

Formulações oleosas contendo fungos artropodopatogênicos para o controle de *Rhipicephalus microplus**

Isabele da Costa Angelo¹⁺, Hilton Carmo Diniz-Neto², Samilla V. Santos², Wendell Marcelo de Souza Perinotto³, Simone Quinelato⁴, Huarrisson Azevedo Santos¹, Patrícia Silva Gôlo⁵, Mariana Guedes Camargo⁵, Allan Felipe Marciano⁶ e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt⁷

ABSTRACT. Angelo I.C., Diniz-Neto H.C., Santos S.V., Perinotto W.M.S., Quinelato S., Santos H.A., Gôlo P.S., Camargo M.G., Marciano A.F. & Bittencourt V.R.E.P. [Oil-based formulations containing arthropodpathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus*.] Formulações oleosas contendo fungos artropodopatogênicos para o controle de *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(Supl.1):18-24, 2015. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: isabeleangelo@yahoo.com.br

Rhipicephalus microplus ticks are responsible for economical losses estimated in US\$ 3.24 billions per year in Brazil. Arthropodpathogenic fungi are an important alternative to the chemical control of this arthropod; however to be efficient in the field, formulations must be developed to protect conidia against environmental stresses. The present study compared the efficacy of mineral or vegetal oil-based formulations containing *Metarhizium anisopliae* s.l. or *Beauveria bassiana* s.l. as well as their association to control *R. microplus* engorged females. *M. anisopliae* and *B. bassiana* isolates were cultivated in Potato Dextrose Agar medium and maintained under optimal conditions. Single fungus oil-based formulations were prepared with the following proportions: 84% aqueous fungal suspension; 15% sterile oil; 1% Tween 80. Associated fungal formulations were prepared as follows: 42% aqueous *M. anisopliae* suspension; 42% aqueous *B. bassiana* suspension; 15% sterile oil and 1% Tween. Engorged females were immersed in 1 mL oil formulations. The following biological parameters were evaluated: initial weigh of engorged female; weight of egg mass; egg production index; nutritional index and percentage of tick control. There was no difference in the percentage of tick control when *M. anisopliae* s.l. and/or *B. bassiana* s.l. were tested in mineral oil. Although, when vegetable oil-based formulations were tested, only *M. anisopliae* s.l. formulations (both single and associated) had satisfactory control percentage (41.97% and 40.13%)

*Recebido em 23 de outubro de 2015.

Aceito para publicação em 25 de novembro de 2015.

¹ Médica(o)-veterinária(o), DSc, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: huarrisson@yahoo.com.br; ⁺ Autora para correspondência, E-mail: isabeleangelo@yahoo.com.br

² Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901. E-mails: hiltoncarmodinizneto@hotmail.com; samillavs@gmail.com

³ Médico-veterinário, DSc, Departamento de Parasitologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Avenida Beira Rio 3100, Jardim Europa, Cuiabá, MT 78065-900. E-mail: wendellperinotto@bol.com.br

⁴ Médica-veterinária, DSc. Coleção de Fungos Filamentosos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Rocha Lima, sala 525, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360. E-mail: squinelato@gmail.com

⁵ Médica-veterinária, DSc, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mails: mari_gc6@yahoo.com.br; patricia_golo@yahoo.com.br

⁶ Curso de Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: allan_sjc@yahoo.com.br

⁷ Médica-veterinária, PhD, DPA, Anexo I, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: vaniabit@ufrjr.br - bolsista produtividade em pesquisa CNPq.

while single fungus *B. bassiana* s.l. formulation yield a very low percentage of tick control (10.88%). Accordingly, the use of different oils (mineral or vegetable oils) may affect in different ways the arthropodpathogenic fungi efficacy to control *R. microplus*. Therefore, different oils should be tested in formulations to control ticks, as well as their interactions with different fungal isolates what will contribute to the development of a promising alternative to control this important parasite.

KEY WORDS. Ticks, biological control, mineral oil, vegetable oil.

RESUMO. O carrapato *Rhipicephalus microplus* é responsável por perdas na pecuária brasileira estimadas em U\$ 3,24 bilhões anuais. Fungos artropodopatogênicos representam uma importante alternativa ao controle químico deste artrópode; entretanto para que sua utilização a campo seja eficaz o desenvolvimento de formulações que protejam os conídios dos estresses ambientais é necessário. O presente trabalho comparou a eficácia de formulações oleosas a base de óleo mineral ou vegetal contendo *Metarhizium anisopliae* s.l. ou *Beauveria bassiana* s.l. bem como a associação de ambos os fungos no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram cultivados em meio BDA e mantidos em condições ideais de temperatura e umidade. A formulação oleosa contendo um único fungo foi composta de 84% de suspensão conidial aquosa, 15% de óleo estéril e 1% de Tween 80. Para avaliação da associação dos fungos, a formulação consistiu de 42% de suspensão aquosa de *M. anisopliae* s.l., 42% de suspensão aquosa de *B. bassiana* s.l., 15% de óleo estéril e 1% de Tween 80. As fêmeas foram homogeneizadas quanto ao peso e distribuídas em grupos. O tratamento consistiu da imersão das fêmeas em 1 mL de formulação oleosa. Os parâmetros avaliados foram: peso inicial da fêmea, peso da massa total de ovos, índices de produção de ovos e nutricional e percentual de controle. Não houve diferença no percentual de controle quando *M. anisopliae* e/ou *B. bassiana* foram testados em óleo mineral. Contudo, quando o óleo vegetal foi utilizado, somente as formulações contendo *M. anisopliae* s.l. (isoladamente ou em associação) apresentaram percentual de controle satisfatório (41,97% e 40,13%), enquanto que a formulação somente com *B. bassiana* s.l. resultou em baixo percentual de controle (10,88%). Dessa forma, o uso de diferentes óleos (mineral ou vegetal) pode afetar de diferentes maneiras a eficácia de fungos artropodopatogênicos para controlar *R. microplus*. Logo, diferentes tipos de óleo utilizados na formulação de fungos artropodopatogênicos para o controle de *R. microplus* devem ser testados, bem como sua interação com os isolados

destes fungos, o que contribuirá para o desenvolvimento de uma alternativa eficaz para o controle deste importante parasito.

PALAVRAS-CHAVE. Carrapatos, controle biológico, óleo mineral, óleo vegetal.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, cuja produtividade é determinante na economia do país. No entanto, devido às condições climáticas e deficiência no manejo, o gado brasileiro é altamente acometido pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, produzindo perdas diretas e indiretas pela transmissão de doenças, diminuição na produção de carne e leite e pelo elevado custo de seu controle. Estima-se que, só no Brasil, estas perdas sejam de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares por ano (Grisi et al. 2014).

O controle deste parasito é feito basicamente através do uso de carrapaticidas que, em sua maioria, são organofosforados, amidinas, piretróides, avermectinas, reguladores do crescimento ou inibidores de muda. A utilização inadequada destes produtos tem selecionado populações de *R. microplus* resistentes a quase todas as bases químicas existentes (Furlong et al. 2007, Labruna 2008), além da contaminação ambiental e da presença de resíduos desses produtos no leite e na carne (Mendes et al. 2007). Neste contexto, o controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos é um método promissor para o controle alternativo de carrapatos.

Atualmente, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são espécies fúngicas bem caracterizadas e amplamente estudadas quanto ao seu potencial para o controle *in vitro* de espécies de carrapatos do mundo inteiro (Zimmermann 2007a, 2007b, Fernandes & Bittencourt 2008, Reis et al. 2008, Schrank & Vainstein 2010). Estas espécies fúngicas já tiveram sua eficácia comprovada no controle de diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*, em condições laboratoriais (Fernandes & Bittencourt 2008). Entretanto, em condições ambientais há uma diminuição na eficácia destes pató-

genos, devido à interferência dos fatores abióticos tais como temperatura, umidade relativa e incidência de radiação solar (Inglis et al. 2001, Bahiense et al. 2007, Leemon et al. 2008, Camargo et al. 2014).

A formulação em que os conídios são aplicados é de fundamental importância para o sucesso do biocontrole de carrapatos, pois atua na manutenção da viabilidade, virulência e eficácia dos patógenos a nível de campo. Os óleos minerais e vegetais têm sido amplamente utilizados como adjuvantes em formulações visando manter a virulência e até mesmo aumentar a eficácia dos fungos artropodopatogênicos contra carrapatos (Polar et al. 2005, Angelo et al. 2010, Kaaya et al. 2011, Camargo et al. 2012, Camargo et al. 2014), pois quando adicionados a suspensões fúngicas, os óleos atuam protegendo os conídios das condições ambientais desfavoráveis, além de facilitar a adesão dos conídios à superfície do artrópode. Logo, a elaboração de formulações oleosas que aumentem a virulência dos fungos artropodopatogênicos contribuirá para a caracterização de novos métodos de controle de carrapatos, que poderão ser desenvolvidos e utilizados em estratégias mais eficazes de controle a campo deste parasito. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l., formulados em óleo mineral ou vegetal, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* bem como avaliar o efeito da associação destes fungos em ambas as formulações.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano da Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Manutenção das colônias de fungos artropodopatogênicos

Os isolados Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. e ESALQ 986 de *B. bassiana* s.l. foram cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (U.R.) $\geq 80\%$ durante 15 dias para o crescimento fúngico. Posteriormente, os isolados foram armazenados a 4°C até a realização do bioensaio.

Preparo das formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l.

Os conídios de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. foram raspados da superfície das placas e ressuspensos em água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 a

0,1% (Luz et al. 1998). As suspensões conidiais aquosas foram quantificadas utilizando hemacitômetro e microscópio óptico (Alves 1998) e ajustadas para a concentração de 2×10^8 conídios/mL. As formulações contendo óleo mineral ou vegetal foram preparadas a partir da suspensão aquosa contendo conídios de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* s.l. de acordo com Angelo et al. (2010): 84% de suspensão conidial aquosa, 15% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda[®]) ou vegetal (óleo de soja) e 1% de espalhante adesivo (Tween 80). Para avaliar a associação dos fungos, a seguinte proporção foi utilizada: 42% de suspensão aquosa contendo conídios de *M. anisopliae* s.l., 42% de suspensão aquosa contendo conídios de *B. bassiana* s.l., 15% de óleo mineral ou vegetal (óleo de soja) e 1% de espalhante adesivo (Tween 80).

Viabilidade dos conídios

Uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ da suspensão conidial aquosa e das formulações oleosas de ambos os isolados fúngicos foi inoculada em placas de Petri contendo meio de cultura BDA para determinação do percentual de germinação dos conídios de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. As placas de Petri foram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ durante 24 horas e a viabilidade dos conídios foi avaliada (Alves 1998).

Obtenção da colônia de *R. microplus*

Fêmeas ingurgitadas foram obtidas de infestação artificial de bezerros mestiços estabulados (Processo na Comissão de Ética da UFRRJ, protocolo 2083.011620/2011-68) na EPPWON. A assepsia da cutícula das fêmeas de *R. microplus* foi realizada por imersão em hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos. Posteriormente, as fêmeas foram secas em papel toalha, pesadas individualmente e distribuídas homogeneamente quanto ao peso para a formação dos grupos.

Delineamento experimental

Foram formados nove grupos, a saber: 1- grupo controle negativo (água destilada estéril e Tween 80 0,1%); 2 - grupo Controle OM (84% de água destilada estéril, 15% de óleo mineral e 1% de Tween 80); 3 - grupo Controle OV (84% de água destilada estéril, 15% de óleo vegetal e 1% de Tween 80); 4 - grupo Ma OM (84% de suspensão aquosa contendo conídios de *M. anisopliae* s.l., 15% de óleo mineral e 1% de Tween 80); 5 - grupo Bb OM (84% de suspensão aquosa contendo conídios de *B. bassiana* s.l., 15% de óleo mineral e 1% de Tween 80); 6 - grupo Ma OV (84% de suspensão aquosa contendo conídios de *M. anisopliae* s.l., 15% de óleo vegetal e 1% de Tween 80); 7 - grupo Bb OV (84% de suspensão aquosa contendo conídios de *B. bassiana* s.l., 15% de óleo vegetal e 1% de Tween 80); 8- grupo Ma + Bb OM (42% de suspensão aquosa contendo conídios de *M. anisopliae* s.l., 42% de suspensão aquosa contendo conídios de *B. bassiana* s.l., 15% de óleo mineral e 1% de Tween 80); 9- grupo Ma + Bb OV (42% de suspensão aquosa contendo conídios de *M. anisopliae* s.l., 42% de suspensão aquosa contendo conídios de *B. bassiana* s.l., 15% de óleo vegetal e 1% de Tween 80). Cada grupo foi constituído por oito fêmeas.

Avaliação da virulência de formulações oleosas para *R. microplus*

O tratamento consistiu na imersão individual de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em um mL de cada formulação, durante três minutos. Em seguida, as fêmeas foram fixadas em placas de Petri, em decúbito dorsal, e mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ para acompanhamento dos parâmetros biológicos. Diariamente, a postura de cada fêmea foi coletada, pesada e armazenada individualmente em frascos de vidro, vedados com uma rolha de algodão hidrófilo, identificados e mantidos em condições ideais de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$) para a posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas. Os parâmetros biológicos avaliados foram: peso inicial da fêmea, peso total da massa de ovos, índices de produção de ovos (IPO) e nutricional (IN) calculados de acordo com Bennett (1974), eficiência reprodutiva e percentual de controle (Drummond et al. 1971).

Reisolamento dos fungos artropodopatogênicos

Três dias após o término da oviposição, amostras de fêmeas de todos os grupos foram colocadas em câmara úmida e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ para facilitar o crescimento dos fungos e posterior confirmação de suas características macro e micromorfológicas (Samson 1974).

Análise estatística

Para análise dos dados paramétricos foi realizada a análise de variância seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias; para a análise dos dados não paramétricos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguida pelo teste SNK para comparação entre as ordenações médias com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Viabilidade dos conídios

Os conídios das suspensões aquosas apresentaram percentual de germinação superior a 98% após 24 h de incubação, no entanto, os conídios contidos nas formulações contendo óleo mineral ou vegetal apresentaram percentual de germinação superior a 98% após 72 h de incubação.

Virulência de formulações oleosas para *R. microplus*

A média do peso inicial das fêmeas utilizadas no bioensaio variou entre 0,3030g e 0,3066g e não houve diferença significativa entre os grupos testados, indicando que os mesmos estavam homogêneos entre si. Logo, as alterações observadas nos parâmetros biológicos avaliados são decorrentes do efeito do tratamento realizado.

O óleo mineral, quando testado isoladamente, sem a presença dos conídios dos isolados Ma 959

de *M. anisopliae* s.l. e ESALQ 986 de *B. bassiana* s.l., (Controle OM) não causou alterações significativas nos parâmetros avaliados quando comparado com o grupo controle negativo (água destilada estéril e Tween 80 0,1%). Sendo assim, para a expressão dos resultados obtidos no presente trabalho a comparação entre os grupos tratados com as formulações fúngicas foi realizada com o grupo controle contendo óleo mineral (Controle OM). No entanto, o óleo vegetal, quando testado isoladamente, sem a presença dos isolados fúngicos (Controle OV), causou alteração significativa em alguns dos parâmetros avaliados (IPO e IN) quando comparado com o grupo controle negativo (água destilada estéril e Tween 80 0,1%), demonstrando um efeito deletério para fêmeas de *R. microplus*. Sendo assim, para a expressão dos resultados, a comparação entre os grupos tratados com as formulações fúngicas contendo o óleo vegetal foi realizada com ambos os grupos, controle negativo e controle contendo óleo vegetal (Controle OV).

As formulações contendo conídios de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* s.l. formulados em óleo mineral causaram alterações significativas em todos os parâmetros biológicos avaliados (Tabela 1). O peso total da massa de ovos foi reduzido significativamente quando conídios de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* s.l. foram utilizados separadamente, sendo esta redução de 40,62% e 50%, respectivamente. Quando ambos os fungos foram associados não houve redução significativa deste parâmetro quando comparado com o grupo controle. Com a formulação contendo óleo vegetal, *M. anisopliae* s.l. reduziu significativamente o peso total da massa de ovos em 23,2% enquanto *B. bassiana* s.l. reduziu apenas 16% quando comparados com o grupo Controle OV. Já a associação dos isolados em óleo vegetal reduziu significativamente o peso da massa de ovos em aproximadamente 29% quando comparada ao grupo Controle OV. Quando a comparação foi realizada com o grupo controle negativo, essa redução foi de 42,6%, 26,3% e 44,5%, respectivamente.

Ambos os isolados de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* s.l. formulados em óleo mineral reduziram significativamente o IPO quando comparados com o grupo Controle OM. *M. anisopliae* s.l. reduziu este parâmetro em 38,7%, enquanto *B. bassiana* s.l. reduziu cerca de 54,4%. No entanto, a associação de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. em formulação contendo óleo mineral não causou redução significativa no IPO quando comparado com o grupo controle. Já a formulação contendo óleo vegetal

Tabela 1. Média \pm desvio padrão do peso inicial da fêmea, peso da massa total de ovos, índice de produção de ovos (IPO), índice nutricional (IN), eficiência reprodutiva (ER) e percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. e/ou *Beauveria bassiana* formulados em óleo mineral (Vetec®). Após o tratamento, as fêmeas foram mantidas em condições ideais de temperatura e umidade (27 ± 1 °C e U.R. $\geq 80\%$).

Tratamentos	Peso inicial da fêmea (g)	Peso massa total de ovos (g)	IPO	IN	ER	Percentual de controle (%)
Controle	0,3034 ^a \pm 0,03	0,1876 ^a \pm 0,02	61,88 ^a \pm 5,96	81,70 ^a \pm 4,19	57,41 ^a \pm 7,93	-
Controle OM	0,3066 ^a \pm 0,03	0,1760 ^a \pm 0,01	57,49 ^a \pm 3,20	69,41 ^{ab} \pm 4,09	47,64 ^{ab} \pm 10,27	-
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma)	0,3058 ^a \pm 0,03	0,1045 ^b \pm 0,08	35,22 ^{bc} \pm 27,64	48,00 ^c \pm 33,79	27,64 ^c \pm 22,98	41,97
<i>Beauveria bassiana</i> (Bb)	0,3030 ^a \pm 0,03	0,0880 ^b \pm 0,10	26,24 ^c \pm 29,27	38,38 ^c \pm 41,86	22,09 ^c \pm 27,13	53,62
Ma + Bb	0,3059 ^a \pm 0,03	0,1361 ^a \pm 0,06	45,17 ^{ab} \pm 19,09	54,68 ^{bc} \pm 22,35	28,52 ^c \pm 22,60	40,13

(*) Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste SNK ($P \geq 0,05$).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão do peso inicial da fêmea, peso da massa total de ovos, índice de produção de ovos (IPO), índice nutricional (IN), eficiência reprodutiva (ER) e percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. e/ou *Beauveria bassiana* formulados em óleo vegetal. Após o tratamento, as fêmeas foram mantidas em condições ideais de temperatura e umidade (27 ± 1 °C e U.R. $\geq 80\%$).

Tratamentos	Peso inicial da fêmea (g)	Peso da massa total de ovos (g)	IPO	IN	ER	Percentual de controle (%)
Controle	0,3034 ^a \pm 0,03	0,1876 ^a \pm 0,02	61,88 ^a \pm 5,96	81,70 ^a \pm 4,19	57,41 ^a \pm 7,93	-
Controle OV	0,3045 ^a \pm 0,03	0,1475 ^{ab} \pm 0,03	48,29 ^b \pm 7,28	61,22 ^b \pm 7,07	43,47 ^{ab} \pm 8,26	-
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma)	0,3037 ^a \pm 0,03	0,1133 ^c \pm 0,05	35,49 ^c \pm 17,44	44,87 ^c \pm 21,12	25,00 ^c \pm 13,92	42,48
<i>Beauveria bassiana</i> (Bb)	0,3035 ^a \pm 0,03	0,1239 ^b \pm 0,04	45,65 ^{bc} \pm 6,86	55,44 ^{bc} \pm 6,69	38,74 ^{bc} \pm 10,01	10,88
Ma + Bb	0,3022 ^a \pm 0,03	0,1045 ^c \pm 0,03	34,36 ^c \pm 9,08	59,29 ^{bc} \pm 9,05	24,91 ^c \pm 9,67	42,70

(*) Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste SNK ($P \geq 0,05$).

causou redução no IPO quando os isolados foram avaliados isoladamente e em associação: *M. anisopliae* s.l. reduziu significativamente este parâmetro em 26,5%, *B. bassiana* s.l. em 5,5% e a associação em 28,8%, quando comparados com o Controle OV, no entanto, quando comparados com o controle negativo, esse percentual de redução foi de 42,6%, 26,2% e 44,5%, respectivamente.

Em relação ao IN, os isolados de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* s.l. formulados em óleo mineral reduziram significativamente este parâmetro em 30,8% e 44,7%. A associação dos fungos artropodopatogênicos não causou redução significativa quando comparado com o grupo Controle OM, no entanto, foi observada redução de 33,07% quando a comparação foi realizada com o grupo controle contendo apenas água destilada e Tween 80 0,1%. Em relação ao formulado contendo óleo vegetal, somente *M. anisopliae* s.l. foi capaz de reduzir significativamente o IN quando comparado com o grupo Controle OV (redução de 45%). No entanto, quando comparados com o grupo controle negativo, *M. anisopliae* s.l. causou redução de 54,9%, *B. bassiana* s.l. 32,1% e a associação dos fungos reduziu o IN em 27,4%.

Os isolados de *M. anisopliae* s.l. ou *B. bassiana* s.l. reduziram significativamente a eficiência reprodutiva (ER) de fêmeas de *R. microplus* quando utilizados isoladamente ou quando associados na mesma formulação contendo o óleo mineral. *M. anisopliae*

s.l. reduziu esse parâmetro em aproximadamente 42% enquanto *B. bassiana* s.l. reduziu em 53,6%. Já a associação de ambos os fungos reduziu este parâmetro em 40%. Em relação ao óleo vegetal, não houve diferença significativa entre os grupos controle negativo e Controle OV, logo a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se os dados do grupo Controle OV. Sendo assim, *B. bassiana* s.l. não causou alteração significativa neste parâmetro, enquanto *M. anisopliae* s.l. o reduziu em 42,5% e a associação dos fungos causou redução da ER de 42,7%.

O percentual de controle exercido pela formulação contendo óleo mineral e *M. anisopliae* s.l. foi de 41,97%, enquanto a formulação contendo *B. bassiana* s.l. foi de 53,62%. Já na associação dos isolados, o percentual de controle foi de 40,13%. Com a formulação contendo o óleo vegetal, o percentual de controle obtido com *M. anisopliae* s.l. foi de 42,48%, com *B. bassiana* s.l. 10,88% e com a associação dos isolados 42,70%.

DISCUSSÃO

Neste estudo duas formulações oleosas (baseadas em dois tipos diferentes de óleo: óleo mineral ou óleo vegetal) e duas espécies fúngicas foram comparadas quanto a virulência para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. A utilização de diferentes tipos de óleos em formulações contendo fungos

artropodopatogênicos objetiva favorecer a germinação e o desenvolvimento fúngico sob condições ambientais desfavoráveis, como a baixa umidade, altas temperaturas e intensidade de radiação solar (Polar et al. 2005, Camargo et al. 2014). Além de atuar reduzindo os impactos causados por essas condições estressantes, o óleo também auxilia no processo de adesão do conídio na superfície do artrópode (Alves 1998), dinamizando o início do processo infeccioso.

Diferentes óleos podem ser utilizados nas formulações, incluindo óleos de origem vegetal ou mineral. Os resultados do presente estudo mostraram que o tipo de óleo e o isolado fúngico podem apresentar incompatibilidade, afetando negativamente a virulência do isolado para fêmeas de *R. microplus*, como pode ser observado com o isolado ESALQ 986 de *B. bassiana* e o óleo vegetal de soja. Os isolados de *M. anisopliae* s.l. estudados por Perinotto (2013) apresentaram maior percentual de controle para fêmeas de *R. microplus* quando formulados em óleo mineral quando comparado com o óleo vegetal. Entretanto, no presente estudo, o mesmo não foi observado quando o isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. foi formulado em óleo mineral ou óleo vegetal, sugerindo que não somente as características intrínsecas do óleo como também a adequação do conídio do isolado fúngico ao tipo de óleo, são importantes fatores para o desenvolvimento da formulação.

Levando em consideração que o uso de óleos de origem vegetal é considerado mais sustentável, dentre os óleos e isolados testados no presente estudo, o isolado de *M. anisopliae* s.l. formulado em óleo de soja seria o conjunto ideal para o controle de fêmeas de *R. microplus*. Entretanto, em alguns casos o uso de óleos vegetais é restrito devido a sua baixa estabilidade térmica e propensão à oxidação. Comparando 5 óleos de origem vegetal, o óleo de canola se mostrou menos propenso à oxidação, seguido pelo óleo de milho, semente de algodão, girassol e por último óleo de soja (Souza et al. 2009). Testar a eficácia da formulação à base de óleo vegetal e *M. anisopliae* sob diferentes condições de temperatura poderá demonstrar os reais desafios da utilização de óleos de origem vegetal em formulações contendo conídios de fungos artropodopatogênicos.

Segundo Bennett (1974), fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* com pequeno tamanho são menos eficientes na produção de ovos do que fêmeas apresentando média de peso entre 160 e 300 mg. Logo, as fêmeas utilizadas no presente estudo apresentaram médias de peso que validam a cepa de *R. mi-*

croplus. De um modo geral, as formulações oleosas testadas no presente estudo interferiram nos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas causando redução da oviposição, o que significou redução dos índices nutricional (IN) e de produção de ovos (IPO) e da eficiência reprodutiva. O IN traduz a relação entre o somatório de nutrientes ingeridos pela fêmea durante a fase parasitária e a energia desprendida para a produção da massa de ovos, enquanto o IPO demonstra a proporção entre o peso inicial da fêmea ingurgitada e a produção de ovos. Logo, a redução significativa destes índices demonstra que as formulações oleosas contendo os conídios de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. interferem na capacidade reprodutiva de fêmeas de *R. microplus*, reduzindo a geração subsequente deste parasito e contribuindo para o controle da fase não parasitária do carrapato.

Não foi observado efeito aditivo quando os conídios de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. foram associados em ambas as formulações, contendo óleo mineral ou vegetal, sugerindo que um isolado fúngico pode inibir ou reduzir o potencial virulento do outro. O mesmo foi observado por Perinotto (2013) quando associou dois isolados de *M. anisopliae* (CG 148 e CG 629) em formulação oleosa. Logo, a associação entre dois isolados fúngicos ou mesmo duas espécies fúngicas deve sempre ser avaliada.

Espera-se que fungos patogênicos para carrapatos devam apresentar resultados de virulência ainda mais satisfatórios quando formulados em óleo. No entanto, o presente estudo reportou que pode haver incompatibilidade entre o óleo e o isolado fúngico testado. Portanto, a seleção de adjuvantes que garantam uma atuação ótima do fungo é fundamental no desenvolvimento de bioprodutos mais eficientes para o controle biológico de artrópodes praga.

CONCLUSÃO

O tipo de óleo usado na formulação fúngica interfere na virulência do isolado ESALQ 986 de *B. bassiana* s.l. sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, no entanto, não causa alteração na virulência do isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. O isolado ESALQ 986 de *B. bassiana* s.l. apresenta maior eficácia sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* quando formulado em óleo mineral. Não há efeito aditivo quando os isolados ESALQ 986 de *B. bassiana* s.l. e Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. são associados em óleo mineral ou óleo vegetal de soja. O óleo vegetal de soja apresenta efeito deletério para fêmeas de *R. microplus*. Logo, diferentes tipos de óleo utilizados na

formulação de fungos artropodopatogênicos para o controle de *R. microplus* devem ser testados, bem como sua interação com os isolados destes fungos, o que contribuirá para o desenvolvimento de uma alternativa eficaz para o controle deste importante parasito.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi executada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Vânia R.E.P. Bittencourt é bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alves S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. FEALQ, Piracicaba, 1998. 1163p.
- Angelo I.C., Fernandes E.K.K., Bahiense T.C., Perinotto W.M.S., Moraes A.P.R., Terra A.L.M. & Bittencourt V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 172:317-322, 2010.
- Bahiense T.C., Fernandes E.K.K., Angelo I.C., Perinotto W.M.S. & Bittencourt V.R.E.P. Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16:243-245, 2007.
- Bennett G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, 16:52-61, 1974.
- Camargo M.G., Gólo 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*, 188:140-147, 2012.
- Camargo M.G., Marciano A.F., Sá F.A., Perinotto W.M.S., Quinelato S., Gólo P.S., Angelo I.C., Prata M.C.A. & Bittencourt V.R.E.P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. *Veterinary Parasitology*, 205:271-176, 2014.
- Drummond R.O., Gladney W.J., Whetstone T.M. & Ernst S.E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. *Journal of Economic Entomology*, 64:686-688, 1971.
- Fernandes E.K.K. & Bittencourt V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 46:71-93, 2008.
- Furlong J., Martins J.R.S. & Prata M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *Hora Veterinária*, 27:53-56, 2007.
- Grisi L., Leite R.C., Martins J.R.S., Barros A.T.M., Andreotti R., Cançado P.H.D., León A.A.P., Pereira J.B. & Villela H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23:150-156, 2014.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Tariq M.B. & Strasser H. *Fungi as Biological Control Agents*. CAB International, Wallingford, 2001, p.23-69.
- Kaaya G.P., Samish M., Hedimbi M., Gindin G. & Glazer I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 55:273-281, 2011.
- Labruna M.B. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, p.81-105. In: Pereira M.C., Labruna M.B., Szabó M.P.J. & Klafke G.M. (Orgs), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência*. Medvet, São Paulo, 2008.
- Leamon D.M., Turner L.B. & Jonsson N.N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary Parasitology*, 156:248-260, 2008.
- Luz C., Tiganos M.S., Silva I.G., Cordeiro C.M.T. & Aljanabi S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93:839-846, 1998.
- Mendes M.C., Lima C.K.P. & Prado A.P. Determinação da frequência de realização de bioensaios para o monitoramento da resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acarí: Ixodidae). *AArquivos do Instituto Biológico*, 74:87-93, 2007.
- Perinotto W.M.S. *Estudo da atividade enzimática e patogênica de isolados brasileiros de Metarhizium anisopliae s.l. visando o uso no controle biológico de Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tese, (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013. 85p.
- Polar P., Kairo M.T.K., Moore D., Pegram R. & John S.A. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160:151-157, 2005.
- Reis R.C.S., Fernandes E.K.K. & Bittencourt V.R.E.P. Fungal Formulations to Control *Rhipicephalus sanguineus* Engorged Females. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*, 1149:239-241, 2008.
- Samson R.A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6:1-119, 1974.
- Schrank A. & Vainstein M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins *Toxicon*, 56:1267-1274, 2010.
- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17:553-596, 2007a.
- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17:879-920, 2007b.