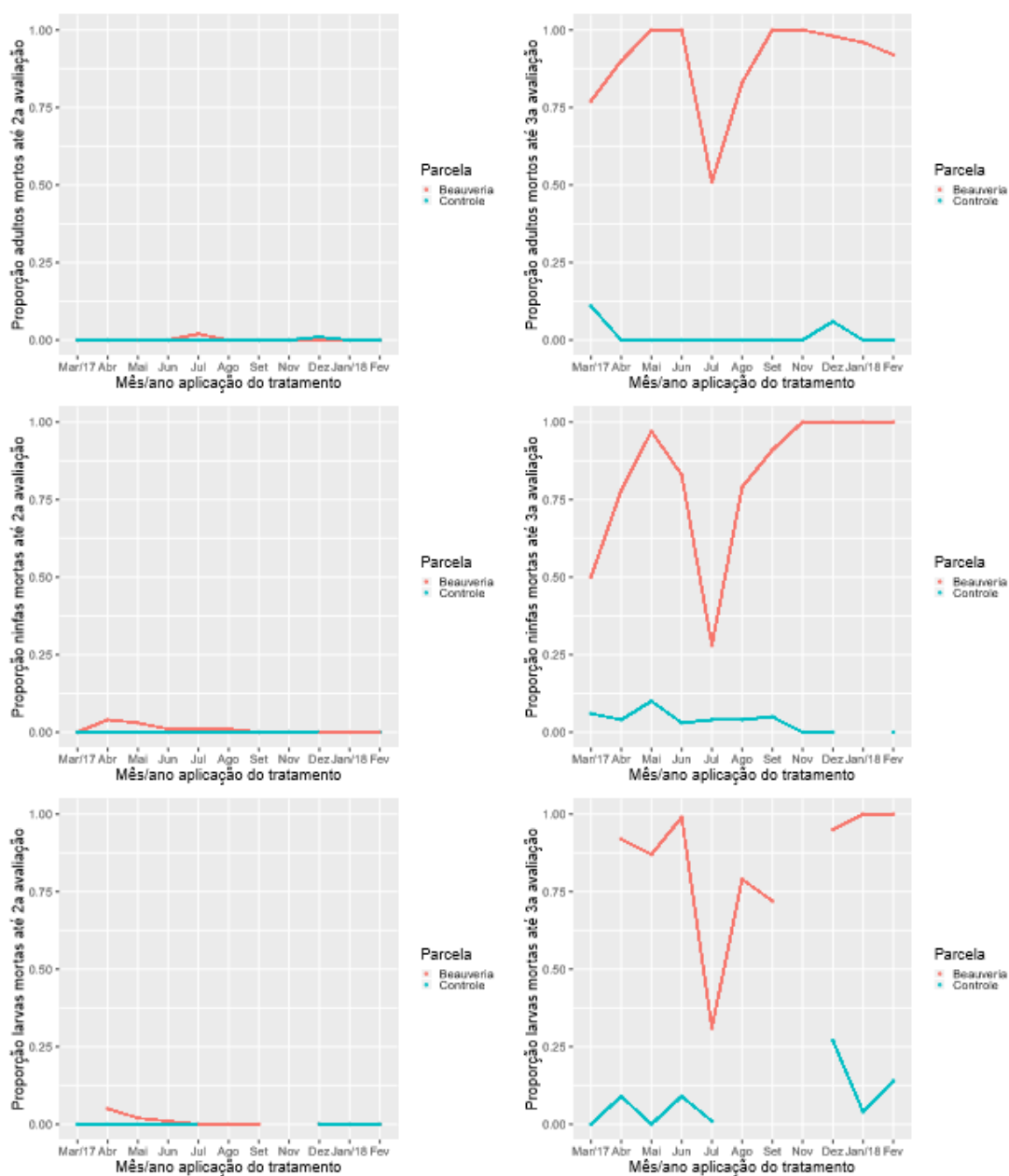
| Mês | Prec. | Tem. | Adultos | | | | Ninfas | | | | Larvas | | | |
|--------|-------|-------|----------|----------|------------|------------|----------|----------|------------|-------------|----------|----------|------------|------------|
| | | | Controle | | Tratamento | | Controle | | Tratamento | | Controle | | Tratamento | |
| | | | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) | N | Mort (%) |
| Mar/17 | 240 | 23 | 9 | 1 (11,1) | 22 | 17 (77,3) | 18 | 1 (5,6) | 8 | 4 (50,0) | 6 | 0 (0,0) | 0 | - |
| Abr/17 | 88 | 23 | 3 | 0 (0,0) | 20 | 18 (90,0) | 23 | 1 (4,3) | 23 | 18 (78,3) | 11 | 1 (9,1) | 664 | 608 (91,6) |
| Mai/17 | 114 | 20 | 1 | 0 (0,0) | 4 | 4 (100,0) | 83 | 8 (9,6) | 60 | 58 (96,7) | 3 | 0 (0,0) | 1005 | 872 (86,8) |
| Jun/17 | 27 | 18 | 2 | 0 (0,0) | 5 | 5 (100,0) | 76 | 2 (2,6) | 750 | 626 (83,5) | 11 | 1 (9,1) | 480 | 477 (99,4) |
| Jul/17 | 0 | 17 | 6 | 0 (0,0) | 49 | 25 (51,0) | 341 | 12 (3,5) | 3739 | 1029 (27,5) | 1025 | 13 (1,3) | 213 | 66 (30,9) |
| Ago/17 | 34 | 21 | 14 | 0 (0,0) | 29 | 24 (82,8) | 366 | 13 (3,5) | 789 | 626 (79,3) | 0 | - | 117 | 93 (79,5) |
| Set/17 | 13 | 23 | 38 | 0 (0,0) | 78 | 78 (100,0) | 140 | 7 (5,0) | 240 | 219 (91,3) | 0 | - | 32 | 23 (71,9) |
| Nov/17 | 234 | 22 | 3 | 0 (0,0) | 9 | 9 (100,0) | 6 | 0 (0,0) | 4 | 4 (100,0) | 0 | - | 0 | - |
| Dez/17 | 173 | 25 | 79 | 5 (6,3) | 65 | 64 (98,5) | 3 | 0 (0,0) | 30 | 30 (100,0) | 15 | 4 (26,7) | 39 | 37 (94,9) |
| Jan/18 | 205 | 24,18 | 22 | 0 (0,0) | 119 | 114 (95,8) | 0 | - | 33 | 33 (100,0) | 116 | 5 (4,3) | 3 | 3 (100,0) |
| Fev/18 | 88,9 | 25,39 | 17 | 0 (0,0) | 65 | 60 (92,3) | 6 | 0 (0,0) | 13 | 13 (100,0) | 28 | 4 (14,3) | 10 | 10 (100,0) |

Prec. : Precipitação acumulada (mm). Tem.: Temperatura (°C).

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A partir dos dados acima, foram construídos gráficos de perfil da proporção de mortalidade mensal de indivíduos, adultos, ninfas e larvas na segunda e terceira avaliação (Figura 4). Pode se observar que na segunda avaliação a mortalidade foi pouco expressiva. No entanto, na terceira avaliação há uma maior mortalidade em todas as fases do carrapato na parcela tratada, entre os meses de março, abril e maio; setembro, novembro, dezembro de 2017 e janeiro e fevereiro de 2018 (meses caracterizados com maior precipitação acumulada – período de chuva). Enquanto que na parcela controle os indivíduos se mantêm com mortalidade pouco expressiva.

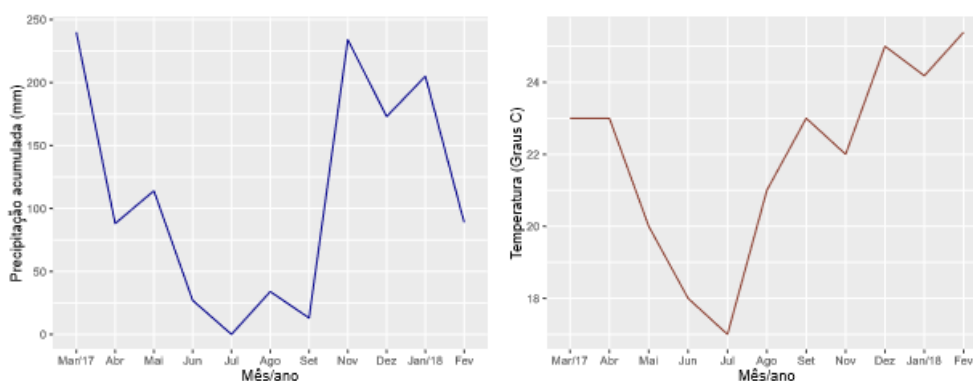
Figura 4 – Perfil da proporção de indivíduos mortos (adultos, ninfas e larvas) por mês na segunda e terceira avaliação.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

São demonstrados na figura 5, gráficos de linha construídos a partir das informações de dados meteorológicos obtidos do site (<https://www.cpa.unicamp.br>), contendo precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento.

Figura 5 – Precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A seguir são apresentados nas tabelas 5, 6 e 7, a soma absoluta dos resultados de todas as colheitas com porcentagem de vivos e mortos na primeira, segunda e terceira avaliação das parcelas tratadas e controle de adultos, ninfas e larvas respectivamente.

Tabela 5 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de adultos na primeira, segunda e terceira avaliação.

| Parcela | Mortos * | | | Resumo total | | |
|------------|----------|-------|-------|--------------|------------|-----------|
| | 1a A. | 2a A. | 3a A. | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados |
| Controle | 0 | 1 | 5 | 6 (3,1) | 188 (96,9) | 194 |
| Tratamento | 0 | 1 | 417 | 418 (89,9) | 47 (10,1) | 465 |
| Total | 0 | 2 | 422 | 424 (64,3) | 235 (35,7) | 659 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 6 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de ninfas na primeira, segunda e terceira avaliação.

| Parcela | Mortos * | | | Resumo total | | |
|------------|----------|-------|-------|--------------|-------------|-----------|
| | 1a A. | 2a A. | 3a A. | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados |
| Controle | 0 | 0 | 44 | 44 (4,1) | 1018 (95,9) | 1062 |
| Tratamento | 0 | 46 | 2614 | 2660 (46,8) | 3029 (53,2) | 5689 |
| Total | 0 | 46 | 2658 | 2704 (40,1) | 4047 (59,9) | 6751 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 7 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de larvas na primeira, segunda e terceira avaliação.

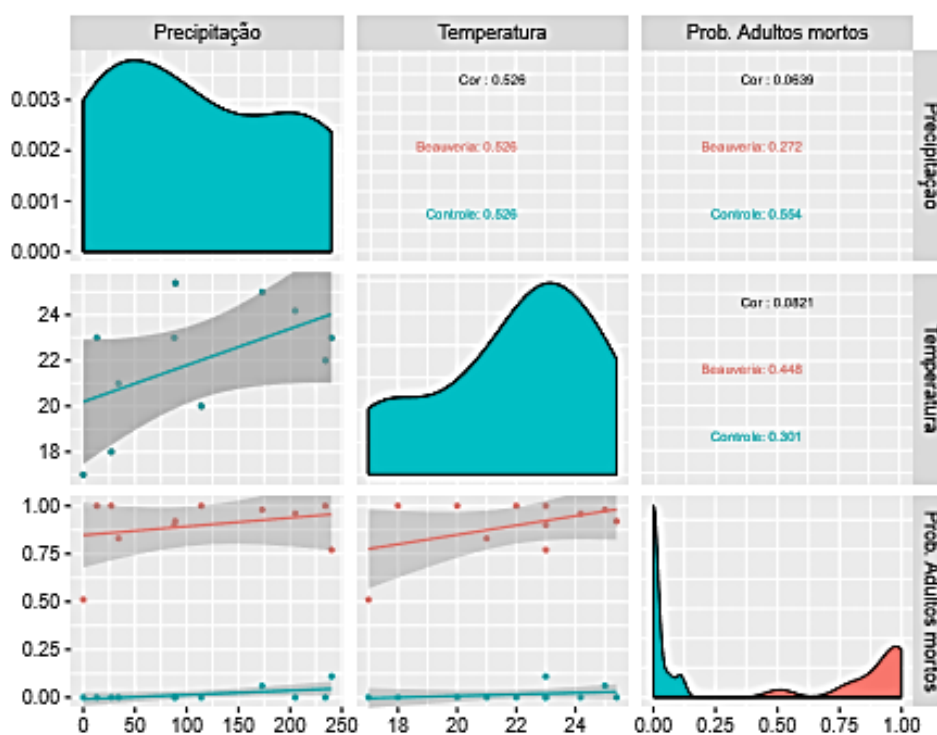
| Parcela | Mortos * | | | Resumo total | | |
|------------|----------|-------|-------|--------------|-------------|-----------|
| | 1a A. | 2a A. | 3a A. | Mortos (%) | Vivos (%) | Coletados |
| Controle | 0 | 0 | 28 | 28 (2,3) | 1187 (97,7) | 1215 |
| Tratamento | 0 | 55 | 2134 | 2189 (85,4) | 374 (14,6) | 2563 |
| Total | 0 | 55 | 2162 | 2217 (58,7) | 1561 (41,3) | 3778 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A partir das informações acima, foram construídas matrizes com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de adultos, ninfas e larvas mortos por influencia da precipitação e temperatura (Figuras 6, 7 e 8).

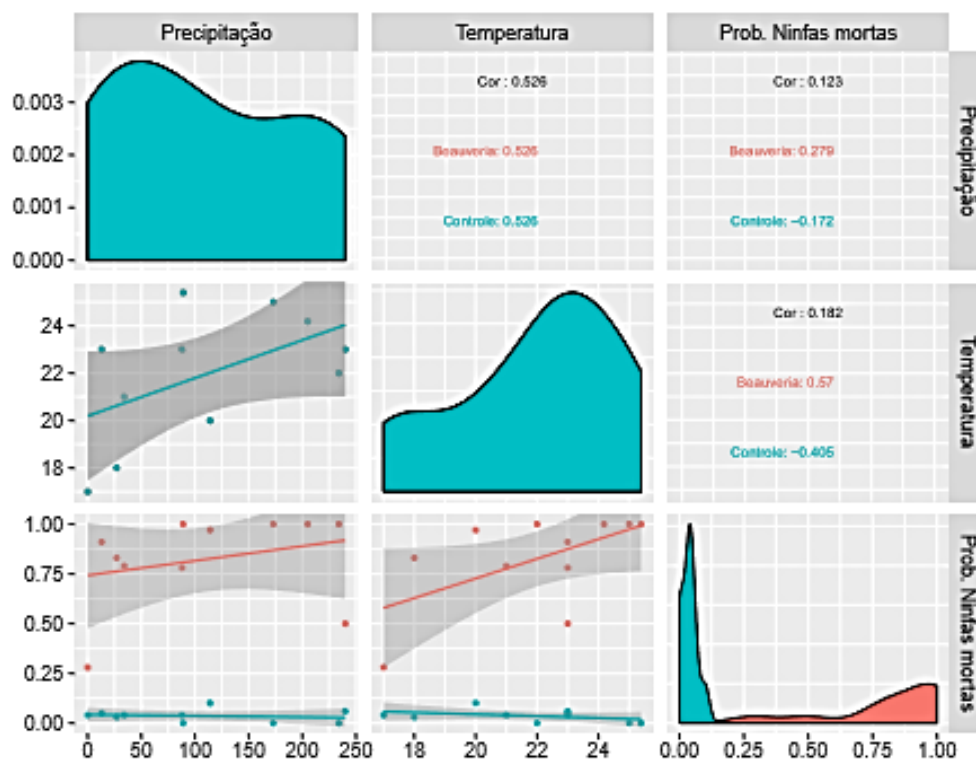
Segundo o painel inferior das matrizes de dispersão observa-se para todas as etapas dos carrapatos (adultos, ninfas e larvas) uma associação linear positiva entre a proporção de indivíduos mortos com a precipitação e a temperatura, principalmente para os tratados com o fungo. No entanto, observa-se que em relação as ninfas do controle houve uma correlação negativa.

Figura 6 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de adultos mortos por precipitação e temperatura.



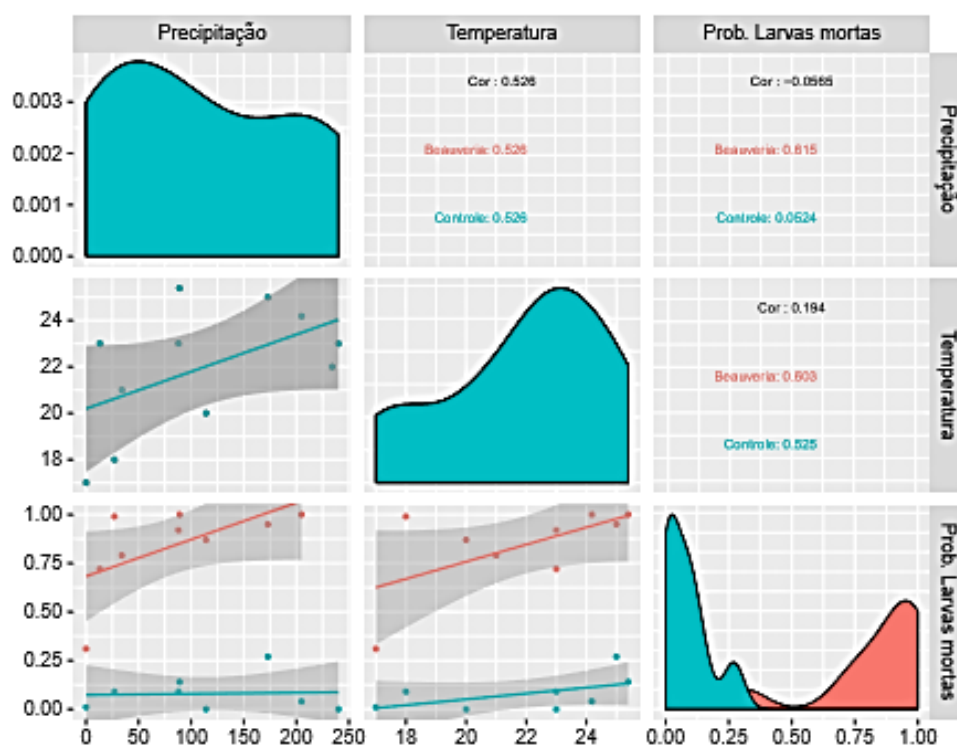
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 7 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de ninfas mortas por precipitação e temperatura.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 8 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de larvas mortas por precipitação e temperatura.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A seguir estão apresentados nas tabelas 9, 10 e 11 o número de adultos, ninfas e larvas mortos até a terceira avaliação após aplicação do fungo *B. bassiana*. Os dados foram ajustados pelo modelo de Poisson.

Observa-se que para adultos, ninfas e larvas, todos os parâmetros resultaram significativos ($p=0,046$ ou $p<0,001$), excetuando-se o parâmetro precipitação para ninfas que não foi significativo ($p= 0,177$).

Tabela 8 – Ajuste do modelo Poisson ao número de adultos mortos até a terceira avaliação.

| Parâmetros | Estimativa | Erro padrão | Valor p |
|----------------------------|------------|-------------|---------|
| Intercepto | -3,459 | 0,814 | < 0,001 |
| Trat. (<i>Beauveria</i>) | 4,244 | 0,411 | < 0,001 |
| Precipitação | -0,076 | 0,009 | < 0,001 |
| Temperatura | 0,097 | 0,033 | < 0,001 |
| Precipita.:Tempera. | 0,003 | 0,001 | < 0,001 |
| Deviance: 191,8 | | | |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 9 – Ajuste do modelo Poisson ao número de ninfas mortas até a terceira avaliação.

| Parâmetros | Estimativa | Erro padrão | Valor p |
|----------------------------|------------|-------------|---------|
| Intercepto | 5,088 | 0,2413 | < 0,001 |
| Trat. (<i>Beauveria</i>) | 4,101 | 0,1520 | < 0,001 |
| Precipitação | -0,007 | 0,0049 | 0,177 |
| Temperatura | -0,169 | 0,0102 | < 0,001 |
| Precipita.:Tempera. | -0,001 | 0,0002 | 0,046 |
| Deviance: 1413,3 | | | |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 10 – Ajuste do modelo Poisson ao número de larvas mortas até a terceira avaliação.

| Parâmetros | Estimativa | Erro padrão | Valor p |
|----------------------------|------------|-------------|---------|
| Intercepto | -1,597 | 0,3428 | < 0,001 |
| Trat. (<i>Beauveria</i>) | 4,359 | 0,1902 | < 0,001 |
| Precipitação | 0,139 | 0,0041 | < 0,001 |
| Temperatura | 0,095 | 0,014 | < 0,001 |
| Precipita.: Tempera. | -0,006 | 0,0001 | < 0,001 |
| Deviance: 3825,8 | | | |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Quanto aos animais silvestres e inimigos naturais (Figura 9), mesmo após várias aplicações com os fungos entomopatogênicos, demonstraram-se preservados sem qualquer tipo de inibição de reprodução.

Figura 9 – Formigueiro formado na área onde foi aplicado o tratamento com *B. bassiana*, Campinas -SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Após aplicação do tratamento com o fungo entomopatogênico a campo, em uma das colheitas foram recuperados adultos e ninfas de *Amblyomma sculptum* que foram levadas para laboratório para avaliação *in vitro*, e ao findar o décimo dia de avaliação os adultos (Figura 10) e ninfas (Figura 11) se encontravam mortos e totalmente colonizados com o fungo *B. bassiana*.

Figura 10 – Adulto recuperado da área experimental, observada após o décimo dia de avaliação *in vitro*, morto e colonizado com o fungo *B. bassiana* (Campinas – SP).



Fonte: COSTA, V. A., 2019 – Instituto Biológico – CAMPINAS – SP.

Figura 11 – Nífa recuperada da área experimental, observada após o décimo dia de avaliação *in vitro*, morta e colonizada com o fungo *B. bassiana* (Campinas – SP).



Fonte: COSTA, V. A., 2019 – Instituto Biológico - CAMPINAS – SP.

4.4 DISCUSSÃO

No Brasil, o carrapato *A. sculptum* é a espécie mais frequentemente encontrada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, parte das regiões Sul e Nordeste, associada a áreas de cerrado (MARTINS *et al.*, 2016), mas note-se que Ramos *et al.*, (2014) e Siqueira (2017) também registraram sua associação com formações florestais.

Antas, cavalos e capivaras são reconhecidos como hospedeiros primários deste parasito, sendo que os porcos foram incluídos há pouco tempo neste rol (OSAVA *et al.*, 2016). Não obstante, *A. sculptum* possui a faculdade de parasitar uma grande variedade de hospedeiros selvagens e domésticos (LABRUNA *et al.*, 2005, RAMOS *et al.*, 2016). Destaque-se que o sítio experimental deste trabalho é localizado na Região Metropolitana de Campinas - SP, onde há intensa ação humana, sendo a infestação mantida principalmente pelas capivaras que residem na Fazenda Mato Dentro e circulam pelos gramados da área de experimento, abrigando-se nas matas ciliares dos mananciais da fazenda, onde funciona a Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal.

A. sculptum foi recuperado em abundância nas parcelas demarcadas para estes experimentos.

O controle microbiano é um elemento que pode ser agregado quando se pretende determinar estratégias de manejo integrado de pragas. Porém, a seleção de isolados de microrganismos entomopatogênicos é um pré-requisito, de modo que se torna essencial existir a retaguarda de um banco de isolados devidamente conservados e com variabilidade genética comprovada. Cumprido este requisito é possível selecionar agentes que sejam promissores para o programa de controle de uma determinada praga (BARCI *et al.*, 2009).

Barci *et al.*, (2009) testaram a cepa de *B. bassiana* (IBCB 66) contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em testes *in vitro*, analisando comparativamente dados de mortalidade acumulada. Este isolado ficou entre os cinco melhores e também foi demonstrado que apresenta maior potencial para utilização a campo, tendo em vista o controle de *R. (B.) microplus*, além de ter a característica de uma melhor produção massal.

O isolado utilizado no presente estudo do fungo *B. bassiana* (IBCB 66), esta depositado na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu" do Instituto Biológico, e já vem sendo utilizados em diversos produtos comerciais, registrados pelo Ministério da Agricultura para o controle de diferentes pragas de interesse agrônomo.

Para isolados de *B. bassiana*, Bittencourt et al., (1997) descreveram uma mortalidade acima de 80% contra *R. (B.) microplus* na concentração de 10^8 conídios/mL em testes *in vitro*. Achados similares foram descritos por Reis et al., (2004) frente ao carrapato-estrela em testes *in vitro* na mesma concentração. Neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho, para o fungo *B. bassiana* demonstrou potencial patogênico para a espécie de carrapato *A. sculptum*, causando mortalidade em todos os estágios, podendo ser indicado nos programas de controle do carrapato *A. sculptum*.

Fernandes (2007) obteve mortalidade significativa no décimo dia pós-tratamento em estudo da ação de 60 isolados fúngicos de *B. bassiana*, contra larvas de *R. (B.) microplus*, num modelo *in vitro*.

Estes achados relatados na literatura fundamentaram a decisão de efetuar uma avaliação no décimo dia após a colheita dos carrapatos no campo, visto tratar-se do instante que ocorre a maior mortalidade dos parasitos expostos aos fungos entomopatogênicos em condições de campo.

A análise estatística reforça essa decisão e sugere que é possível abandonar a avaliação intermediária feita no terceiro dia pós colheita.

Garcia (2008) avaliou a aplicação da cepa E9 de *M. anisopliae* na pastagem contra *R. (B.) microplus*, utilizando uma suspensão contendo 10^7 conídios/ml aplicada num volume médio de 66,7 mL por metro quadrado de pasto, concluindo que o tratamento não resultou na redução do número de larvas infectantes na pastagem e nem do número de fêmeas ingurgitadas sobre os bovinos.

No presente trabalho, foi possível comprovar que há um efeito significativo quando da aplicação de suspensões dos fungos entomopatogênicos estudados. Em adição aos efeitos significativos registrados durante os testes de dosagem, conseguimos reproduzir os mesmos efeitos no estudo com um ano de duração na dosagem de 5×10^{13} conídios/ha de *B. bassiana*.

Fernandes e Bittencourt (2008) relataram que a infecção de carrapatos por fungos é beneficiada por condições de alta umidade e pouca incidência de raios ultravioletas. No presente estudo observou-se que há um importante efeito da precipitação acumulada (mm) e da umidade relativa do ar sobre o efeito letal de *B. bassiana* para os carrapatos.

Maranga et al., (2005) realizaram estudo *in vitro* contra ninfas e adultos de *Amblyomma variegatum*, com fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, utilizando formulação oleosa, demonstrando melhor desempenho em todos os ensaios, com maior mortalidade de carrapatos de 92% ocorrendo durante a estação chuvosa na concentração de conídios de 10^{10} conídios / ml dos fungos mistos comparados a 49% para a formulação aquosa em concentrações semelhantes

de conídios. No entanto, na mesma concentração de conídios durante a estação seca, as mortalidades no campo foram relativamente baixas, com a mistura dos fungos registrando 24% e 17% de mortalidade de carrapatos para a formulação de óleo e água, respectivamente.

Os resultados do estudo de confirmação da dose do fungo entomopatogênico *B. bassiana* (IBCB 66) mostra que, dos indivíduos capturados, houve maior mortalidade de adultos, ninfas e larvas com porcentagens acima de 70% nos meses com maior precipitação acumulada (mm), caracterizado como períodos de chuva, enquanto que, no mês de julho, houve menor porcentagem de mortalidade para todas as fases de vida dos carrapatos. Julho caracteriza-se por ser um mês com menor precipitação acumulada (mm), qualificado como período de seca, obtendo-se porcentagens de mortalidade de 51,0% para adultos, 27,5% para ninfas e 30,9% para larvas.

Os dados produzidos neste trabalho sugerem fortemente que a utilização dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (IBCB 66) aplicados a campo tem a capacidade de promover o controle de todas as fases de vida do *Amblyomma sculptum*, quebrando o ciclo do parasito, quando aplicado de forma estratégica.

4.5 CONCLUSÕES

O isolado utilizado no presente estudo do fungo *B. bassiana* (IBCB 66) demonstrou ter potencial patogênico para utilização a campo.

O melhor dia de avaliação de mortalidade *in vitro* dos carrapatos capturados do campo após aplicação de tratamento foi o décimo comprovando os melhores resultados.

A dosagem de 5×10^{13} conídios por hectare para o fungo *B. bassiana* contra *Amblyomma sculptum* demonstrou-se eficaz para o controle deste ectoparasito a campo, com percentual de mortalidade acima de 70% nos períodos de chuva.

O pico de mortalidade ocorreu ao redor de 30 dias decorridos da aplicação do fungo *B. bassiana* até a última avaliação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, n.4, p. 749-843, 1936.
- BARCI, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. D. C.; ZAPPELINI, L. O.; PRADO, A. P. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 18, (1), p. 7-13, 2009.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J.; PERALVA, S.L.F.S. et al. Avaliação da eficácia in vitro do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.6, p.49-52, 1997.
- CEPRAG, TEMPO E CLIMA UNICAMP. Disponível em: < [Http://www.cpa.unicamp.br](http://www.cpa.unicamp.br) >. Acessado em 20 de março de 2019.
- FRANCO, C. S. **A influência dos fatores ambientais na ocorrência de carrapatos (Arthropoda, Acari, Ixodidae) e *Rickettsia* em área de transmissão e área de predisposição para a febre maculosa brasileira**. 2018. 67 p. Tese (Doutorado em em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2018.
- FERNANDES, E. K. K. **Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus***. 2007. 150p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007. Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Exp Appl Acarol**, v. 46, p. 71-93, 2008.
- GARCIA, M. V. **Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* em pastagens visando o controle do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos**. 2008. 58p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Jaboticabal, São Paulo, 2008.

GARCIA, M. V., RODRIGUES, V. S., MONTEIRO, A. C., SIMI, L. D., HIGA, L. O. S., MARTINS, M. M., PRETTE, N., MOCHI, D. A., ANDREOTTI, R., SZABÓ, M. P. J. In vitro efficacy of *Metarhizium anisopliae* sensu lato against unfed *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 76 (4), p. 507-512, 2018.

GRAY, J.S. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. **Experimental and Applied Acarology**, v. 1, p. 35-44, 1985.

LABRUNA, M.B.; KEBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H; DE WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p.1-14, 2001.

LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; TERRASSINI, F.A.; FERREIRAA, F.; SCHUMAKER, T.S.; CAMARGO, E.P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondonia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.

MARTINS, M. M. **Fauna, sazonalidade e riquetsias de carrapatos em área do Cerrado goiano**. 2016. 85p. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.159, n.4, p.527-532, 2005.

OSAVA, C. F. **Perfil sorológico contra *Rickettsia* spp e *Leptospira* spp e infestação de carrapatos em suínos mantidos sob diferentes sistemas de criação**. 2016 98p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias): Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

PINTER, A.; COSTA, C.S.; HOLCMAN, M.M.; CAMARA, M.; LEITE, R.M. A Febre Maculosa Brasileira na região metropolitana de São Paulo. **BEPA**, v. 13(151), p. 3-47, 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em < <http://www.R-project.org>>, Acessado em 28 de fevereiro de 2019.

RAMOS, V. N., OSAVA, C. F., PIOVEZAN, U., & SZABÓ, M. P. Ticks on humans in the Pantanal wetlands, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5(5), p. 497-499, 2014.

RAMOS, V.N., PIOVEZAN, U., FRANCO, A.H.A., RODRIGUES, V.S., NAVA, S., SZABÓ, M.P.J. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. **Exp Appl Acarol**, v. 68, p. 227-240, 2016.

REIS, R. C. S.; CHACON, S. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, (1883) na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908) (Acari-Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.2, p.68-70, 2003.

REIS, R.C.S., MELO, D. R., BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56 (6), p. 788-791, 2004.

SOUZA S.S.L., SOUZA C.E., NETO R.J.E. & PRADO A.P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cienc. Rur.**, v 36, p. 887-891, 2006.

SIQUEIRA, S. M. **Fluxo de carrapatos entre ambientes e animais na fazenda Capim Branco.** 2017. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE MANEJO INTEGRADO COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana* PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Amblyomma sculptum* NO CAMPUS USP DE PIRASSUNUNGA – SÃO PAULO

RESUMO

A espécie de carrapato *Amblyomma sculptum* estão associados à transmissão da Febre Maculosa Brasileira apresentando baixa especificidade, podendo parasitar uma diversidade de hospedeiros inclusive o homem. O objetivo do presente estudo foi a utilização dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (IBCB 66) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) a campo, visando implementar medidas de manejo já adotadas pelo Campus da Universidade de São Paulo – Pirassununga. O experimento foi realizado no período de novembro de 2017 a novembro de 2018. A suspensão de conídios foi preparada com formulação aquosa acrescentada de emulsificante alimentício na concentração de 2×10^{13} conídios por hectare. Cada área de tratamento era composta por piquete de um hectare, cada piquete correspondente, recebeu suspensão de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e o controle que recebeu apenas água. O monitoramento foi realizado a cada 30 dias, e a mortalidade dos indivíduos capturados foi avaliada nos dias 1 (avaliação 1), 3 (avaliação 2) e 10 (avaliação 3). Os dados foram submetidos a diferentes métodos e modelos estatísticos utilizando o software livre R (R, 2019). As porcentagens das contagens totais de indivíduos para fungos *B. bassiana* foi na ordem de, 91,7%, 56,9% e 63,0% de mortalidade para adultos, ninfas e larvas respectivamente. Enquanto que para o fungo *M. anisopliae* foi na ordem de 100%, 56,9% e 100% de mortalidade para adultos, ninfas e larvas respectivamente. O melhor dia de avaliação de mortalidade *in vitro* dos carrapatos capturados do campo após aplicação de tratamento foi o décimo. A formulação aquosa com emulsificante alimentício, demonstrou mais praticidade e eficiência para aplicação no campo para ambos os fungos. Os isolados utilizados no presente estudo dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, assim como, a dosagem de 2×10^{13} conídios por hectare, demonstraram ter potencial patogênico e são eficazes para utilização a campo no controle deste ectoparasito.

5.1 INTRODUÇÃO

A espécie de carrapato *Amblyomma sculptum* utilizam mais de um hospedeiro, e seus diferentes estágios ocorrem em estações distintas, tendo apenas uma geração por ano e picos definidos para as populações de larvas, ninfas e adultos (Oliveira et al., 2003), estes também estão associados à transmissão da (FMB) - Febre Maculosa Brasileira (Lemos, 2002).

No Brasil o controle do carrapato estrela tem sido feito através do tratamento nos equinos usando principalmente o produto químico, piretróide deltametrina, porém, não têm demonstrado boa efetividade no controle. Segundo Barros-Battesti et al., (2006) há necessidade de maiores concentrações de produto químico, que podem chegar 1,8 vezes o valor recomendado para o carrapato do boi, e intervalos menores entre banhos estratégicos para se obter um resultado satisfatório.

O uso exclusivo do controle químico é pouco viável em termos práticos e econômicos, sendo indicado o emprego de métodos alternativos (Barros e Evans, 1989). Neste contexto, se integra o controle microbiano. Há uma diversidade de microrganismos que são empregados como agentes controladores de pragas, no entanto, os fungos entomopatogênicos tem se evidenciado com maior potencial no controle de ixodídeos, especialmente pelo seu mecanismo de ação (Alves 1998).

O controle biológico em condições laboratoriais utilizando os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para o gênero *Amblyomma*, tem apresentado resultados satisfatórios, demonstrando grande potencial patogênico para várias espécies deste gênero de carrapatos, como por exemplo, *Amblyomma cooperi* (REIS et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004; LOPES et al., 2007), *Amblyomma parvum* (GARCIA et al., 2018) *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005).

Em virtude dos registros da literatura científica acerca de parâmetros como eficácia, baixo custo, diminuição de resíduos químicos nos alimentos e meio ambiente, preservação dos inimigos naturais e aumento da biodiversidade nos ecossistemas, assim como na segurança do homem e de outros organismos não-alvo, a utilização de fungos entomopatogênicos tem evidenciado vantagens em relação aos pesticidas químicos (ALVES, 1998).

Por estas razões e a partir dos resultados apresentados no capítulo anterior, delineou-se o presente teste para avaliação de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* num estudo de longa duração.

O presente estudo teve por objetivo utilizar os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (IBCB 66) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) a campo, visando implementar medidas de manejo já adotadas pelo Campus da Universidade de São Paulo - Pirassununga, podendo ser uma importante ferramenta que forneça subsídios para o sucesso do controle integrado de carrapatos no campo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O trabalho foi realizado no Campus da Universidade de São Paulo (figura 1), localizada no município de Pirassununga (21° 57' 11.3" Sul, 47° 27' 07.2" Oeste), estado de São Paulo, no período de novembro de 2017 a novembro de 2018, a propriedade se caracteriza pela presença de rebanhos de bovinos de corte e leite, suínos, equinos, caprinos, ovinos, búfalos, coelhos, peixes, reservas florestais e ecológicas, vida silvestre, represas e a presença de seres humanos como funcionários e estudantes.

5.2.2 AVALIAÇÃO DE INFESTAÇÃO

Foi feita vistoria do local e logo depois, foram colocadas armadilhas atrativas em diferentes piquetes para verificar a possibilidade de níveis de infestações, determinando quais piquetes seriam usados para aplicação do controle integrado juntamente com o controle biológico com avaliação mensal no período de um ano. Optou-se por não interromper a rotina do Campus.

5.2.3 PALESTRA DE CAPACITAÇÃO

Foi apresentada uma palestra aos funcionários e estagiários, capacitando-os quanto às diversidades de carrapatos existentes na propriedade, à biologia, ecologia, controle dos mesmos e sobre a Febre Maculosa Brasileira (Figura 1).

Figura 1 – Palestra de capacitação de funcionários e estagiários - Campus Pirassununga – SP.



Fonte: ANJO, K. A., 2018.

5.2.4 COLETA DE CARRAPATOS

Para a coleta de carrapatos foram utilizadas armadilhas em cortes retangulares de pano sintético branco, à base de polipropileno e viscose, popularmente conhecido como “tnt”, com aproximadamente $0,7 \text{ m}^2$ de área cada. No centro dos panos colocou-se cerca de 100g de gelo seco para que o CO_2 liberado durante a sublimação atraísse os carrapatos (GRAY, 1985). Foram utilizadas 18 armadilhas para cada piquete de um hectare (Figura 2).

Figura 2 – Armadilhas no piquete - Campus Pirassununga – SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

5.2.5 APLICAÇÃO DOS FUNGOS *B. bassiana* E *M. anisopliae*

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram cedidos pela empresa Toyobo do Brasil Ltda. Para as áreas que receberam tratamento, foram preparadas suspensões utilizando 100g de conídios puros de *B. bassiana* e 200g de conídios puros de *M. anisopliae*, calculados para proporcionar uma dosagem de 2×10^{13} conídios por ha. Para preparação de uma carga de 300 L no pulverizador de barras (Figura 3) foi feita a mistura de emulsificante alimentício à base de mono e diglicerídios de ácidos graxos (Emustab, Selecta) aos conídios puros, sendo necessários 200g de emulsificante para *B. bassiana* e 300g para o *M. anisopliae*. A área testemunha recebeu apenas água. Tanto a aplicação dos fungos como a aplicação de água (controle) foi efetuada a partir das 16h00.

Figura 3 – Aplicação dos fungos entomopatogênicos por pulverizador de barras - Campus Pirassununga – SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2018.

5.2.6 MONITORAMENTO

O monitoramento das áreas experimentais em Pirassununga – SP foi realizado a cada 30 dias, no período de novembro de 2017 a novembro de 2018. Seguindo as mesmas bases metodológicas, as armadilhas de CO₂ são colocadas nos piquetes e recolhidas após 40 minutos aproximadamente, sendo acondicionadas em sacos plásticos corretamente identificados e imediatamente lacrados. As armadilhas são levadas para o laboratório para a contagem diferencial dos carrapatos e, logo após, os parasitos adultos, larvas e ninfas são separados e colocados em tubos de ensaio rotulados, tampados com algodão umedecido e levados à estufa tipo B.O.D à temperatura de 28°C e 80 % de umidade. A mortalidade dos indivíduos capturados foi avaliada nos dias 1 (avaliação 1), 3 (avaliação 2) e 10 (avaliação 3).

5.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados utilizou-se o software livre R (R, 2019).

Calculou-se a distribuição da proporção de mortalidade mensal dos indivíduos (adultos, ninfas e larvas) considerando tratamento, ultima avaliação, precipitação acumulada, temperatura e taxa de mortalidade diária. A partir destes dados foram construídos gráficos de perfil com a proporção de mortalidade mensal dos indivíduos na segunda e terceira avaliação.

Foram construídos gráficos de dispersão com curva de tendência da taxa de mortalidade por dia referentes aos indivíduos, adultos, ninfas e larvas, segundo os dias decorridos entre a aplicação do tratamento e a última avaliação.

Foram obtidos gráficos de perfil a partir das informações de dados meteorológicos do site (<http://www.agrariasusp.com.br/agrariasusp01/estacao.html>), contendo precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento.

Foi feita a soma absoluta dos resultados de todas as colheitas com porcentagem de vivos e mortos na primeira, segunda e terceira avaliação das parcelas tratadas e controle de adultos, ninfas e larvas respectivamente. Os dados também foram submetidos ao teste exato de Fisher para adultos e larvas e submetidos ao teste Qui-quadrado de Pearson para ninfas.

As matrizes de dispersão não foram construídas com as somas de todas as colheitas, estas matrizes correspondem as coletas mensais onde foi possível obter proporção de

mortalidade, o número de pontos corresponde ao número de colheitas nos meses do experimento.

Utilizou-se um modelo linear generalizado de Poisson com função de ligação logarítmica para avaliar o efeito do tratamento, da precipitação e da temperatura na quantidade de indivíduos mortos.

Foram testados diferentes modelos considerando o tempo percorrido desde a aplicação dos tratamentos até a terceira avaliação como “offset” e o tratamento como variáveis “dummy” ou não. Assim, quatro modelos foram testados para adultos, ninfas e larvas.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo utilizou-se o deviance e o critério de informação de Akaike (AIC), e por fim, foi escolhido o melhor levando em consideração estes critérios, além dos erros padrão das estimativas dos coeficientes dos modelos testados.

5.3 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão os dados referentes ao total de carrapatos capturados em armadilhas de CO₂, nas áreas demarcadas para experimento, nas visitas realizadas no período de novembro de 2017 a novembro de 2018. Coletou-se um total de 1243 carrapatos em vida livre, todos do gênero *Amblyomma*. Dos carrapatos coletados, 103 eram larvas, seguidas por 1097 ninfas e 43 adultos. Dos adultos coletados, todos foram identificados como *Amblyomma sculptum*.

Tabela 1 – Número de carrapatos e espécies encontradas em vida livre nas áreas demarcadas para experimento com aplicação de fungos entomopatogênicos, no período de novembro de 2017 a novembro de 2018.

| Espécie de carrapato | Larva | Ninfa | Adultos | Total |
|-----------------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
| <i>Amblyomma</i> spp | 103 | | | 103 |
| <i>Amblyomma sculptum</i> | | 1097 | 43 | 1140 |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A distribuição da proporção de mortalidade mensal dos indivíduos (adultos, ninfas e larvas) considerando tratamento, última avaliação, precipitação acumulada, temperatura e taxa de mortalidade diária são observados nas tabelas 2, 3 e 4.

Em relação aos carrapatos adultos capturados pode-se observar que o controle se manteve sem mortalidade, enquanto que para os tratamentos com *B. bassiana* e *M. anisopliae* os indivíduos em sua maioria tiveram 100% de mortalidade ao terceiro dia de avaliação, com exceção do mês de abril para o tratamento com *B. bassiana* que os dois indivíduos capturados permaneceram vivos, mês que ocorreu declínio na precipitação acumulada (mm).

Nos resultados obtidos com as ninfas note-se que no controle teve mortalidade pouco expressiva no mês de junho. No tratamento com *B. bassiana* nos meses de abril e maio ocorreu mortalidade de 25,3% e 30,7% respectivamente, enquanto que no mês de junho obteve-se uma mortalidade de 98,3%. Enquanto que no tratamento com *M. anisopliae* nos meses de abril e

maio ocorreu mortalidade de 18,7% e 40,5% respectivamente, porém no mês de junho o resultado de mortalidade foi de 92,3%.

Nos resultados das larvas pode se observar que o controle se manteve sem mortalidade. No tratamento com *B. bassiana* no mês de abril, teve mortalidade de 44,4%, enquanto que para o tratamento com *M. anisopliae* ocorreu mortalidade de 100% no mesmo mês.

Podemos observar que para adultos o maior número de captura de carrapatos aconteceu no mês de setembro de 2018, enquanto que para as ninfas ocorreu nos meses de abril, maio e junho e para as larvas ocorreu do mês de maio.

Apesar da precipitação acumulada (mm) ser menor nos meses de abril a agosto de 2018, meses caracterizados como períodos de seca, para adultos e ninfas ocorreu mortalidade de 100% no mês de julho e acima de 92,3% no mês de junho respectivamente para os dois fungos entomopatogênicos, este fato é justificável pois a umidade relativa pontual anotado nos dias da aplicação dos fungos eram acima de 50%, o que pode ter favorecido a sobrevivência e infecção dos fungos nos carrapatos.

Tabela 2 – Resultados da distribuição da mortalidade de adultos. Col. corresponde à colheita, Prec. corresponde à precipitação média do mês em milímetros, Tem. corresponde à temperatura média do mês em °C. Dias* corresponde ao número de dias percorridos entre aplicação do tratamento e terceira avaliação, são a base para o cálculo da taxa de mortalidade diária

| Col. | Mês | Prec. | Tem. | Dias * | Controle | | | <i>Beauveria</i> | | | <i>Metarhizium</i> | | | | | |
|------|--------|-------|------|--------|----------|--------|-----|------------------|----|--------|--------------------|------|---|--------|-------|------|
| | | | | | N | Mortos | % | Taxa | N | Mortos | % | Taxa | N | Mortos | % | Taxa |
| 1 | Out/17 | 115 | 21,4 | 38 | 6 | 0 | 0,0 | 0,00 | 3 | 3 | 100,0 | 0,08 | 0 | - | - | - |
| 2 | Nov/17 | 141 | 22,2 | 42 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 3 | Jan/18 | 230 | 23,1 | 37 | 0 | - | - | - | 4 | 4 | 100,0 | 0,11 | 3 | 3 | 100,0 | 0,08 |
| 4 | Fev/18 | 198 | 23,1 | 43 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 100,0 | 0,02 | 0 | - | - | - |
| 5 | Mar/18 | 144 | 22,7 | 45 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 100,0 | 0,02 | 0 | - | - | - |
| 6 | Abr/18 | 48 | 21 | 43 | 2 | 0 | 0,0 | 0,00 | 2 | 0 | 0,0 | 0,00 | 0 | - | - | - |
| 7 | Mai/18 | 41 | 18,6 | 47 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 8 | Jun/18 | 30 | 17,1 | 29 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 100,0 | 0,03 | 0 | - | - | - |
| 9 | Jul/18 | 19 | 16,9 | 72 | 2 | 0 | 0,0 | 0,00 | 10 | 10 | 100,0 | 0,14 | 2 | 2 | 100,0 | 0,03 |
| 10 | Ago/18 | 48 | 20,2 | 50 | 1 | 0 | 0,0 | 0,00 | 1 | 1 | 100,0 | 0,02 | 5 | 5 | 100,0 | 0,10 |
| 11 | Set/18 | 115 | 21,4 | 25 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 100,0 | 0,04 | 0 | - | - | - |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 3 – Resultados da distribuição da mortalidade de ninfas. Col. corresponde à colheita, Prec. corresponde à precipitação média do mês em milímetros, Tem. corresponde à temperatura média do mês em °C. Dias* corresponde ao número de dias percorridos entre aplicação do tratamento e terceira avaliação, são a base para o cálculo da taxa de mortalidade diária.

| Col. | Mês | Prec. | Tem. | Dias * | Controle | | | <i>Beauveria</i> | | | <i>Metarhizium</i> | | | | | |
|------|--------|-------|------|--------|----------|--------|-----|------------------|-----|--------|--------------------|------|-----|--------|-------|------|
| | | | | | N | Mortos | % | Taxa | N | Mortos | % | Taxa | N | Mortos | % | Taxa |
| 1 | Out/17 | 115 | 21,4 | 38 | 1 | 0 | 0,0 | 0,00 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 2 | Nov/17 | 141 | 22,2 | 42 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 3 | Jan/18 | 230 | 23,1 | 37 | 2 | 0 | 0,0 | 0,00 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 4 | Fev/18 | 198 | 23,1 | 43 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 5 | Mar/18 | 144 | 22,7 | 45 | 5 | 0 | 0,0 | 0,00 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 6 | Abr/18 | 48 | 21 | 43 | 36 | 0 | 0,0 | 0,00 | 146 | 37 | 25,3 | 0,86 | 187 | 35 | 18,7 | 0,81 |
| 7 | Mai/18 | 41 | 18,6 | 47 | 4 | 0 | 0,0 | 0,00 | 101 | 31 | 30,7 | 0,66 | 74 | 30 | 40,5 | 0,64 |
| 8 | Jun/18 | 30 | 17,1 | 29 | 125 | 11 | 8,8 | 0,38 | 175 | 172 | 98,3 | 5,93 | 233 | 215 | 92,3 | 7,41 |
| 9 | Jul/18 | 19 | 16,9 | 72 | 3 | 0 | 0,0 | 0,00 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 100,0 | 0,01 |
| 10 | Ago/18 | 48 | 20,2 | 50 | 3 | 0 | 0,0 | 0,00 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 100,0 | 0,02 |
| 11 | Set/18 | 115 | 21,4 | 25 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

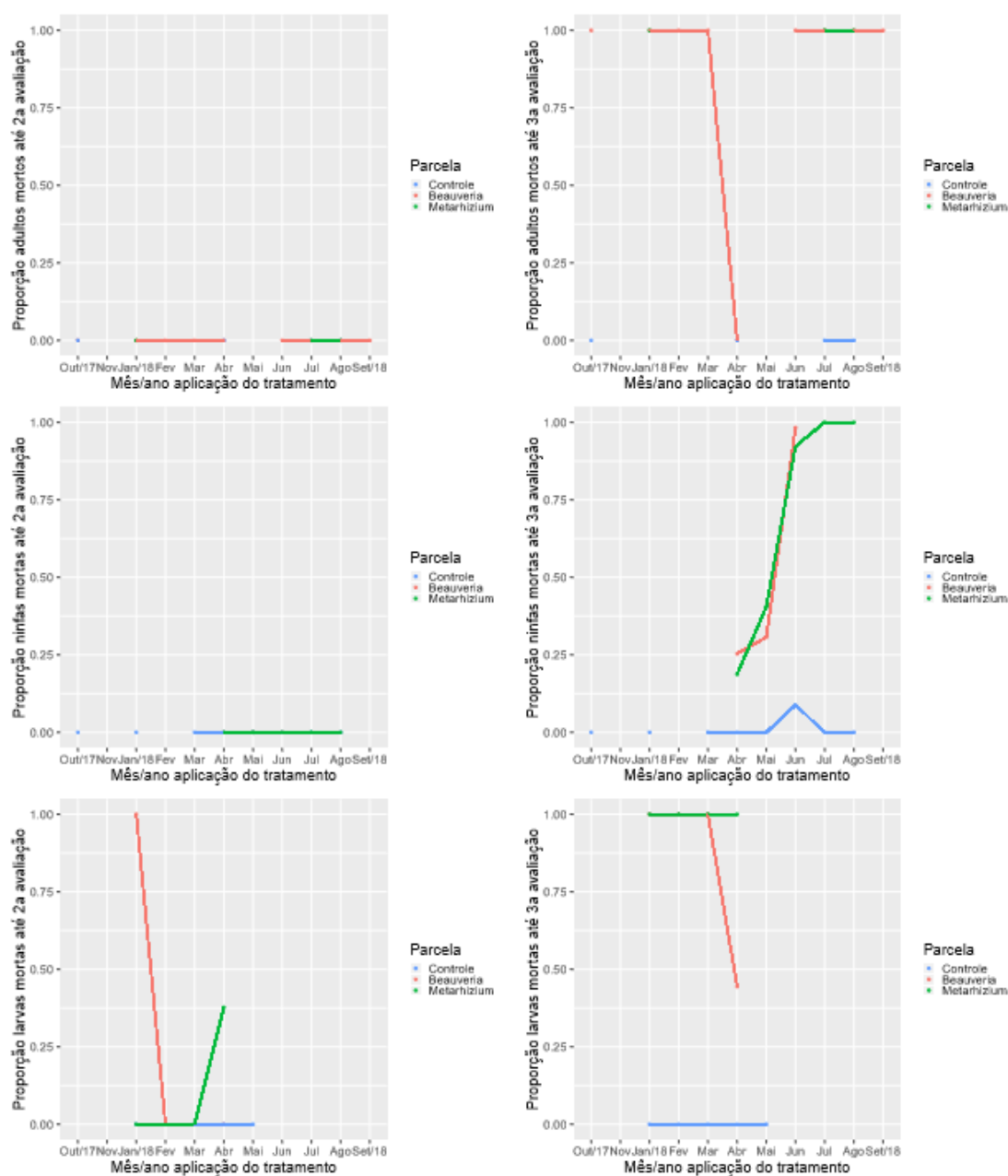
Tabela 4 – Resultados da distribuição da mortalidade de larvas. Col. corresponde à colheita, Prec. corresponde à precipitação média do mês em milímetros, Tem. corresponde à temperatura média do mês em °C. Dias* corresponde ao número de dias percorridos entre aplicação do tratamento e terceira avaliação, são a base para o cálculo da taxa de mortalidade diária

| Col. | Mês | Prec. | Tem. | Dias * | Controle | | | <i>Beauveria</i> | | | <i>Metarhizium</i> | | | | | |
|------|--------|-------|------|--------|----------|--------|-----|------------------|----|--------|--------------------|------|----|--------|-------|------|
| | | | | | N | Mortos | % | Taxa | N | Mortos | % | Taxa | N | Mortos | % | Taxa |
| 1 | Out/17 | 115 | 21,4 | 38 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 2 | Nov/17 | 141 | 22,2 | 42 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 3 | Jan/18 | 230 | 23,1 | 37 | 2 | 0 | 0,0 | 0,00 | 1 | 1 | 100,0 | 0,03 | 3 | 3 | 100,0 | 0,08 |
| 4 | Fev/18 | 198 | 23,1 | 43 | 1 | 0 | 0,0 | 0,00 | 4 | 4 | 100,0 | 0,09 | 1 | 1 | 100,0 | 0,02 |
| 5 | Mar/18 | 144 | 22,7 | 45 | 1 | 0 | 0,0 | 0,00 | 4 | 4 | 100,0 | 0,09 | 1 | 1 | 100,0 | 0,02 |
| 6 | Abr/18 | 48 | 21 | 43 | 1 | 0 | 0,0 | 0,00 | 18 | 8 | 44,4 | 0,19 | 61 | 61 | 100,0 | 1,42 |
| 7 | Mai/18 | 41 | 18,6 | 47 | 5 | 0 | 0,0 | 0,00 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 8 | Jun/18 | 30 | 17,1 | 29 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 9 | Jul/18 | 19 | 16,9 | 72 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 10 | Ago/18 | 48 | 20,2 | 50 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |
| 11 | Set/18 | 115 | 21,4 | 25 | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - | 0 | - | - | - |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A partir dos dados acima foram construídos gráficos de perfil com a proporção de mortalidade mensal de indivíduos, adultos, ninfas e larvas na segunda e terceira avaliação (Figura 4). Pode se observar que na segunda avaliação a mortalidade foi pouco expressiva para ambos os fungos. No entanto, na terceira avaliação há uma maior mortalidade em todas as fases do carrapato nas parcelas tratada.

Figura 4 – Perfil da proporção de indivíduos mortos (adultos, ninfas e larvas) por mês na segunda e terceira avaliação.



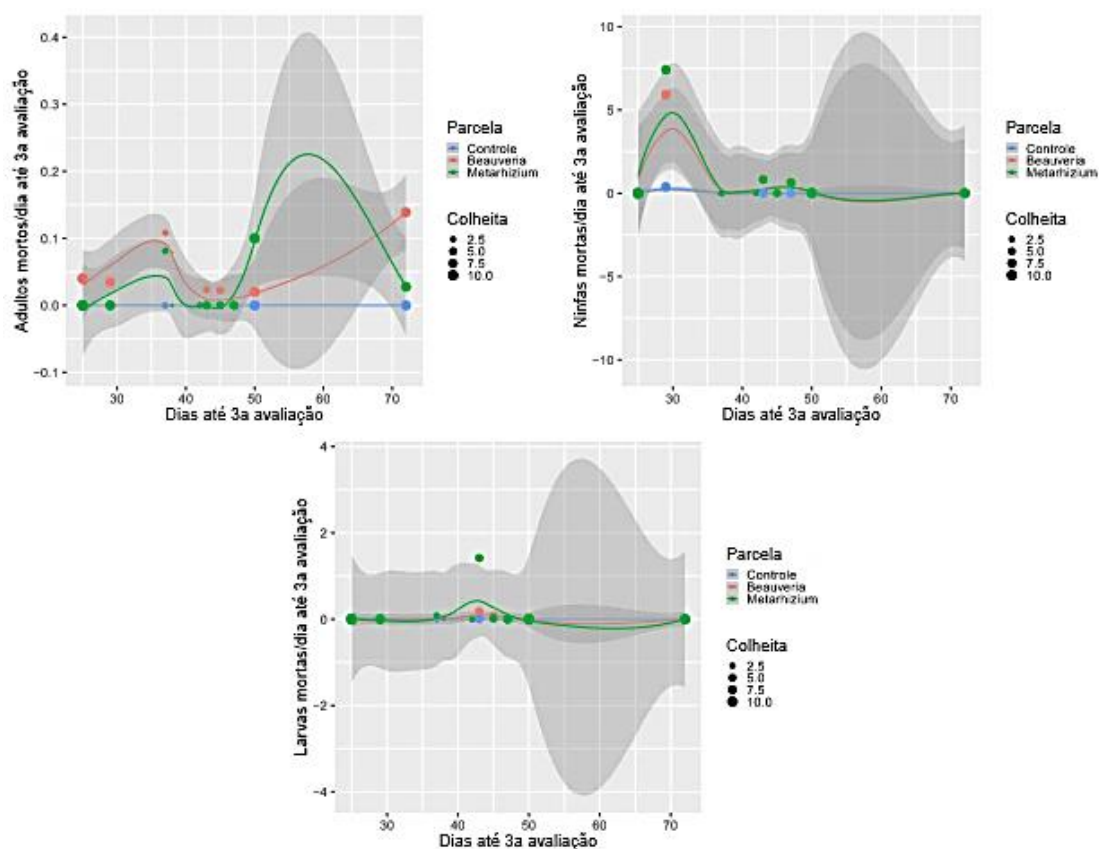
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

As representações gráficas dos dados de dispersão com curva de tendência da taxa de mortalidade por dia referentes aos indivíduos, adultos, ninfas e larvas, segundo os dias decorridos entre a aplicação do tratamento e a última avaliação estão apresentados na figura 5.

Pode se observar que os gráficos de adultos e larvas foram inconclusivos devido ao número de carrapatos capturados serem baixos. Isto é justificável por que se optou por não interromper a rotina do campus, onde os funcionários já realizavam uma medida de controle do *Amblyomma sculptum* com aplicações de carrapaticidas nos cavalos.

Em relação as ninfas note-se o pico de mortalidade ao redor de 30 dias decorridos da aplicação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* até a ultima avaliação.

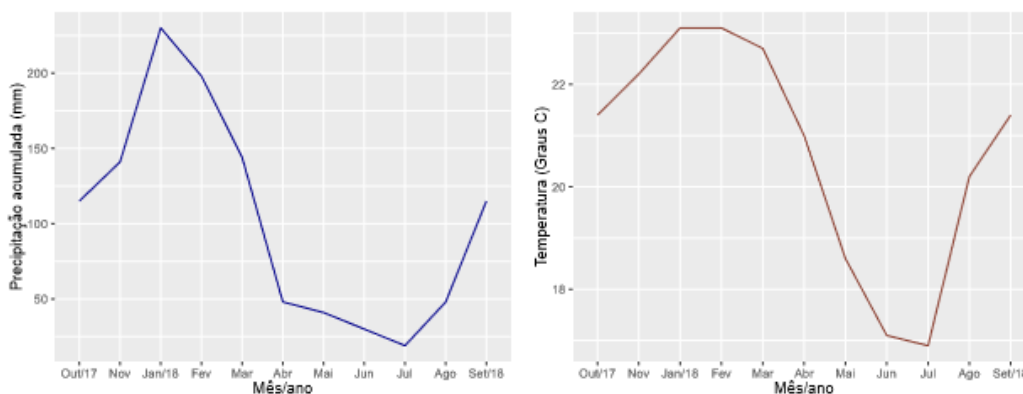
Figura 5 – Dispersão com curva de tendência da taxa de mortalidade por dia referentes aos indivíduos, adultos, ninfas e larvas, segundo os dias decorridos entre a aplicação do tratamento e a última avaliação.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

São demonstrados na figura 6, gráficos de linha construídos a partir das informações de dados meteorológicos obtidos do site (<http://www.agrariasusp.com.br/agrariasusp01/estacao.html>), contendo precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento.

Figura 6 – Precipitação acumulada (mm) e temperatura (°C) registradas durante o ano de experimento.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Foi feita a soma absoluta dos resultados de todas as colheitas com porcentagem de vivos e mortos na primeira, segunda e terceira avaliação das parcelas tratadas e controle de adultos, ninfas e larvas respectivamente. Os dados também foram submetidos ao teste exato de Fisher para adultos e larvas e submetidos ao teste Qui-quadrado de Pearson para ninfas (Tabelas 5, 6 e 7).

Ao comparar os tratamentos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi observada diferença entre eles de aproximadamente de 9% para mortalidade de adultos segundo teste exato de Fisher. Para ninfas segundo teste χ^2 de Pearson não houve diferença no percentual de mortalidade para ambos os fungos. No entanto, para larvas foi notado que houve diferença de mortalidade para *B. bassiana* e *M. anisopliae* com valores de 63,0% e 100% respectivamente segundo teste exato de Fisher.

Para o controle note-se que a máxima expressão de mortalidade foi de 6,1% para ninfas.

Note-se que para os tratamentos com os fungos entomopatogênicos o fungo *M. anisoplie* evidenciou-se ser mais eficaz para adultos e larvas.

Tabela 5 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de adultos na primeira, segunda e terceira avaliação.

| Parcela | Mortos * | | | Mortos (%) | Resumo total | | Valor p ** |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|--------------|-----------|------------|
| | 1 ^a A. | 2 ^a A. | 3 ^a A. | | Vivos (%) | Coletados | |
| Controle | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0) | 11 (100,0) | 11 | |
| <i>Beauveria</i> | 0 | 0 | 22 | 22 (91,7) | 2 (8,3) | 24 | 1,000 |
| <i>Metarhizium</i> | 0 | 0 | 10 | 10 (100,0) | 0 (0,0) | 10 | |
| Total | 0 | 0 | 32 | 32 (71,1) | 13 (28,9) | 45 | |

* Número de mortos na primeira (1a A.), segunda (2aA.) e terceira (3a A.) avaliação.

** Teste exato de Fisher.

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 6 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de ninfas na primeira, segunda e terceira avaliação.

| Parcela | Mortos * | | | Mortos (%) | Resumo total | | Valor p ** |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|--------------|-----------|------------|
| | 1 ^a A. | 2 ^a A. | 3 ^a A. | | Vivos (%) | Coletados | |
| Controle | 0 | 0 | 11 | 11 (6,1) | 168 (93,9) | 179 | |
| <i>Beauveria</i> | 0 | 0 | 240 | 240 (56,9) | 182 (43,1) | 422 | 0,996 |
| <i>Metarhizium</i> | 0 | 0 | 282 | 282 (56,9) | 214 (43,1) | 496 | |
| Total | 0 | 0 | 533 | 533 (48,6) | 564 (51,4) | 1097 | |

* Números de mortos na primeira (1a A.), segunda (2aA.) e terceira (3a A.) avaliação.

** Teste Qui-quadrado de Pearson.

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 7 – Distribuição da porcentagem de mortalidade de parcelas tratadas e controle de larvas na primeira, segunda e terceira avaliação.

| Parcela | Mortos * | | | Mortos (%) | Resumo total | | Valor p ** |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|--------------|-----------|------------|
| | 1 ^a A. | 2 ^a A. | 3 ^a A. | | Vivos (%) | Coletados | |
| Controle | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0) | 10 (100,0) | 10 | |
| <i>Beauveria</i> | 0 | 1 | 16 | 17 (63,0) | 10 (37,0) | 27 | < 0,001 |
| <i>Metarhizium</i> | 0 | 23 | 43 | 66 (100,0) | 0 (0,0) | 66 | |
| Total | 0 | 24 | 59 | 83 (80,6) | 20 (19,4) | 103 | |

* Números de mortos na primeira (1a A.), segunda (2aA.) e terceira (3a A.) avaliação.

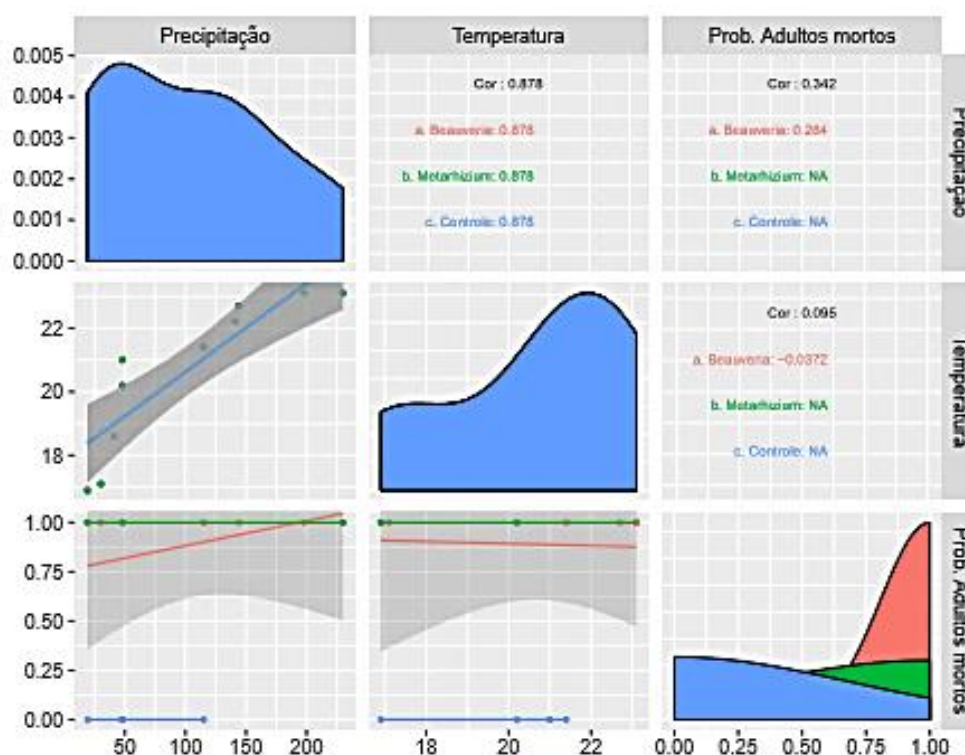
** Teste exato de Fisher.

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A partir das informações acima, foram construídas matrizes com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de adultos, ninfas e larvas mortos por influencia da precipitação e temperatura (Figura 7, 8 e 9).

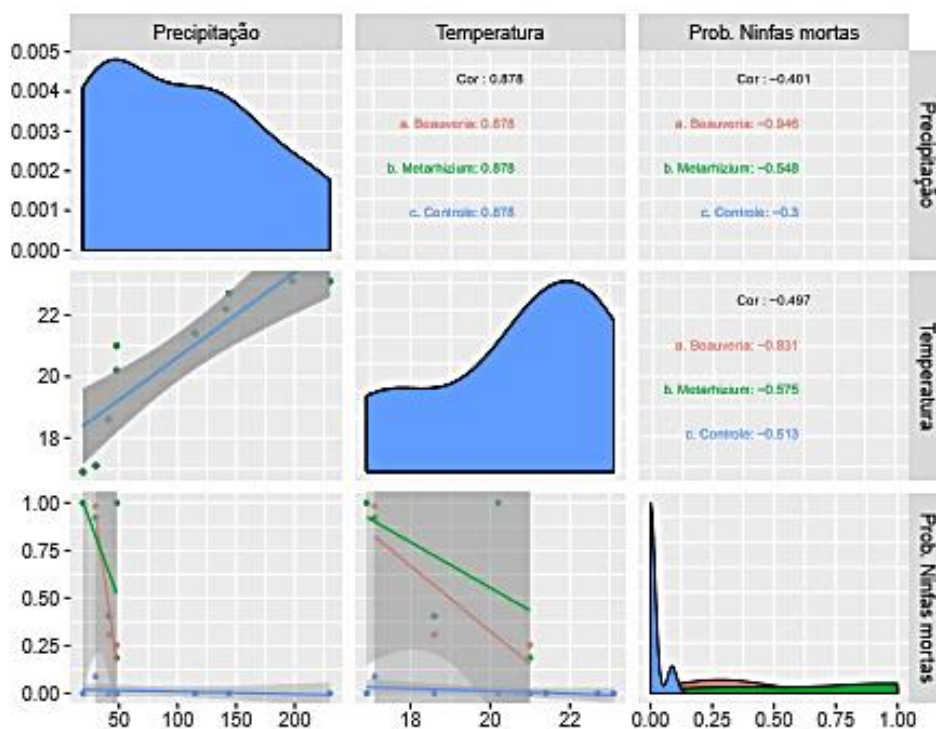
Segundo o painel inferior das matrizes de dispersão observa-se para todas as etapas dos carrapatos (adultos, ninfas e larvas) uma associação linear positiva entre a proporção de indivíduos mortos com a precipitação e a temperatura, principalmente para os tratados com o fungo.

Figura 7 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de adultos mortos por precipitação e temperatura.



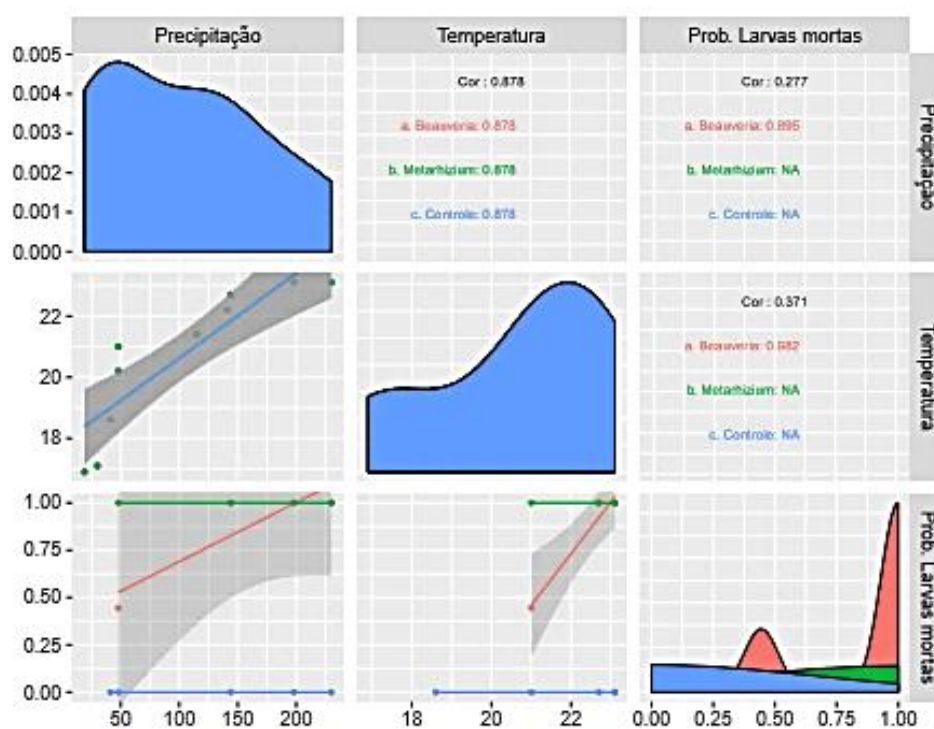
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 8 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de ninfas mortas por precipitação e temperatura.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 9 – Matriz com gráficos de dispersão e coeficientes de correlação da proporção de larvas mortas por precipitação e temperatura.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

A seguir são demonstrados o modelo linear generalizado de Poisson com função de ligação logarítmica para avaliar o efeito do tratamento, da precipitação e da temperatura na quantidade de indivíduos mortos.

Quatro modelos foram testados para adultos, ninfas e larvas, considerando o tempo percorrido desde a aplicação dos tratamentos até a terceira avaliação como “offset” e o tratamento como variáveis “dummy” ou não.

Uma medida para avaliar a qualidade do ajuste é o deviance, quanto menor o valor, melhor o ajuste. O critério AIC também é frequentemente usado, sendo o melhor modelo aquele com menor AIC. Os resultados apresentados nas tabelas 8, 9 e 10, correspondem aos melhores ajustes, levando em consideração o deviance, o AIC e os erros padrão das estimativas dos parâmetros do modelo.

O melhor modelo para adultos (tabela 8) considerou a variável tratamento de forma global e com offset, ou seja, levou em conta o tempo de aplicação do tratamento. Segundo o ajuste, apenas tratamento ($p = 0,034$) e temperatura ($p = 0,013$) mostraram efeito significativo quanto ao número esperado de adultos mortos.

O melhor modelo para as ninfas (tabela 9) não inclui o offset, mas ao contrário dos adultos, o tratamento foi considerado como variável “dummy” e, tendo como referência o controle, houve significância tanto para *B. bassiana* ($p < 0,001$) como para o *M. anisopliae* ($p < 0,001$). Além disso, a precipitação ($p < 0,001$) e a interação da precipitação com a temperatura ($p < 0,001$) também foram significativas no que diz respeito ao número esperado de ninfas mortas na terceira avaliação.

Por fim, em relação às larvas (tabela 10), o melhor ajuste foi sem “offset” e considerando o tratamento de forma global. Neste caso, com exceção do intercepto, todas as variáveis no modelo foram igualmente significativas no efeito esperado de larvas mortas até o final da terceira avaliação ($p < 0,001$). O valor de p para o intercepto foi ($p < 0,007$).

Tabela 8 – Ajuste do modelo Poisson ao número de adultos mortos até a terceira avaliação

| Parâmetros | Estimativa | Erro padrão | Valor p |
|-------------------------------|------------|-------------|---------|
| Intercepto | 4,221 | 3,158 | 0,181 |
| Tratamento | 0,487 | 0,229 | 0,034 |
| Precipitação | -0,102 | 0,108 | 0,345 |
| Temperatura | -0,472 | 0,191 | 0,013 |
| Precipita.: Tempera. | 0,005 | 0,004 | 0,277 |
| Deviance: 65,888. AIC: 105,39 | | | |

Tabela 9 – Ajuste do modelo Poisson ao número de ninfas mortas até a terceira avaliação

| Parâmetros | Estimativa | Erro padrão | Valor p |
|--------------------------------|------------|-------------|---------|
| Intercepto | -5,601 | 1,947 | 0,004 |
| Tratam. (<i>Beauveria</i>) | 3,083 | 0,308 | < 0,001 |
| Tratam. (<i>Metarhizium</i>) | 3,244 | 0,307 | < 0,001 |
| Precipitação | 0,703 | 0,051 | < 0,001 |
| Temperatura | 0,207 | 0,112 | 0,064 |
| Precipita.: Tempera. | -0,034 | 0,003 | < 0,001 |
| Deviance: 525,93. AIC 581,75 | | | |

Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Tabela 10 – Ajuste do modelo Poisson ao número de larvas mortas até a terceira avaliação

| Parâmetros | Estimativa | Erro padrão | Valor p |
|-------------------------------|------------|-------------|---------|
| Intercepto | -23,199 | 8,654 | 0,007 |
| Tratamento | 1,701 | 0,235 | < 0,001 |
| Precipitação | -1,789 | 0,374 | < 0,001 |
| Temperatura | 1,602 | 0,414 | < 0,001 |
| Precipita.: Tempera. | 0,074 | 0,004 | < 0,001 |
| Deviance: 40,316. AIC: 75,729 | | | |

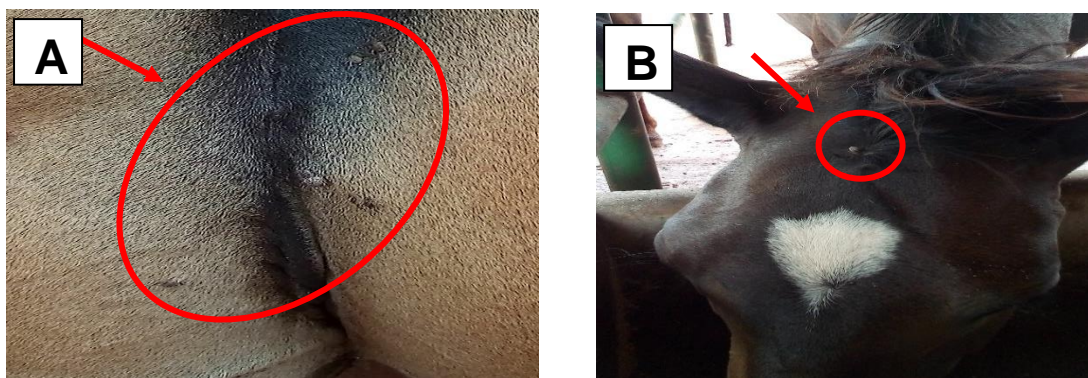
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

5.3.1 ANIMAIS ENCONTRADOS NA PROPRIEDADE

Os animais domésticos presentes na área de experimento incluíam gatos e equinos. A fauna silvestre era representada pelas capivaras, teiús, tatus e por diversas espécies aviárias.

Observou-se que os equinos estavam infestados por *A. sculptum* (Figura 10 A e B), porém nos foi informado que estes animais estavam sendo tratados com carrapaticida, no período de abril a julho com banhos semanais, optou-se por não interromper a rotina do local. Nos demais animais não se fez investigação quanto à infestação por carrapatos.

Figura 10 – Equinos infestados por *Amblyomma sculptum*, A e B – Campus Pirassununga - SP



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Determinação de locais para aplicação de fungos entomopatogênicos e monitoramento com captura de carrapatos.

Após investigação de infestações através de armadilhas atrativas, foram selecionados três piquetes de 10.000 metros quadrados (que correspondia um para cada parcela de tratamento e controle).

O piquete separado para aplicação do fungo *B. bassiana* foi separado dos demais por cerca de arame farpado, córrego de água e por aproximadamente três metros de terra.

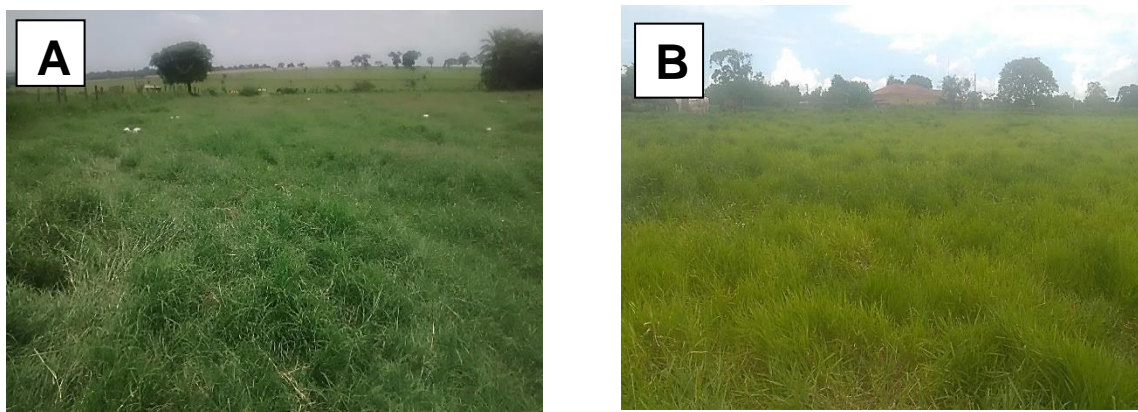
Os piquetes separados para aplicação do fungo *M. anisopliae* e controle foram separados entre si por uma cerca de arame farpado.

Optou-se por distribuir as armadilhas com aproximadamente quatro metros de distância das laterais das cercas em todos os piquetes. As 18 armadilhas foram separadas em três fileiras contendo 6 armadilhas e a distância de cada uma delas entre si foi de dez metros cada. A avaliação foi feita com coletas mensais ao longo de todo experimento.

5.3.2 PASTAGENS E ANIMAIS

Os equinos já vinham sendo tratados com carrapaticida semanalmente, os pastos eram altos (figura 11, A e B) e não foi indicado roçamento porque os mesmos eram usados como fonte de alimentação para os equinos.

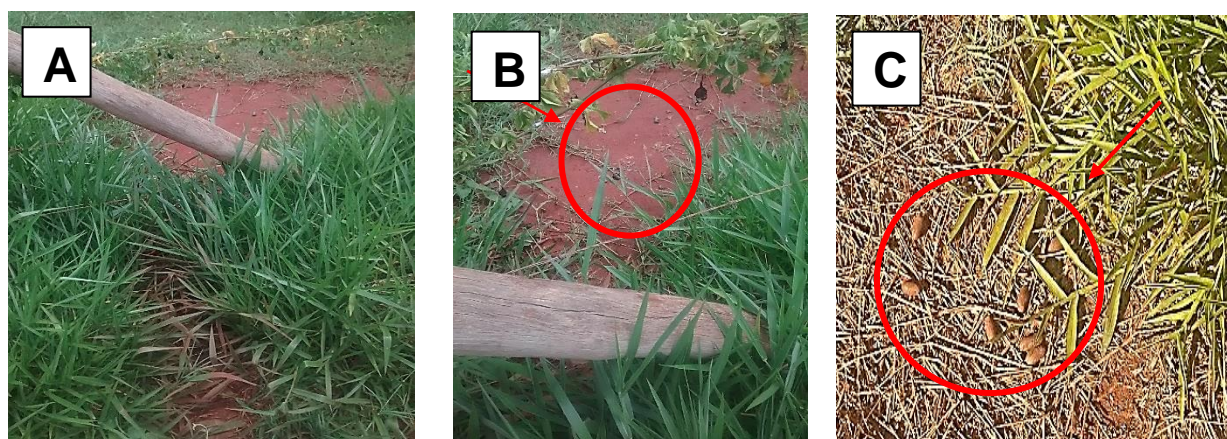
Figura 11 – Piquetes com pasto alto, usados como alimentação para os equinos, A e B – Campus Pirassununga - SP



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Nas visitas de monitoramento foi observado que as capivaras acessavam os piquetes, estando frequentemente em contato com os equinos (figura 12 A, B e C).

Figura 12 – Caminho aberto na cerca por capivaras, A; presença de fezes de capivaras dentro dos piquetes, A e B.– Campus Pirassununga - SP



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Foi indicado instalação de certa elétrica em torno dos piquetes para impossibilitar o contato das capivaras com os equinos com a intenção de mitigar a propagação de carrapatos, porém até o término do trabalho a cerca não tinha sido instalada.

Ao longo do experimento nos deparamos com algumas dificuldades como: predadores que por vezes se alimentavam com os carrapatos que estavam nas armadilhas (Figura 13 A e B) e também os equinos jovens que brincavam com as armadilhas, rasgando os panos e mordendo o recipiente onde era colocado o gelo seco e assim espalhando o mesmo (figura 14 A e B).

Figura 13 – Predadores se alimentando de carrapatos nas armadilhas, A e B – Campus Pirassununga – SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 14 – Equinos jovens brincando com as armadilhas – Campus Pirassununga – SP.



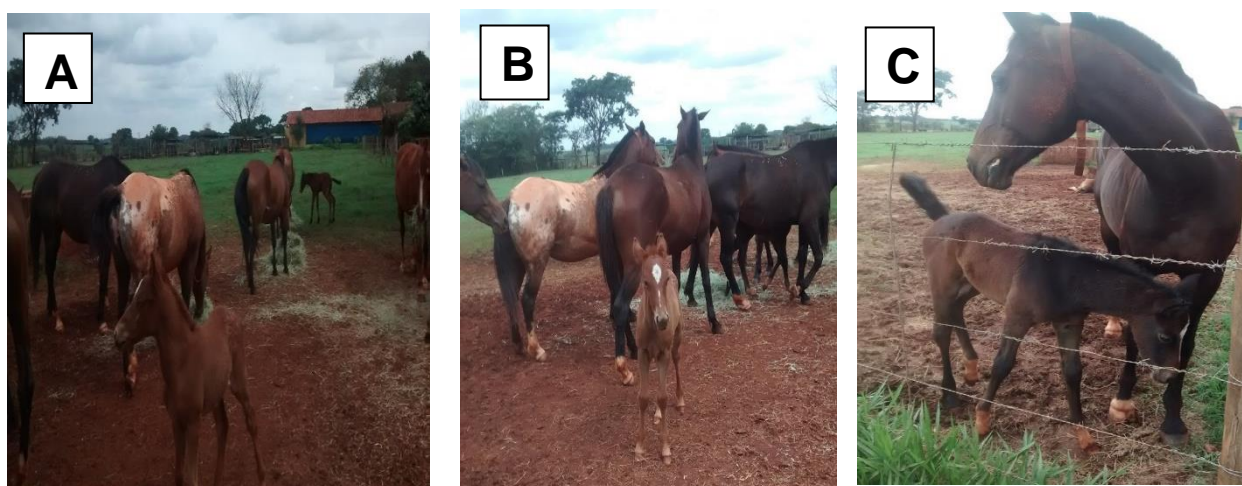
Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

No piquete que foi separado para aplicação do fungo *B. bassiana* ficavam as fêmeas prenhes ou que tinham acabado de dar cria (Figura 15 A, B e C), as mesmas não recebiam

tratamentos com carrapaticida devido as suas condições físicas (conforme foi informado por funcionários).

Apesar disso, foi observado através dos dados total de captura dos indivíduos (adultos, ninfas e larvas) que o maior número de indivíduos capturados foi no piquete separado para tratamento com o fungo *M. anisopliae*.

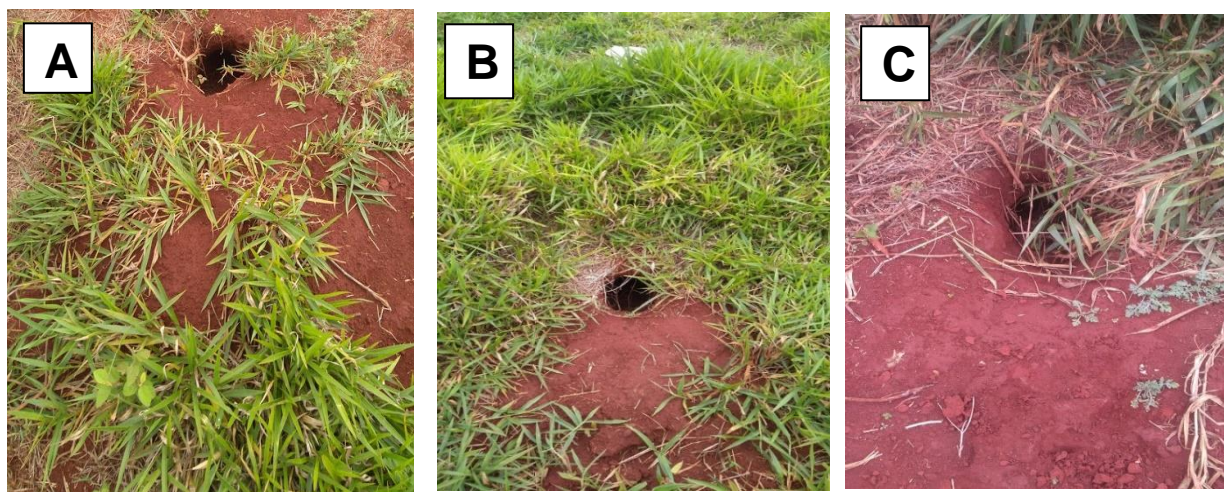
Figura 15 – Éguas prenhes e ou paridas, A, B e C – Campus Pirassununga – SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

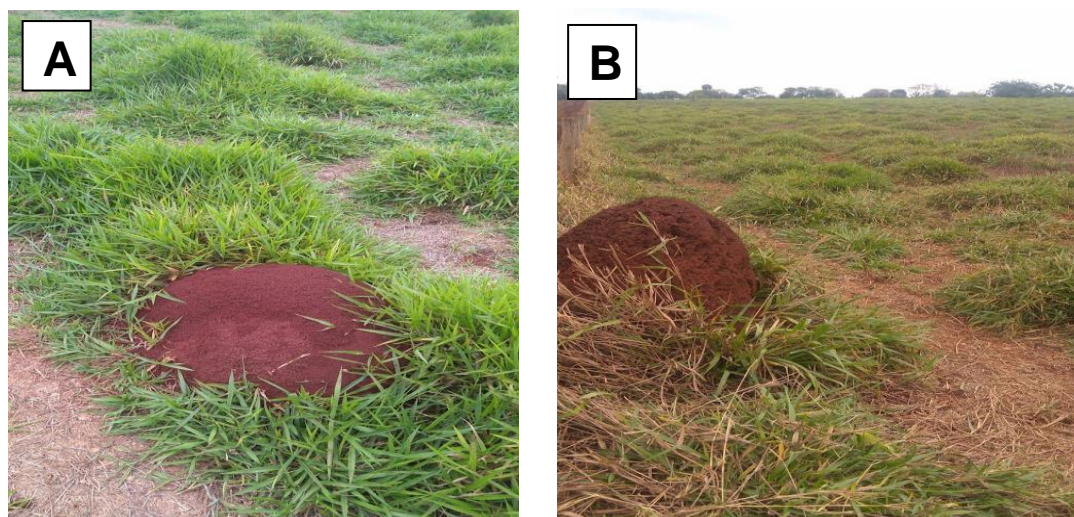
Quanto a fauna silvestre (Figura 16 A, B e C) e os inimigos naturais (Figura 17 A e B), mesmo após várias aplicações com os fungos entomopatogênicos, demonstraram-se preservados sem qualquer tipo de inibição de reprodução.

Figura 16 – Aberturas de tatus, 6 meses aproximadamente após ser feita a aplicação dos fungos entomopatôgenicos, piquete área *B. bassiana*, A; piquete área controle, B; piquete área *M. anisopliae*, C – Campus Pirassununga – SP.



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Figura 17 – Formação de formigueiros, 6 meses aproximadamente após ser feita a aplicação dos fungos entomopatôgenicos, nas áreas *B. bassiana*, A e área *M. anisopliae*, B – Campus Pirassununga – SP



Fonte: ARAÚJO, S. B., 2019.

Após aproximadamente trinta dias da aplicação do tratamento com os fungos entomopatogênicos a campo, em uma das colheitas foi recuperado ninfas de *Amblyomma*

sculptum que foram levadas para laboratório para avaliação *in vitro*, e ao findar o décimo dia de avaliação as mesmas se encontravam mortas e totalmente colonizadas com os fungos *B. bassiana* (Figura 18) e *M. anisopliae* (Figura 19). Devido ajuste de iluminação do microscópio utilizado para realização da foto com a ninfa colonizada com o fungo *M. anisopliae*, a mesma aparece um pouco esbranquiçada, porém sua cor original era verde.

Figura 18 – Ninfa recuperada do Campus Pirassununga – SP, observada após o décimo dia de avaliação *in vitro*, morta e colonizada com o fungo *B. bassiana*.



Fonte: SIQUEIRA, M. A., 2019.

Figura 19 – Ninfa recuperada do Campus Pirassununga – SP, observada após o décimo dia de avaliação, *in vitro*, morta e colonizada com o fungo *M. anisopliae*.



Fonte: SIQUEIRA, M. A., 2019.

5.4 DISCUSSÃO

A espécie predominante capturada nas colheitas no campus de Pirassununga, USP-SP foi a espécie *Amblyomma sculptum*, tais resultados corroboram com o que foi apresentado por Martins et al., (2016), os autores descreveram que no Brasil, a espécie *Amblyomma sculptum* é a mais frequentemente encontrada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, parte das regiões Sul e Nordeste.

Optou-se por não interromper a rotina do Campus, os funcionários já estavam adotando a estratégia de banhos nos equinos de abril a julho proposta por LABRUNA et al., (2004), com exceção das éguas prenhes ou paridas que, em razão de suas condições físicas, não recebiam tratamento com carrapaticidas químicos. O piquete destinado a estas éguas foi justamente aquele alocado para o tratamento com o fungo *B. bassiana*.

A espécie *A. sculptum* tem como hospedeiros primários a anta, o cavalo, a capivara e os suínos (OSAVA et al., 2016), no entanto, em sua forma imatura, pode parasitar grande variedades de hospedeiros selvagens e domésticos (LABRUNA et al., 2005; RAMOS et al., 2016; SZABÓ et al., 2001).

LABRUNA et al. (2004) demonstraram que mesmo quando o controle de carrapatos é obtido com banhos estratégicos nos equinos de forma intensiva, condições favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos permitem sua perpetuação no ambiente, parte desta população poderia ser mantida alimentando-se em algumas espécies de animais silvestres, possibilitando o seu desenvolvimento, podendo assim nunca ser extinta da área.

Neste trabalho não foi possível adotar a medida de manejo de roçamento nos piquetes, pois os pastos serviam como alimentação para os equinos. Observou-se que as capivaras tinham acesso aos piquetes e contato direto com os equinos, isto corrobora com o que foi descrito pelos autores e é possível entender que a população de capivaras era responsável pela manutenção dos parasitos.

O controle microbiano pode ser usado como medida estratégica para controle de pragas por possuir fatores favoráveis como: alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, não causam toxicidade aos mamíferos, diminuição de aparecimento de resistência, capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente (ALVES, 1998; PERINOTTO, 2010). No entanto, é de grande importância que haja um banco de isolados conservados adequadamente e com variabilidade genética comprovada.

Os isolados da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico já foram comprovados frente a diversas pragas de interesse agrícola e veterinário quanto a variabilidade genética, virulência e patogenicidade (ALMEIDA et al., 1997; TAMAI et al., 2002; BARCI et al., 2009).

O isolado utilizado no presente estudo do fungo *B. bassiana* (IBCB 66) já foi testado em testes *in vitro* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por Barci et al., (2009), os autores demonstraram que esta cepa apresenta maior potencial para utilização a campo, tendo em vista o controle de *R. (B.) microplus*, tendo ainda característica de uma melhor produção massal.

Quanto ao isolado de *M. anisopliae* (IBCB 425) utilizado neste trabalho, esta mesma cepa já foi utilizada em testes *in vitro* pelos autores Garcia et al., (2018) contra *Amblyomma parvum*, em suspensão de $1,0 \times 10^9$ conídios/ml, obtendo-se 100% de mortalidade no 11º dia pós tratamento. Também se demonstrou mortalidade de 90% no 4º dia após infecção.

Em relação ao melhor dia de avaliação de mortalidade *in vitro* dos carrapatos capturados do campo após aplicação de tratamento com os fungos entomopatogênicos, este trabalho apontou o décimo dia de avaliação com os melhores resultados. Apesar deste trabalho pesquisar a aplicação dos fungos entomopatogênicos no campo e o dos autores acima efetuar o tratamento nos carrapatos *in vitro*, eles também obtiveram resultados parecidos no 11º dia de avaliação pós tratamento. Verificou-se, portanto, que os modelos utilizados resultam numa exposição diferente do parasito aos agentes de controle biológico. Garcia et al., (2018), e muitos outros autores previamente citados que executaram modelos *in vitro* optaram pela imersão dos carrapatos em suspensões de conídios, ao passo que nos estudos de campo, os conídios estão dispersos pela pastagem, dependendo da movimentação do parasito pela área para exercer seu efeito patogênico, além de estar sujeito às variações climáticas.

Em que pese a diferença dos presentes resultados em relação aqueles divulgados pelos autores Garcia et al., (2018), que obtiveram 90% de mortalidade no 4º dia após infecção em seu estudo *in vitro*, verificamos que, sob condições de campo, houve mortalidade pouca expressiva no terceiro dia de avaliação, sugerindo fortemente que a segunda avaliação não é necessária para fins de estudo da eficácia de fungos entomopatogênicos em experimentos de campo, minimizando desta forma as horas de trabalho necessárias para execução da pesquisa.

O controle biológico em condições laboratoriais usando os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* utilizando o gênero *Amblyomma* tem apresentado resultados satisfatórios, demonstrando patogenicidade para várias espécies de carrapatos, como *Amblyomma cooperi* (REIS et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004; LOPES

et al., 2007), *Amblyomma parvum* (GARCIA et al., 2018) e *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005)

No entanto, não há registros na literatura de trabalhos similares a presente pesquisa que avaliou a eficácia dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra o gênero *Amblyomma* sob condições de campo

Trabalhos de controle biológico em condições de canteiro e pastagem utilizando o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem se encontrado na literatura, porém, estes apresentam algumas divergências.

Bittencourt et al., (2003) testaram formulações contendo 10^7 e 10^9 conídios/ml do fungo *M. anisopliae*, cepa ESALQ 959, contra larvas de 15 dias de idade de *Rhipicephalus (B.) microplus*, num modelo que utilizava canteiros de *Brachiaria decumbens* medindo 1m^2 . Cada canteiro foi infestado artificialmente com 10.000 larvas, recebendo o tratamento correspondente no volume de 60 ml. Os autores obtiveram ação reduzida de controle, com percentuais de eficácia total da ordem de 37,84 e 53,78 ao fim da terceira repetição, respectivamente.

Em um modelo similar com canteiros, Basso et al., (2005) conseguiram alcançar uma redução de 87% a 94% na população de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* utilizando uma suspensão da cepa E9 de *M. anisopliae* contendo $1,8 \times 10^8$ conídios/ml aplicada num volume de $200\text{ml}/\text{m}^2$.

Com relação aos autores que trabalharam com o modelo de canteiros, nota-se que Bittencourt et al., (2003) utilizaram uma dose inferior aquela estudada por Basso et al., (2005). Tal fato poderia justificar os resultados de diferença de eficácia dos trabalhos

Garcia (2008) avaliou a aplicação de *M. anisopliae* no campo contra *R. (B.) microplus*, em dosagens no intervalo de 1,06 a $1,47 \times 10^9$ conídios por m^2 , concluindo que o tratamento não resultou na redução do número de larvas infectantes na pastagem e nem do número de fêmeas ingurgitadas sobre os bovinos.

No presente trabalho, optou-se por explorar o conhecimento agrônomico consolidado, utilizando a dosagem de 2×10^{13} conídios por hectare para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra *A. sculptum*. Foi observado nas contagens totais de indivíduos porcentagens para fungos *B. bassiana* na ordem, 91,7%, 56,9% e 63,0% de mortalidade para adultos, ninfas e larvas respectivamente.

A porcentagem para o fungo *M. anisopliae* foi na ordem de 100%, 56,9% e 100% de mortalidade para adultos, ninfas e larvas respectivamente.

Maranga et al., (2005) realizaram estudo *in vitro* contra ninfas e adultos de *Amblyomma variegatum*, com fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, utilizando formulação oleosa, demonstrando melhor desempenho em todos os ensaios, com maior mortalidade de carrapatos de 92% ocorrendo durante a estação chuvosa na concentração de conídios de 10^{10} conídios / ml dos fungos mistos comparados a 49% para a formulação aquosa em concentrações semelhantes de conídios. No entanto, na mesma concentração de conídios durante a estação seca, as mortalidades no campo foram relativamente baixas, com a mistura dos fungos registrando 24% e 17% de mortalidade de carrapatos para a formulação de óleo e água, respectivamente.

Durante a estação chuvosa e seca resultados similares aos descrito por Maranga et al., (2005), foram obtidos no presente trabalho. Para adultos, ninfas e larvas capturados pós tratamento com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em períodos de maior precipitação acumulada (mm) ocorreu mortalidade acima de 90% para ambos os fungos.

No entanto, em períodos de menor precipitação acumulada (mm), caracterizados como estação seca nos meses de abril e maio para ninfas capturadas após tratamento com o fungos *B. bassiana* ocorreu mortalidade de 25,3% e 30,7% respectivamente. Enquanto que para as que foram tratadas com o fungo *M. anisopliae* esta porcentagem foi de 18,7% e 40,5% para os meses respectivos. Em relação as larvas, no mês de abril o valor foi de 44,4% de mortalidade para o fungo *B. bassiana*.

Outro fator que ocorreu neste trabalho foi que, apesar da precipitação acumulada (mm) ser menor nos meses de abril a agosto de 2018, meses caracterizados como períodos de seca, para adultos e ninfas ocorreu mortalidade de 100% no mês de julho e acima de 92,3% no mês de junho respectivamente para os dois fungos entomopatogênicos, no entanto, a anotação da umidade relativa pontual no dia da aplicação dos fungos nestes meses foram acima de 50%. Tais resultados corroboram com o que foi descrito por Fernandes e Bittencourt (2008) que relataram que a infecção de carrapatos por fungos é beneficiada por condições de alta umidade e pouca incidência de raios ultravioletas.

Estes resultados podem ser um indicativo claro de que a umidade é um fator importante para eficácia de fungos entomopatogênicos em pesquisas a campo.

No presente estudo foram testados diferentes modelos estatísticos para análise dos dados, a fim de se encontrar aquele que proporcionasse melhor ajuste, suportando as conclusões ora apresentadas. Observe-se que os estudos a campo apresentam maior número de variáveis que não podem ser controladas pelo pesquisador.

Neste sentido, Normando et al., (2010) afirmam que a análise estatística dos resultados obtidos em um determinado estudo é uma ferramenta importantíssima na validação desses

dados, assim como para a adequada extrapolação dos resultados obtidos para a população estudada, um equívoco poderia levar o pesquisador a conclusões finais inadequadas.

Em decorrência dos resultados apresentados no presente trabalho, os isolados dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (IBCB 66) e *M. anisopliae* (IBCB 425) demonstraram ter grande importância no controle de *A. sculptum*, pois os mesmos promoveram efeitos deletérios com redução da taxa de crescimento populacional em todas as fases de desenvolvimento dos carrapatos a campo.

Tais achados, também evidenciam a possibilidade de em breve ser reproduzido em programas estratégicos de controle contra outras espécies de ixodídeos

5.5 CONCLUSÕES

Os isolados utilizados no presente estudo dos fungos *B. bassiana* (IBCB 66) e *M. anisopliae* (IBCB 425) confirmaram ter potencial patogênico para utilização a campo.

A formulação aquosa com emulsificante alimentício para ambos os fungos, demonstraram mais praticidade e eficiência para aplicação no campo.

O melhor dia de avaliação de mortalidade *in vitro* dos carrapatos capturados do campo após aplicação de tratamento foi o décimo, evidenciando os melhores resultados.

A dosagem de 2×10^{13} conídios por hectare para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra *Amblyomma sculptum* se demonstrou eficaz para o controle deste ectoparasito a campo.

As porcentagens das contagens totais de indivíduos para fungos *B. bassiana* foi na ordem de, 91,7%, 56,9% e 63,0% de mortalidade para adultos, ninfas e larvas respectivamente. Enquanto que para o fungo *M. anisopliae* foi na ordem de 100%, 56,9% e 100% de mortalidade para adultos, ninfas e larvas respectivamente.

Em relação as ninfas o pico de mortalidade ocorreu ao redor de 30 dias decorridos da aplicação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* até a última avaliação

A aplicação dos fungos entomopatogênicos a campo são favorecidos quando estas ocorrem com umidade relativa acima de 50%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRARIAS FZEA USP. Disponível em <http://agrariasusp.com.br/agrariasusp01/estacao.html>
Acessado em 20 de março de 2019.

ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). **Journal of Applied Entomology**, v. 121, (9/10), p. 539-543, 1997.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. **Controle microbiano de insetos**. 2^a. Ed. Piracicaba: FEALQ, p.289, 1998.

BARCI, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. D. C.; ZAPPELINI, L. O.; PRADO, A. P. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 18, (1), p. 7-13, 2009.

BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.9, p. 17-21, 1989.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, SP, Brasil. Vox/ICTTD-3/ Butantan, 223p, 2006.

BASSO, L. M. D. S.; MONTEIRO, A. C.; BELO, M. A. D. A.; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.40, n.6, p.595-600, 2005.

BITTENCOURT VREP, BAHIENSE TC, FERNANDES EKK, SOUZA EJ Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1883) (Acari: Ixodidae). **Rev Bras Parasitol Vet** v. 12, p.38–42, 2003.

FERNANDES ÉKK, BITTENCOURT VREP. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Exp Appl Acarol**, v. 46, p. 71-93, 2008.

GARCIA, M. V. **Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* em pastagens visando o controle do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos**. 2008. 58p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Jaboticabal, São Paulo, 2008.

GARCIA, M. V., RODRIGUES, V. S., MONTEIRO, A. C., SIMI, L. D., HIGA, L. O. S., MARTINS, M. M., PRETTE, N., MOCHI, D. A., ANDREOTTI, R., SZABÓ, M. P. J. In vitro efficacy of *Metarhizium anisopliae* sensu lato against unfed *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 76 (4), p. 507-512, 2018.

GRAY, J.S. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. **Experimental and Applied Acarology**, v. 1, p. 35-44, 1985.

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Rev. Ciência Rural**, v. 34, p.195-200, 2004.

LABRUNA, M.B.; JORGE, R.S.P.; SANA, D.A.; JÁCOMO, A.T.A.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M.; FERRO, C.; PEREZ, S.A.; SILVEIRA, L.; SANTOS JR, T.S.; MARQUES, S.R.; MORATO, R.G.; NAVA, A.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; GOMES, A.A.B.; CONFORTI, V.A.; AZEVEDO, F.C.C.; PRADA, C.S.; SILVA, J.C.; BATISTA, A.F.; MARVULO, MF.V.; MORATO, R.L.G.; ALHO, C.J.R.; PINTER, A.; FERREIRA, P.M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Acari:Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, V. 36, p. 149-163, 2005.

LEMOS, E. R. S. Rickettsial Diseases in Brazil. **Virus Review and Research**, v. 7, p. 7-16, 2002.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.

MARTINS, M. M. **Fauna, sazonalidade e riquetsias de carrapatos em área do Cerrado goiano**. 2016. 85p. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.159, n.4, p.527-532, 2005.

NORMANDO, D., TJADERHANE, L., AND QUINTÃO, C. C. A. A escolha do teste estatístico - um tutorial em forma de apresentação em PowerPoint. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 15 (02), p. 101 – 106, 2010.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 412–416, 2003.

OSAVA, C. F. **Perfil sorológico contra Rickettsia spp e Leptospira spp e infestação de carrapatos em suínos mantidos sob diferentes sistemas de criação**. 2016 98p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias): Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

PERINOTTO, W. M. S. **Ação de Beauveria Bassiana e Metarhizium anisopliae sobre populações de Rhipicephalus (Boophilus) microplus de diferentes localidades**. 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias – Área de Parasitologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em < <http://www.R-project.org>>, Acessado em 28 de fevereiro de 2019.

RAMOS, V.N., PIOVEZAN, U., FRANCO, A.H.A., RODRIGUES, V.S., NAVA, S., SZABÓ, M.P.J. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. **Exp Appl Acarol**, v. 68, p. 227-240, 2016.

REIS, R. C. S.; CHACON, S. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, (1883) na ecdise

ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908) (Acari-Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.2, p.68-70, 2003.

REIS, R.C.S., MELO, D. R., BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56 (6), p. 788-791, 2004.

SZABÓ, M. P. J., CUNHA, T.M., PINTER, A., VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Exp. Appl. Acarol**, v. 25 (10–11), 909–916, 2001.

TAMAI, M. A. et al. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 77-84, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram avaliados três diferentes cenários rurais. No primeiro, a Fazenda da Ponte, em Itu - SP, temos uma unidade onde já não ocorre a produção pecuária propriamente dita, sendo os animais mantidos com finalidade de lazer. No segundo caso, a fazenda Mato Dentro, Campinas – SP, a propriedade se volta para a pesquisa agropecuária, mas ali já não se exploram as espécies domésticas, sendo a população de *Amblyomma* mantida exclusivamente pelas capivaras e, por fim, no Campus Fernando Costa temos uma unidade de ensino e pesquisa onde são exploradas todas as espécies domésticas e, ao mesmo tempo conservam-se importantes parcelas de mata nativa.

É importante ressaltar que os três diferentes cenários guardam um elemento comum, qual seja a presença de grupos de capivaras, apresentando problemática comum entre eles, as infestações pelo *Amblyomma sculptum* que causam incômodos aos seres humanos.

Foi possível comprovar no presente trabalho que se pode alcançar um grau de infestação tolerável somente com medidas de manejo.

Por outro lado, os trabalhos com fungos entomopatogênicos evidenciam sua eficácia como agente de controle biológico de *Amblyomma* subsidiando sua adoção em programas de controle numa escala aumentada.

A partir dos resultados ora apresentados é possível propor um calendário de acordo com os diferentes desafios impostos pelo parasito.

Evidenciou-se que nos meses de seca a mortalidade dos indivíduos após aplicação dos fungos entomopatogênicos é menor.

Porém mesmo a precipitação acumulada (mm) sendo mais baixa, obteve-se resultados eficazes quando a umidade relativa registrada no local do experimento era maior do que 50%. A princípio, com umidade relativa menor que 50%, não seria recomendável fazer aplicação dos fungos entomopatogênicos a campo, porque sua eficácia seria reduzida.

Entretanto, a aplicação dos fungos entomopatogênicos na estação seca pode ser justificável em situações de alta infestação e riscos a saúde pública.

Neste caso, sugere-se fazer as aplicações dos fungos entomopatogênicos a cada 30 dias durante o ano todo, porém o efeito letal é mais pronunciado quando se leva em consideração a umidade relativa do ar do local a ser tratado.

Em situações em que as populações estiverem controladas, sugere-se que a aplicação dos fungos entomopatogênicos seja feita em estação chuvosa, que corresponde aos meses de

setembro a janeiro, período caracterizado pela presença de indivíduos adultos. A eliminação dos adultos mitiga as infestações de larvas e, conseqüentemente, de ninfas.

Cada adulto morto representa uma redução de aproximadamente cinco mil larvas no campo.

Esses achados complementam as medidas propostas por Labruna et al (2004) com banhos nos equinos de abril a julho e roçamento para modificar o microclima dos carrapatos. Note-se que o roçamento não se aplica em áreas de pastagens que serve de alimento para os animais.