

## CONTROLE DE *Dermacentor nitens* UTILIZANDO UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL A BASE DE *Metarhizium anisopliae*\*

Wendell Marcelo de Souza Perinotto<sup>1</sup>, Mariana Guedes Camargo<sup>2</sup>, Patricia da Silva Golo<sup>2</sup>, Isabele da Costa Angelo<sup>3</sup>, Simone Quinelato<sup>1</sup>, Caio Márcio de Oliveira Monteiro<sup>4</sup>, Fillipe de Araujo Sá<sup>5</sup>, Caio Júnior Balduino Coutinho Rodrigues<sup>5</sup>, Allan Felipe Marciano<sup>6</sup>, Jéssica Fiorotti de Paulo<sup>6</sup> e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt<sup>7+</sup>

**ABSTRACT.** Perinotto W.M.S., Camargo M.G., Golo P.S., Angelo I.C., Quinelato S., Monteiro C.M.O., Sá F.A., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Marciano A.F., Fiorotti J. P. & Bittencourt V.R.E.P. [**Control of *Dermacentor nitens* using a commercial formulation of *Metarhizium anisopliae*.**] Controle de *Dermacentor nitens* utilizando uma formulação comercial à base de *Metarhizium anisopliae*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl. 2):35-42, 2013. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Anexo 1, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, *Campus Seropédica*, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

*Dermacentor nitens* ticks are commonly found in the equine auditory canal. This ectoparasite causes substantial economic losses due to its direct damage caused by the parasitism, transmission of pathogens, and embargoes during marketing and transport of horses. *Metarhizium anisopliae sensu lato* (s.l.) is a cosmopolitan entomopathogenic fungus, which has been used to control ticks, *in vitro*. Studies have shown that when formulated these entomopathogenic fungi reach an improved percent of control against ticks and insects, what is essential to drive *in vivo* studies and obtain good results in the field. This scenario has aroused the interest of industries that have developed different formulations of entomopathogenic fungi. Metarril WP<sup>®</sup> is a commercial product based on *M. anisopliae* spores used in agricultural pest control, but little is known about their effect against ticks. Accordingly, this study aimed to evaluate the effects of this product on partially engorged females, eggs and larvae of *D. nitens*. The formulations were prepared following manufacturer's recommendations and adjusted to 10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup> conidia mL<sup>-1</sup>, increased by 10 or 0.5 % mineral oil. The biological parameters of engorged females (posture weight, egg production index and nutritional index) were significantly reduced by 10% oily formulations at 10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup> conidia mL<sup>-1</sup>. Different treatments using Metarril WP<sup>®</sup> product yielded control percent of partially engorged females ranging from 10.57 % to 82.48 %. Formulations containing mineral

---

\*Recebido em 9 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 8 de novembro de 2013.

<sup>1</sup> Médico-veterinário, DSc. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Anexo 1, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. Email: wendellufrj@hotmail.com e squinelato@gmail.com - bolsistas de Pós-Doutorado FAPERJ e CAPES

<sup>2</sup> Médico-veterinário, MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: marianacamargo@hotmail.com; patricia\_golo@yahoo.com.br - bolsistas CAPES.

<sup>3</sup> Médica-veterinária, DSc. Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: isabeleangelo@yahoo.com.br;

<sup>4</sup> Biólogo. Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36037-000, Brasil. E-mail: caiosat@gmail.com - bolsista de Pós-Doutorado CAPES.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: llipesa@hotmail.com; caio-jr@hotmail.com - bolsistas de mestrado CAPES.

<sup>6</sup> Curso de Medicina Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: allan\_sjc@yahoo.com.br; jeskvni@gmail.com - bolsistas de iniciação científica CNPq e FAPERJ

<sup>7</sup> Médica-veterinária, PhD. DPA, IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. +Autora para correspondência, E-mail: vaniabit@ufrj.br - bolsista CNPq.

oil also demonstrated high efficacy against eggs and larvae of *D. nitens*. Metarril WP<sup>®</sup> formulated in mineral oil showed to be effective against *D. nitens* in different developmental stages. This is the first report of the effect of this commercial product against *D. nitens* ticks.

KEY WORDS. Ticks, Biological Control, Metarril WP.

**RESUMO.** *Dermacentor nitens*, carrapato encontrado comumente no conduto auditivo de equídeos, é um ectoparasito que causa grandes perdas econômicas devido aos danos diretos causados pelo seu parasitismo, transmissão de patógenos e embargos durante a comercialização e transporte de equinos. *Metarhizium anisopliae* é um fungo entomopatogênico cosmopolita, que vem sendo utilizado no controle *in vitro* de carrapatos. Com intuito de potencializar e viabilizar a utilização destes microrganismos *in vivo*, estudos tem demonstrado que quando formulados, os fungos entomopatogênicos alcançam melhores percentuais de controle sobre as pragas alvo. Isso tem despertado o interesse de indústrias que tem investido na formulação de fungos entomopatogênicos. Metarril WP<sup>®</sup> é um produto comercial a base de *M. anisopliae*, utilizado no controle de pragas agrícolas, porém existem poucos estudos sobre carrapatos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de Metarril WP<sup>®</sup> sobre fêmeas parcialmente ingurgitadas, ovos e larvas de *D. nitens*. As formulações foram preparadas seguindo as recomendações do fabricante e ajustadas para 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL, acrescidas de 0,5 e 10% de óleo mineral. Como resultados pode se observar que os parâmetros biológicos: peso da postura, índice de produção de ovos e índice nutricional das fêmeas semi ingurgitadas, foram significativamente reduzidos pelas formulações oleosas a 10% com 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL, proporcionando percentuais de controle variando de 10,57 a 82,48%. Além disso, também demonstraram eficácia para ovos e larvas de *D. nitens*. Desta forma, pode se concluir que Metarril WP<sup>®</sup> formulado em óleo mineral foi eficaz no controle *in vitro* dos diferentes estágios de desenvolvimento de *D. nitens*. Este é o primeiro relato da eficácia deste produto comercial para esta espécie de carrapato.

PALAVRAS-CHAVE. Carrapatos, controle biológico, Metarril WP.

## INTRODUÇÃO

*Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (= *Anocentor nitens*), popularmente conhecido como “carrapato da orelha dos cavalos”, é encontrado no pavilhão

auricular, divertículo nasal, crina e região perineal do corpo. É um ixodídeo de grande importância para os equídeos, embora outros vertebrados possam servir de hospedeiros (Labruna et al. 2001). Acarreta enfermidades diretas como a Babesiose equina (Roby & Anthony 1963), e indiretas como a perda da audição, queda do desempenho podendo inclusive, levar os animais a morte (Borges et al. 2000).

Para contornar estes problemas, os carrapaticidas químicos têm sido cada vez mais utilizados tanto como medida profilática quanto de tratamento. Porém, o uso de forma indiscriminada tem acarretado problemas como contaminação ambiental, intoxicação de mamíferos e surgimento de cepas de carrapatos resistentes, dificultando ainda mais o controle deste parasito (Bittencourt et al. 1999).

Desta forma, a utilização de métodos alternativos de controle vem sendo cada vez mais viável e neste contexto se enquadra o controle microbiano. Vários são os microrganismos utilizados como agentes controladores de pragas, porém, os fungos têm demonstrado maior potencial no controle de carrapatos, principalmente devido sua capacidade de penetração via cutícula do hospedeiro (Alves 1998).

*Metarhizium anisopliae* (Sorokin, 1883) é um fungo de distribuição mundial, amplamente utilizado para o controle de pragas (Alves 1998). É considerado potencialmente patogênico para o carrapato *Rhipicephalus microplus* (Bittencourt et al. 1994) e apresentou excelentes resultados em tratamentos de ovos (Bittencourt et al. 2000) e larvas (Bittencourt et al. 1999) de *D. nitens* em testes laboratoriais. Entretanto, quando esses fungos são testados em condições *in vivo*, observa-se diminuição na eficácia, devido à influência de diversos fatores, tais como: temperatura, umidade relativa, radiação solar, interferência de mecanismos de defesa do hospedeiro, entre outros (Inglis et al. 2001). Para tentar minimizar os efeitos dos fatores abióticos e favorecer a ação dos microrganismos, diversas pesquisas têm buscado a utilização de formulações com esses fungos (Alves 1998).

Atualmente existem em torno de 171 produtos comerciais à base de fungos em todo o mundo (Fa-

ria & Wraight 2007). A grande maioria destes microcaricidas é indicada para o controle de pragas agrícolas, demonstrando alta eficiência, baixo custo e por isso, vem sendo utilizada em escala industrial. Esse tipo de controle pode ser considerado viável, visto que preserva o meio ambiente, além disso, agrega valores ao produto final, pois a população humana segue a tendência do desenvolvimento sustentável e tem buscado consumir mais alimentos sem contato com produtos químicos (Samish 2004).

No Brasil, um dos principais produtos formulados a base de *M. anisopliae sensu lato* (s.l.) é conhecido como Metarril WP® (MAPA nº6605 – Itaforte Industrial Bio-Produtos Agro-Florestais LTDA), sendo classificado como inseticida biológico e possui ação comprovada sobre *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar), *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar), *Amblyomma cajennense*, entre outros artrópodes (Lopes et al. 2007). Porém, não é conhecido o efeito sobre *D. nitens*, sendo este trabalho pioneiro ao utilizar uma formulação comercial de *M. anisopliae* s.l. sobre esta espécie de carrapato.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar a eficácia *in vitro* de Metarril WP® sobre ovos, larvas e fêmeas semi ingurgitadas de *D. nitens*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de *Dermacentor nitens*

Para realização dos ensaios biológicos, foram coletadas fêmeas semi-ingurgitadas diretamente do conduto auditivo de equídeos naturalmente infestados e sem contato recente com carrapaticidas químicos, em uma propriedade rural situada no município de Seropédica, RJ, Brasil. Essas fêmeas foram levadas ao Laboratório de Controle Microbiano, Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, onde foi realizada a assepsia da cutícula utilizando hipoclorito de sódio a 1%. Posteriormente, parte das fêmeas foi pesada e separada homogeneamente por peso para realização dos ensaios biológicos. Outra parte foi acondicionada em placas de Petri (95 × 15 mm, Fisherbrand®) e mantida em câmaras climatizadas, sob temperatura de 27 ± 1° C e umidade relativa ≥ 80%, para realizarem postura que seriam utilizadas nos ensaios biológicos de ovos e larvas.

### Obtenção da formulação fúngica

A formulação denominada Metarril WP® (pó molhável) foi gentilmente cedida pela empresa Itaforte Industrial Bio-Produtos Agro-Florestais LTDA e armazenada em temperatura de 4 °C.

Para preparação das formulações com Metarril WP®, foram seguidas as recomendações do fabricante, cuja indicação é de uma parte de fungo para oito de água (p:v), esta quantidade de conídio proporciona uma suspensão com aproxima-

damente 10<sup>7</sup> conídios/mL. Além desta concentração, foi feita uma suspensão contendo 10<sup>8</sup> conídios/mL, ambas foram quantificadas utilizando câmara de Neubauer. A partir das suspensões aquosas, foram formuladas as oleosas nas concentrações de 0,5 e 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina LTDA., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para os grupos controle, foram formadas três soluções: água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% e água destilada estéril com Tween 80 a 0,01% acrescida de óleo mineral a 0,5 e 10%. Cada tratamento foi formado por dez repetições.

### Viabilidade das suspensões conidiais

Para avaliação da viabilidade dos fungos, uma amostra de 10 µl da suspensão conidial foi depositada em placa de Petri (95 × 15 mm, Fisherbrand®) contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). As placas foram incubadas sob temperatura de 25 ± 1°C e umidade relativa ≥ 80% e a viabilidade avaliada 24 horas após. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

### Ensaio Biológico

**Fêmeas Semi-Ingurgitadas.** Para a homogeneização do peso das fêmeas semi ingurgitadas destinadas ao tratamento, o número de classes foi calculado através da fórmula de Yule (Sampaio 2002). Cada grupo foi composto por dez fêmeas.

As fêmeas semi ingurgitadas foram colocadas em tubos de ensaio (12 × 75 mm, Fisherbrand®) e imersas em um mL de suspensão fúngica por três minutos, as fêmeas dos grupos controles foram imersas somente ao diluente e as formulações sem conídios, pelo mesmo período de tempo. Após o tratamento, as fêmeas foram fixadas com fita adesiva no interior das placas de Petri (95 × 15 mm, Fisherbrand®), e mantidas em câmara climatizada a temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa ≥ 80%.

O ensaio biológico foi avaliado diariamente para coletar a massa de ovos que foi pesada e armazenada individualmente em pequenos frascos de vidro vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada sob as condições anteriormente descritas. O percentual de eclosão das larvas foi acompanhado diariamente.

Os parâmetros biológicos utilizados para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre fêmeas semi-ingurgitadas de *D. nitens* foram: peso da massa de ovos, percentual de eclosão das larvas e os índices de produção de ovos (IPO) e nutricional (IN), obtidos através das equações segundo Bennett (1974). Além disso, foi calculado o percentual de controle de acordo com a fórmula de Drummond et al. (1971).

**Ovos.** Para este ensaio biológico, foi utilizada a massa de ovos obtida até o décimo dia de postura de fêmeas previamente separadas. Os ovos foram pesados em alíquotas de 50 mg e acondicionados em tubos de ensaio devidamente vedados com algodão hidrófilo. Para realização do tratamento dos ovos foi utilizada a mesma metodologia descrita para fêmeas semi-ingurgitadas. Após o tratamento, os tubos de ensaio foram invertidos para retirar o excesso de suspensão e mantidos em câmara climatizada temperatura de 27 ± 1°C e umidade relativa ≥ 80%. Como parâmetro de avaliação, foi observado diariamente o percentual de eclosão das larvas.

**Larvas.** Tubos de ensaio contendo 50 mg de ovos de *D. nitens* foram mantidos em câmara climatizada até a completa eclosão das larvas. Os tubos de ensaio que não apresentaram eclosão superior a 95% não foram utilizados no ensaio biológico. O tratamento ocorreu no 15º dia após o início da eclosão das larvas e a metodologia utilizada para este ensaio biológico foi à mesma descrita para o de fêmeas e de ovos.

A estimativa do percentual de mortalidade das larvas foi observada a cada três dias, sendo a última leitura realizada ao nono dia pós-tratamento.

### Reisolamento fúngico após o ensaio biológico

Três dias após o término da postura, amostras de fêmeas ingurgitadas de cada tratamento, foram colocadas em câmara úmida e incubadas em câmara climatizada sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  para facilitar o crescimento dos fungos e posterior confirmação de suas características (Rombach et al. 1986).

### Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente conforme a normalidade, ou seja, para os resultados com distribuição normal, foram empregados testes paramétricos, como ANOVA. Teste não-paramétrico, como Kruskal-Wallis foi implicado na análise dos dados de distribuição não normal ou livre. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa estático Bioestatic 5.0.

## RESULTADOS

### Viabilidade dos conídios

Através do teste de viabilidade, foi possível observar que o fungo utilizado no experimento estava viável, demonstrando percentual de germinação de 99% após 24 horas de incubação a  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ .

### Ensaio biológico

**Fêmeas semi-ingurgitadas.** As fêmeas de *D. nitens* dos grupos controle realizaram postura normalmente e os ovos estavam viáveis de acordo com o padrão dos valores normais para esta espécie de carrapato (Drummond et al. 1969). O produto comercial Metarril WP® foi capaz de promover alterações em todos os parâmetros avaliados, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

Analisando separadamente cada parâmetro, o peso da massa total de ovos de *D. nitens* foi significativamente reduzido em todos os tratamentos com Metarril WP®, quando comparado aos grupos controle. Não foi observada redução significativa entre os grupos controle aquoso e controle óleo a 0,5%. As formulações contendo 0,5% e 10% de óleo mineral diferiram significativamente das suspensões aquosas, com exceção da formulação contendo 0,5% de óleo na concentração  $10^7$  conídios/

Tabela 1. Valores do peso e eclosão de fêmeas ingurgitadas de *Dermacentor nitens* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas de Metarril WP Organic® nas concentrações de 1, 3 ou 5% de óleo mineral.

Tratamento	Peso (g) <sup>a</sup>		Percentual de Eclosão <sup>a</sup>
	Inicial da Fêmea	Postura	
Controle Aquoso	0,3205±0,08 <sup>a</sup>	0,2061±0,04 <sup>a</sup>	95,7±2,81 <sup>a</sup>
Controle Oleoso 0,5%	0,3193±0,07 <sup>a</sup>	0,2225±0,06 <sup>a</sup>	93,6±8,42 <sup>a</sup>
Controle Oleoso 10%	0,3107±0,05 <sup>a</sup>	0,1725±0,05 <sup>b</sup>	84,2±9,70 <sup>a</sup>
Metarril Aquoso 107	0,3247±0,08 <sup>a</sup>	0,1857±0,07 <sup>b</sup>	96,4±1,81 <sup>a</sup>
Metarril Oleoso 107 0,5%	0,3229±0,07 <sup>a</sup>	0,1939±0,04 <sup>b</sup>	95,7±3,49 <sup>a</sup>
Metarril Oleoso 107 10%	0,3215±0,07 <sup>a</sup>	0,1067±0,10 <sup>bc</sup>	71,2±36,1 <sup>b</sup>
Metarril Aquoso 108	0,3166±0,06 <sup>a</sup>	0,1686±0,04 <sup>b</sup>	96,1±4,01 <sup>a</sup>
Metarril Oleoso 108 0,5%	0,3219±0,07 <sup>a</sup>	0,1062±0,09 <sup>bc</sup>	96,2±2,68 <sup>a</sup>
Metarril Oleoso 108 10%	0,3218±0,07 <sup>a</sup>	0,0555±0,08 <sup>c</sup>	63,3±5,77 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Média e desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

Tabela 2. Índice de produção de ovos, índice nutricional, eficiência reprodutiva e percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Dermacentor nitens* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas de Metarril WP Organic® nas concentrações de 1, 3 ou 5% de óleo mineral.

Tratamento	Índice (%) <sup>a</sup>		Percentual de Controle
	Produção de Ovos	Nutricional	
Controle Aquoso	67,42±2,12 <sup>a</sup>	82,12±3,61 <sup>a</sup>	—
Controle Oleoso 0,5%	69,23±6,19 <sup>a</sup>	84,98±7,09 <sup>a</sup>	-0,18
Controle Oleoso 10%	54,55±12,17 <sup>a</sup>	72,94±11,86 <sup>a</sup>	17,22
Metarril Aquoso 107	57,97±7,83 <sup>a</sup>	68,33±7,56 <sup>a</sup>	13,65
Metarril Oleoso 107 0,5%	60,25±3,56 <sup>a</sup>	71,48±3,06 <sup>a</sup>	10,57
Metarril Oleoso 107 10%	29,99±25,69 <sup>b</sup>	39,21±30,34 <sup>b</sup>	60,51
Metarril Aquoso 108	52,93±5,12 <sup>b</sup>	64,57±5,08 <sup>a</sup>	21,06
Metarril Oleoso 108 0,5%	35,56±29,47 <sup>b</sup>	42,75±35,42 <sup>b</sup>	46,93
Metarril Oleoso 108 10%	17,85±25,24 <sup>b</sup>	26,64±39,12 <sup>b</sup>	82,48

<sup>a</sup>Média e desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

mL. Porém, foi na maior concentração conidial e de óleo ( $10^8$  conídios/mL a 10% de óleo mineral) que o fungo foi mais eficaz, diminuindo a postura em torno de 75% quando comparado ao grupo controle aquoso.

As formulações oleosas promoveram redução dos índices de produção de ovos e nutricional das fêmeas de *D. nitens*, sendo estas reduções significativas nas concentrações de  $10^7$  conídios/mL a 10% de óleo e  $10^8$  conídios/mL a 0,5 e 10% de óleo. Não foi observada alteração significativa destes parâmetros ao comparar as fêmeas dos diferentes grupos controle e das suspensões aquosas. As formulações com óleo mineral diferiram estatisticamente das suspensões aquosas, com exceção da formulação contendo 0,5% de óleo na concentração de  $10^7$  conídios/mL.

Com relação ao percentual de eclosão das larvas oriundas da postura das fêmeas expostas aos tra-

tamentos com diferentes formulações de Metarril WP®, somente os grupos contendo 10% de óleo mineral, nas concentrações de 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL reduziram significativamente esse parâmetro.

A partir dos parâmetros biológicos das fêmeas de *D. nitens* foi calculado o percentual de controle, cujos valores podem ser observados na tabela 2. Todos os tratamentos promoveram percentuais positivos variando de 10,57 a 82,48%. Além disso, foi observada uma tendência ao aumento do percentual à medida que se aumentou a concentração conidial e de óleo. No presente estudo, utilizando a concentração recomendada pelo fabricante de Metarril WP®, o percentual de controle foi de 10,57%, no entanto, quando utilizamos a concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL com 10% de óleo mineral, o percentual foi de 82,48%.

**Ovos.** As formulações utilizando óleo mineral diferiram estatisticamente das suspensões aquosas, sendo extremamente eficientes independente da concentração de conídios utilizada, com valores do percentual de eclosão das larvas variando de 7,6 a 0%, nas concentrações de 10<sup>7</sup> conídios/mL a 0,5 % de óleo mineral e 10<sup>8</sup> conídios/mL a 10% de óleo mineral, respectivamente. Já as suspensões aquosas influenciaram pouco sobre este parâmetro, demonstrando percentuais de eclosão entre 94,7 a 88,8% nas concentrações de 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle analisados, como pode ser visualizado na tabela 3.

**Larvas.** O percentual de mortalidade foi analisado a cada três dias até o nono dia após o tratamento das larvas. Foi possível observar que tanto as suspensões aquosas quanto as formulações oleosas de Metarril WP® foram eficazes, promovendo morta-

lidade das larvas, como pode ser visto na tabela 4. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle analisados, com percentual de mortalidade de larvas inferior a 1% ao nono dia.

Tabela 4. Percentual de mortalidade de larvas de *Dermacentor nitens* tratadas com suspensões conidiais aquosas ou formulações a base de óleo mineral com conídios de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamento	Percentual de Mortalidade		
	Dia 3	Dia 6	Dia 9
Controle Aquoso	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,6±0,7 <sup>a</sup>
Controle Oleoso 0,5%	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,8±1,0 <sup>a</sup>
Controle Oleoso 10%	0 <sup>a</sup>	0,2±0,42 <sup>a</sup>	0,2±0,42 <sup>a</sup>
Metarril Aquoso 107	57,5±15,0 <sup>b</sup>	91,2±8,6 <sup>b</sup>	98,7±1,4 <sup>b</sup>
Metarril Oleoso 107 0,5%	78,33±17,9 <sup>b</sup>	95,4±8,6 <sup>bc</sup>	99,1±1,6 <sup>b</sup>
Metarril Oleoso 107 10%	83,0±9,5 <sup>b</sup>	94,5±6,7 <sup>bc</sup>	99,8±0,4 <sup>b</sup>
Metarril Aquoso 108	99,2±0,4 <sup>c</sup>	100±0 <sup>c</sup>	100±0 <sup>b</sup>
Metarril Oleoso 108 0,5%	99,6±0,5 <sup>c</sup>	99,9±0,3 <sup>c</sup>	100±0 <sup>b</sup>
Metarril Oleoso 108 10%	96,0 ±3,7 <sup>c</sup>	99,9±0,3	100±0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si estatisticamente (p ≥ 0,05).

## Reisolamento fúngico

As amostras de fêmeas, ovos e larvas de *D. nitens* submetidas ao tratamento com a suspensão aquosa e as formulações oleosas foram incubadas em câmara úmida e apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas, sendo o fungo reisolado e identificado, confirmando assim a infecção. Por isso, pode-se dizer que as alterações observadas sobre *D. nitens* foram pela ação do fungo testado.

## DISCUSSÃO

A eficiência de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico é condicionada pelos fatores abióticos aos quais são submetidos. O interesse no desenvolvimento de alternativas para superação de condições abióticas adversas ao desenvolvimento fúngico tem sido impulsionado por estudos que indicam que conídios formulados em óleo apresentam maior infectividade do que aqueles formulados em suspensões aquosas convencionais (Bateman & Alves 2000). A formulação do fungo em óleo, além de proteger os esporos de radiações ultravioletas (Alves et al. 2002), facilita a adesão e a distribuição do microrganismo na cutícula do artrópode, criando uma condição inicial mais favorável ao desenvolvimento fúngico (Alves 1998). Estudos indicaram que fungos entomopatogênicos em formulações oleosas tiveram sua eficiência aumentada, levando à morte de hospedeiros mesmo em condições adversas ao desenvolvimento fúngico (Bateman et al. 1992, Bateman 1997, Malsam et al. 2002).

Tabela 3. Percentual de eclosão de larvas de *Dermacentor nitens* após o tratamento de ovos com suspensões conidiais ou formulações a base de óleo mineral com *Metarhizium anisopliae*.

Tratamento	Percentual de Eclosão <sup>a</sup>
Controle Aquoso	98,4 ± 1,35 <sup>a</sup>
Controle Oleoso 0,5%	96,6 ± 5,89 <sup>ab</sup>
Controle Oleoso 10%	93,8 ± 2,94 <sup>ab</sup>
Metarril Aquoso 107	94,7 ± 5,72 <sup>ab</sup>
Metarril Oleoso 107 0,5%	7,6 ± 9,05 <sup>c</sup>
Metarril Oleoso 107 10%	0,9 ± 1,1 <sup>c</sup>
Metarril Aquoso 108	88,8 ± 12,0 <sup>b</sup>
Metarril Oleoso 108 0,5%	2,3 ± 2,65 <sup>c</sup>
Metarril Oleoso 108 10%	0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si estatisticamente (p ≥ 0,05).

No ensaio biológico com fêmeas semi-ingurgitadas, o produto comercial Metarril WP® foi capaz de promover alterações em todos os parâmetros avaliados, apresentando maior eficácia em concentrações conidiais e de óleo mais elevadas. Resultados similares foram encontrados por Monteiro et al. (1998) que avaliaram a ação de *Beauveria bassiana* isolado Bb 986 em suspensão aquosa sobre fêmeas ingurgitadas de *D. nitens* e observaram uma diminuição gradativa inversamente proporcional às concentrações de conídios no peso da massa de ovos. A diminuição na produção de ovos é de extrema importância quando se pensa no controle de carrapatos, visto que somente uma fêmea de *D. nitens* é capaz de ovipor mais de três mil ovos.

Neste contexto, pode-se afirmar que a formulação comercial nas concentrações de  $10^7$  conídios/mL a 10% de óleo,  $10^8$  conídios/mL a 0,5 e 10% de óleo foi eficiente em condições laboratoriais, sendo capaz de diminuir os índices de produção de ovos e nutricional das fêmeas de *D. nitens*. Resultados similares foram observados por Angelo et al. (2010) que utilizaram o fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii* tanto em formulação oleosa como em suspensão aquosa no controle de *R. microplus*, os autores puderam observar que somente a suspensão oleosa foi capaz de diminuir o índice de produção de ovos do artrópode testado. Isso também foi observado por Kaaya (2000) que demonstrou que formulações a base de óleo e os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram mais patogênicas para diversas espécies de carrapatos quando comparada com suspensões aquosas, tanto em condições laboratoriais quanto a campo. Estes resultados reforçam a influência da utilização do óleo mineral nas formulações fúngicas.

No presente estudo, foi observada diminuição do percentual de eclosão das larvas oriundas da postura das fêmeas expostas aos tratamentos com diferentes concentrações de Metarril WP®, principalmente nos grupos tratados somente com formulações oleosas. Resultados similares foram observados por Camargo et al. (2012), quando utilizaram formulações oleosas a base de *M. anisopliae* s.l. isolado Ma 959 e *B. bassiana* s.l. isolado Bb 986 no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus in vitro*. Vários trabalhos têm demonstrado que o óleo utilizado nas formulações contendo fungos entomopatogênicos potencializa a ação destes microrganismos (Kaaya 2000; Alves et al. 2000, Angelo et al. 2010, Peng & Xia 2011). Isso provavelmente ocorre devido ao ca-

ráter hidrofóbico da cutícula do carrapato, ou seja, quando as suspensões fúngica contem óleo, aumenta o contato dos conídios com a epicutícula do artrópode cuja camada mais externa é formada por lipídios, com isso há um favorecimento na adesão conidial e propicia o mecanismo de infecção do fungo. Pelo fato do fungo ter melhores condições quando em suspensão oleosa a penetração pode ocorrer de forma mais rápida e com isso influenciar mais intensamente na fisiologia do carrapato. Quando se pensa em um microrganismo para ser utilizado no controle de carrapatos, é importante que este seja capaz de diminuir a quantidade de ovos e também o percentual de eclosão das larvas.

A partir dos parâmetros biológicos das fêmeas de *D. nitens* foi calculado o percentual de controle, onde foi possível observar que todos os tratamentos promoveram percentuais positivos. Além disso, foi observada uma tendência no aumento do percentual à medida que se aumentou a concentração conidial e também de óleo. Castro et al. (1997) também observaram que a medida que se aumentava a concentração de conídios de *M. anisopliae* melhor era o efeito sobre *R. microplus*. Souza et al. (2009) testaram o efeito de *B. bassiana* associada a um gel polimerizado de celulose sobre *D. nitens* em testes a campo, e puderam observar um percentual de controle de até 81,2 %. No presente estudo, utilizando a concentração recomendada pelo fabricante de Metarril WP®, o percentual de controle foi de 10,57%, no entanto, quando utilizamos a concentração de  $10^8$  conídios/ml a 10% de óleo o percentual foi de 82,48%. Esses valores são extremamente positivos dentro do contexto biológico, onde se busca minimizar a população de praga, ao invés de erradicá-la.

A formulação fúngica também foi eficiente sobre ovos, com significativa redução do percentual de eclosão das larvas. Monteiro et al. (2003) testaram suspensões aquosas em diferentes concentrações conidiais de *B. bassiana* sobre ovos de *D. nitens*, e obtiveram um menor percentual de eclosão de larvas expostas a concentração de  $10^8$  conídios/mL (66,44%), porém, não foi significativamente diferente do grupo controle (82,1%). Angelo et al. (2010), avaliaram o efeito do fungo *L. lecanii*, tanto em suspensão aquosa como em formulação oleosa, sobre ovos de *R. microplus* e obtiveram resultados similares ao do presente estudo, cujas formulações oleosas foram melhores que as suspensões aquosas. A partir desses resultados, fica evidenciado a possi-

bilidade de utilização desta formulação também sobre este estágio de *D. nitens*, pois houve diminuição do percentual de eclosão das larvas, efeito desejado dentro de um contexto de controle parasitário.

O percentual de mortalidade das larvas aumentou à medida que se aumentava a concentração conidial. Bittencourt et al. (1999), obtiveram percentuais de mortalidade de larvas de *D. nitens* variando entre 10 a 81%, com o isolado Ma 959, 6 a 97% com o isolado Ma 319, 29 a 99% com o isolado Ma E9, 4 a 98% com o isolado Bb 747, 10 dias após o tratamento com diferentes concentrações de suspensões aquosas dos fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l., nas concentrações de  $10^5$  a  $10^8$  conídios/mL, respectivamente. Ambos os estudos demonstraram a capacidade destes fungos entomopatogênicos atuarem no controle deste carrapato, porém ficou evidenciado alto percentual de mortalidade em menor tempo quando se utilizou o produto formulado (Metarril WP®), principalmente na maior concentração de óleo mineral.

As formulações oleosas atuam de diversas maneiras na proteção e potencialização do desempenho dos fungos entomopatogênicos no controle de artrópodes (Peng & Xia 2001). Esses autores sugerem que este fato está relacionado às características físicas de uma emulsão de água em óleo, pois o óleo mantém o ambiente úmido por mais tempo, evitando a evaporação da água e a água, por possuir um maior calor específico que o óleo, absorve a radiação solar elevando menos a temperatura, evitando desta forma, danos aos conídios. Também deve se levar em consideração o fato das formulações oleosas possuírem melhor espalhamento em relação às suspensões aquosas. Este evento é explicado pela diminuição da tensão superficial do líquido causada pelo óleo, o que facilita o espalhamento dos conídios e a aderência dos mesmos sobre a cutícula do hospedeiro. Desta forma, a proporção de conídios em contato com a cutícula do artrópode é aumentada por formulações a base de óleo, já que um mesmo volume desta formulação irá se espalhar melhor do que um volume equivalente de uma suspensão a base de água (Alves et al. 2001).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a eficácia *in vitro* do produto comercial Metarril WP® formulado em óleo mineral para ovos, larvas e fêmeas semi ingurgitadas de *D. nitens*. Vale ressaltar que este é o primeiro relato da eficácia deste produto comercial para esta espécie de carrapato.

## CONCLUSÃO

O produto comercial Metarril WP® apresenta eficácia para o controle *in vitro* de *D. nitens*. Sendo assim, é indicado a realização de novos estudos *in vivo* para verificar o efeito dessas formulações em programas de controle a campo deste carrapato.

**Agradecimentos.** Esta pesquisa foi financiada pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos também a empresa Itaforte Industrial Bio-Produtos Agro-Florestais LTDA por fornecer o fungo utilizado neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1998. 1163p.
- Alves R.T., Oliveira M.A.S., Bateman R.P., Prior C. & Leather S.R. *Espalhamento e eficiência de uma formulação de fungo à base de óleo adjuvante emulsionável*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa Cerrados, Planaltina, n. 6, p.1-14, 2001.
- Alves S.B., Alves L.F.A., Lopes R.B., Pereira R.M. & Vieira S.A. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera- Culicidae). *J. Appl. Entomol.*, 126:504-509, 2002.
- Angelo I.C., Fernandes E.K.K., Bahiense T.C., Perinotto W.M.S., Moraes A.P.R., Terra A.L.M. & Bittencourt V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 172:317-322, 2010.
- Bateman M.C., Moore D. & Prior C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Ann. Appl. Biol.*, 122:145-152, 1992.
- Bateman R.P. 1997. Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. *Mem. Entomol. Soc. Can.*, 171:69-81, 1997.
- Bateman R.P. & Alves R.T. Delivery systems for mycoinsecticides using oil-based formulations. *Ann. Appl. Biol.*, 57:163-170, 2000.
- Bennett G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia.*, 16:52-61, 1974.
- Bittencourt V.R.E.P., Massard C.L. & Lima A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Rev. Univ. Rur.: Cienc. Vida.*, 16:32-38, 1994.
- Bittencourt V.R.E.P., Menezes G.C.R., Mascarenhas A.G. & Monteiro S.G. Ação dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 sobre larvas do carrapato *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Dia.*, 23:3-4, 1999.

- Bittencourt V.R.E.P., Mascarenhas A.G., Menezes G.C.R. & Monteiro S.G. Ação *in vitro* do *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre ovos do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Med. Vet.*, 22:248-251, 2000.
- Borges L.M.F., Oliveira P.R. & Ribeiro M.F.B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. *Vet. Parasitol.*, 89:165-171, 2000.
- Camargo M.G., Golo P.S., Angelo I.C., Perinotto W.M.S., Sa F.A., Quinelato S. & Bittencourt V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of entomopathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.*, 188:140-147, 2012.
- Castro A.B.A., Bittencourt V.R.E.P., Daemon E. & Viegas E.C. Eficácia *in vivo* do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Rev. Univ. Rur.: Cienc. Vida.*, 19:73-82, 1997.
- Drummond R.O., Whetstone T.M., Ernst S.E. & Gladney W.J. Laboratory study of *Anocentor nitens* (Neumann) (Acarina: Ixodidae), the tropical horse tick. *J. Med. Entomol.*, 6:150-154, 1969.
- Drummond R.O., Gladney W.J., Whetstone T.M. & Ernst S.E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. *J. Econ. Entomol.*, 64:686-688, 1971.
- Faria M.R. & Wraight P.S. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Bio. Control.*, 43:237-256, 2007.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Tariq M.B. & Strasser H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. p.23-69. In: Butt T.M., Jackson C.W. & Magan N. (Eds.), *Fungi as Biological Control Agents*. CABI, Wallingford, 2001.
- Kaaya G.P. Laboratory and field evaluation of entomogenous fungi for tick control. *Ann. New York Acad. Sci.*, 916:559-564, 2000.
- Labruna M.B., Kerber 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, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 97:1-14, 2001.
- 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). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 16:27-31, 2007.
- Malsam O., Kilian M., Oerke E.C. & Dehne H.W. Oils for increased efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control whiteflies. *Biocontrol Sci. Technol.*, 12:337-348, 2002.
- Monteiro S.G., Carneiro M.E., Bittencourt V.R.E.P. & Daemon, E. Efeito do isolado 986 do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 50:673-676, 1998.
- Monteiro S.G., Bahiense T.C. & Bittencourt V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). *Cienc. Rur.*, 33:559-563, 2003.
- Peng G. & Xia Y. The mechanism of the mycoinsecticide diluent on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. *Bio Control.*, 56:893-902, 2011.
- Roby T.O. & Anthony D.W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 142:768-769, 1963.
- Rombach M.C., Humber R.A. & Roberts D.W. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var.nov., a pathogen of plant- and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon*, 27:87-92, 1986.
- Samish M., Ginsberg H. & Glazer I. Biological control of ticks. *Parasitology.*, 129:389-413, 2004.
- Sampaio I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Souza E.J., Costa G.L., Bittencourt V.R.E.P. & Fagundes A.S. Ação do fungo *Beauveria bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens* em teste de campo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:163-169, 2009.