

EFICIÊNCIA *in vitro* DE UMA FORMULAÇÃO OLEOSA DE *Metarhizium anisopliae* SENSU LATO NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus**

Allan Felipe Marciano¹, Jessica Fiorotti de Paula¹, Luciana Aparecida de Souza¹, Mariana Guedes Camargo², Wendell Marcelo de Souza Perinotto³, Isabele da Costa Angelo⁴, Patrícia Silva Gôlo², Fillipe Araujo de Sá⁵, Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues⁵, Simone Quinelato³ e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt⁶⁺

ABSTRACT. Marciano A.F., Fiorotti J.P., Souza L.A., Camargo M.G., Perinotto W. M.S., Angelo I.C., Gôlo P.S., Sá F.A., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Quinelato S. & Bittencourt V.R.E.P. [Efficiency *in vitro* of a oil formulation of *Metarhizium anisopliae sensu lato* in the control of *Rhipicephalus microplus*.] Eficiência *in vitro* de uma formulação comercial de *Metarhizium anisopliae sensu lato* no controle de *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl.2):28-34, 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 23897-970, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

Rhipicephalus microplus is an ectoparasite responsible for great economic losses in cattle industry. In an effort to reduce the use of chemical acaricides, which causes many environmental problems, the research for alternative ways to control ticks, in special the use of formulations of entomopathogenic fungi, has been attracting attention. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of oil-based formulations in different oil concentrations of a commercial product of *Metarhizium anisopliae* (Metarril WP Organic[®]) against eggs, larvae and engorged female of *R. microplus*. Eight groups were formed: an aqueous control group treated only with sterile distilled water and 0.1% Tween 80, a group treated with the aqueous suspension Metarril WP Organic[®], three control groups containing 1, 3 or 5% mineral oil and three groups treated with the oil-based formulations Metarril WP Organic[®] containing 1, 3 or 5% mineral oil. The formulations had a concentration of 10⁸ conidia.mL⁻¹. The treatment consisted of the immersion of the specimens in one mL of suspension tested for three minutes. The biological parameters of engorged females were significantly affected by the oil-based formulations Metarril WP Organic[®], leading to 97.35% efficacy control in the group treated with the fungal oil-based formulation containing 5% mineral oil. In the treatment of eggs, oil-based formulations Metarril WP Organic[®] decreased 55 times larvae hatching when

*Recebido em 9 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 7 de novembro de 2013.

¹ Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil E-mail: allan_sjc@yahoo.com.br; jeskvni@gmail.com; las3souza@ig.com.br

² Médica-veterinária, MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: marianagcamargo@hotmail.com; patricia_golo@yahoo.com.br

³ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: wendellufrj@hotmail.com; squinelato@gmail.com

⁴ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: isabeleangelo@yahoo.com.br

⁵ Médico-veterinário, PPGCV, IV, Anexo 1, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: llipesa@hotmail.com; caio-jr@hotmail.com

⁶ 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.

compared to the control groups. In the treatment of larvae mortality was 100% at fifth day after the treatment with the fungal formulations containing 3 and 5 % mineral oil. These results suggest that the formulations of Metarril WP Organic® containing 1, 3 or 5 % mineral oil are effective *in vitro* against tick developmental stages of *R. microplus*.

KEY WORDS. Cattle ticks, biological control, mineral oil, entomopathogenic fungi.

RESUMO. *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasito responsável por grandes perdas econômicas na pecuária bovina. Na tentativa de diminuir o emprego de produtos químicos e os problemas por eles acarretados, a elaboração de formulações de entomopatógenos vem se destacando nas pesquisas de formas alternativas no combate deste carrapato. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de formulações oleosas de um produto comercial de *M. anisopliae* (Metarril WP Organic®) em diferentes concentrações de óleo mineral, sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Para realização deste estudo, foram formados oito grupos: um grupo controle aquoso, tratado apenas com água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%; um grupo tratado com a suspensão aquosa de Metarril WP Organic®; três grupos controle contendo 1, 3 ou 5% de óleo mineral, e três grupos tratados com as formulações de Metarril WP Organic® contendo 1, 3 ou 5% de óleo mineral. As formulações possuíam a concentração de 10^8 conídios/mL. O tratamento consistiu na imersão dos espécimes em um ml da suspensão testada durante três minutos. Os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas foram significativamente alterados pelas formulações oleosas de Metarril WP Organic®, sendo observado um percentual de controle de 97,35% no grupo tratado com a formulação fúngica contendo 5% de óleo mineral. No tratamento de ovos, as formulações oleosas de Metarril WP Organic® reduziram em até 55 vezes a eclosão das larvas quando comparadas aos grupos controle. No tratamento de larvas, a mortalidade foi de 100% no quinto dia após o tratamento com as formulações fúngicas contendo 3 e 5% de óleo mineral. Estes resultados sugerem que as formulações de Metarril WP Organic® contendo 1, 3 ou 5% de óleo mineral são eficientes, *in vitro*, contra os estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

PALAVRAS-CHAVE. Carrapato dos bovinos, Controle biológico, Óleo mineral, Fungos entomopatogênicos

INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), possui elevada importância para a pecu-

ária brasileira, devido aos prejuízos causados pelo hematofagismo, que lesa o couro e diminui a produção de leite e carne. Além disto, esse carrapato é o principal vetor de agentes patogênicos que provocam graves enfermidades. Todos estes danos causados pelo carrapato *R. microplus* associados aos gastos com o seu controle causam um prejuízo na pecuária brasileira estimado em dois bilhões de dólares anuais (Grisi et al. 2002).

O controle deste carrapato é feito principalmente através do uso de produtos químicos. Esses produtos, quando utilizados de forma inadequada, podem trazer sérios problemas à saúde do homem e dos animais e causar danos ao meio ambiente, além de selecionar populações de carrapatos resistentes devido à forte pressão seletiva (Furlong et al. 2007).

Nesta conjuntura, as pesquisas de formas alternativas à utilização de produtos químicos crescem intensamente, tanto no Brasil quanto em outros países. Desta forma, o controle biológico vem se destacando e os fungos entomopatogênicos mostrando-se agentes promissores no controle microbiano de artrópodes de importância médico veterinária.

Dentre os fungos entomopatogênicos, *Metarhizium* e *Beauveria* têm sido os gêneros mais estudados no controle de carrapatos (Fernandes et al. 2012). Estudos sob condições laboratoriais feitos por Bittencourt et al. (1994) mostram que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae sensu lato* (s.l.) é eficiente contra todos os estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*. Embora a virulência dos fungos entomopatogênicos já tenha sido comprovada em condições de laboratório, sua eficácia diminui consideravelmente quando são testados a campo. O desempenho de fungos entomopatogênicos é afetado por uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, radiação solar, chuvas e ventos, além do microclima no habitat em que o entomopatógeno vive (Inglis et al. 2001).

Vários estudos (Polar et al. 2005, Lopes et al. 2007, Angelo et al. 2010, Rondelli et al. 2011, Santi et al. 2011, Camargo et al. 2012, Perinotto et al. 2012) têm investigado a utilização de formulações contendo óleos vegetais e minerais que viabilizem

a aplicação de biopesticidas a campo, sem que os entomopatógenos presentes percam sua infectividade. Os óleos visam promover maior adesão dos conídios à superfície dos artrópodes e propiciar uma maior proteção à radiação ultravioleta.

Segundo Faria & Wraight (2007), cerca de 171 produtos a base de fungos são comercializados no mundo para o controle de insetos e ácaros. O produto Metarril WP Organic[®] é um produto a base do fungo *M. anisopliae* comercializado no Brasil pela empresa Itaforte BioProdutos para o controle de pragas da agricultura. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da formulação Metarril WP Organic[®] acrescida de 1, 3 e 5% de óleo mineral sobre o carrapato *R. microplus* em condições laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Elaboração das Suspensões e Quantificação dos Inóculos

O produto comercial utilizado no presente trabalho foi o Metarril WP Organic[®], constituído pelos isolados ESALQ 1037 e ESALQ E9 de *Metarhizium anisopliae* e produzido pela empresa Itaforte BioProdutos, do grupo Koppert. Para o preparo da suspensão aquosa 12 g do produto foi diluído em 30 mL de água destilada estéril acrescida de Tween 80 a 0,1%. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e mantida em repouso para a precipitação do inerte, seguindo as recomendações do fabricante. A fase sobrenadante foi retirada e o procedimento descrito acima repetido duas vezes, a fim de se retirar todo o inerte contido no produto comercial. O sobrenadante foi quantificado com auxílio de câmara de Neubauer segundo Alves (1998) e ajustado a concentração 10^8 conídios/mL, obtendo-se assim a suspensão aquosa. As formulações oleosas foram obtidas a partir da suspensão aquosa acrescida de óleo mineral (Vetec[®]) nas concentrações de 1, 3 ou 5%. Sendo assim os bioensaios foram compostos por oito grupos: um grupo controle aquoso, tratado apenas com água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%, um grupo tratado com a suspensão aquosa de Metarril Organic[®], três grupos controle contendo 1, 3 ou 5% de óleo mineral, e três grupos tratados com as formulações de Metarril Organic[®] contendo 1, 3 ou 5% de óleo mineral. Cada grupo continha dez repetições.

Para avaliar a viabilidade dos conídios, foi inoculada uma alíquota de 20 μ L da suspensão aquosa em placa de Petri, contendo meio de cultura BDA com cloranfenicol 0,5% e incubada sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ durante 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta em microscópio óptico e o cálculo da germinação realizado segundo Alves (1998), obtendo-se um percentual de germinação através do número de conídios germinados e o total de conídios contados, multiplicados por 100.

Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram obtidas a partir da infestação artificial de bezerros estabelecidos (submetido à Comissão de Ética da UFRRJ, protocolo

2083.011620/2011-68) sem contato recente com carrapaticidas químicos no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Para garantir a assepsia da cutícula as fêmeas foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos. Posteriormente, parte das fêmeas foi pesada e separada homogeneamente por peso para realização do bioensaio, enquanto outra parte foi acondicionada em placas de Petri e incubada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ para realização de postura para os bioensaios com ovos e larvas.

Ensaio Biológico

Fêmeas Ingurgitadas. As fêmeas ingurgitadas foram homogeneizadas quanto ao peso utilizando a fórmula de Yule (Sampaio, 2002) para determinação do número de classes e a divisão das fêmeas entre os grupos. Foram utilizadas dez fêmeas ingurgitadas por grupo. A metodologia utilizada para o tratamento das fêmeas ingurgitadas foi a mesma utilizada por Camargo et al. (2012). O bioensaio foi avaliado diariamente para verificar a presença de fêmeas mortas e também para coletar a massa de ovos que foi pesada e armazenada em pequenos frascos de vidro vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada. O percentual de eclosão das larvas foi acompanhado diariamente.

Os parâmetros biológicos utilizados para avaliar o efeito do fungo sobre fêmeas ingurgitadas foram: peso da massa de ovos, percentual de eclosão das larvas, índices de produção de ovos (IPO = peso da massa de ovos/peso inicial da fêmea x 100) e nutricional (IN = peso da massa de ovos/peso inicial da fêmea - peso residual da fêmea x 100) (Bennett, 1974). Além disso, a eficiência reprodutiva (ER = peso da massa de ovos/peso inicial da fêmea ingurgitada x percentual de eclosão) foi utilizada para calcular o percentual de controle (PC = média da ER do controle - média da ER do grupo tratado/ média da ER do grupo controle x 100) (Drummond et al. 1971).

Ovos. Os ovos foram separados no 10^o dia de postura, pesados em alíquotas de 50 mg e acondicionados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo. Em cada tubo foi colocado um mL da respectiva suspensão ou formulação testada, que ficou em contato com os ovos por três minutos. Em seguida, os tubos foram invertidos para retirar o excesso da suspensão/formulação, sendo esta absorvida pelo algodão. Os tubos contendo os ovos tratados foram mantidos em câmara climatizada sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$. Cada grupo possuía dez réplicas. Como parâmetro de avaliação, foi observado diariamente o percentual de eclosão das larvas.

Larvas. Alíquotas de 50 mg de ovos foram acondicionada em tubos de ensaio e incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ até a completa eclosão das larvas. Os tubos que não apresentaram eclosão superior a 95% foram descartados. A metodologia para o tratamento de larvas foi a mesma utilizada para o tratamento de ovos. O percentual de mortalidade das larvas foi observado a cada três dias após a realização do tratamento.

Reisolamento fúngico

Três dias após o término da postura, amostras de fêmeas de todos os grupos foram colocadas em câmara úmida e incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ para facilitar o crescimento dos fungos e posterior confirmação de suas características (Samson & Evans 1982).

Análise estatística

Para análise dos dados paramétricos (peso da massa de ovos) foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias, com nível de significância de 5%. Os dados não paramétricos (percentuais de eclosão e de mortalidade das larvas e os índices de produção de ovos e nutricional) foram submetidos à análise de Kruskal Wallis, seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as ordenações médias, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Através do teste de viabilidade, foi possível observar que o fungo utilizado no experimento estava viável, demonstrando percentual de germinação maior que 99% após 24 horas.

Ensaio Biológico

Fêmeas Ingurgitadas. O peso das fêmeas utilizadas não variou significativamente, uma vez que as mesmas foram distribuídas de forma homogênea em cada grupo, sendo assim este parâmetro não interferiu nos resultados obtidos (Tabela 1).

O peso da postura não apresentou diferença significativo entre os grupos, controle aquoso, controle oleoso 1, 3 e 5%, Metarril aquoso e Metarril oleoso 1%. Entretanto, conforme observado na tabela 1, nos grupos Metarril oleoso 3% e 5% houve redução significativa da postura em até 4,2 vezes e 28,1 vezes, respectivamente, quando comparados ao grupo Metarril aquoso.

Os grupos tratados com formulação de Metarril contendo 3 e 5% de óleo mineral, apresentaram redução significativa no percentual de eclosão das larvas quando comparados aos demais grupos, não havendo diferença significativa neste parâmetro

entre os grupos controle aquoso, oleoso 1, 3 e 5%, Metarril aquoso e Metarril oleoso (Tabela 1).

As formulações fúngicas contendo 3 e 5% de óleo mineral reduziram significativamente o índice de produção de ovos, o índice nutricional e a eficiência reprodutiva, quando comparados aos demais grupos (Tabela 2). O grupo tratado com a formulação de Metarril contendo 1% de óleo mineral diferiu estatisticamente dos grupos controle aquoso e controle oleoso 1%, entretanto não houve diferença significativa entre o Metarril oleoso 1% e os controles oleosos 3 e 5% e o Metarril aquoso nos índices de produção de ovos e nutricional e na eficiência reprodutiva (Tabela 2).

As formulações de Metarril contendo 1, 3 e 5% de óleo mineral apresentaram percentuais de controle de 22,66, 85,26 e 97,35%, respectivamente (Tabela 2).

Ovos. Não foi observada diferença significativa no período de incubação entre os grupos avaliados

Tabela 1. Valores do peso e eclosão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 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) ¹		Percentual de Eclosão ¹
	Inicial da Fêmea	Postura	
Controle Aquoso	0,2468 ^a ±0,03	0,1470 ^a ±0,02	96,65 ^a ±3,43
Controle Oleoso 1%	0,2498 ^a ±0,03	0,1477 ^a ±0,02	95,21 ^a ±7,35
Controle Oleoso 3%	0,2488 ^a ±0,03	0,1424 ^a ±0,02	93,88 ^a ±6,85
Controle Oleoso 5%	0,2546 ^a ±0,03	0,1375 ^a ±0,02	87,07 ^a ±18,70
Metarril Aquoso	0,2493 ^a ±0,03	0,1378 ^a ±0,03	96,50 ^a ±3,38
Metarril Oleoso 1%	0,2558 ^a ±0,03	0,1224 ^a ±0,03	92,33 ^a ±11,81
Metarril Oleoso 3%	0,2485 ^a ±0,03	0,0321 ^b ±0,05	20,30 ^b ±33,64
Metarril Oleoso 5%	0,2496 ^a ±0,03	0,0049 ^b ±0,01	15,76 ^b ±35,25

¹Média e desvio padrão. ^aMédias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (p > 0,05).

Tabela 2. Índice de produção de ovos, índice nutricional, eficiência reprodutiva e percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 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 ¹ (%)		Eficiência Reprodutiva ^a (%)	Percentual de Controle ¹
	Produção de Ovos	Nutricional		
Controle Aquoso	59,64 ^a ±3,68	73,45 ^a ±4,31	57,66 ^a ±4,35	-----
Controle Oleoso 1%	59,09 ^a ±6,43	70,97 ^a ±4,81	56,59 ^a ±8,56	1,85
Controle Oleoso 3%	57,37 ^a ±5,36	65,27 ^{ab} ±4,91	53,86 ^{ab} ±6,48	6,59
Controle Oleoso 5%	54,39 ^{ab} ±9,62	66,33 ^{ab} ±8,72	48,24 ^{ab} ±14,94	16,34
Metarril Aquoso	55,09 ^{ab} ±7,81	64,98 ^{ab} ±6,56	53,14 ^{ab} ±7,64	7,85
Metarril Oleoso 1%	48,34 ^b ±12,54	57,98 ^b ±11,33	44,59 ^b ±12,66	22,66
Metarril Oleoso 3%	12,59 ^c ±20,18	16,50 ^c ±24,33	8,49 ^c ±17,10	85,26
Metarril Oleoso 5%	2,12 ^d ±4,49	3,80 ^d ±8,02	1,53 ^d ±3,84	97,35

¹Média e desvio padrão. ^aMédias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (p > 0,05).

(Tabela 3). Também não houve diferença estatística no período de eclosão entre os grupos controle aquoso, controle oleoso 1, 3 e 5% e Metarril aquoso. Não foi possível realizar a análise estatística dos grupos tratados com as formulações de Metarril contendo 1, 3 e 5% de óleo mineral devido ao número reduzido de amostras (Tabela 3).

A suspensão aquosa e as formulações oleosas de Metarril mostraram-se capazes de reduzir significativamente o percentual de eclosão das larvas quando comparadas com os grupos controle (Tabela 3). As formulações de Metarril Organic® contendo 1, 3 e 5% de óleo mineral reduziram a eclosão das larvas em mais de 40 vezes, quando comparadas ao grupo tratado com a suspensão aquosa.

Larvas. Quando testada nas larvas as formulações de Metarril contendo 1, 3 e 5% de óleo mineral mostraram-se capazes de potencializar de forma significativa a ação do produto testado, produzindo elevada mortalidade nos primeiros dias após o tratamento (Tabela 4). Os grupos tratados com as

formulações oleosas de Metarril apresentaram um percentual de mortalidade variando entre 99,7 e 100% no quinto dia após tratamento, enquanto o grupo tratado com a suspensão aquosa de Metarril apresentou mortalidade de 62%, e os grupos controle apresentaram 0% de mortalidade no mesmo período (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que as formulações de Metarril WP Organic® contendo 1, 3 ou 5 % de óleo mineral foram eficientes contra ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, em condições de laboratório. A utilização e importância de formulações de entomopatógenos no controle de carrapatos têm sido amplamente estudadas (Kaaya & Hassan 2000, Maranga et al. 2005, Polar et al. 2005, Lopes et al. 2007, Leemon et al. 2008, Reis et al. 2008, Souza et al. 2009, Ángel-Sahagún et al. 2010, Angelo et al. 2010, Jackson et al. 2010, Peng & Xia 2011, Camargo et al. 2012). Os óleos utilizados como adjuvantes em formulações evitam a dessecação dos conídios sobre elevadas temperaturas, diminuindo a evaporação da água e mantendo o ambiente úmido por mais tempo para atender as necessidades hídricas exigidas pelos entomopatógenos. No presente estudo o produto Metarril WP Organic® teve seu efeito potencializado pelo óleo mineral contra todos os estágios de desenvolvimento avaliados do carrapato *R. microplus*. Estes resultados concordam com os resultados encontrados por Angelo et al. (2010), que formularam *Lecanicillium lecanii* em 15% de óleo mineral e verificaram diferenças significativas em todos os estágios de desenvolvimento de *R. microplus*.

Tabela 3. Valores do período de incubação, período de eclosão e percentual de eclosão do tratamento de ovos de *Rhipicephalus microplus* imersos em suspensão aquosa ou formulações oleosas de Metarril WP Organic® nas concentrações de 1, 3 ou 5% de óleo mineral.

Tratamento	Período em dias ¹		Eclosão(%)
	Incubação	Eclosão	
Controle Aquoso	23,0 ^a ±0,0	5,7 ^a ±0,76 ^a	98,9 ^a ±0,38
Controle Oleoso 1%	23,0 ^{ab} ±0,0	4,8 ^a ±0,83 ^a	97,9 ^{ab} ±1,69
Controle Oleoso 3%	23,0 ^{ab} ±0,0	5,3 ^a ±0,48 ^a	98,1 ^{ab} ±1,29
Controle Oleoso 5%	23,0 ^{ab} ±0,0	5,7 ^a ±0,71 ^a	98,0 ^{ab} ±1,73
Metarril Aquoso	23,0 ^b ±0,0	5,7 ^a ±1,25 ^a	94,1 ^b ±4,45
Metarril Oleoso 1%	23,0 ^c ±0,0	-----	1,78 ^c ±1,30
Metarril Oleoso 3%	23,0 ^c ±0,0	-----	1,88 ^c ±3,31
Metarril Oleoso 5%	23,0 ^c ±0,0	-----	2,2 ^c ±2,31

¹Média e desvio padrão. ^aMédias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Tabela 4. Valores do percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas de Metarril Organic® nas concentrações 1, 3 ou 5% de óleo mineral nos diferentes dias após o tratamento e mantidas a temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa ≥ 80%.

Tratamento	Período em dias ¹				
	5°	10°	15°	20°	25°
Controle Aquoso	0,0 ^a ±0	0,0 ^a ±0	0,2 ^a ±0,63	0,2 ^a ±1,58	0,5 ^a ±1,52
Controle Oleoso 1%	0,0 ^a ±0	0,1 ^a ±0,33	0,4 ^a ±0,53	0,4 ^a ±0,53	1,2 ^a ±0,83
Controle Oleoso 3%	0,0 ^a ±0	0,2 ^a ±0,42	0,3 ^a ±0,48	0,5 ^a ±0,53	1,0 ^a ±0,47
Controle Oleoso 5%	0,0 ^a ±0	0,0 ^a ±0	0,4 ^a ±0,51	0,4 ^a ±0,51	1,0 ^a ±0,47
Metarril Aquoso	62,0 ^b ±26,47	75,6 ^b ±25,37	93,9 ^b ±10,34	97,4 ^b ±6,15	100,0 ^b ±0
Metarril Oleoso 1%	99,7 ^b ±0,67	99,7 ^{bc} ±0,67	99,7 ^b ±0,67	100,0 ^b ±0	100,0 ^b ±0
Metarril Oleoso 3%	100,0 ^c ±0	100,0 ^c ±0	100,0 ^b ±0	100,0 ^b ±0	100,0 ^b ±0
Metarril Oleoso 5%	100,0 ^c ±0	100,0 ^c ±0	100,0 ^b ±0	100,0 ^b ±0	100,0 ^b ±0

¹Média e desvio padrão. ^aMédias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (p> 0,05).

A cutícula dos carrapatos possui característica hidrofóbica conferida por sua constituição, que apresenta quitina, proteína e lipídeo (Prior et al. 1988, Sonenshine 1991, Jenkins et al. 1998). Desta forma, os conídios que são suspensos somente em meio aquoso têm a adesão à cutícula do hospedeiro dificultada. No presente estudo, as formulações oleosas de Metarril WP Organic® foram mais eficientes sobre *R. microplus* quando comparadas à suspensão aquosa. Estes resultados podem ser explicados pelo aumento da afinidade dos conídios com a cutícula dos carrapatos, proporcionado pelo adjuvante oleoso utilizado nas formulações, aumentando também a adesão dos conídios à cutícula dos carrapatos, o que potencializa a infectividade e, conseqüentemente a patogenicidade do isolado fúngico. Outros autores (Polar et al. 2005, Kaaya 2006, Angelo et al. 2010, Camargo et al. 2012) encontraram resultados similares ao testarem suspensões aquosas e formulações oleosas contra diversas espécies de carrapatos.

As formulações oleosas de Metarril WP Organic® nas concentrações de 3 e 5% de óleo mineral reduziram significativamente o índice de produção de ovos, o índice nutricional e a eficiência reprodutiva de *R. microplus*. A alteração nos parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas pode ser considerada um dos pontos-chave para o controle de carrapatos, já que a redução do número total de ovos, bem como da viabilidade dos mesmos, comprometerá as gerações subseqüentes e reduzirá a população de carrapatos no ambiente (Perinotto et al. 2012).

Além das alterações nos parâmetros biológicos no tratamento de fêmeas, as formulações oleosas de Metarril WP Organic® influenciaram significativamente os parâmetros avaliados nos tratamentos de ovos e larvas de *R. microplus*. Camargo et al. (2012) ao avaliarem o efeito de formulações oleosas dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre ovos, larvas e fêmeas de *R. microplus* observaram que as formulações fúngicas alteraram significativamente todos os estágios de desenvolvimento do carrapato. Estes pesquisadores encontraram percentual de eclosão de larvas provenientes de ovos tratados com as formulações oleosas de *M. anisopliae* variando entre 0,94 e 2,19% e percentual de mortalidade de larvas tratadas com as mesmas formulações de quase 100% no quinto dia após o tratamento. No presente trabalho, foi observada diminuição significativa no percentual de eclosão de larvas oriundas do tratamento de ovos e mortalidade elevada das larvas

tratadas com as formulações fúngicas no quinto dia após o tratamento, indicando que as formulações oleosas de Metarril WP Organic® foram eficientes contra as diversas fases de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

A formulação em que os conídios são aplicados é de fundamental importância para o biocontrole de carrapatos, pois atua na manutenção da viabilidade, virulência e eficácia dos entomopatógenos em nível de campo, promovendo maior adesão dos conídios à superfície dos artrópodes e propiciando proteção contra as condições ambientais adversas. Estudos que busquem inertes e adjuvantes ideais visando manter estas características dos agentes biológicos são importantes para o desenvolvimento de formulações realmente eficientes em condições ambientais.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que as formulações de Metarril WP Organic® contendo 1, 3 e 5% de óleo mineral foram eficientes contra ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* em condições laboratoriais. Estas formulações podem ser ferramentas importantes no controle alternativo deste carrapato, entretanto testes *in vivo* são necessários para avaliar a aplicação e ação destas formulações em condições naturais no controle integrado do carrapato dos bovinos.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi executada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Agradecemos ao Instituto Universitário de Pesquisas Melhorar (CAPES) por fornecer aos Mestrandos e Doutorandos as bolsas de estudo, e 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*. 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*. *Vet. Parasitol.*, 172:317-322, 2010.
- Ángel-Sahagún C.A., Lezama-Gutiérrez R., Molina-Ochoa J., Pescador-Rubio A., Skoda S.R., Cruz-Vázquez C., Lorenzon A.G., Galindo-Velasco E., Fragozo-Sánchez H. & Foster J.E. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce

- larval tick density under field conditions. *Vet. Parasitol.*, 170:278-286, 2010.
- 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* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Rev. Univ. Rur.: Cienc. Vida*, 16:49-55, 1994.
- 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 entomopathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.*, 188:140-147, 2012.
- 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 S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*, 43:237-256, 2007.
- Fernandes E.K.K., Bittencourt V.R.E.P. & Roberts D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp. Parasitol.*, 130:300-305, 2012.
- 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 Vet.*, 27:53-56, 2007.
- Grisi L., Massard C.L., Borja G.E.M. & Pereira J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.*, 21:23-28, 2002.
- 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.
- Jackson M.A., Dunlap C.A. & Jaronski S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*, 55:129-145, 2010.
- Jenkins N.E., Hevief G., Langewald J., Cherry A.J. & Lomer C.J. Development of massproduction technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inform.*, 19:21-31, 1998.
- Kaaya G.P. Laboratory and Field Evaluation of Entomogenous Fungi for Tick Control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 916:559-564, 2006.
- Kaaya G.P. & Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp. Appl. Acarol.*, 24: 13-926, 2000.
- Leemon D.M. & Jonsson N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 97:40-49, 2008.
- 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.
- Maranga R.O., Kaaya 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*, 159:527-532, 2005.
- Peng G. & Xia Y. The mechanism of the mycoinsecticide diluent on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. *Biocontrol*, 56:893-902, 2011.
- Perinotto W.M.S., Angelo I.C., Golo P.S., Camargo M.G., Sá F.A., Monteiro C.M.O., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Quinelato S., Marciano A.F. & Bittencourt V.R.E.P. Eficiência da formulação comercial de *Beauveria bassiana* no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 34:95-101, 2012.
- 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.
- Prior C., Jollands P. & Le Patourel G. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera:Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 52:66-72, 1988.
- Reis R.C.S., Fernandes E.K.K. & Bittencourt V.R.E.P. Fungal Formulations to Control *Rhipicephalus sanguineus* Engorged Females. *Anim. Biodiv. Emerg. Dis.*, 1149:239-241, 2008.
- Rondelli V.M., Pratissoli D., Polanczyk R.A., Marques E.J., Sturm G.M. & Tiburcio M.O. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 46:212-214, 2011.
- Sampaio I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. FEPMVZ- Editora, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Samson R.A. & Evans H.C. Two new *Beauveria* spp. from South America. *J. Invertebr. Pathol.*, 39:93-97, 1982.
- Santi L., Silva L.A.D., Silva W.O.B., Corrêa A.P.F., Rangel D.E.N., Carlini C.R., Schrank A. & Vainstein M.H. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. *World J. Microb. Biot.*, 27:2297-2303, 2011.
- Sonenshine D.E. *Biology of ticks*. Oxford University Press, Norfolk, 1991. 447p.