

PATOGENICIDADE *IN VITRO* DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883, SOBRE O CARRAPATO *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)*

DENISE R. DE MELO¹; ROSANA C.S. REIS²; VÂNIA RITA E.P. BITTENCOURT³

ABSTRACT: - MELO, D.R. DE; REIS, R.C.S. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. [*In vitro* pathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).] Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, n. 4, p. 157-162, 2006. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ, 23890-000, Brazil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

The cattle tick *Boophilus microplus* is a serious concern to the Brazilian cattle industry. It causes decreased meat and milk production, low alimentary conversion, damage to leather and transmission of pathogens. The use of entomopathogenic fungi as biological control agents for ticks has shown promising results. This study tests the *in vitro* effects of two *Metarhizium anisopliae* isolates (E9 and 319) towards three stages of *B. microplus*: eggs, larvae and engorged females. The bioassays were composed of five treatment groups (concentrations: 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ conidia/ml and the control) each one with ten repetitions. The stages were treated by immersion for three minutes. After the treatments, the females, eggs and larvae were incubated at 27°C ± 1 and RH ≥ 80%. The main studied parameters were: percentage of larvae eclosion, percentage of larvae mortality and the indexes of nutritional and reproductive efficiency. *In vitro* tests of the fungal isolates showed effective control of the three stages of *B. microplus*, suggesting high potential for their use as a microbial control agent of the *B. microplus* tick.

KEY WORDS: Control biological, entomopathogenic fungi, tick, *Boophilus microplus*.

RESUMO

O *Boophilus microplus* é uma espécie de carrapato que causa grandes prejuízos a bovinocultura brasileira. Entre os danos causados por este carrapato verificamos a diminuição na produção de carne e leite, baixa conversão alimentar, prejuízos ao couro e transmissão de patógenos. Visando o controle biológico desta espécie de carrapato estudou-se, *in vitro*, os efeitos causados pelos isolados E9 e 319 do fungo *Metarhizium anisopliae*, sobre os estágios não parasitários do *B. microplus*. Os ensaios biológicos foram realizados utilizando-se cinco tratamentos (concentrações 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ conídios/ml e o controle) com dez repetições. Os estágios testados foram

imersos na suspensão fúngica por três minutos. Após os tratamentos as fêmeas, os ovos e as larvas foram mantidos à 27°C ± 1 3 80% UR. Os principais parâmetros avaliados foram: percentual de eclosão de larvas, percentual de mortalidade das larvas, e os índices de eficiência nutricional e reprodutiva. Os isolados testados demonstram ação deletéria em testes *in vitro* sobre a fase não parasitária, sugerindo, seu potencial para utilização no controle microbiano do carrapato *B. microplus*.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, fungos entomopatogênicos, carrapato, *Boophilus microplus*.

INTRODUÇÃO

No Velho Mundo, a espécie *Boophilus microplus* é considerada como importante vetor de doenças para bovinos (EVANS et al., 2000). Segundo Cordovés (1997), algumas perdas devidas a este carrapato são: diminuição da produção de leite, deterioração da qualidade do couro e transmissão de agentes patogênicos. Vários trabalhos (CORDOVÉS, 1997;

*Sob os auspícios da CAPES/PROEX.

¹ Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000. Bolsista CAPES.

² Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Roraima (UFRR), Km 12 da BR 174, Boa Vista, RR 69300-000.

³ Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, pesquisadora do CNPq. E-mail: vaniabit@ufrj.br

GRISI et al., 2002) citam que entre as espécies de carrapatos que acometem o bovino, a espécie *B. microplus* é a que causa maiores prejuízos à bovinocultura brasileira.

No Brasil, já foram realizados vários experimentos visando o controle biológico de ixodídeos utilizando fungos entomopatogênicos, onde vários autores já puderam observar a eficácia de alguns isolados em laboratório e a campo (BITTENCOURT et al., 1997; CORREIA et al., 1998; SOUZA et al., 1999; FRAZZON et al., 2000; BITTENCOURT et al., 2003 e BASSI et al., 2005).

O fungo *Metarhizium anisopliae* foi o primeiro agente utilizado no controle microbiano descrito na literatura, sua ação patogênica atualmente é comprovada para diferentes espécies de carrapatos. Pensa-se que esse patógeno ocorra naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos e ácaros de diferentes ordens (ALVES, 1998).

As pesquisas utilizando microrganismos para o controle do carrapato ainda se encontram em caráter inicial, e vários pesquisadores têm-se dedicado ao estudo de infecções experimentais por fungos e constatado resultados satisfatórios, em diferentes espécies de carrapatos com diferentes isolados fúngicos, principalmente em testes em condições laboratoriais (BITTENCOURT et al., 1994a, 1994b, 1997, COSTA et al., 2002, REIS et al., 2004).

O aparecimento de resistência aos produtos químicos, devido a utilização indiscriminada de carrapaticidas, tem estimulado a procura de novas alternativas de controle desse ectoparasito (SANGSTER et al., 2001). Segundo este autor, há uma necessidade urgente em desenvolver métodos melhorados para a descoberta do mecanismo de resistência, e elaborar esquemas para administração do parasita de forma integrada.

Esse trabalho teve o objetivo de avaliar a patogenicidade *in vitro* dos isolados 319 e E9 do fungo *M. anisopliae*, sob a fase não parasitária do carrapato *B. microplus*, utilizando uma suspensão fúngica aquosa em diferentes concentrações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados de *M. anisopliae* utilizados no experimento foram cedidos pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo. Os isolados testados foram 319 (isolado de formiga) e E9 (isolado padrão).

Os fungos foram produzidos em sacos de polipropileno contendo 60 gramas de arroz e 30ml de água destilada e levados ao autoclave por 20 minutos a 120°C segundo Bittencourt et al. (1994a). Após o resfriamento, foram inoculados com os isolados de fungos entomopatogênicos a serem testados e levados à câmara climatizada com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade $\geq 80\%$, onde foram homogeneizados manualmente durante 15 dias ou até o desenvolvimento micelial.

Os ensaios biológicos realizados com os estágios de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas foram constituídos de um grupo controle e quatro grupos tratados com as concentrações 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml, sendo que para cada tratamento foram realizadas dez repetições.

As suspensões foram preparadas em copo Griffin com 100ml de água destilada estéril e 0,1% Tween 80. Após agitação, uma amostra da suspensão foi colocada na câmara de Neubauer e levada ao microscópio óptico para leitura do número de conídios (ALVES; MORAES, 1998). Preparou-se uma suspensão na concentração de $1,72 \times 10^8$ conídios/ml, para o isolado 319 e de $1,40 \times 10^8$ conídios/ml para o isolado E9. Através da realização de uma diluição seriada, as suspensões 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/ml foram preparadas a partir da suspensão com 10^8 conídios/ml. Para o grupo controle foi utilizadas apenas água destilada estéril e Tween 80 (0,1%).

Para a realização dos ensaios biológicos, fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram coletadas de bovinos naturalmente infestados e levadas ao laboratório para proceder a assepsia da cutícula. Nesse procedimento lavam-se as fêmeas em água corrente, depois as mergulha em solução de hipoclorito a 1%, durante três minutos, em seguida são novamente lavadas em água destilada e secas em papel toalha estéril.

Posteriormente foram separadas em dois grupos. O primeiro grupo foi composto de 100 indivíduos escolhidos aleatoriamente, que após separação foram utilizados no ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas. O segundo grupo foi composto de 90 fêmeas, que foram acondicionadas em placas de Petri e levadas à câmara climatizada com temperatura e umidade já descritas para a obtenção da postura. A massa de ovos obtida dessas fêmeas foi utilizada para a realização dos ensaios biológicos com ovos e larvas.

O teste estatístico utilizado foi o de Kruskal-Wallis com nível de significância ($p < 0,05$) seguido pelo teste de Dunn's. A análise de Próbites segundo Finney (1964 e 1971) e Litchfield e Wilcoxon (1949) foi utilizada para calcular a concentração letal (CL 50 e CL 90).

Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas

As suspensões fúngicas preparadas, nas diferentes concentrações, foram utilizadas para a imersão das fêmeas ingurgitadas, durante três minutos. Decorrido esse período as fêmeas foram secas em papel toalha, pesadas em balança analítica e fixadas em placa de Petri sobre fita adesiva dupla face. Para facilitar a coleta das posturas, as fêmeas foram fixadas em decúbito dorsal. Após identificação, as placas com as fêmeas foram colocadas em câmara climatizada com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade $\geq 80\%$.

Diariamente a massa de ovos de cada fêmea foi individualmente recolhida, pesada em balança analítica e acondicionada em tubo de ensaio (10mm X 14mm) também individual. Os tubos contendo ovos foram vedados com algodão hidrófilo e levados à câmara climatizada, para o acompanhamento dos parâmetros relativos a esta fase evolutiva. Três dias após o término da postura, as fêmeas foram pesadas e a assepsia da cutícula foi realizada. Em seguida foram distribuídas em câmara úmidas com o objetivo de observar o crescimento fúngico e suas respectivas características macro e microscópicas.

Na análise da ação fúngica sobre as fêmeas, foram avaliados os seguintes parâmetros: peso da fêmea; período de pré-

postura, período de postura; peso da postura; período de incubação; período de eclosão; percentual de eclosão das larvas; peso da fêmea após a morte; índices de eficiência nutricional e reprodutiva; eficiência reprodutiva e percentual de controle.

Ensaio biológico com ovos

Dez dias após o início das posturas, os ovos foram pesados em balança analítica segundo a metodologia preconizada por Alvarado e Gonzales (1979). Alíquotas de 50mg de ovos foram acondicionados em tubos de ensaio devidamente identificados e vedados com algodão hidrófilo. Cada grupo recebeu 1ml da suspensão a ser testada, onde os ovos permaneceram imersos por três minutos. Decorrido esse período os tubos foram invertidos para que a suspensão fosse absorvida pelo algodão. Após o tratamento esses tubos com ovos foram colocados em câmara climatizada com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade $\geq 80\%$. Na avaliação dos efeitos do *M. anisopliae* sobre ovos foram avaliados os parâmetros: período de incubação; período de eclosão; percentual de eclosão e mortalidade das larvas após a eclosão, para tal os tubos com ovos foram observados diariamente.

Os ovos que não eclodiram foram mergulhados em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por um minuto, em seguida mergulhados em água destilada estéril, também por um minuto, foram secos em papel toalha e colocados em câmara úmida sob temperatura e umidade controladas e já descritas, para observação do desenvolvimento fúngico.

Ensaio biológico com larvas

Assim como para os ensaios biológicos com ovos, seguindo a metodologia de Alvarado e Gonzales (1979), as larvas utilizadas no experimento foram obtidas através da pesagem de 50mg de massa de ovos no décimo dia após início da postura. Esses ovos foram colocados em tubos de ensaio, identificados e vedados com algodão hidrófilo e levados à câmara climatizada com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade $\geq 80\%$. Foi colocado 20% a mais de tubos com ovos, para fossem selecionados os tubos com o maior percentual

de eclosão das larvas. Desta forma, quinze dias após término da eclosão foram selecionados os 100 tubos com aproximadamente 100% de eclosão das larvas para serem utilizados no experimento.

Com o auxílio de uma seringa e agulha estéril, cada grupo recebeu um mililitro da suspensão a ser testada, permanecendo imerso por três minutos. Após esse período os tubos foram invertidos para que a suspensão fosse absorvida pelo algodão. O material foi colocado em câmara climatizada com temperatura e umidade já citadas. Dez dias após o tratamento foi feita a avaliação do efeito dos isolados, através da observação do índice de mortalidade das larvas tratadas.

Assim como para os ensaios biológicos com fêmeas ingurgitadas e ovos, as larvas mortas foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante um minuto, mergulhadas em água destilada pelo mesmo período, secas em papel toalha, colocadas em câmara úmida e levadas a câmara climatizada para observação do desenvolvimento do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio biológico com ovos

Após análise estatística, foi verificado que no período médio de eclosão das larvas houve diferenças significativas para os tratamentos realizados com o isolado E9, nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml e para o isolado 319 na concentração 10^8 conídios/ml, quando comparadas ao período médio de eclosão de larvas do grupo controle que foi de $8,40 \pm 0,70$ dias. O percentual de eclosão das larvas apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), na concentração 10^8 conídios/ml para o isolado E9, já para o isolado 319 houve diferenças significativas nas concentrações 10^7 e 10^8 conídios/ml quando comparadas ao grupo controle (Tabela 1). Bittencourt et al. (1994a) ao testarem a eficácia do fungo *M. anisopliae* em ovos de *B. microplus* observaram que quanto maior a concentração de conídios utilizada na suspensão, maior o período médio de eclosão das larvas, que foi de 13,27 dias. Tais observações são semelhantes às encontradas no presente trabalho.

Tabela 1. Avaliação do efeito do tratamento com isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Boophilus microplus*.

| Isolados | Concentração conídios/ml | Período de eclosão | Percentual de eclosão | Mortalidade das larvas | |
|----------|--------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| | | | | pós eclosão | tratadas |
| E9 | Controle | $8,80 \pm 1,3^a$ | $86,0 \pm 11,4^a$ | $00,0 \pm 0,0^a$ | $2,0 \pm 1,2^a$ |
| | 10^5 | $7,60 \pm 4,4^a$ | $76,0 \pm 13,5^a$ | $27,0 \pm 21,1^{ab}$ | $14,0 \pm 5,1^a$ |
| | 10^6 | $6,10 \pm 4,6^{ab}$ | $55,0 \pm 20,2^{ab}$ | $63,0 \pm 34,9^b$ | $37,0 \pm 6,3^b$ |
| | 10^7 | $4,60 \pm 0,8^b$ | $42,0 \pm 20,0^b$ | $68,0 \pm 28,3^b$ | $95,0 \pm 5,2^b$ |
| | 10^8 | $4,10 \pm 1,2^b$ | $19,0 \pm 14,5^b$ | $96,0 \pm 09,6^b$ | $99,0 \pm 3,1^b$ |
| 319 | Controle | $8,40 \pm 0,7^a$ | $88,0 \pm 10,3^a$ | $00,0 \pm 0,0^a$ | $1,0 \pm 0,1^a$ |
| | 10^5 | $7,00 \pm 1,9^a$ | $68,0 \pm 22,0^a$ | $01,0 \pm 0,0^a$ | $5,0 \pm 3,2^a$ |
| | 10^6 | $7,50 \pm 2,3^a$ | $54,0 \pm 24,5^a$ | $04,0 \pm 0,8^a$ | $16,0 \pm 9,7^b$ |
| | 10^7 | $6,50 \pm 3,3^a$ | $48,0 \pm 30,4^{ab}$ | $04,0 \pm 1,1^a$ | $94,0 \pm 6,9^b$ |
| | 10^8 | $5,30 \pm 1,8^b$ | $39,0 \pm 33,8^{ab}$ | $12,0 \pm 0,7^b$ | $97,0 \pm 4,8^b$ |

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais são equivalentes, segundo teste Kruskal Wallis ($p > 0,05$).

Para o parâmetro percentual de mortalidade das larvas após eclosão, observa-se que os grupos tratados com o isolado E9 apresentaram altos índices de mortalidade, a concentração 10^6 conídios/ml apresenta 63% e a concentração 10^8 conídios/ml 96% de mortalidade, quando comparado ao percentual de mortalidade das larvas do grupo controle, que apresentou 0% de mortalidade. As larvas que eclodiram dos ovos tratados com o isolado 319 apresentaram um percentual de mortalidade de 12% na concentração 10^8 conídios/ml, o que demonstra uma reduzida ação do isolado 319, sobre este parâmetro de avaliação, quando comparado ao isolado E9 (Tabela 1). Acredita-se que tal ocorrência possa estar ligada a ação deletéria do fungo no processo de embriogênese, ou através do efeito contínuo do fungo que mantinha seu desenvolvimento nos tubos de ensaio após o processo de eclosão das larvas.

Os valores de CL 50 obtidos com a utilização dos isolados para promover a inibição da eclosão de larvas, foram $6,70 \times 10^8$ para o isolado E9 e $4,70 \times 10^9$ para o isolado 319. Os dados encontrados no presente trabalho foram elevados quando comparados aos valores citados por Bittencourt et al. (1994a) que foi $5,6 \times 10^6$ conídios/ml.

Ensaio biológico com larvas

O percentual médio de mortalidade das larvas foi observado dez dias após a realização do ensaio biológico. Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos de ambos isolados testados. Os percentuais de mortalidade de larvas dos grupos tratados foram diretamente proporcionais à concentração da suspensão de conídios utilizada, ou seja, à medida que se aumentou a concentração da suspensão, os percentuais de mortalidade também aumentaram. Para os dois isolados testados houve diferenças significativas, a partir da concentração 10^6 conídios/ml (Tabela 1).

Bittencourt et al. (1994 a, b), Monteiro et al. (1998a), Souza et al. (1999), Kaaya e Hassan (2000) e Gindin et al. (2001), trabalhando com larvas de *B. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *A. variegatum* e *B. annulatus*, respectivamente, verificaram elevada mortalidade de larvas quando expostas à ação de diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*; o que demonstra a ação desses

entomopatógenos para diferentes espécies de carrapatos.

As CL 50 verificadas para os isolados 319 e E9 foram respectivamente $2,40 \times 10^7$ e $1,10 \times 10^7$, e as CL 90 foram respectivamente $1,60 \times 10^8$ e $1,00 \times 10^8$.

Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas

Após tratamento com os isolados fúngicos, as fêmeas ingurgitadas foram observadas diariamente para a obtenção de alguns parâmetros, que serviram de comparação entre os grupos tratados e o grupo controle. Observou-se que o período médio de postura variou de dois a nove dias e quanto maior a concentração utilizada, menor o número de ovos por fêmea. Apesar do período de postura ter diminuído consideravelmente, de acordo com o aumento da concentração fúngica, pode-se observar diferenças estatísticas somente para a concentração 10^8 conídios/ml, quando tratadas com o isolado 319 (Tabela 2).

O número de ovos depositados por fêmeas ingurgitadas, inoculadas com as suspensões fúngicas, foi reduzido à medida que se aumentou a concentração de conídios/ml nas suspensões, afetando o peso médio das posturas. Pôde-se observar, que a concentração 10^8 conídios/ml do isolado 319 apresentou uma maior média, quando comparado com a mesma concentração do isolado E9, ambos isolados apresentaram diferenças significativas, quando comparados ao controle (Tabela 2). Athayde et al. (2001) ao verificarem a ação dos fungos *M. flavoviride*, *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre fêmeas adultas de *B. microplus*, registraram pesos da massa de ovos reduzidos ao utilizarem a concentração 10^8 conídios/ml de suspensão. Acredita-se que os números reduzidos de ovos depositados pelas fêmeas, das diferentes espécies de carrapatos, estejam relacionados com a inoculação fúngica sobre elas.

Para o parâmetro do grupo percentual médio de eclosão das larvas, observou-se que para ambos isolados, E9 e 319, ocorreu uma diminuição da média a medida que a concentração fúngica foi aumentando. As concentrações 10^8 conídios/ml apresentaram diferenças significativas, quando comparadas ao controle. Esse resultado demonstra o efeito desses isolados, inibindo a eclosão dos ovos. Costa et al. (2002) ao

Tabela 2. Avaliação do efeito do tratamento com isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre fêmeas de *Boophilus microplus*.

| Isolados | Concentração conídios/ml | Período de postura | Peso de postura | Percentual de eclosão | Índice de Eficiência Nutricional | Índice de Eficiência Reprodutiva |
|----------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| E9 | Controle | 10,10 ± 2,2 ^a | 0,125 ± 0,0 ^a | 72,5 ± 27,6 ^a | 71,00 ± 14,9 ^a | 52,23 ± 15,5 ^a |
| | 10^5 | 7,70 ± 3,4 ^a | 0,085 ± 0,0 ^{ab} | 51,3 ± 24,2 ^a | 53,41 ± 30,6 ^a | 34,42 ± 26,4 ^{ab} |
| | 10^6 | 6,90 ± 3,9 ^a | 0,082 ± 0,0 ^{ab} | 41,4 ± 29,1 ^a | 53,47 ± 24,2 ^a | 34,61 ± 22,8 ^{ab} |
| | 10^7 | 5,53 ± 3,5 ^a | 0,041 ± 0,0 ^b | 37,5 ± 26,3 ^a | 43,06 ± 27,9 ^a | 21,96 ± 13,5 ^{ab} |
| | 10^8 | 2,77 ± 3,1 ^b | 0,021 ± 0,0 ^b | 20,0 ± 8,9 ^b | 39,18 ± 30,1 ^a | 11,06 ± 6,6 ^b |
| 319 | Controle | 9,20 ± 2,3 ^a | 0,116 ± 0,0 ^a | 73,3 ± 19,4 ^a | 66,74 ± 19,4 ^a | 47,98 ± 18,0 ^a |
| | 10^5 | 8,60 ± 3,7 ^{ab} | 0,079 ± 0,0 ^a | 37,7 ± 18,5 ^{ab} | 57,97 ± 22,7 ^a | 39,75 ± 23,7 ^a |
| | 10^6 | 5,33 ± 3,7 ^{ab} | 0,056 ± 0,0 ^a | 45,7 ± 26,9 ^{ab} | 40,72 ± 20,0 ^{ab} | 25,54 ± 24,6 ^{ab} |
| | 10^7 | 4,60 ± 2,7 ^{bc} | 0,032 ± 0,0 ^{ab} | 26,0 ± 10,6 ^b | 37,22 ± 13,8 ^{ab} | 13,16 ± 8,0 ^{ab} |
| | 10^8 | 2,60 ± 1,4 ^c | 0,013 ± 0,0 ^b | 20,0 ± 8,9 ^b | 26,89 ± 10,6 ^b | 5,60 ± 3,9 ^b |

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais são equivalentes, segundo teste Kruskal Wallis ($p > 0,05$).

testarem diversos isolados do fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, verificaram um comportamento semelhante. Assim como, Bittencourt et al. (1994b) verificaram um percentual médio de eclosão das larvas, em torno de 93%, para os grupos controle e de 9,33% para os grupos tratados com a concentração 10^8 conídios/ml sobre fêmeas de *B. microplus*. No presente trabalho esse parâmetro assemelha-se aos dados obtidos pelos autores supracitados.

Os índices de eficiência nutricional (IEN) registrados para os grupos controle variaram de 66,74% a 71,00%, já para os grupos tratados obtiveram-se valores variando de 26,89% para 319 e 39,18% para E9 à concentração de 10^8 conídios/ml. Observou-se que apesar de não haver diferenças estatísticas para os grupos tratados com o isolado E9, houve uma redução na eficiência nutricional. Já para o isolado 319 diferenças significativas foram observadas a partir da concentração 10^6 conídios/ml (Tabela 2).

Reis et al. (2004), ao testarem os mesmos isolados do presente trabalho sobre fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense*, observaram IEN de 18,12% para o isolado E9 e 28,00% para o isolado 319, ambos para a concentração de 10^8 conídios/ml. Bittencourt et al. (1997) ao testarem os isolados 986 e 747 do fungo *B. bassiana* sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, obtiveram percentuais de 22,93% e 26,26% respectivamente para os isolados testados. Monteiro et al. (1998b) registraram um IEN de 44,42% para o isolado 986 de *B. bassiana* na concentração de 10^8 conídios/ml, quando inoculado sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens*.

Observa-se que os autores supracitados à medida que aumentavam as concentrações das suspensões fúngicas usadas nos experimentos encontraram redução dos percentuais de IEN, mesmo utilizando diferentes espécies de ixodídeos e isolados, indicando a possibilidade desses fungos entomopatogênicos serem utilizados no controle destas espécies de carrapato.

Os índices de eficiência reprodutiva (IER) encontrados nos grupos controle foram próximos aos obtidos por Gloria et al. (1993) ao avaliarem a biologia do *B. microplus* na fase não parasitária. Esses autores registraram índices de 43,93% a 64,97%, quando utilizaram condições de temperatura e umidade semelhantes ao presente trabalho, que registrou índices de 47,98% a 52,23% no grupo controle. Para os grupos tratados com os isolados observou-se diferença significativa, apresentando um percentual de 5,60% para a concentração 10^8 conídios/ml (Tabela 2). Tais percentuais de IER, quando baixos, significam que as fêmeas expostas aos fungos entomopatogênicos realizaram uma postura inferior ao seu potencial biológico, o que demonstra o potencial destes entomopatogênicos.

CONCLUSÕES

Todos os estádios do carrapato *B. microplus* avaliados foram susceptíveis aos dois isolados avaliados do fungo *M. anisopliae* o que demonstra que estes podem ser utilizados em programas de controle biológico deste parasito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, R.U.; GONZALES, J.C. A postura e a viabilidade do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodidae) em condições de laboratório. *Revista Latino-americana de Microbiologia*, v. 21, n. 1, p. 31-36, 1979.
- ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.765-777.
- ALVES, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ATHAYDE, A.C.R.; FERREIRA, U.L.; LIMA, E.A.L. Fungos entomopatogênicos. *Biocotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. v. 21, n. 1, p. 13-15, 2001.
- BASSI, L.M.S.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M.V.; MOCHI, D.A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n. 6, p. 595-600, 2005.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 16, n. 1-2, p. 39-45, 1994b.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; SOUZA E.J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 38-42, 2003.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J.; PERALVA, S.L.F.S.; MASCARENHAS, A.G.; ALVES, S.B. Avaliação da eficácia in vitro do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 6, n. 1, p. 49-52, 1997.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 16, n. 1-2, p. 41-47, 1994a.
- CORDOVÉS, C.O. *Carrapato: controle ou erradicação*. 2ª ed. Guaíba: Agropecuária. 1997. 130p.
- CORREIA, A.C.B.; MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; VERÍSSIMO, J.C. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 71, n. 2, p. 189-191, 1998.
- COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brasil. *Mycopathologia*, v. 154, n. 4, p. 207-209, 2002.
- EVANS D.E., MARTINS J.R.; GUGLIELMONE A.A. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and

- geographic distribution. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.
- FINNEY, D.L. *Probit Analysis*. 3ª ed. Cambridge: University Press. 1971. 333p.
- FINNEY, D.L. *Statistical method in Biological Assay*. 2ª ed. London: Charles Griffin. 1964. 668 p.
- FRAZZON, A.P.G.; VAZ, I.S.; MASUDA, A.; VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 1-2, p. 117-125, 2000.
- GINDIN, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*. v. 11, n. 1, p. 111-118, 2001.
- GLORIA, M.A.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E.; GRISI, L. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (CAN, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 2, n. 2, p. 85-91, 1993.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYABORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- KAAYA, G.P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*. v. 24, n. 12, p. 913-926, 2000.
- LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. Simple method of fitting dose effect curve. *Journal Pharmacology Experimental and Therapeutic*, v. 95, n. 1, p. 99-113, 1949.
- MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.7, n. 2, p. 113-116, 1998a.
- MONTEIRO, S.G.; CARNEIRO, M.E.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E. Efeito do isolado 986 do fungo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 6, p. 673-676, 1998b.
- REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc.) Sorok. Sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 6, p. 788-791, 2004.
- SANGSTER, N.C. Managing Parasiticide Resistance. *Veterinary Parasitology*. v. 98, n.1-3, p. 89-109, 2001.
- SOUZA, E.J; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeito do contato dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na ecdise ninfal de *Amblyomma cajennense*. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 6, n. 2, p. 84-87, 1999.

Recebido em 15 de fevereiro de 2006.

Aceito para publicação em 08 de outubro de 2006.