

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *Beauveria*
bassiana E *Metarhizium anisopliae*, SOBRE OS
DIFERENTES ESTÁDIOS DE *Rhipicephalus sanguineus*
NO CÃO E NO AMBIENTE**

Nancy Prette

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIA VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *Beauveria
bassiana* E *Metarhizium anisopliae*, SOBRE OS
DIFERENTES ESTÁDIOS DE *Rhipicephalus sanguineus*
NO CÃO E NO AMBIENTE**

Nancy Prette

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2007

P937p Prette, Nancy
Avaliação da Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e
Metarhizium anisopliae, sobre os diferentes estádios de *Rhipicephalus*
sanguineus no cão e no ambiente / Nancy Prette. -- Jaboticabal,
2007
x, 63 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Antônio Carlos Monteiro

Banca examinadora: Gilson Pereira de Oliveira, Lúcia Padilha
Cury Thomaz de Aquino, Inajá Marchizeli Wenzel, Fernando Antonio
de Ávila

Bibliografia

1. Controle biológico. 2. Controle Microbiano. 3. Fungo
entomopatogênico. 4. carrapato. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES

NANCY PRETTE - Filha de Luiz Antonio Prette e Dirce Ferreira Bonfim Prette, nasceu em 03 de março de 1977, em Jaboticabal, SP. Concluiu o curso de Ciências Biológicas no Centro de Excelência Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP em 1999, recebendo o título de Bióloga. Foi bolsista de iniciação científica da FAPESP e obteve em 2003 o título de mestre junto ao Programa de Pós - Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP-Jaboticabal, SP, sendo bolsista FAPESP. Publicou e apresentou 25 trabalhos em anais de congressos e simpósios científicos e oito artigos completos em periódicos específicos. Exerceu a função de pesquisadora convidada junto ao Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) da FCAV/UNESP, no período de julho/2000 a fevereiro/2002 e de agosto/2005 a outubro/2006. Exerceu a função de professora, responsável pela disciplina de biologia, junto à Rede Oficial do Ensino de 1º e 2º Graus da Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, no período de agosto de 2000 a fevereiro/2001 e de janeiro/2004 a agosto/2005 e junto ao Colégio Técnico Agrícola da FCAV/UNESP no período de abril/2001 a julho/2001. Exerce a função de professora de ensino médio junto a secretaria municipal de Ribeirão Preto desde agosto de 2006.

*Aos meus pais
Dirce e Luiz Antonio
Aos meus irmãos
Nailanita e Luiz Afonso
Com Todo Amor
Ofereço*

*À avó paterna de meu filho
Regina
Pelo carinho, ajuda e amizade*

*Ao meu filho
Pedro
Pelo grande amor que me conforta
Dedico*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro, professor, orientador, pelo incentivo, paciência e dedicação com que me orientou e amizade;

Aos Professores Dr. Alvimar José da Costa e Dr. Gilson Pereira de Oliveira, pela amizade, apoio e pela cessão das dependências do CPPAR para instalação do experimento;

Ao amigo Vando Edésio Soares e ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela valiosa colaboração na análise estatística;

Aos Professores Lucia Padilha Cury Thomaz de Aquino, Fernando Antonio de Ávila, Inajá Marchizeli Wenzel e Gilson Pereira de Oliveira pela participação na banca e valiosas sugestões para melhoria do trabalho;

Aos amigos sempre presentes Ana Carolina, Amanda, Dinalva, Heloisa, Karina, Lívia, Lucas, Luciana, Tatisa, Marco Valério, pela ajuda nos experimentos, pelas palavras de incentivo e o grande companherismo;

Aos amigos Marco Belo e Newton Castagnolli pelas correções em inglês;

Às secretarias Edna e Jouvana, pela ajuda e companherismo;

As amigas de laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV-UNESP, Jaboticabal, Aline, Carime, Poliane, Manuela e aos professores, funcionários e estagiários, pela harmoniosa convivência;

Aos amigos Cláudio, Rafael, Luis Fernando, Welber e a toda equipe CPPAR, pelo incentivo;

As amigas, Irla da Silva Costa, Lucina Cabral, Renata Cabral, Thais Fausto e Vanete por terem compartilhado de minhas alegrias e tristezas e pela cumplicidade;

À FCAV-UNESP, pela oportunidade em seu curso de pós-graduação;

A CAPES pela bolsa concedida;

Aos animais utilizados nos experimentos e que seu sacrificio venha a servir o bem estar dos seres;

A todos aqueles que direta, ou indiretamente, colaboraram e incentivaram na realização deste trabalho;

A minha família pelo amor;

À Deus por ter me ajudado a realizar mais um sonho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 O carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2
2.2 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	4
2.3 O fungo <i>Beauveria bassiana</i>	5
2.4 O Controle Biológico.....	5
3. REFERÊNCIAS	9
CAPÍTULO 2 –Ação de <i>Beauveria bassiana</i> em <i>Rhipicephalus sanguineus</i> não alimentado e infestado artificialmente em cães.....	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Colônia de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	17
2.2 Fungo utilizado	18
2.3 Avaliação “in vitro” das fases não alimentadas de <i>R. Sanguineus</i>	18
2.4 Avaliação da ação de <i>B. Bassiana</i> em <i>R. Sanguineus</i> infestada artificialmente em cães.....	19
2.5 Análise estatística.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONCLUSÕES	27
5. REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 3 – Atividade patogênica de <i>Metarhizium anisopliae</i> para a fase não	

alimentada de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , e infestado artificialmente em cães.....	32
RESUMO	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 Suscetibilidade da fase não alimentada de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> a ação do fungo.....	38
3.2 Ação do fungo em larvas, ninfas e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infestados em cães.....	39
4.CONCLUSÕES	46
5. REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 4- Ação de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> nos estádios de desenvolvimento de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> naturalmente encontrados no ambiente habitado pelo cão.....	52
RESUMO	52
ABSTRACT	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.CONCLUSÕES	65
5. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 2

Figura 1. Percentual médio de sobrevivência dos estádios não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* inoculados *in vitro* com o fungo *Beauveria bassiana* na concentração de 10^8 con. mL⁻¹. NT=ninfas tratadas; NC=ninfas controle; FT= fêmeas tratadas; FC= fêmeas controle; MT= machos tratados; MC=machos controle; LC= larvas controle. Letras minúsculas iguais dentro do mesmo estágio não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... de 21

Capítulo 3

Figura 1. Percentual médio de sobrevivência dos estádios não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* inoculados *in vitro* com o fungo *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^8 con. mL⁻¹. NC=ninfas controle; FT= fêmeas tratadas; FC= fêmeas controle; MT= machos tratados; MC=machos controle; LC= larvas controle. Letras minúsculas iguais dentro do mesmo estágio não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No 5º dia as comparações para os estádios de ninfa e no 15º dia para machos e larvas não foram feitas porque ocorreram 100% de mortalidade nos grupos tratados..... 39

Capítulo 4

Figura 1. Temperatura de fora (.....▪.....) e de dentro (___■___), e umidade de fora (___x___) e dentro (.....x.....) das baias ocorridas durante o período experimental (01/05/07 a 30/06/07). A: baia pulverizada com *Beauveria bassina*; B: baia pulverizada solução veículo; C: baia pulverizada com *Metarhizium anisopliae*..... 58

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 2

- Tabela 1.** Parâmetros biológicos dos estádios de larva, ninfa e fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem imersos em suspensão de *Beauveria bassina*..... 23
- Tabela 2.** Parâmetros biológicos dos estádios de larva, ninfa e fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem pulverizados em suspensão de *Beauveria bassina*..... 24

Capítulo 3

- Tabela 1.** Parâmetros biológicos dos estádios de larva, ninfa e fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem imersos em suspensão de *Metarhizium anisopliae*..... 41
- Tabela 2.** Parâmetros biológicos dos estádios de larva, ninfa e fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem pulverizados em suspensão de *Metarhizium anisopliae*..... 42

Capítulo 4

- Tabela 1.** Infestação dos cães com larvas de *Rhipicephalus sanguines* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassina*..... 60
- Tabela 2.** Infestação dos cães com larvas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguines* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassina*..... 60
- Tabela 3.** Infestação dos cães com ninfas e adultos *Rhipicephalus sanguines* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassina*..... 62
- Tabela 4.** Infestação dos cães com ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguines* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassina*..... 63
- Tabela 5.** Infestação dos cães com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassina*..... 63

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae*, SOBRE OS DIFERENTES ESTÁDIOS DE *Rhipicephalus sanguineus* NO CÃO E NO AMBIENTE

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo avaliar “in vitro”, a ação de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, para larvas, ninfas e adultos machos e fêmeas não alimentadas de *Rhipicephalus sanguineus* e para onde as mesmas fases do ciclo de vida do ácaro mantidas alimentadas em cães por meio de câmaras de alimentação coladas no dorso do animal. A ação no ambiente habitado pelo cão foi avaliada por meio de infestações naturais em boxes com todos os estádios do ácaro. Foram usadas suspensões contendo 10^8 conídios mL^{-1} de cada isolado. Nos ensaios com as fases não alimentadas os estádios foram imersos nas suspensões dos fungos e no ensaio com de alimentação no cão os diversos estádios do ciclo biológico do carrapato foram imersos ou pulverizados com as suspensões de conídios, e no ensaio do ambiente do cão as suspensões foram pulverizadas em todo o canil. Nos ensaios “in vitro” foram avaliadas a mortalidade de larvas, ninfas e adultos machos e fêmeas, e no ensaio com alimentação no cão avaliou-se a mortalidade de cada estádio e os indivíduos sobreviventes foram colocados para ingurgitar em coelhos, para avaliação dos estádios subseqüentes do ciclo do carrapato, até se obter novamente a mesma fase em que iniciaram o ciclo. No ensaio do ambiente do cão foi avaliada diariamente a infestação dos animais com as diversas fases do ciclo de vida do ácaro. *B. bassiana* e *M. anisopliae* promoveram significativa redução da sobrevivência de todos os estádios não alimentados, deixando claro a atividade patogênica para a fase não alimentada de *R. sanguineus*. No experimento com a alimentação em cães, *B. bassiana* promoveu mortalidade de fêmea, mas não houve mortalidade de larvas e ninfas, fato este também observado para *M. anisopliae*. No ensaio conduzido em boxes naturalmente infestados com os estádios de *R. sanguineus* foi possível observar que *B. bassiana* reduziu o número de larvas não alimentadas e de larvas ingurgitadas na primeira semana pós-tratamento, mas o mesmo efeito não foi observado para *M. anisopliae*. Ambos os fungos reduziram o número de ninfas ingurgitadas na primeira semana de tratamento,

mas apenas *B. bassiana* mostrou efeito sobre o estágio de ninfa não alimentada e sobre os adultos, reduzindo os respectivos números ao longo de todo o experimento. Tanto *B. bassiana* como *M. anisopliae* reduziram o número de fêmeas em várias avaliações. Os fungos se mostraram patogênicos para os estádios não alimentados de *R. sanguineus* em condições de laboratório. Nos ensaios conduzidos em campo, tanto no ensaio com alimentação no cão como no ambiente habitado pelo cão, *B. bassiana* se mostrou mais efetiva do que *M. anisopliae* e o estágio de fêmea foi o mais susceptível a ação de ambos os fungos.

Palavras-chave: controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, carrapato.

**ASSESEMENTOL OF THE *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae*
PATHOGENICITY OVER THE DIFFERENT STADIUMS OF *Rhipicephalus*
sanguineus IN THE DOG AND IN THE ENVIRONMENT WHERE THE DOG LIVE.**

ABSTRACT - This work aimed to assess the "in vitro" action of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, for unfed larvae, nymphs and adult male and female of *Rhipicephalus sanguineus* and for the same stadiums the tick life cycle maintained fed on dogs through feeding cameras fixed on dog's dorsal region. The action on the ambient where the dog lives was also evaluated through natural infestations with all of the stadiums of the acarid. Suspensions containing 10^8 conidia mL⁻¹ of each isolated were used. In every assay with the unfed phase, the stadiums were immersed in the suspensions of the fungus and in the assays with feeding cameras, all the phases of the biological cycle of the tick were immersed or powdered with the conidial suspension and in the assay in the ambient suspensions were spread powdered in the whole box. In the "in vitro" assays it was evaluated the larvae, nymphs and adult male and female mortality. In the feeding cameras assay, the mortality of each stadium was evaluated and the surviving individuals were put for engorged in rabbits, to evaluate subsequent stadiums of the cycle of the tick, until obtain the same stadium wich was attained at the moment they began the cycle. In the environmental assay it was daily evaluated the infestation of the animals with all the phases of the life cycle of the acarid. *B. bassiana* and *M. anisopliae* promoted a significant reduction of the survival rate of all unfed stadiums of the tick what brings a strong evidence of pathogenicity to unfed phases of *R. sanguineus*. In the experiment with feeding cameras, *B. bassiana* promoted female mortality, but mortality of larvae and nymphs were not observed, fact this also observed for *M. anisopliae*. In the environment of the dog naturally infested with the stadiums of *R. sanguineus* was possible to observe that *B. bassiana* reduced the number of unfed and engorged larvae in the first week after treatment, but the same effect was not observed for *M. anisopliae*. Both fungus reduced the number of engorged nymphs in the first week of treatment but, just *B. bassiana* showed effect on the unfed nymph and promoted the reduction unfed fed adults along the whole experiment. Both *B. bassiana* and *M.*

anisopliae reduced the number of females in several evaluations. The fungi were pathogenic to the stadiums of unfed *R. sanguineus* in laboratory conditions. In the researches conducted with the stadiums of the tick feeding on dog or infested in the environment of the dog *B. bassiana* has been more effective than *M. anisopliae* and the female stadium was more susceptible to the action of both fungus.

Key words: biological control, microbial control, entomopathogenic fungus, tick.

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus sanguineus* é o mais importante ectoparasito de cães, tanto quanto o carrapato *Boophilus microplus* para os bovinos nos países do Cone Sul e Austrália, ou mesmo o *Rhipicephalus appendiculatus* na África, embora suas conseqüências econômicas sejam menos relevantes. Originário da Região Afrotropical, o *R. sanguineus* foi introduzido no Brasil possivelmente a partir do século XVI, com a chegada dos colonizadores europeus e seus animais domésticos (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

GODDARD (1989) verificou que há relação entre o número crescente de casos registrados de erliquiose humana devido à infecção por *Ehrlichia canis* e o aumento de parasitismo humano por *R. sanguineus*. Ele pode transmitir ainda, para o homem, outras espécies de riquetsias, tal como a *Rickettsia rickettsii* e a *Rickettsia conorii*, agentes causais, respectivamente, da febre maculosa das montanhas rochosas no México e na América do Sul, e da febre botonosa, na região mediterrânea do sul da Europa e da África do Norte (SWANGO et al., 1992). O cão tem um importante papel na epidemiologia dessas doenças que ocorrem no homem, pois é ele quem leva os carrapatos infectados para o ambiente humano (ACHA & SZYFRES, 1986).

O carrapato *R. sanguineus* pode completar seu ciclo de vida em um ambiente doméstico e atingir níveis insuportáveis em pouco tempo. Seu ciclo biológico está estimado em três meses, mas cada estágio ativo pode persistir por meses sem se alimentar e as infestações perdurarem por muito tempo no ambiente depois que o cão foi removido.

O controle das infestações por *R. sanguineus* tem sido realizado principalmente com a aplicação de produtos químicos, vários dos quais podem causar intoxicações, atingindo principalmente as crianças que geralmente são mais susceptíveis. Contudo, a utilização exclusiva de carrapaticidas químicos é cada dia menos viável em termos práticos e econômicos, tornando-se necessária a alternância com outros métodos em sistemas integrados de controle (BARROS & EVANS, 1989). Estes sistemas visam

também atenuar os problemas causados pelo uso indiscriminado destes carrapaticidas, que além de promoverem resistência a vários princípios ativos, causam poluição ambiental e intoxicação ao homem (PAIÃO et al., 2001).

O controle microbiano de *Rhipicephalus sp* destaca-se como promissor, sendo bactérias e fungos, os microrganismos mais estudados no controle. De acordo com ALVES (1998), os fungos entomopatogênicos englobam cerca de 90 gêneros e 700 espécies, estando *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Entomophthora* entre os mais comumente utilizados no controle de pragas. O uso destes fungos é viabilizado pelo fato de não serem prejudiciais ao homem e outros animais homeotermos, pois dificilmente conseguem se desenvolver na faixa de temperatura dos diferentes mamíferos. Várias espécies de fungos têm sido estudadas como patógenos de carrapatos, “in vitro” e “in vivo”; entretanto, ainda são poucos os trabalhos que tratam do uso de fungos para o controle biológico de carrapatos, quando comparados com os de controle químico descritos na literatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

Os carrapatos são ectoparasitos obrigatórios de animais silvestres, domésticos e do homem, sendo conhecidos globalmente cerca de 860 espécies (HOOGSTRAL, 1981; WALKER et al. 2000). A intensa infestação em animais domésticos torna o controle imprescindível, devido às conseqüências diretas como indução de quadros anêmicos, de lesões cutâneas, de queda na produção de leite e carne e disseminação de agentes infecciosos tais como: vírus, bactérias, protozoários e fungos. Os carrapatos podem ainda excretar substâncias farmacologicamente ativas e/ou tóxicas.

R. sanguineus vulgarmente denominado de carrapato vermelho, é um ectoparasito que se caracteriza pela hematofagia em animais de sangue quente. Este carrapato prefere como hospedeiro o cão, mas pode parasitar cavalos e bovinos e até mesmo o homem. Seu ciclo evolutivo envolve três passagens pelo hospedeiro; suas fêmeas põem aproximadamente 4.000 ovos (SLOSS, et al. 1999) e passam por quatro estádios evolutivos: ovo, larva, ninfa e adulto. Assim que a larva eclode do ovo e se fixa no

hospedeiro, ela se alimenta neste por aproximadamente quatro dias, quando então faz ecdise para o próximo estágio evolutivo, a ninfa. Esta, após se alimentar por quatro dias aproximadamente no hospedeiro, realiza uma nova ecdise, neste caso para o estágio adulto. Os carrapatos adultos, diferenciados em machos e fêmeas, se alimentam no hospedeiro por aproximadamente sete dias, copulam e, após a alimentação a fêmea realiza uma única postura de ovos, quando então morre. Todas as fases de vida livre, tais como as ecdises, postura e incubação dos ovos se realizam no ambiente (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

R. sanguineus desperta interesse por se tratar de uma espécie cosmopolita. Segundo SZABÓ, 1995 o cão seu hospedeiro natural, não desenvolve resistência, mesmo após diversas infestações. Isso demonstra que um único cão pode servir por tempo indeterminado como hospedeiro adequado para todos os estádios parasitários do ácaro. Este carrapato é responsável pela transmissão de varias doenças para o cão e o (GODDARD, 1989; SWANGO et al. 1992). Diante das mudanças no estilo de vida atual, o cão tem um contato cada vez maior com o homem, expondo este aos agentes comuns entre essas duas espécies. Recentemente, foi relatado no Brasil a ocorrência de *R. sanguineus* parasitando humanos (DANTAS – TORRES, 2006; LOULY et al., 2006).

Além disto, seus fluidos e toxinas salivares podem produzir reações de irritação acentuada no hospedeiro, o que provoca alterações metabólicas e comportamentais, e ferimentos na pele, que se torna susceptível a infecções bacterianas secundárias e miíases. Em função da espoliação sangüínea, *R. sanguineus* pode levar os animais à morte (BITTENCOURT, et al.1999).

Para o tratamento e controle das infestações por *R. sanguineus*, há duas condições sobre os quais se pode atuar: no hospedeiro, no qual estarão 5% dos carrapatos em um determinado tempo, e no ambiente, onde se encontram 95% da população de carrapatos (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

Por sua importância epidemiológica e econômica, várias formas de controle de carrapatos têm sido estudadas, mas apesar do avanço da ciência, até o presente momento as infestações de carrapatos em animais domésticos são controladas

essencialmente por acaricidas químicos. Na ausência de uma alternativa economicamente viável, o procedimento mais utilizado é o uso de carrapaticidas químicos sintéticos (organoclorados, organofosforados, carbamatos, amitraz, piretróides sintéticos). Cada vez mais cresce o número de populações tolerantes aos carrapaticidas e resíduos de agentes químicos que acabam contaminando o meio ambiente.

O controle biológico apresenta uma série de vantagens em relação ao controle químico, especialmente no caso de parasitos cujos hospedeiros ocorrem comumente em ambientes visitados por pessoas, ou ainda, quando intoxicações humanas podem ocorrer com maior probabilidade. Sua associação com outros meios de controle é recomendável para o melhor controle de carrapato.

2.2 O Fungo *Metarhizium anisopliae*

O deuteromiceto *Metarhizium anisopliae* é um importante agente microbiano utilizado em controle biológico. Sua ação é bastante conhecida, ocorrendo em diferentes regiões, desde ambientes de clima temperado até clima tropical. Este fungo pertence à classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae e foi descrito por Metschnikoff em 1879 pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*. Este pesquisador executou o primeiro trabalho de controle microbiano utilizando este fungo para o controle de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*, e foi finalmente classificado por Sorokin em 1883 como *Metarhizium anisopliae*. A partir de então, a utilização e ação deste patógeno vêm sendo estudadas sobre muitas espécies de insetos, com grandes potencialidades para o controle biológico, tendo como hospedeiros mais de 300 espécies de insetos (ALVES, 1998). Caracteriza-se por ser um fungo de cultivo simples, necessitando quase que exclusivamente de uma fonte nutricional à base de amido e sem dúvida é um dos fungos mais estudados e empregados em programas de manejo de pragas, uma vez que representa grande potencialidade como entomopatógeno (ONOFRE et al., 2002).

2.3. O fungo *Beauveria bassiana*

Beauveria. bassiana é um fungo entomopatogênico pertencente à classe Deuteromycetes, de distribuição cosmopolita, amplamente aplicado no controle de pragas (BELL & HAMELLE, 1970) e com grande potencial para se usado no controle de carrapatos (PAIÃO et al, 2001). Apresenta conídios globosos ou sub-globosos com 2,0 a 3,0 x 2,5 micrômetros, com conidióforos formando densos cachos. A germinação dos conídios ocorre, em geral, num período de 12 horas após inoculação. Em insetos, o fungo penetra no hospedeiro pelo tegumento devido a ação mecânica de suas hifas e ao efeito de enzimas, em aproximadamente 12 horas. Após 72 horas da inoculação, o hospedeiro se encontra totalmente colonizado, apresentando grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie. Causador de epizootia, se caracteriza pela alta taxa de crescimento, produção elevada de unidades infectivas, capacidade de sobrevivência no ambiente, facilidade para penetrar pelo tegumento e alcançar a hemolinfa do hospedeiro, reafirmando sua alta patogenicidade (FUXA, 1987). A duração das diferentes fases do ciclo da relação patógeno-hospedeiro, depende das condições existentes durante a ocorrência da doença, sendo favorecida pela umidade relativa em torno de 90% e de temperatura na faixa de 23 a 28 °C (ALVES, 1998).

2.4.O Controle biológico

Denomina-se de controle biológico natural a regulação espontânea, por organismos vivos (antagonistas), da população de outras espécies animais sem a necessidade de intervenção humana. Este tipo de controle não deve ser subestimado, já que populações de muitos protozoários, artrópodes e helmintos parasitos podem apresentar crescimento descontrolado na ausência de seus respectivos antagonistas naturais (GRONVOLD, 1996). Com base neste comportamento natural, surgiu o conceito de controle biológico, agora com a intervenção humana, para controlar e/ou combater as chamadas pragas parasitárias, observadas tanto na agricultura quanto em medicina veterinária.

Segundo ALVES (1998), a alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, a capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, o caráter enzoótico e a não toxicidade são atributos favoráveis para que este tipo de estratégia possa fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir populações de insetos indesejáveis para níveis que não provoquem prejuízos. Além disso, este mesmo autor afirma que o controle biológico possibilita a associação de microrganismos com formulações medicamentosas sem resíduos ou toxicidade para animais e ambiente, bem como o menor custo e diminuição da possibilidade de aparecimento de resistência, haja vista a variedade de mecanismos envolvidos e compostos produzidos e empregados por estes agentes no controle de pragas-alvo.

A busca de alternativas que auxiliem no controle de artrópodes com menor impacto ambiental, diminuindo a utilização de compostos químicos, têm sido uma constante na pesquisa nos últimos anos. Dentre as estratégias estudadas está a utilização de fungos entomopatogênicos, o que parece ser uma alternativa eficiente e segura (PAIÃO, et al., 2001; SILVA 2001).

Os fungos mais utilizados e que se destacam no controle de insetos são os dos gêneros *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Paecilomyces* e *Hirsutella*.

Os primeiros testes com fungos que infectam insetos, denominados de fungos entomopatogênicos foram realizados no final do século XIX, pelo russo Metschnikoff, quando avaliou o potencial do *Metarhizium anisopliae* para o controle de uma espécie de besouro. No Brasil, os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados (ALVES, 1992). Atualmente vários inseticidas biológicos à base de fungos (micoinseticidas) são comercializados, sendo utilizados na agricultura em diferentes países.

Os fungos são patógenos de largo espectro, responsáveis por epizootias naturais. Sua grande variabilidade genética pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de artrópodes (ALVES, 1998).

Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para

serem utilizados como inseticidas microbianos (AZEVEDO, 1998).

Atualmente, são reconhecidas cerca de 25 espécies de fungos importantes no controle de insetos economicamente preocupantes na agricultura e na medicina (McCOY & TIGANO-MILANI, 1992).

Com suas estruturas altamente especializadas que facilitam a penetração via tegumento em seu hospedeiro, os fungos dispõem de uma grande vantagem quando comparados com outros patógenos que utilizam apenas a via oral como forma de penetração no hospedeiro (BITTENCOURT et al., 1999). Esta penetração está ligada à secreção de enzimas como proteases e quitinases (CHARNLEY & St. LEGER, 1991) e, na maioria dos casos, a ação física de penetração também auxilia no processo. No caso específico de carrapatos, a penetração tegumentar é de grande importância, já que a infecção oral é praticamente nula para artrópodes hematófagos.

Após a penetração da cutícula pelos tubos germinativos, o fungo rapidamente invade os órgãos internos, causando a morte do hospedeiro (KAAYA et al., 1996). Outro fator importante é a produção de micotoxinas pelos fungos, que muitas vezes, contribuem para a morte do hospedeiro, redução do peso de ingurgitamento, fecundidade e percentagem de eclosão dos ovos, sendo estes fatores proporcionalmente relacionados à concentração de esporos depositados sobre os mesmos (KAAYA et al., 1996).

Além disso, os conídios dos fungos possuem capacidade de disseminação horizontal e podem ser levados por diferentes agentes para locais muito distantes (ALVES, 1998). Segundo FUXA & TANADA (1987), a patogenicidade está mais relacionada a grupos ou espécies de patógenos, sendo definida como uma característica “qualitativa”, enquanto que a virulência determinaria o grau desta patogenicidade dentro de um grupo de espécies ou patógenos, caracterizando um termo “quantitativo”.

Uma visão mais detalhada da relação patogênica entre fungos e insetos-hospedeiros foi relatada em trabalhos realizados por ROBERTS (1989), onde este autor resume a importância, o estado de desenvolvimento e as formas de ação dos fungos entomopatogênicos, citando diferentes gêneros e espécies de fungos.

BITTENCOURT et al. (1995) verificaram a patogenicidade in vitro dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* em ovos e larvas não alimentadas de *Boophilus microplus*, observando uma diminuição acentuada do percentual de eclosão e também maior taxa de mortalidade das larvas. A patogenicidade deste fungo também foi verificada para as espécies de carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens* e *Amblyomma variegatum* (MONTEIRO et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999 e BITTENCOURT 2000; KAAYA et al., 1996).

PAIÃO et al. (2001) constataram redução no período de pré-oviposição e peso da postura, e no índice de produção de ovos de fêmeas de *B. microplus* inoculadas com suspensões de diferentes concentrações de conídios de vários isolados de *B. bassiana*. A patogenicidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* para *B. microplus*, em condições de laboratório, foi evidenciada por MONTEIRO et al. (1998), tendo os isolados E 9 e AM 9 promovido redução na oviposição e elevada mortalidade de fêmeas do carrapato.

SAMISH et al. (2001), estudaram a patogenicidade de quatro espécies de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *Paecilomyces fumosoroseus* para larvas, ninfas e fêmeas não alimentadas e ingurgitadas de *R. sanguineus*. Verificaram que larvas e ninfas não alimentadas foram mais sensíveis à infecção fúngica do que as ingurgitadas, mas por outro lado, as fêmeas não alimentadas foram mais resistentes do que as ingurgitadas.

O objetivo do presente trabalho foi verificar “in vitro” a suscetibilidade de larvas, ninfas e fêmeas e machos não alimentados de *R. sanguineus* à ação de isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e verificar “in vivo” a ação destes isolados na mesmas fases do ciclo de vida do ácaro alimentadas em cães e no ambiente habitado pelo cão, por meio de canis artificialmente infestados.

3. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N., SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales**. 2ed. Washington: OPS/OMS, 989p.1986.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1998, 386p.

ALVES, S.B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 27, 77-86, 1992.

AZEVEDO, J.L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de insetos**. 2ª Edição. Piracicaba: FEALQ, 1163p., 1998.

BARROS, T.A.M; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato de bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.9, n.1/2, p17-21,1989.

BELL, J. V.; HAMELLE, R. J. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.15, p.447-50, 1970.

BITTENCOURT, V.R.E.P. Controle Biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO. J.L. **Controle biológico de carrapatos**. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 4, 145-175, 2000.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J. de; PERALVA, S.L.F.S.; REIS, R.C.S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1883) (Acari:

Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.20, n.2, p.78-82, 1999.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F. da S.; VIEGAS, E. de C. Eficácia In vitro dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, sup. 1. 1, p. 86, 1995.

BITTENCOURT, V.R.E.P. Controle Biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico de carrapatos**. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2000, cap. 4, 145-175.

CHARNLEY, A.K.; St. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. Ed. **The fungal spore and diases initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 267-286, 1991.

FUXA, J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.32, p.225-251, 1987.

FUXA, J.R.; TANADA, Y. **Epizootiology of insect diases**. New York: Wiley-interscience, 1987, 555p,

GODDARD, J. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal Medicine Entomology**, Lanham, v. 26, n. 6, p. 628-629, 1989.

GRONVOLD, J. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larva, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *J. of Helminthol.*, London, v.70, p.291-297, 1996.

HAJEK, A.E.; LEGER, R.J.S. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 293-322, 1994.

HOOGSTALL, H. E AT. Changing patterns of tickborne diseases in modern society. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, 26, 75-99, 1981.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*. Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 15-20, 1996.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, Milano, n.30, p.24- 32, 2001.

LOULY, C.C.B; FONSECA, I.N; OLIVERIA, V.F de; BORGES, L.M.F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.7, p.103–106, 2006.

McCOY, C.W.; TIGANO-MILANI, M.S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 87-93, 1992. Edição especial.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A.C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (CAN.) (ACARI:IXODIDAE) Under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 109-112, 1998.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and

Metarrhizium anisopliae on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.7, p.113-116, 1998.

ONOFRE S.B., MINIUIK, C.M., de BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L. 2001. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, 62: 1478–1480. et al. 2002

PAIÃO , J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 17, p. 245-251, 2001.

ROBERTS, D.W. World picture of biological control of insects by fungi. **Memórin do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 84, 3, 89-100, 1989.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.6, p.1355-1359, 2001.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Infecções bacterianas, riquetsiais, protozoais e outras. In: ETTINGER, S.J. Tratado de medicina veterinária interna: **Moléstias do cão e do gato**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap.46, sec. 3, p. 277-311, 1992.

SILVA, C.A.D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 243-247, 2001.

SLOSS, M.W., ZAJAC, A.M., KEMP, R.L. **Parasitologia clínica veterinária**, São Paulo, SP. 6. Ed., 1999, 1-198p.

SZABÓ, M.P.J. **Aspectos imunopatológicos da resistência a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em cães e cobaias.**1995. 160. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 1995.

WALKER, J.B. KEIRANS, J.E., HORAK, I.G. **The genus *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world.** London, Cambridge Univ. Press. 2000, 643p.

**CAPÍTULO 2 - AÇÃO DE *Beauveria bassiana* EM *Rhipicephalus sanguineus* NÃO
ALIMENTADO
E INFESTADO ARTIFICIALMENTE EM CÃES**

RESUMO - Este trabalho objetivou verificar a ação de *B. bassiana* nas fases de larva, ninfa, fêmea e macho não alimentadas de *R. sanguineus*, e nas mesmas fases do ciclo de vida infestadas em cães, em duas formas de aplicação. Suspensões contendo 10^8 conídios mL^{-1} do fungo foram usadas para tratar os estádios de larva, ninfa e fêmea e macho não alimentados do ácaro e para imergir ou pulverizar os mesmos estádios mantidos em câmaras de alimentação fixadas no dorso de cães. O fungo reduziu significativamente ($P < 0,05$) a sobrevivência de todos os estádios não alimentados, atingindo 100% de mortalidade de larvas e ninfas. Entre as fêmeas sobreviventes (26%), apenas 12% copularam e 4% realizaram postura com ovos inférteis. No experimento com cães observou-se mortalidade apenas no estágio de fêmea, mas o fungo afetou diversos parâmetros biológicos do ciclo do ácaro, reduzindo as fases imaturas, e conseqüentemente, a população do carrapato. A fase não alimentada de *R. sanguineus* é suscetível a ação patogênica de *B. bassiana*. A aplicação nos estádios alimentados em cães reduz a população do carrapato, promovendo o controle nas gerações subseqüentes. A forma de aplicação não afeta a ação patogênica do fungo.

Palavras - chave: Controle biológico, fungo entomopatogênico, carrapato, cão.

**ACTION Of *Beauveria bassiana* ON UNFED *Rhipicephalus sanguineus*
AND FED INFESTED IN DOGS**

ABSTRACT – The aim of this paper was to access the action of *B. bassiana* on larvae, nymph, female and male unfed stadiums of *R. sanguineus*, and in the same stadiums of life cycle of the tick fed in dogs, through two application ways. Suspension containing 10^8 conidia ml^{-1} of the fungus was utilized to treat the unfed stadiums of larvae, nymphs, female and male of the tick. The same conidial suspension was used to immerse or spray the above mentioned stadiums maintained in feeding chambers fixed on dog's dorsal region. The fungus promoted a significant reduction ($P < 0.05$) in the survival rate of all unfed ticks stadiums, causing 100% mortality of larvae and nymph. Only 26% of the females have survived and only 12% of them have copulated and 4% were able to lay infertile eggs. In the experiment with dogs mortality was observed only for the stadium of females. The fungus affected several biological parameters of the tick life cycle, mailing the immature stadiums, reducing the tick population. The unfed stadium of *R. sanguineus* is susceptible to the pathogenic action of *B. hassiana*. The application of the fungus in the stadiums feeding on dog's reduced the population of the tick, promoting the control in the following generations. The application method has not affected the pathogenic action of the fungus.

Key words: biological control, entomopathogenic fungus, tick, dog.

1. INTRODUÇÃO

Rhipicephalus sanguineus é a espécie de carrapato mais amplamente distribuída no mundo. Seu hospedeiro natural, o cão, não desenvolve resistência, mesmo após diversas infestações (SZABÓ et al., 1995). Um único animal pode servir por tempo indeterminado como hospedeiro adequado de todos os estágios parasitários do ácaro. A espoliação sangüínea por *R. sanguineus* pode levar o cão à morte (BITTENCOURT et al., 1999) e os fluidos e toxinas salivares dos carrapatos podem produzir reações de irritação acentuada no cão, provocando alterações metabólicas e comportamentais e ferimentos na pele, que o torna susceptível a infecções bacterianas e miíases.

Este parasita é também responsável pela transmissão de doenças severas como a babesiose, haemobartonelose, hepatozoonose e erliquiose para os caninos e erliquiose, febre maculosa, botonosa e borreliose Lyme símile para o homem (YOSHINARI et al., 1997; LABRUNA & PEREIRA, 2001; ROZENTAL et al., 2002; CARDOSO et al., 2006).

Nos dias atuais, há um elevado número de cães em convivência domiciliar (TRHUSFIELD, 1999), expondo o homem aos agentes patogênicos transmitidos pelo carrapato. LOULY et al. (2006) relataram que, entre 46 trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, infecções por *R. sanguineus* foram encontradas em 68% das mulheres e 71% dos homens, sendo este um dos primeiros relatos do parasitismo de humanos por este carrapato no Brasil.

Até o presente momento as infestações de carrapatos em animais domésticos são controladas essencialmente por quimioterápicos. No entanto, apesar de toda a variedade de princípios ativos disponíveis no mercado, não é possível impedir o aparecimento de populações de parasitos resistentes ou tolerantes aos medicamentos. MILLER et al. (2001) relataram o desenvolvimento de resistência de *R. sanguineus* a alguns princípios ativos utilizados em formulações comerciais. Vários destes princípios ativos podem causar poluição ambiental e intoxicações, atingindo crianças que geralmente são mais susceptíveis (PAIÃO et al., 2001; PRETTE et al., 2005). Assim, o uso exclusivo de carrapaticidas químicos é cada vez menos viável, sendo necessária a adoção de sistemas integrados que combinem diversas estratégias de controle.

O controle biológico se apresenta como uma técnica vantajosa, especialmente no controle de parasitos, cujos hospedeiros ocorrem em ambientes freqüentados por pessoas, ou quando intoxicações humanas podem ocorrer com maior probabilidade. Trabalhos envolvendo o uso de fungos no controle biológico de carrapatos são crescentes. Diversos estudos feitos em laboratório mostraram que *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* tem ação patogênica para *R. sanguineus* (SAMISH et al., 2001, GARCIA et al., 2004, GARCIA et al., 2005, PRETTE et al., 2005; REIS et al., 2005).

Contudo, estes estudos foram feitos em ausência da ação parasitária do carrapato, usando na maioria dos trabalhos as fases do ciclo biológico do ácaro já ingurgitadas. Como conseqüência, os requisitos necessários para o estabelecimento de programas de controle integrado do carrapato não foram ainda estabelecidos. Por esta razão é importante analisar a ação do patógeno sobre as fases do ácaro infestadas no hospedeiro e a adequação da forma de aplicação.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a ação de *B. bassiana* nas fases de larva, ninfa, fêmea e macho não alimentadas de *R. sanguineus*, e nas mesmas fases do ciclo de vida do ácaro infestadas em cães, em duas formas de aplicação do fungo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colônia de *Rhipicephalus sanguineus*

A colônia de *R. sanguineus* foi mantida junto ao Centro de Pesquisas Animal (CPPAR), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), segundo metodologia descrita por BECHARA et al. (1994).

2.2 Fungo utilizado

Utilizou-se o isolado AM 9 (obtido de *Deois incompleta*) de *Beauveria bassiana*, mantido em cultura estoque na coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV. O isolado foi cultivado em meio BDA [200 g de batata (B), 20g de dextrose (D) e 20g de ágar (A)] mantido a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 15 dias, com ausência de iluminação. A viabilidade foi determinada pelo método de contagem de conídios germinados em lâmina de microscopia (MARQUES et al., 2004). Suspensões do fungo foram preparadas transferindo conídios da superfície de colônias jovens para tubos contendo 20 mL de solução de Tween 80® a 0,1% (v v-1). A quantificação dos conídios foi feita em câmara de Neubauer com amostras devidamente homogêneas de cada suspensão fúngica. Padronizou-se a concentração de 10^8 conídios mL^{-1} .

2.3 Avaliação *in vitro* das fases não alimentadas de *R. sanguineus*

Para avaliar a ação do fungo nas fases de larva, ninfa, fêmea e macho não alimentadas preparou-se um bioensaio composto por um tratamento formado pelos isolados fúngicos (viabilidade de 98%) e um controle contendo apenas o veículo da suspensão. Grupos de 250 larvas com 14 a 21 dias de idade, de 50 ninfas com 10 dias decorridos da ecdise, 10 machos e 10 fêmeas não ingurgitadas, foram colocados em tubos de plástico e imersos por 1 minuto, em 1mL da suspensão de conídios ou na solução de Tween 80® a 0,1% (v v-1) (controle). O excesso de líquido foi retirado com papel toalha e os tubos foram mantidos a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 80%, até o 18o dia após o tratamento. Para verificar o efeito do fungo na sobrevivência de ninfas e adultos a observação foi realizada diariamente, mas a avaliação somente ocorreu quando houve o maior número de mortes, e para larvas foi feita apenas no último dia do ensaio. Este procedimento foi necessário devido à sensibilidade de larvas e ninfas e para evitar perdas na contagem.

Terminada a avaliação, os estádios sobreviventes foram colocados em coelhos, segundo metodologia descrita por Bechara et al. (1994), para observar se estes faziam as mudas para os estádios subseqüentes do ciclo do carrapato, até se obter novamente

a mesma fase em que iniciaram o ciclo. Devido ao grande número de indivíduos, quando os estádios alcançaram as fases de larva, ninfa e fêmea, foram escolhidos 250, 1250 e 25 indivíduos, respectivamente, que foram divididos em grupos homogêneos, para observar a continuidade do ciclo do carrapato. Para avaliar a ação do fungo foram usados os seguintes parâmetros do ciclo biológico dos carrapatos recolhidos: peso da fêmea (PF), peso da massa de ovos (PMO), percentagem de eclosão (%ECLO), índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em ovos (IECO), percentagem de ecdise de larvas (%EL) e ninfas (%EN) e a percentagem de recuperação de carrapatos (%RECUP) (Szabõ et al., 1995). Com base nestes parâmetros calculou-se: a) número estimado de ovos (NEO) = $PMO \times 27^*/0,001$; b) número estimado de larvas (NEL) = $NEO \times \%ECLO/100$; c) número estimado de larvas recuperadas (NELR) = $NEL \times \text{número de larvas recuperadas da amostra}/100$; d) número estimado de ninfas (NEN) = $NELR \times \%EL/100$; e) número estimado de fêmeas (NEF) = $NEN \times \text{número de fêmeas da amostra}/100$; f) número estimado de fêmeas recuperadas (NEFR) = $NEF \times \text{percentagem de fêmeas recuperadas da amostra}/100$ (* é uma constante e corresponde à estimativa do número de larvas por miligrama de ovos).

2.4 Avaliação da ação de *B. bassiana* em *R. sanguineus* infestado artificialmente em cães

No ensaio com o carrapato infestado artificialmente em cães, foram utilizados 10 filhotes da raça Poodle, vacinados, vermifugados e isentos de ectoparasitos, que foram alimentados com ração e água “ad libitum”. Os cães foram mantidos em boxes individuais pertencentes ao CPPAR da FCAV.

No dorso de cada animal foram fixadas, com material atóxico, três câmaras de alimentação de plástico com 5 cm de diâmetro e 4 cm de altura (dois tratamentos e um controle). Colares de restrição foram colocados nos cães para evitar a retirada das câmaras.

Um dia após a montagem das câmaras, em cada uma delas foi realizada a infestação dos cães, com 5 fêmeas, 5 machos, 30 ninfas e 250 larvas de *R.*

sanguineus. A aplicação do fungo foi realizada de duas formas. Na primeira, 24 horas após a infestação, cada câmara do grupo tratamento foi pulverizada com 0,5 mL de suspensão contendo $1,9 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ de *B. bassiana* com 98% de viabilidade, e o grupo controle com a solução de Tween 80® a 0,1% (v v⁻¹), sendo em seguida fechadas. Na segunda forma de aplicação, grupos de fêmeas, machos, ninfas e larvas de *R. sanguineus* iguais aos já mencionados, foram imersos na mesma suspensão de conídios por um minuto. Após a retirada do excesso de líquido, os grupos foram colocados dentro das câmaras de alimentação para infestação dos cães. Para cada forma de aplicação foram utilizados cinco cães. No dia seguinte a aplicação, e diariamente por sete dias, as câmaras foram abertas e recolhidos os estádios já desprendidos. Após a separação e contagem de acordo com os respectivos estádios, estes foram mantidos a 27 ± 1 °C e 80% de umidade, para realizarem mudas. Após a ecdise, todos os estágios foram colocados em coelhos para o desenvolvimento e avaliação do ciclo biológico do carrapato, conforme já descrito no ensaio da ação dos fungos com as fases não alimentadas. A única diferença foi o número de larvas e ninfas separadas que, neste ensaio, foram de 500 e 150, respectivamente.

2.5 Análise Estatística

Para análise dos dados utilizou-se o programa Estat (1995). Todas as variáveis foram estudada as de maneira descritiva, pelo cálculo da média, desvio padrão e mediana. As médias foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado (ANOVA) e as comparações múltiplas foram aferidas pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *B. bassiana* reduziu ($P < 0,05$) a sobrevivência de ninfas, fêmeas e machos não alimentados de *R. sanguineus* a partir do 13º dia pós-tratamento. No 18º dia após a inoculação do fungo apenas sobreviveram 12 de fêmeas e 13 machos (Figura 1). Após a infestação destes nos coelhos, apenas três fêmeas ingurgitaram e duas realizaram posturas com ovos inférteis. No grupo controle 80% de larvas e 100%

de ninfas, fêmeas e machos sobreviveram, e todos os seus respectivos estádios recuperados completaram o ciclo após infestação nos coelhos. *B. bassiana* não promoveu a morte do carrapato nos primeiros dias após a infecção, mas se mostrou patogênico para os estádios não alimentados de *R. sanguineus*, pois causou doença levando-os a morte.

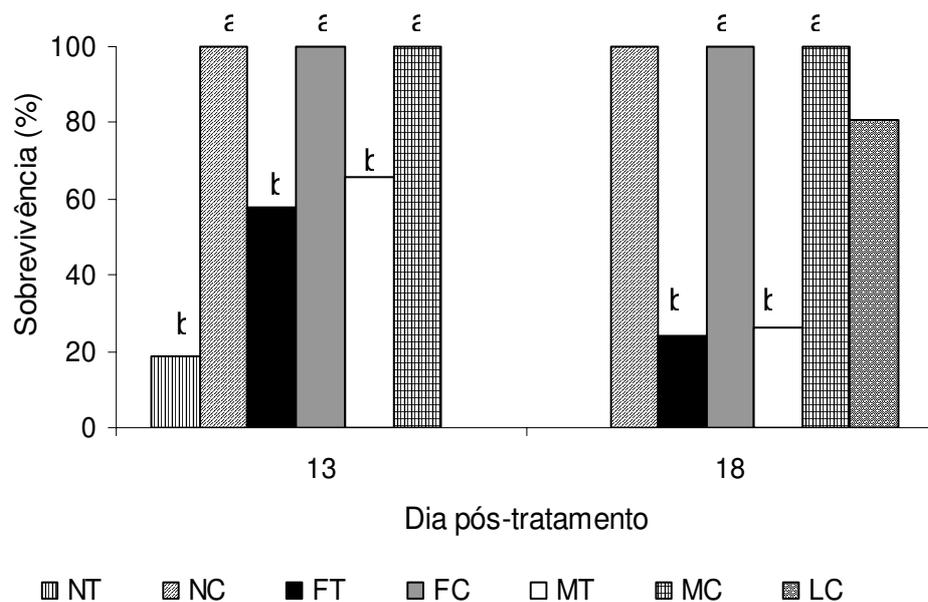


Figura 1. Percentual médio de sobrevivência dos estádios não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* inoculados "in vitro" com o fungo *Beauveria bassiana* na concentração de 10^8 con. mL^{-1} . NT = ninfas tratadas; NC = ninfas controle; FT = fêmeas tratadas; FC = fêmeas do controle; MT = machos tratados; MC = machos do controle; LC = larvas controle. Letras minúsculas iguais dentro do mesmo estádio não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após tratarem larvas e ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* com 10^6 e 10^8 con. mL^{-1} de dois isolados de *B. bassiana*, BARBOSA et al (1997) obtiveram 100% de mortalidade de ambos os estádios. PRETTE et al. (2005) observaram alta mortalidade de larvas (100%) e ninfas (96,3%) ingurgitadas de *R. sanguineus* no 5º dia após o

tratamento com 10^8 con.mL⁻¹ de *B. bassiana*, enquanto GINDIN et al. (2002) obtiveram 94% de mortes de fêmeas ingurgitadas do ácaro. Tais resultados obtidos com estádios alimentados do carrapato foram corroborados pelos achados deste trabalho, confirmando a ação patogênica de *B. bassiana* para todos os estádios de *R. sanguineus*, embora os estádios ingurgitados avaliados por estes estudos tenham se mostrado os mais suscetíveis. No entanto, Gindin et al. (2002) obtiveram pequena mortalidade de larvas não alimentadas de *R. sanguineus* (2 a 8%) expostas ao contato com conídios de *B. bassiana* impregnados em papel de filtro. Provavelmente o resultado pouco expressivo obtido por estes autores, foi consequência da metodologia de inoculação utilizada.

A aplicação de *B. bassiana* em larvas de *R. sanguineus* infestadas em cães não promoveu alteração significativa na maioria dos parâmetros usados para a avaliação do ciclo de vida do ácaro (Tabelas 1 e 2). Entretanto, no tratamento por imersão das larvas, houve redução significativa (91,1%) no número estimado de ovos e no número estimado de novas larvas (91,6%), em relação ao controle. Este aspecto é importante, pois implica numa redução acentuada na quantidade de larvas que poderiam reinfestar o hospedeiro, e evidencia uma ação residual do fungo no ciclo biológico do carrapato. Esta ação já foi observada em insetos, pela mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata* após a infecção de larvas com o fungo *M. anisopliae* (MOCHI et al., 2006). Como o fungo foi aplicado nas larvas apenas uma vez, pode se presumir que a aplicação por várias gerações reduziria substancialmente o número de larvas nas gerações futuras, promovendo o controle do carrapato. No tratamento por pulverização este efeito também ocorreu, mas de modo não significativo, pois a redução no número estimado de novas larvas, em relação ao controle, foi de apenas 16,1%.

Tabela 1. Parâmetros biológicos dos estádios de larva, ninfa e fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem imersos em suspensão de *Beauveria bassiana*.

Estádio inoculado	Fases do ciclo	Parâmetros	Tratamentos/Media ¹ e Erro Padrão			
			Imersão	Controle	F	
Larva	Larva	%RECUP	20,80 ± 9,61A	23,36 ± 9,61A	0,4 ^{ns}	
		%EL	91,99 ± 3,94A	87,26 ± 3,94A	6,93 ^{ns}	
	Ninfa	%RECUP	90,97 ± 3,98A	96,60 ± 3,98A	1,00 ^{ns}	
		%EN	77,13 ± 8,67A	90,09 ± 8,67A	1,12 ^{ns}	
	Fêmea	%RECUP	99,33 ± 0,72A	99,23 ± 0,72A	0,01 ^{ns}	
		PF (g)	0,11 ± 0,16A	0,07 ± 0,16A	3,03 ^{ns}	
		PMO (g)	0,04 ± 0,16A	0,04 ± 0,16A	0,03 ^{ns}	
		NEO	1064,39 ± 2771,90B	11976 ± 2771,90A	7,75*	
		IECO	36,37 ± 13,86A	46,38 ± 13,86A	0,26 ^{ns}	
	Nova larva	%ECLO	56,00 ± 21,64A	80,00 ± 21,64A	0,61 ^{ns}	
		NEL	999,80 ± 2770,67B	11976,12 ± 2770,67A	7,85*	
	Ninfa	Ninfa	%RECUP	9,33±10,88A	28,66±10,88A	1,58 ^{ns}
			%EN	60,00±23,52A	54,78±23,52A	0,02 ^{ns}
		Fêmea	%RECUP	40,00±24,49A	60,00±24,49A	0,33 ^{ns}
PF (g)			0,05±0,03A	0,08±0,03A	0,55 ^{ns}	
PMO (g)			0,04±0,02A	0,08±0,02A	1,91 ^{ns}	
NEO			1023,51±627,03A	1533,06±627,03A	0,33 ^{ns}	
IECO			28,91±17,18A	39,62±17,18A	0,19 ^{ns}	
Larva		%ECLO	40,00±24,49A	60,00±24,49A	0,33 ^{ns}	
		NEL	1023,51±627,03A	1533,06±627,03A	0,33 ^{ns}	
Nova ninfa		%RECUP	31,60±19,08A	44,80±19,08	0,24 ^{ns}	
		%EN	36,20±21,71A	52,00±21,71A	0,27 ^{ns}	
		NEN	730,14±429,52A	988,24±429,52A	0,18 ^{ns}	
Fêmea		Fêmea	%RECUP	20,00±9,43B	74,29±9,43A	16,00*
			PF (g)	0,09±0,00A	0,09±0,00A	0,25 ^{ns}
	PMO (g)		0,04±0,13A	0,05±0,13A	0,52 ^{ns}	
	NEO		950,76±345,55B	2620,40±345,55A	11,67*	
	IECO		38,73±13,77A	54,62±13,77A	0,67 ^{ns}	
	Larva	%ECLO	66,66±24,03A	93,33±24,03A	0,62 ^{ns}	
		NEL	950,76±378,19B	2453,44±378,19A	7,89*	
	Ninfa	%RECUP	29,00±12,74A	74,67±12,74A	6,41 ^{ns}	
		%EN	66,67±23,61A	97,97±23,61A	0,88 ^{ns}	
		NEN	325,48±135,58B	1678,51±135,58A	49,80**	
	Nova fêmea	NEF	70,08±48,24B	609,42±48,24A	62,50**	

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≥0,05).

%RECUP = percentagem de recuperação; %EL = percentagem de ecdise de larvas; %EN = percentagem de ecdise de ninfas; PF = peso médio da fêmea; PMO = peso médio da massa de ovos; NEO = número estimado de ovos; IECO = índice de eficiência da reserva alimentar; %ECLO = percentagem de eclosão, NEL = número estimado de larvas; NEN = número estimado de ninfas; NEF = número estimado de fêmeas.

Tabela 2. Parâmetros biológicos dos estádios de larva, ninfa e fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem pulverizados com suspensão de *Beauveria bassiana*.

Estádio inoculado	Fases do ciclo	Parâmetros	Tratamentos/Media ¹ e Erro Padrão			
			Pulverização	Controle	F	
Larva	Larva	%RECUP	38,48±16,93A	70,96±16,93A	1,84 ^{ns}	
		%EL	44,25±13,06A	73,53±13,06A	2,51 ^{ns}	
	Ninfa	%RECUP	41,98±14,75A	61,94±14,75A	0,92 ^{ns}	
		%EN	81,36±29,85A	81,33±29,85A	0,00 ^{ns}	
	Fêmea	%RECUP	56,55±16,92A	88,33±16,92A	1,76 ^{ns}	
		PF (g)	0,09±0,01A	0,11±0,01A	2,28 ^{ns}	
		PMO (g)	0,05±0,01A	0,06±0,01A	0,88 ^{ns}	
		NEO	1394,44±240,74 ±A	1662,96±240,74A	0,62 ^{ns}	
		IECO	54,24±6,26A	55,54±6,26A	0,02 ^{ns}	
	Nova larva	%ECLO	100,00±0,00A	100,00±0,00A	-	
		NEL	1394,44±240,74 ±A	1662,96±240,74A	0,62 ^{ns}	
	Ninfa	Ninfa	%RECUP	52,00±10,54A	64,00±10,54A	0,65 ^{ns}
			%EN	82,27±11,85A	81,21±11,85A	0,00 ^{ns}
		Fêmea	%RECUP	36,90±12,83A	64,46±12,83A	2,31 ^{ns}
PF (g)			0,11±0,02A	0,12±0,02A	0,04 ^{ns}	
PMO (g)			0,06±0,01A	0,07±0,01A	0,23 ^{ns}	
NEO			1594,84±309,76A	1808,78±309,76A	0,24 ^{ns}	
IECO			42,93±8,07A	57,96±8,07A	1,73 ^{ns}	
Larva		%ECLO	42,80±9,69B	96,16±9,69A	15,16 ^{**}	
		NEL	851,38±216,56B	1743,36±216,56A	8,48 [*]	
Nova ninfa		%RECUP	55,80±10,40A	80,40±10,40	2,80 ^{ns}	
	%EN	76,05±13,81A	90,26±13,81A	0,53 ^{ns}		
	NEN	550,36±141,03B	1258,57±141,03A	12,61 ^{**}		
Fêmea	Fêmea	%RECUP	60,00±8,90A	75,00±8,90A	1,42 ^{ns}	
		PF (g)	0,09±0,01A	0,10±0,01A	0,65 ^{ns}	
		PMO (g)	0,03±0,01A	0,05±0,01A	2,33 ^{ns}	
		NEO	978,07±251,73A	1369,47±251,73A	1,21 ^{ns}	
		IECO	44,22±9,63A	52,81±9,63A	0,40 ^{ns}	
	Larva	%ECLO	21,25±7,18B	98,75±7,18A	58,24 ^{**}	
		NEL	292,88±153,11B	1349,26±153,11A	23,80 ^{**}	
	Ninfa	%RECUP	21,00±7,93B	72,25±7,93A	20,86 ^{**}	
		%EN	65,00±15,52A	92,69±15,52A	1,59 ^{ns}	
		NEN	95,23±74,90B	1223,51±74,90A	113,46 [*]	
Nova fêmea	NEF	11,41±27,80B	437,52±27,80A	117,47 [*]		

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≥0,05).

%RECUP = percentagem de recuperação; %EL = percentagem de ecdise de larvas; %EN = percentagem de ecdise de ninfas; PF = peso médio da fêmea; PMO = peso médio da massa de ovos; NEO = número estimado de ovos; IECO = índice de eficiência da reserva alimentar; %ECLO = percentagem de eclosão, NEL = número estimado de larvas; NEN = número estimado de ninfas; NEF = número estimado de fêmeas.

A atividade patogênica de *B. bassiana* em larvas de *R. sanguineus* infestadas em cães não foi ainda relatada. Em laboratório, *B. bassiana* e *M. anisopliae* causaram grande mortalidade de larvas não alimentadas (MONTEIRO et al., 1998, GINDIN et al., 2002) e larvas ingurgitadas de *R. sanguineus* (SAMISH et al., 2001). Neste ensaio estes resultados não foram confirmados, pois não houve mortalidade de larvas tratadas e nem alteração da maioria dos parâmetros do ciclo biológico do carrapato, diferentemente do relatado em laboratório.

Pela Tabela 1 pode-se observar que não ocorreram diferenças significativas nos parâmetros usados para a avaliação de ninfas submetidas a imersão com *B. bassiana*. Na aplicação por pulverização, a ação do fungo diminuiu a porcentagem de eclosão de larvas oriundas de ninfas tratadas e reduziu em 56,3% o número estimado de novas larvas, em relação ao controle (Tabela 2). Este resultado se assemelha ao observado na infecção de larvas com o fungo, indicando a possibilidade de controle do carrapato pela redução da população de ninfas no ambiente nas gerações subsequentes. Efeito semelhante (redução de 26,1%) ocorreu na aplicação do fungo na forma de banho, mas de modo não significativo. Estudos conduzidos em laboratório mostraram que ninfas de *R. sanguineus* foram muito suscetíveis a ação patogênica de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (SAMISH et al., 2001), e segundo KIRKLAND et al. (2004), ocorreram percentuais de mortalidade maiores que 60% e 90% dentro de 14 dias e 21 a 28 dias após a infecção, respectivamente. A inoculação de ninfas com *B. bassiana* reduziu acentuadamente o percentual de ecdise (PRETTE et al., 2005).

Os resultados promissores obtidos em condições de laboratório para ensaios utilizando larvas e ninfas não foram, no entanto, verificados neste estudo. Isto pode ser consequência da situação nutricional, pois a fixação da ninfa ou de larva propiciou a absorção de fluidos do corpo do cão, o que, possivelmente, lhes conferiu maior resistência a ação patogênica de *B. bassiana*. Mesmo usando larvas e ninfas ingurgitadas, como nos estudos de laboratório, o estado fisiológico não é o mesmo.

Os resultados mais expressivos foram obtidos com a infecção de adultos de *R. sanguineus* com *B. bassiana*. Na aplicação por imersão, obteve-se redução significativa da recuperação de fêmeas e do número estimado de ovos, larvas, ninfas e novas

fêmeas, evidenciando claramente a ação do fungo na fase adulta do ácaro (Tabela 1). A pulverização do fungo sobre adultos promoveu reduções significativas nas porcentagens de eclosão e recuperação de larvas, e do número estimado de larvas, ninfas e nova fêmeas (Tabela 2). Desse modo, obteve-se acentuada redução no número estimado de novas fêmeas, tanto pela aplicação por imersão (88,50%) como por pulverização (97,94%), e esta redução é importante para o controle do carrapato, diminuindo bastante a população do ácaro nas gerações futuras.

Poucos trabalhos relataram a patogenicidade de fungos para adultos de *R. sanguineus*. O mecanismo de penetração e colonização de fêmeas ingurgitadas por *M. anisopliae* foi descrito por GARCIA et al. (2004). Em ensaio conduzido em laboratório, SAMISH et al (2001) obtiveram 100% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e adultos não alimentados, enquanto GINDIN et al. (2002) relataram que fêmeas ingurgitadas foram mais suscetíveis a ação patogênica de *M. anisopliae* do que fêmeas não alimentadas. A aplicação de formulações de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em laboratório, ocasionou 100% de mortalidade de adultos do carrapato (REIS et al., 2005). Neste trabalho o estágio de fêmea foi o mais suscetível a ação do fungo e teve efeito nas fases subsequentes do ciclo de vida do ácaro, reduzindo o número de indivíduos nas fases imaturas, com conseqüente diminuição da população.

Tanto no tratamento de larvas, como de ninfas ou adultos, o fungo apresentou maior efeito nos parâmetros relacionados à postura (Tabelas 1 e 2). Isso ocorreu provavelmente porque as infecções causaram modificações morfológicas ou fisiológicas nas fêmeas ou esterilidade em machos no decorrer do ciclo biológico do ácaro. A ação do patógeno não foi afetada pela aplicação por imersão ou pulverização. No entanto, a recuperação de larvas e ninfas no controle por imersão, foi substancialmente menor do que no controle por pulverização. Em laboratório, a imersão é a forma mais usada para infectar o ácaro. Contudo, é possível que o ambiente das câmaras de alimentação do controle por imersão, tenha se tornado bastante úmido, dificultando a recuperação de larvas e ninfas que, provavelmente, são mais sensíveis à umidade, pois o mesmo fato não ocorreu com a fase adulta. O conhecimento destes fatos pode auxiliar na previsão

de aplicações de fungos, sendo tais informações importantes em programas de manejo integrado de infestações do carrapato em campo.

Não foram encontrados na literatura ensaios para avaliar a efetividade de fungos para o controle de *R. sanguineus* em condições de campo. Em estudos com *Boophilus microplus*, os resultados promissores obtidos em laboratório não foram totalmente reproduzidos nos ensaios iniciais em campo (CASTRO et al., 1997; CORREIA et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999). Em estudo recente, ALONSO-DÍAZ et al. (2007) obtiveram sucesso no controle da infestação natural de bovinos com fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* pela aplicação repetida de *M. anisopliae*. Resultado semelhante pode ser obtido para o controle de *R. sanguineus*, mas é necessário realizar estudos para avaliar a eficiência do fungo em condições de campo e estabelecer metodologias adequadas de aplicação.

4. CONCLUSÕES

Os estádios de larva, ninfa e adultos de *R. sanguineus* são suscetíveis a ação patogênica de *B. bassiana* quando estão se alimentando em cães.

O fungo promove a mortalidade de fêmeas e é capaz de afetar vários parâmetros do ciclo biológico do carrapato nos estádios de larva, ninfa e fêmea.

A aplicação do fungo por imersão ou pulverização, não tem efeito na ação patogênica.

5. REFERÊNCIAS

ALONSO-DÍAZ, M.A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.147, p. 336-340, 2007.

BARBOSA, J.V.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V.; FACCINI, J.L.H. Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, sobre a muda larval e sobrevivência de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.6, p.53-56, 1997.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.; MUKAI, L.S.; ROSA, P.C. Immunisation of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.52, p.79-90, 1994.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J. de; PERALVA, S.L.F.S.; REIS, R.C.S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1883) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.20, n.2, p.78-82, 1999.

CASTRO, A.B.A. de; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E. de C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista da Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v.19, p.73-82, 1997.

CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.B.; FIGUEIRA, F.C.B.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H.; GALVÃO, M.A.M. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, p.495-501, 2006.

CORREIA, A.C.B.; FIORIN, A.C.; MONTEIRO, A. VERÍSSIMO, C.J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, p.189-191, 1998.

ESTAT – **Sistema para análises estatísticas**, V. 2.0 (livre), 1995, Departamento de Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download2/softweres/estat/>

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonization and lesions on engorged female *Rhipicephalus sanguineus*, caused by *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1513-1518, 2004.

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

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI G.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.28, p.283-288, 2002.

KIRKLAND, B.H.; WESTWOOD, G.S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.41, n.4, p. 705 -711, 2004.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, Milano, n.30, p.24- 32, 2001.

LOULY, C.C.B; FONSECA, I.N; OLIVERIA, V.F de; BORGES, L.M.F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.7, p.103–106, 2006.

MARQUES, R.P, MONTEIRO, A.C., PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1675-1680, 2004.

MILLER, R.J.; GEORGE, J.E., GUERRERO, F. CARPENTER, L.; WELCH, J.B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.38, n.2, p.298-302, 2001.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C., BORTOLI, S. A.; DÓRIA. H. O.S.; BARBOSA, J. C. Pathogenicity of *Metarrhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.382-389, 2006.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.7, p.113-116, 1998.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.17, p.245-251, 2001.

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

REIS, R.C.S. MELO, D.R. de.; PERINOTTO, W.M. de S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade in vitro de formulações fungicas sobre ninfas e adultos de

Rhipicephalus sanguineus (LATREILLE, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.14, p.101-105, 2005.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M.C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N.M.; LEMOS, E.R.S. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.44, p.155-158, 2002.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.6, p.1355-1359, 2001.

SZABÓ, M. P. J.; ARANTES, G. J.; BECHARA, G. H. Immunological characterization of *Rhipicephalus sanguineus* tick (Latreille, 1806) antigens by Western blot analysis using serum from infested or vaccinated dogs and guinea pigs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.4, n.2, p.79-83, 1995.

TRHUSFIELD, M.V. **Epidemiologia veterinária**. Acribia, Zaragoza, Ed. 1, 1999, 339p.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; BONOLDI, V.L.N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D.M.B.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H.; SCHUMAKER, T.T. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo v.52, p.111-117, 1997.

CAPÍTULO 3- ATIVIDADE PATOGÊNICA DE *Metarhizium anisopliae* PARA A FASE NÃO ALIMENTADA DE *Rhipicephalus sanguineus*, E INFESTADO ARTIFICIALMENTE EM CÃES

RESUMO – Este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* para os estádios de larva, ninfa, fêmea e macho não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* e infestados em cães, em duas formas de aplicação. Suspensões contendo 10^8 conídios mL^{-1} foram usadas para tratar os estádios não alimentados do ácaro e para imergir ou pulverizar os mesmos estádios infestados em cães, dentro de câmaras de alimentação fixadas no dorso dos animais. *M. anisopliae* promoveu significativa redução da sobrevivência de ninfas, fêmeas e machos não alimentados, deixando claro a atividade patogênica para a fase não alimentada de *R. sanguineus*. No experimento com a infestação em cães, não se observou significativa mortalidade de larvas, ninfas e fêmeas, mas o fungo reduziu o número de indivíduos em algumas fases imaturas, principalmente na aplicação por pulverização, o que contribuiu para diminuir a população do ácaro nas gerações futuras, promovendo o seu controle. A fase não alimentada de *R. sanguineus* é suscetível a atividade patogênica de *M. anisopliae*. A aplicação nos estádios infestados em cães afeta vários parâmetros do ciclo biológico do carrapato, quando aplicado nos estádios de ninfa e fêmea, e a aplicação do fungo por pulverização é mais eficiente do que por imersão

Palavras-chave: Controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, carrapato, cão.

**PATHOGENIC ACTIVITY OF *Metarhizium anisopliae* FOR THE UNFED PHASE
UNFED OF *Rhipicephalus sanguineus*, AND FED IN DOGS**

ABSTRACT – The aim of this research was to evaluate the *Metarhizium anisopliae* pathogenic activity against larva stadiums, nymphs, females and males of *Rhipicephalus sanguineus* during unfed phase and fed in infested dogs, in two application forms. Suspensions containing 10^8 conidia mL⁻¹ was used to treat unfed stadiums fed and stadiums fed in dogs by with immersion or spraying applications, inside of feeding cameras fixed on the back of the animals. *M. anisopliae* promoted significant reduction of the survival of unfed nymphs, females and males, demonstrating high pathogenic activity to *R. sanguineus* in the no fed phase. In the experiment carried out with the infestation in dogs, it was not observed significant mortality of larvae, nymphs and females, but the fungus reduced the number of individuals in some immature phases, mainly in the application for spraying, what contributes to reduce the population of the acarid in the future generations, promoting their control. During no fed phase *R. sanguineus* is susceptible to *M. anisopliae* pathogenic activity. The treatment on infected dogs affects several parameters of the biological cycle, when applied in the nymph and female stadium, and the application of the fungus by spraying it is more efficient than immersion.

Key-words: biological control, microbiological control, entomopatogenic fungus, ticks, dog.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* está presente em todos os continentes, onde parasita primariamente o cão doméstico (LABRUNA, 2004). Embora ele tenha se originado na região Afrotropical, sua distribuição se deve às migrações humanas pelo mundo, levando consigo o cão doméstico (WALKER et. al., 2000). A introdução de *R. sanguineus* nas Américas pode ter ocorrido durante a colonização européia no final do século 15, ou mesmo anteriormente, já que existem relatos fósseis de cães domésticos no Peru, na Bolívia e México datados de antes do século 15 (LEONARD et al., 2002). Atualmente, *R. sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães no Brasil, e tal fato é refletido pela grande atenção com que a indústria farmacêutica veterinária trata este carrapato (LABRUNA, 2004).

O cão doméstico não desenvolve imunidade efetiva para o *R. sanguineus* (SZABÓ et al., 1995) sendo também o único hospedeiro primário conhecido para os três estágios parasitários. Secundariamente, *R. sanguineus* pode parasitar outros mamíferos, aves e répteis. É o principal vetor biológico e reservatório da *Ehrlichia canis* e *Babesia* (ANDEREG & PASSOS, 1999).

Foi comprovado que *R. sanguineus*, principalmente em sua forma imatura, se alimenta em humanos mais freqüentemente do que antes se supunha (HARRISON et al., 1997). No Brasil foi relatado recentemente o primeiro caso de parasitismo por este carrapato (LOULY et al., 2006), *R. sanguineus* pode transmitir doenças para o homem, como a *Rickettsia rickettsii* e a *R. conorii*, agentes casuais, respectivamente, da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas no México e na América do Sul, e da Febre Botonosa na região mediterrânea do sul da Europa e da África do Norte (SWANGO et al., 1992).

R. sanguineus pode completar seu ciclo de vida em um ambiente doméstico e atingir níveis insuportáveis em pouco tempo. Cada estágio ativo pode persistir por meses sem se alimentar e sua permanecer no ambiente muito tempo depois que o cão foi removido. Porém, não há estudos que evidenciam com clareza a duração de cada geração de *R. sanguineus* em condições naturais no Brasil (LABRUNA, 2004).

O controle das infestações de *R. sanguineus* vem sendo realizado principalmente

com a aplicação de produtos químicos, seja no meio ambiente ou nos cães (LABRUNA & PEREIRA, 2001). MILLER et al. (2001) verificaram tolerância aos carrapaticidas DDT, coumaphos, permetrin e amitraz por uma população de *R. sanguineus* e FERNANDES et al. (2001) observaram baixa suscetibilidade de populações de *R. sanguineus* a deltametrina.

O uso indiscriminado desses produtos facilita o desenvolvimento de resistência aos vários princípios ativos e causa poluição ambiental e intoxicação ao homem (PAIÃO, et al. 2001), atingindo principalmente as crianças, que geralmente são mais susceptíveis. Assim, a utilização exclusiva de carrapaticidas químicos é cada dia menos viável em termos práticos e econômicos, tornando-se necessária a alternância com outros métodos em sistemas integrados de controle.

O controle microbiano se destaca como promissor, sendo bactérias e fungos os microrganismos mais estudados no controle do *R. sanguineus*. Os trabalhos que estudaram a ação dos fungos entomopatogênicos foram realizados em laboratório e mostraram que *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* tem ação patogênica para *R. sanguineus* (SAMISH et al., 2001; GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005; REIS et al., 2005; PRETTE et al., 2005). No entanto, não foram encontrados trabalhos que analisaram a ação destes fungos em cães artificialmente infestados.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* para os estádios de larva, ninfa, fêmea e macho não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* e infestados em cães, em duas formas de aplicação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A colônia de *R. sanguineus* foi mantida junto ao Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), segundo metodologia descrita por BECHARA et al. (1994). Utilizou-se o isolado E 9 (obtido de *Deois flavopicta*) de *M. anisopliae*, mantido em cultura estoque na coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV. O

isolado foi cultivado em meio BDA [200 g de batata (B), 20g de dextrose (D) e 20g de ágar (A)] mantido a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 15 dias, com ausência de iluminação. A viabilidade foi determinada pelo método de contagem de conídios germinados em lâmina de microscopia (MARQUES et al., 2004). Suspensões do fungo foram preparadas transferindo conídios da superfície de colônias jovens para tubos contendo 20 mL de solução de Tween 80® a 0,1% (v v-1). A quantificação dos conídios foi feita em câmara de Neubauer com amostras devidamente homogeneizadas de cada suspensão fúngica. Padronizou-se a concentração de 108 conídios mL⁻¹.

Para avaliar a ação do fungo nas fases de larva, ninfa, fêmea e macho não alimentado preparou-se um bioensaio composto por um tratamento formado pelo isolado fúngico com viabilidade de 92,9% e um controle contendo apenas o veículo da suspensão. Grupos de 250 larvas com 14 a 21 dias de idade, de 50 ninfas com 10 dias decorridos da ecdise, 10 machos e 10 fêmeas não ingurgitadas, foram colocados em tubos de plástico e imersos por 1 minuto, em 1 mL da suspensão de conídios ou na solução de Tween (controle). O excesso de líquido foi retirado com papel absorvente e os tubos foram mantidos a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (e umidade relativa acima de 80%, até o 18o dia após o tratamento. Para verificar o efeito do fungo na sobrevivência de ninfas e adultos a observação foi realizada diariamente, mas a avaliação somente ocorreu quando houve o maior número de mortes, e para larvas foi feita apenas no último dia do ensaio. Este procedimento foi necessário devido à sensibilidade de larvas e ninfas e para evitar perdas na contagem.

Terminada a avaliação, os estádios sobreviventes foram colocados para ingurgitar em coelhos, segundo metodologia descrita por BECHARA et al. (1994), para observar se estes estádios faziam as mudas para os estádios subseqüentes do ciclo do carrapato, até se obter novamente a mesma fase em que iniciaram o ciclo. Devido ao grande número de indivíduos, quando os estádios alcançaram as fases de larva, ninfa e fêmea, foram escolhidos 250, 1250 e 25 indivíduos, respectivamente, que foram divididos em grupos homogêneos, para observar a continuidade do ciclo do carrapato. Para avaliar a ação do fungo foram usados os seguintes parâmetros do ciclo biológico dos carrapatos recolhidos: peso da fêmea (PF), peso da massa de ovos (PMO),

percentagem de eclosão (%ECLO), índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em ovos (IECO), percentagem de ecdise de larvas (%EL) e ninfas (%EN) e a percentagem de recuperação de carrapatos (%RECUP) (Szabó et al., 1995). Com base nestes parâmetros calculou-se: a) número estimado de ovos (NEO) = PMO x 27*/0,001; b) número estimado de larvas (NEL) = NEO x %ECLO/100; c) número estimado de larvas recuperadas (NELR) = NEL x número de larvas recuperadas da amostra/100; d) número estimado de ninfas (NEN) = NELR x %EL/100; e) número estimado de fêmeas (NEF) = NEN x número de fêmeas da amostra/100; f) número estimado de fêmeas recuperadas (NEFR) = NEF x percentagem de fêmeas recuperadas da amostra/100 (* é uma constante e corresponde à estimativa do número de larvas por miligrama de ovos).

No ensaio com o carrapato infestado artificialmente em cães, foram utilizados 10 filhotes da raça Poodle, vacinados, vermifugados e isentos de ectoparasitos, que foram alimentados com ração e água “ad libitum”. Os cães foram mantidos em boxes individuais pertencentes ao CPPAR da FCAV.

No dorso de cada animal foram fixadas, com material atóxico, três câmaras de alimentação de plástico com 5 cm de diâmetro e 4 cm de altura (dois tratamentos e um controle). Colares de restrição foram colocados nos cães para evitar a retirada das câmaras.

Um dia após a montagem das câmaras, em cada uma delas foi realizada a infestação dos cães, com 5 fêmeas, 5 machos, 30 ninfas e 250 larvas de *R. sanguineus*. A aplicação do fungo foi realizada de duas formas. Na primeira, 24 horas após a infestação, cada câmara do grupo tratamento foi pulverizada com 0,5 mL de suspensão contendo $2,1 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ de *M. anisopliae* com 89% de viabilidade, e o grupo controle com a solução de Tween 80® a 0,1% (v v⁻¹), sendo em seguida fechadas. Na segunda forma de aplicação, grupos de fêmeas, machos, ninfas e larvas de *R. sanguineus* iguais aos já mencionados, foram imersos na mesma suspensão de conídios por um minuto. Após a retirada do excesso de líquido com papel absorvente, os grupos foram colocados dentro das câmaras de alimentação para infestação dos cães.

Para cada forma de aplicação foram utilizados cinco cães. No dia seguinte a aplicação, e diariamente por sete dias, as câmaras foram abertas e recolhidos os estádios já desprendidos. Após a separação e contagem de acordo com os respectivos estádios, estes foram mantidos a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 80% de umidade, para realizarem mudas. Após a ecdise, todos os estágios foram colocados para ingurgitar em coelhos, visando o desenvolvimento e avaliação do ciclo biológico do carrapato, conforme já descrito no ensaio com as fases não alimentadas do ácaro. A única diferença foi o número de larvas e ninfas separadas que, neste ensaio, foram de 500 e 150, respectivamente.

Para análise dos dados utilizou-se o programa ESTAT (1995). Todas as variáveis foram estudadas de maneira descritiva, pelo cálculo da média, desvio padrão e mediana. As médias foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado (ANOVA) e as comparações múltiplas foram aferidas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Suscetibilidade da fase não alimentada de *R. sanguineus* a ação do fungo

M. anisopliae promoveu significativa redução da sobrevivência de ninfas, fêmeas e machos não alimentados, a partir do quinto dia pós-tratamento. No 10º dia, apenas 11,6% dos machos sobreviveram e no 15º dia todos os estádios inoculados com o fungo estavam mortos, deixando claro a atividade patogênica do fungo para a fase não ingurgitada de *R. sanguineus* (Figura 1).

Estes achados se assemelham àqueles encontrados na literatura. De acordo com SAMISH et al. (2001), 69 a 95,9% de larvas e 47 a 92,2% de ninfas estavam mortas sete dias após a inoculação com três isolados de *M. anisopliae* e 100% de fêmeas e machos morreram até o 21º dia pós-tratamento. REIS et al (2005) obtiveram 100% de mortalidade após tratarem larvas alimentadas e adultos não alimentados de *R. sanguineus* com formulações de *M. anisopliae*. Segundo GINDIN et al. (2002) a concentração 10^7 conídios mL^{-1} de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium flavoviride*, *M.*

anisopliae e *Paecilomyces fumosoroseus* causou a morte em vários estádios *R. sanguineus*, mas os três isolados de *M. anisopliae* demonstraram maior virulência. Possivelmente, a rápida germinação e penetração de *M. anisopliae* através da epicutícula do carrapato (GARCIA et al., 2004) sejam importantes fatores para a virulência.

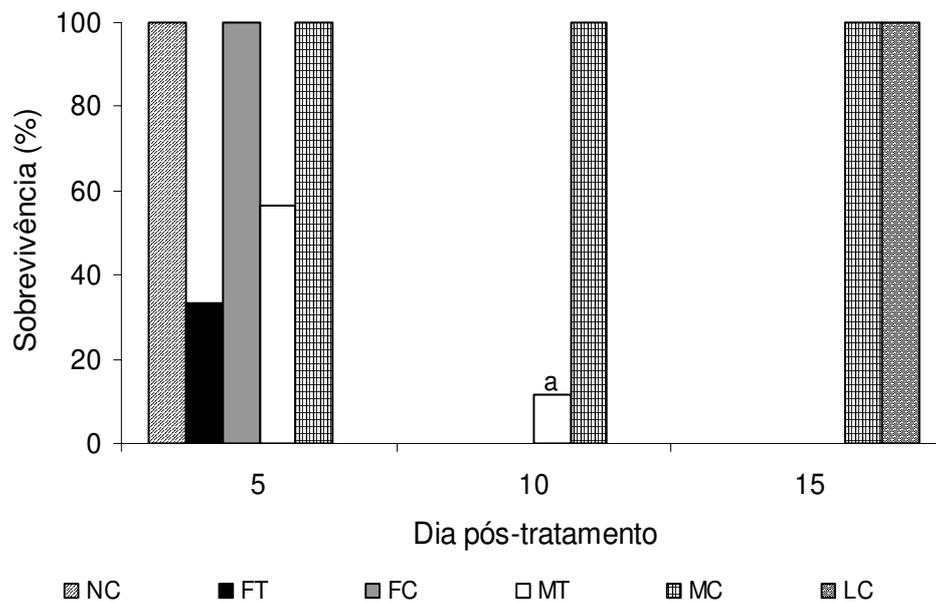


Figura 1. Percentual médio de sobrevivência dos estádios não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* inoculados in vitro com o fungo *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^8 con. mL⁻¹. NC = ninfas controle; FT = fêmeas tratadas; FC = fêmeas do controle; MT = machos tratados; MC = machos do controle; LC = larvas do controle. Letras minúsculas iguais dentro do mesmo estádio não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No 5° dia as comparações para os estádios de ninfa e no 15° dia para machos e larvas não foram feitas porque ocorreu 100% de mortalidade nos grupos tratados.

3.2 Ação do fungo em larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* infestados em cães

A aplicação de *M. anisopliae* em larvas de *R. sanguineus* não reduziu a sobrevivência das mesmas e não promoveu alterações significativas nos parâmetros usados para a avaliação do ciclo de vida do ácaro. Do mesmo modo, a ação do fungo não foi influenciada pela sua aplicação na forma de imersão ou pulverização (Tabelas 1 e 2).

A atividade patogênica de *M. anisopliae* em larvas de *R. sanguineus* infestadas em cães não foi ainda relatada. Em condições de laboratório *M. anisopliae* e *B. bassiana* causaram grande mortalidade de larvas não alimentadas (MONTEIRO et al., 1998; GINDIN et al., 2002) e ingurgitadas de *R. sanguineus*, sendo os isolados de *M. anisopliae* mais virulentos do que os isolados de *B. bassiana* (SAMISH et al, 2001). Neste ensaio realizado “in vivo” os resultados obtidos em laboratório não foram confirmados, pois não houve mortalidade de larvas tratadas com o fungo e nem alteração em outros parâmetros do ciclo biológico do carrapato.

Tabela 1. Parâmetros biológicos dos estádios de larvas, ninfas e fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem imersos em suspensão de *Metarhizium anisopliae*.

Estádio inoculado	Fase do ciclo	Parâmetro	Tratamento/Media ¹ e Erro Padrão		
			Imersão	Controle	F
Larva	Larva	%RECUP	16,00 ± 4,23A	23,36 ± 4,23A	1,51 ^{ns}
		%EL	82,93 ± 2,88A	87,26 ± 2,88A	1,13 ^{ns}
	Ninfa	%RECUP	80,13±6,46A	96,60 ± 6,46A	3,25 ^{ns}
		%EN	88,02± 3,66A	90,02 ± 3,66A	0,16 ^{ns}
	Fêmea	%RECUP	98,26 ± 1,34A	99,23 ± 0,72A	0,26 ^{ns}
		PF (g)	0,07 ± 0,16A	0,09 ± 0,16A	0,49 ^{ns}
		PMO (g)	0,05 ± 0,14A	0,04 ± 0,14A	0,09 ^{ns}
		NEO	1350,00 ± 2476,48A	11976± 2476,48A	0,81 ^{ns}
		IECO	53,99 ± 13,01A	46,38 ± 13,01A	0,17 ^{ns}
	Nova larva	%ECLO	80,00 ± 20,00A	80,00 ± 20,00A	0,00 ^{ns}
NEL		1350,00 ± 380,34A	1197,61 ± 380,34A	0,08 ^{ns}	
Ninfa	Ninfa	%RECUP	16,66±12,55A	28,66±12,55A	0,46 ^{ns}
		%EN	27,05±19,86A	54,78±19,86A	0,97 ^{ns}
	Fêmea	%RECUP	20,00±22,36A	60,00±22,36A	1,60 ^{ns}
		PF (g)	0,03±0,03A	0,08±0,03A	1,70 ^{ns}
		PMO (g)	0,01±0,02A	0,05±0,02A	1,80 ^{ns}
		NEO	499,28±566,72A	1533,06±566,72A	1,66 ^{ns}
		IECO	13,66±15,22A	39,62±15,22A	1,45 ^{ns}
	Larva	%ECLO	20,00±22,36A	60,00±22,36A	1,60 ^{ns}
		NEL	499,28±566,72A	1533,06±566,72A	1,66 ^{ns}
	Nova ninfa	%RECUP	17,60±18,15A	44,80±18,15A	1,12 ^{ns}
%EN		18,63±19,98A	52,00±19,98A	1,39 ^{ns}	
NEN		409,41±409,40A	988,24±409,40A	1,00 ^{ns}	
Fêmea	Fêmea	%RECUP	60,00±16,99A	73,33±16,99A	0,31 ^{ns}
		PF (g)	0,08±0,00A	0,08±0,00A	1,00 ^{ns}
		PMO (g)	0,05±0,00A	0,05±0,00A	0,25 ^{ns}
		NEO	1272,87±127,23A	1310,20±127,23A	0,04 ^{ns}
		IECO	56,82±3,62A	54,62±3,62A	0,18 ^{ns}
	Larva	%ECLO	90,00±7,17A	93,33±7,17A	0,11 ^{ns}
		NEL	1153,17±168,09A	1226,72±168,09A	0,10 ^{ns}
	Ninfa	%RECUP	74,12±8,16A	93,26±8,16A	2,75 ^{ns}
		%EN	95,74±2,55A	97,97±2,55A	0,38 ^{ns}
		NEN	535,17±29,31B	839,25±29,31A	53,80 ^{**}
Nova fêmea	NEF	128,83±21,94B	609,42±21,94A	32,13 ^{**}	

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (P≥0,05).

%RECUP=percentagem de recuperação; %EL= percentagem de ecdise de larvas; %EN=percentagem de ecdise de ninfas; PF= peso médio da fêmea; PMO= peso médio da massa de ovos; NEO= número estimado de ovos; IECO= índice de eficiência de conversão da reserva alimentar; %ECLO= percentagem de eclosão, NEL= número estimado de larvas; NEN= número estimado de ninfas; NEF= número estimado de fêmeas.

Tabela 2. Parâmetros biológicos dos estádios de larvas, ninfas e fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães, após serem pulverizados com suspensão de *Metarhizium anisopliae*

Estádio inoculado	Fases do ciclo	Parâmetro	Tratamento/Media ¹ e Erro Padrão		
			Pulverização	Controle	F
Larva	Larva	%RECUP	41,76±13,62A	70,96±13,62A	2,30 ^{ns}
		%EL	72,44±6,62A	73,53±6,62A	0,01 ^{ns}
	Ninfa	%RECUP	95,62±8,41A	61,94±8,41B	8,00*
		%EN	79,56±3,92A	81,33±3,92A	6,41*
	Fêmea	%RECUP	78,29±11,04A	88,33±11,04A	0,01 ^{ns}
		PF (g)	0,10±0,01A	0,11±0,01A	1,13 ^{ns}
		PMO (g)	0,06±0,00A	0,06±0,00A	0,05 ^{ns}
		NEO	1582,40±149,44A	1662,96±149,44A	0,15 ^{ns}
		IECO	59,52±5,12A	55,54±5,12A	0,30 ^{ns}
	Nova larva	%ECLO	100,00±0,00	100,00±0,00	-
		NEL	1582,40±149,44A	1662,96±149,44A	0,15 ^{ns}
	Ninfa	Ninfa	%RECUP	44,00±11,10A	64,00±11,10A
%EN			71,16±10,15A	81,21±10,156A	0,49 ^{ns}
Fêmea		%RECUP	44,62±17,40A	64,46±17,40A	0,65 ^{ns}
		PF (g)	0,08±0,02A	0,12±0,02A	0,90 ^{ns}
		PMO (g)	0,04±0,01A	0,07±0,01A	2,35 ^{ns}
		NEO	1105,55±349,49A	1808,78±349,49A	2,02 ^{ns}
		IECO	30,54±8,96A	57,96±8,96A	4,68 ^{ns}
Larva		%ECLO	34,50±10,66B	96,16±10,66A	16,74**
		NEL	656,63±250,07B	1743,36±250,07A	9,44*
Nova ninfa		%RECUP	47,40±13,80A	80,40±13,80A	2,86 ^{ns}
		%EN	50,77±15,16A	90,26±15,16A	3,39 ^{ns}
		NEN	351,86±142,34B	1258,57±142,34A	10,88*
Fêmea	Fêmea	%RECUP	25,00±5,00B	75,00±5,00A	50,00**
		PF (g)	0,13±0,01A	0,10±0,01A	3,27 ^{ns}
		PMO (g)	0,06±0,01A	0,05±0,01A	1,60 ^{ns}
		NEO	1738,80±202,92A	1369,47±202,92A	1,66 ^{ns}
		IECO	48,34±4,49A	52,81±4,49A	0,53 ^{ns}
	Larva	%ECLO	43,75±6,73B	98,75±6,73A	33,38**
		NEL	728,12±145,34B	1349,26±145,34A	9,13*
	Ninfa	%RECUP	41,50±9,61A	72,25±9,61A	5,12 ^{ns}
		%EN	69,46±9,52A	92,69±9,52A	2,97 ^{ns}
		NEN	179,42±57,02B	882,71±74,90A	76,05**
	Nova fêmea	NEF	26,43±40,20B	437,52±40,20A	27,84**

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (P≥0,05).

%RECUP=percentagem de recuperação; %EL= percentagem de ecdise de larvas; %EN=percentagem de ecdise de ninfas; PF= peso médio da fêmea; PMO= peso médio da massa de ovos; NEO= número estimado de ovos; IECO= índice de eficiência de conversão da reserva alimentar; %ECLO= percentagem de eclosão, NEL= número estimado de larvas; NEN= número estimado de ninfas; NEF= número estimado de fêmeas.

Pela Tabela 1 pode-se observar que a imersão de ninfas com a suspensão de conídios de *M. anisopliae* não afetou a sobrevivência das mesmas e não produziu efeito significativo nos parâmetros usados para avaliar o ciclo de vida do ácaro, até se atingir novamente a mesma fase, ou seja, a formação de novas ninfas. Entretanto, no tratamento onde as ninfas foram pulverizadas com a suspensão do fungo, apesar de não ter afetado a sobrevivência, verificou-se uma redução na percentagem de eclosão (64,1%) e no número estimado de larvas (62,3%), e ainda, no número estimado de novas ninfas (72%) (Tabela 2). Como o fungo foi aplicado nas ninfas apenas uma vez, pode se presumir que a pulverização por várias gerações pode reduzir substancialmente o número de ninfas nas gerações futuras, promovendo o controle do carrapato. Outro aspecto a ser destacado, é que a pulverização das ninfas com os fungos produziu efeito significativo em alguns parâmetros do ciclo do carrapato, enquanto na aplicação por imersão isso não foi observado.

Estudos conduzidos em laboratório mostraram que ninfas de *R. sanguineus* foram altamente suscetíveis a ação patogênica de *M. anisopliae*, sendo os isolados de *M. anisopliae* os mais efetivos em promover a mortalidade (SAMISH et al., 2001), obtendo-se percentuais maiores que 60 e 90% em 14 e entre 21 a 28 dias após a infecção, respectivamente (KIRKLAND et al., 2004). Formulações de *M. anisopliae*, aplicadas em laboratório, produziram 100% de mortalidade de ninfas no 15º dia após a aplicação (REIS et al., 2005).

Apesar dos estudos conduzidos em laboratório relatarem a capacidade do fungo em promover a morte de larvas e ninfas, este fato não foi verificado em nossos ensaios. Tal fato pode ser consequência da situação nutricional, pois a fixação da larva ou da ninfa no cão propiciou a absorção de fluidos do corpo do animal, o que, possivelmente, lhes conferiu maior resistência a ação patogênica do fungo. Isso, provavelmente, não ocorre em condições de laboratório, mesmo usando larvas e ninfas ingurgitadas, pois o estado fisiológico de ambas não é o mesmo, nas diferentes condições.

Outro aspecto importante observado, é que houve redução na eclosão de larvas

oriundas de ninfas pulverizadas, evidenciando uma ação residual do fungo no ciclo do carrapato. Esta ação já foi observada em insetos, quando a mortalidade de adultos de *Ceratitis capitata* (mosca-das-frutas) ocorreu após a infecção de larvas por *M. anisopliae* (MOCHI et al., 2006).

Quando os adultos foram imersos com conídios de *M. anisopliae* não se obteve redução na percentagem de recuperação de fêmeas (Tabelas 1), mas no tratamento por pulverização houve efeito do fungo, pois o número de fêmeas recuperadas foi acentuadamente menor (Tabela 2). Prosseguindo o ciclo, observou-se redução na percentagem de eclosão e no número estimado de novas larvas, apenas quando as fêmeas foram pulverizadas com o fungo (Tabela 2). O resultado mais expressivo da aplicação do fungo nos adultos foi verificado pela redução do número estimado de novas ninfas e novas fêmeas. No tratamento por imersão estas reduções foram de 36,2 e 78,9%, respectivamente, e no tratamento por pulverização foram de 79,7 e 93,9%, respectivamente (Tabelas 1 e 2). Este fato é muito importante, pois permite diminuir substancialmente a população do ácaro nas gerações futuras, promovendo o seu controle.

Poucos trabalhos investigaram a patogenicidade de fungos para adultos de *R. sanguineus*. Em estudo conduzido em laboratório, SAMISH et al. (2001) obtiveram 100% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas e adultos não alimentados, enquanto GINDIN et al. (2002) relataram que fêmeas ingurgitadas foram mais suscetíveis a ação patogênica de *M. anisopliae* do que fêmeas não alimentadas. GARCIA et al. (2004) descreveram o mecanismo de penetração e colonização em ovos e nos estádios alimentados de *R. sanguineus* por *M. anisopliae* e verificaram que os estádios de fêmea ingurgitada foi o mais suscetível a infecção. A aplicação, em laboratório, de formulações de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, ocasionou 100% de mortalidade de adultos do carrapato (REIS et al., 2005). Neste trabalho, o fungo promoveu a morte de fêmeas pulverizadas e teve efeito em alguns dos parâmetros do ciclo de vida do carrapato, reduzindo o número de indivíduos nas fases subseqüentes, o que é importante para diminuir a população ao ácaro.

A mortalidade ocorrida nas fêmeas e que não foi observada em larvas e ninfas,

pode ser devido a diferença de composição da cutícula entre os instares. A cutícula dos carrapatos é formada pela camada externa (epicutícula) composta por ceras e internamente por proteínas, e por uma camada interna (procutícula) formada por quitina e proteína (BALASHOV, 1972). Já foi demonstrado que a penetração do fungo via tegumento está ligada a secreção de enzimas extracelulares como proteases, lipases e quitinases e na maioria dos casos, a ação física auxilia no processo (ALVES, 1998). De acordo com ODHIAMBO (1982), a camada de ceras e lipídeos é vista em *Boophilus microplus* somente a partir da ecdise na ninfa, e a produção de lipídeos aumenta enquanto a fêmea se alimenta. Durante a alimentação a quantidade de lipídeos passa de 22 para 63 µg (SONENSHINE, 1991). Sugere-se que o mesmo fenômeno possa ocorrer em relação ao *R. sanguineus*, facilitando a penetração do fungo na fêmea pela produção de lipases. Corrobora com esta hipótese a infecção o difusa e sem preferências por sítios específicos no carrapato (GARCIA et al., 2004), demonstrando a capacidade de penetração por um tegumento composto por várias camadas (BALASHOV, 1972), e, portanto com atividade enzimática considerável.

Outro fato digno de nota foi à redução da percentagem de eclosão de larvas obtida quando ninfas e fêmeas foram pulverizadas com a suspensão de conídios. Isso possivelmente ocorreu porque as infecções ocasionaram modificações morfológicas ou fisiológicas nas fêmeas ou esterilidade em machos. O conhecimento deste fato pode auxiliar na previsão de aplicações de fungos visando o controle do carrapato, e é importante em programas de manejo integrado de infestações em campo.

Até ao presente momento foi encontrado na literatura apenas um trabalho destinado a investigar a patogenicidade de fungos para carrapatos do gênero *Rhipicephalus* em condições de campo. KAYAA et al. (1996) avaliaram a eficácia de *M. anisopliae* para o controle de *R. appendiculatus*, e concluíram que o fungo apresentou elevada atividade acaricida e persistência de uma a três semanas após a aplicação dentro do pavilhão auditivo de bovinos naturalmente infestados pelo ácaro. A maioria dos trabalhos neste sentido foram conduzidos com o carrapato *Boophilus microplus* (CASTRO et al., 1997, CORREIA et al., 1998, BITTENCOURT et al., 1999, BASSO et al., 2005), mas só recentemente os resultados promissores obtidos em condições de

laboratório, foram reproduzidos com algum sucesso em testes a campo (ALONSO-DÍAZ et al., 2007).

Estudos específicos versando sobre o uso de fungos para o controle de *R. sanguineus* infestado em animais não foram encontrados na literatura. Neste trabalho, alguns resultados promissores foram obtidos, mas são ainda preliminares, e novas investigações precisam ser conduzidas para analisar a eficiência do fungo em condições de campo e para estabelecer metodologias eficazes de aplicação.

4. CONCLUSÕES

1) *Metarhizium anisopliae* é patogênico para a fase não ingurgitada de *Rhipicephalus sanguineus*, promovendo reduções significativas na sobrevivência de todos os estádios não alimentados do ácaro.

2) O fungo não reduz a sobrevivência de larvas e ninfas infestadas em cães, mas é capaz de afetar alguns parâmetros do ciclo biológico do carrapato, quando aplicado nesses estádios.

3) A aplicação do fungo por pulverização é mais eficiente do que por imersão, pois promove a mortalidade de fêmeas tratadas e tem maior efeito nas fases subseqüentes do ciclo de vida do ácaro, contribuindo para a redução da população nas gerações futuras.

6. REFERÊNCIAS

ALONSO-DÍAZ, M.A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÚN, C.A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus*

microplus (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.147, p. 336-340, 2007.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1998, 386p.

BALASHOV, Y. S. *Bloodsucking ticks (Ixodoidea): vectors of diseases in man and animals*. Cairo: USNAMRU/Med. Zool. Dep., 1972. 319p. (Transl. 500-7500).

ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose canina-revisão. **Clínica Veterinária**, Milano, 12: 31-38, 1999

BASSO, 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**, Brasília, v.40, n.6, p.595-600, 2005.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.; MUKAI, L.S.; ROSA, P.C. Immunisation of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.52, p.79-90, 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, 1882 sobre larvas do carrapato *ANOCENTOR NITENS* (Acari: Ixodidae). **Parasitologia al Dia**, Santiago, Chile, v. 23, n. 3-4, p. 82-86, 1999.

CASTRO, A.B.A. de; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E. de C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista da Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v.19, p.73-82, 1997.

CORREIA, A.C.B.; FIORIN, A.C.; MONTEIRO, A. VERÍSSIMO, C.J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, p.189-191, 1998.

ESTAT – **Sistema para análises estatísticas**, V. 2.0 (livre), 1995, Departamento de Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download2/softweres/estat/>

FERNANDEZ, F.F., FREITAS, E.P., SILVA, J.R., SILVA, O.R., SILVA, I.G. (2001). Toxicology effects and in vitro inefficacy of deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* from Goiania, Goias, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.34, n.2, p.159-165

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

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonization and lesions on engorged female *Rhipicephalus sanguineus*, caused by *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1513-1518, 2004.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI G.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.28, p.283-288, 2002.

HARRISON, B. A.; ENGER B.R.; APPERSON, C.S. Ticks (Acari:Ixodidae) uncommonly found biting humans in North Carolina. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, 22: 6-12, 1997.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*. Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 15-20, 1996.

KIRKLAND, B.H.; WESTWOOD, G.S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.41, n.4, p. 705 -711, 2004.

LABRUNA, M. B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae).**Revista Brasileira de Veterinária**, Pirassununga, v.13, p. 123-124, 2004.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**,Milano, n.30, p.24- 32, 2001.

LEONARD, J.A., WAYNE, R.K., WHEELER, J. VALADEZ, R., GUILLEN, S., VILA C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science**, Washington, 298, p. 1613-1616.

LOULY, C.C.B; FONSECA, I.N; OLIVERIA, V.F de; BORGES, L.M.F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.7, p.103–106, 2006.

MARQUES, R.P, MONTEIRO, A.C., PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1675-1680, 2004.

MILLER, R.J.; GEORGE, J.E., GUERRERO, F. CARPENTER, L.; WELCH, J.B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarentine Center, Panama. **Journal of Medical Entomology**, Lanhan, v.38, n.2, p.298-302, 2001.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C., BORTOLI, S. A.; DÓRIA. H. O.S.; BARBOSA, J. C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.382-389, 2006.

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* (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.7, p.113-116, 1998.

ODHIAMBO, T.R. **Current themes in tropical science: physiology of ticks**. Oxford: Pergamon, 1982, 508p.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.17, p.245-251, 2001.

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

REIS, R.C.S. MELO, D.R. de.; PERINOTTO, W.M. de S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade in vitro de formulações fungicas sobre ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILE, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.14, p.101-105, 2005.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.6, p.1355-1359, 2001.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. Oxford: Oxford University, 1993. 463p.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Infecções bacterianas, riquetsiais, protozoais e outras. In: ETTINGER, S.J. Tratado de medicina veterinária interna: **Moléstias do cão e do gato**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap.46, sec. 3, p. 277-311, 1992.

SZABÓ, M. P. J.; ARANTES, G. J.; BECHARA, G. H. Immunological characterization of *Rhipicephalus sanguineus* tick (Latreille, 1806) antigens by Western blot analysis using serum from infested or vaccinated dogs and guinea pigs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.4, n.2, p.79-83, 1995.

WALKER, J.B. KEIRANS, J.E., HORAK, I.G. **The genus *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world**. London, Cambridge Univ. Press. 2000, 643p.

CAPÍTULO 4 - AÇÃO DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *Rhipicephalus sanguineus* NATURALMENTE ENCONTRADOS NO AMBIENTE HABITADO PELO CÃO

RESUMO – A ação de fungos sobre o carrapato de cães não foi ainda investigada em condições de ambiente. Este trabalho teve por objetivo verificar a ação dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em boxes naturalmente infestados por ovos, larvas, ninfas e adultos ingurgitados e não alimentados de *R. sanguineus*. Suspensões contendo 10^8 conídios mL⁻¹ foram pulverizadas uma vez por semana, durante nove semanas, em boxes naturalmente infestados com todos os estádios do ciclo de vida do ácaro. Em cada baia foram colocados três cães e diariamente, por 62 dias, foi avaliada a infestação de cada animal. *B. bassiana* reduziu o número de larvas não alimentadas (53,74%) e de larvas ingurgitadas (43,4%) na primeira semana pós-tratamento, mas o mesmo efeito não foi observado para *M. anisopliae*. Ambos os fungos reduziram o número de ninfas ingurgitadas na primeira semana de tratamento, sendo que para *B. bassiana* a redução foi de 78,8%, enquanto para *M. anisopliae* foi de 25,9%. Apenas *B. bassiana* mostrou efeito sobre o estágio de ninfa não alimentada e sobre os adultos, reduzindo os respectivos números ao longo de todo o experimento em 61,8 e 52,5%. Tanto *B. bassiana* como *M. anisopliae* reduziram o número de fêmeas em várias avaliações sendo que, na oitava semana para *B. bassiana* e na sétima para *M. anisopliae*, esta redução foi de 100%. Os fungos se mostraram patogênicos para vários estádios de *R. sanguineus* em condições de ambiente, sendo *B. bassiana* mais efetiva do que *M. anisopliae* e o estágio de fêmea o mais susceptível a ação de ambos os fungos.

Palavras-chave: controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, carrapato, infestação natural.

**ACTION OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* AGAINST
Rhipicephalus sanguineus STADIUMS, NATURALLY PRESENT IN THE DOG
ENVIRONMENT**

ABSTRACT - The action of fungi on the tick of dogs was not investigated in environmental conditions so far. The aim of this research was to verify the pathogenic activity of the fungus *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against eggs engorged and unfed, larvae, nymphs and adults of *R. sanguineus* present in kennels naturally infested. Suspensions containing 10^8 conidia mL⁻¹ was administered one time a week, during 63 days, in boxes naturally infested with all of the stadiums of the cycle of life of this acarid. In each box three dogs were placed daily, for nine weeks, the infestation of each animal was evaluated. The results demonstrated that *B. bassiana* reduced the number of larvae not fed (53.74%) and of unfed engorged larvae (43.4%) in the first week after treatment, but the same effect was not observed for *M. anisopliae*. Both fungi reduced the number of engorged nymphs in the first week of treatment, and for *B. bassiana* the reduction was of 78.8%, while for *M. anisopliae* it was of 25.9%. Just *B. bassiana* showed effect on the unfed nymph stadium and on the adults, reducing the respective numbers along whole the experiment in 61.8 and 52.5%. As much *B. bassiana* as *M. anisopliae* they reduced the number of females in several evaluations and, the eighth week for *B. bassiana* and in the seventh for *M. anisopliae*, this reduction was of 100%. Both pathogenic fungi showed efficacy for controlling all stadiums of *R. sanguineus* in environmental conditions, being *B. bassiana* more effective than *M. anisopliae*. At the same time, tick females demonstrated more susceptibility to the fungus action.

Key words: biological control, microbiology control, entomopathogenic fungus, tick, natural infestation.

1. INTRODUÇÃO

Rhipicephalus sanguineus é um carrapato heteroxeno, cosmopolita, provavelmente pela ampla distribuição de seu hospedeiro natural que é o cão, se caracteriza por ter hábito nidícola, sendo que as fases de vida livre como as ecdises, a postura e a incubação dos ovos se realizam no ambiente (LABRUNA & PEREIRA, 2001). A duração das fases de desenvolvimento em vida livre pode variar de poucas semanas a alguns meses, sendo inversamente proporcional à temperatura ambiente (LABRUNA 2004).

R. sanguineus é vetor de diversos patógenos de importância para os caninos, incluindo os agentes da babesiose, haemobartolose, hepatozoonose e erliquiose (WOLDEHIWET & RISTIC, 1993). No Brasil a participação deste carrapato como um vetor potencial de *Rickettsia rickettsii*, agente da febre maculosa e da borreliose Lyme símile, foi relatada por ROZENTAL et al. (2002) e YOSHINARI et al. (1997), respectivamente.

Devido à ampla distribuição geográfica, sua capacidade em desenvolver infestações intensas em pouco tempo e a possibilidade de veiculação de agentes infecciosos para os animais e o homem, o controle do *R. sanguineus* é cada vez mais importante, especialmente no meio urbano. Este controle é feito rotineiramente por meio de compostos químicos sintéticos. Entretanto, existe a possibilidade do *R. sanguineus* se tornar tolerante ou resistente, uma vez que diversos desses compostos estão sendo administrados indiscriminadamente sob formas e dosagens variadas, em cães e ambientes infestados, gerando ineficiência acaricida (FURLONG, 1993), prejuízos econômicos e intoxicações aos animais e ao homem (FERNANDES, 2000).

O controle biológico com fungos entomopatogênicos apresenta vantagens devido a sua grande variabilidade genética e por meio de técnicas apropriadas, é possível obter isolados de fungos altamente virulentos (ALVES, 1998). Os fungos têm a vantagem da capacidade de penetração tegumentar, já que a infecção oral é praticamente nula para artrópodes hematófagos, e de não ocasionarem intoxicações, sendo adequados para o controle de parasitos cujos hospedeiros ocorrem comumente em ambientes habitados ou visitados por pessoas.

Dentre os fungos mais estudados capazes de promover infestações em *R. sanguineus*, estão os gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* (SAMISH et al. 2001, GARCIA et al. 2004, GARCIA et al. 2005, REIS et al., 2005, PRETTE et al. 2005).

De acordo com LABRUNA & PEREIRA (2001), apenas 5% dos carrapatos estão no hospedeiro em um determinado tempo e os outros 95% se encontram no ambiente, nas fases de vida livre, ocasião em que não se alimentam. Por esta razão é importante verificar se o método de controle é capaz de combater todas as fases do parasito. Contudo, poucas pesquisas foram realizadas com objetivo de determinar a ação de fungos para *R. sanguineus* em condições de campo e, como conseqüência, os requisitos necessários para o estabelecimento de programas de controle integrado do carrapato não foram ainda estabelecidos.

O presente trabalho tem por objetivo verificar a ação dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em canis naturalmente infestados por ovos, e por larvas, ninfas e adultos ingurgitados e pelos mesmos estádios não alimentados de *R. sanguineus*.

2. MATERIAL e METODOS

A colônia de *R. sanguineus* foi mantida junto ao Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), segundo metodologia descrita por BECHARA et al. (1994). Utilizou-se os isolados AM 9 (obtido de *Deois incompleta*) de *B. bassiana* e E 9 (obtido de *Deois flavopicta*) de *M. anisopliae*, mantidos em culturas estoques na coleção do laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/Unesp. Os isolados foram cultivados em meio BDA [200 g de batata (B), 20g de dextrose (D) e 20g de ágar (A)] mantido a 27 ± 1 °C, durante 15 dias, com ausência de iluminação.

M. anisopliae foi produzido em arroz, segundo metodologia descrita por ALVES & PEREIRA (1998), pela empresa Biocontrol Sistemas de Controle Biológico localizada no Município de Sertãozinho, SP e *B. bassiana* foi produzida, pela mesma metodologia, no

laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/Unesp. Em seguida, os fungos foram estocados a -20°C , até o momento do uso. Sob condições assépticas, o arroz com os respectivos fungos foi colocado em saco de plástico transparente, adicionando-se solução aquosa de Tween 80 a 0,1% (v v^{-1}) e, então, foi agitado manualmente para desagregação dos grãos e liberação dos conídios. Em seguida, foi coado em pano de algodão fino, a fim de evitar o entupimento do bico do pulverizador no momento da aplicação, obtendo-se, assim, a suspensão, cuja concentração, determinada em microscópio ótico com auxílio da câmara de Neubauer, foi padronizada em 10^8 conídios mL^{-1} . A viabilidade foi determinada pelo método de contagem de conídios germinados em lâmina de microscopia (MARQUES et al, 2004).

Em cada uma de seis baias medindo $2 \times 1,0 \times 1,0$ m (comprimento x largura x altura), fechadas no teto por grade móvel telada, com piso de alvenaria, pertencentes às instalações do CPPAR, foi colocado um cão infestado com todos os estádios de *R. sanguineus*. Após quatro meses estes cães foram retirados e foi realizada a contagem dos estádios de *R. sanguineus*, com auxílio de lupa manual, para avaliar a infestação das baias, de acordo com o seguinte critério: a) para ovo, larva não alimentada, larva ingurgitada, ninfa não alimentada, ninfa ingurgitada foram considerados a existência em 10, ou 20 ou 30 pontos na baia; b) para adulto e fêmea ingurgitada foi considerada a contagem do número total de indivíduos existentes na baia.

De acordo com a avaliação, foram escolhidas três baias que apresentaram 30 pontos de infestação para os estádios de ovo, larva e ninfa ingurgitada e não alimentada, e em média 20 fêmeas ingurgitadas e 150 adultos. Após escolha das baias, estas foram isoladas em todo o seu perímetro, usando dupla camada de fita adesiva dupla face e graxa adesiva atóxica. A tela de proteção no teto foi totalmente recoberta com plástico transparente. No dia seguinte foram sorteadas as baias, sendo uma pulverizada com a solução aquosa de Tween 80® (controle), outra com a suspensão de *B. bassiana* e outra com a suspensão de *M. anisopliae*. A pulverização foi feita com bomba manual pressurizada, utilizando-se 650 mL de suspensão de conídios ou solução de Tween 80® quantidade suficiente estabelecida em pré-ensaio, para pulverizar toda a baia,.

Um dia após a primeira pulverização foram liberados em cada baia três cães filhotes sem raça definida, isentos de ectoparasitas, vacinados e vermifugados. Durante a condução do ensaio, os animais que adoeceram foram substituídos por outros em iguais condições. No dia seguinte, e diariamente a partir daí, a infestação dos cães foi avaliada com a ajuda de um pente fino, determinando-se o número de larvas e ninfas alimentadas e não alimentadas, o número de adultos (sem distinção de sexo) e o número de fêmeas ingurgitadas. A cada sete dias as baias foram novamente pulverizadas como já especificado, repetindo-se as avaliações diárias, totalizando nove pulverizações dentro de um período experimental de 62 dias, realizado entre 30/04/ a 30/06/2007. As concentrações ($\times 10^8$ conídios viáveis mL⁻¹) usadas em cada pulverização (*M. anisopliae*, *B. bassiana*) foram, respectivamente: 1a: 2,06, 2,22; 2a: 2,07, 2,06; 3a: 2,16, 2,32; 4a: 2,32, 2,14; 5a: 2,23, 2,39; 6a: 2,08, 2,34; 7a: 2,30, 2,03; 8a: 2,53, 1,68; 9a: 1,77, 2,72. Diariamente, em todo o período, a temperatura e umidade no interior das baias e fora delas foram medidas nos horários de 9, 15 e 21 h., com auxílio de um termohigrometro digital (Figura 1).

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com números iguais de repetições, com parcelas subdivididas no tempo. Os resultados foram avaliados pela análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a execução da análise estatística utilizou-se o programa ESTAT (1995).

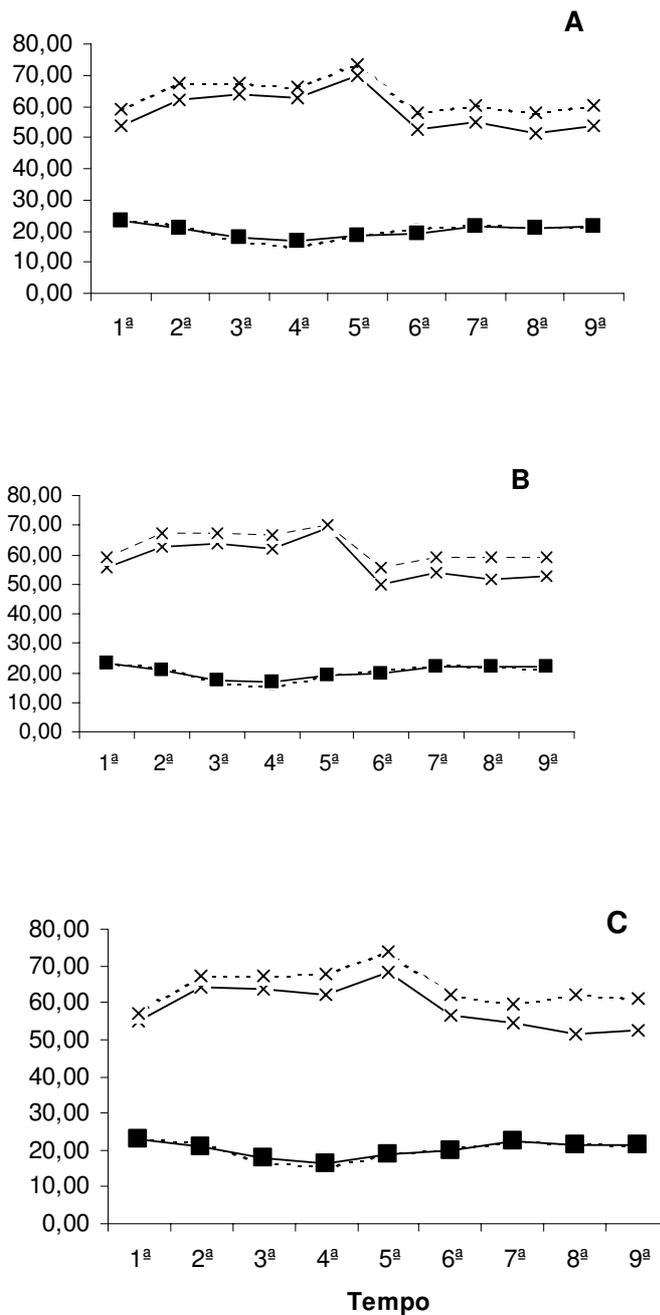


Figura 1. Temperatura fora (.....▪.....) e dentro (___■___), e umidade fora (___x___) e dentro (----x----) das baias ocorridas durante o período experimental (01/05/07 a 30/06/07). A: baia pulverizada com *Beauveria bassiana*; B: baia pulverizada solução veiculo; C:baia pulverizada com *Metarhizium anisopliae*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando pulverizada em canil naturalmente infestado com *R. sanguineus*, *B. bassiana* promoveu alteração significativa apenas na semana seguinte após a primeira pulverização (Tabelas 1 e 2), reduzindo em 53,74% o número de larvas não alimentadas e em 43,4% o número de larvas ingurgitadas, mas o mesmo efeito não foi observado para *M. anisopliae*. Pode-se observar que no decorrer do período experimental que foi de nove semanas houve diminuição do número de larvas nos três tratamentos, não havendo, entretanto, diferença significativa entre eles. Provavelmente isso ocorreu devido a época do ano em que foi conduzido o experimento (fim do outono e início de inverno), que teve amplitude de variação na temperatura dentro dos canis de 16,4 a 23,5°C e umidade de 56,9 a 74%. Recentemente LOULY et al. (2007), avaliaram a dinâmica sazonal de *R. sanguineus* no período de um ano com média de temperatura e umidade variando de 20,7 a 24,6°C e 47 a 76%, respectivamente, e observaram que entre maio e junho houve uma redução acentuada no número de larvas parasitando os cães. Avaliando o efeito da temperatura na fase não parasitária de *R. sanguineus* BELLATO & DAEMON (1997a), constataram que o período de muda e longevidade de larvas foram inversamente proporcionais a temperatura, fato semelhante ao observado para o percentual de ecdise. De acordo com LABRUNA (2004), a duração das fases de vida livre pode variar de poucas semanas a alguns meses, e as condições microclimáticas onde o carrapato ingurgitado se encontra é um fator limitante para a seqüência ao ciclo.

Tabela 1. Infestação dos cães com larvas de *Rhipicephalus sanguineus* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Semanas	Controle ¹	<i>Metarhizium anisopliae</i> ¹	<i>Beauveria bassiana</i> ¹	Teste F
1	167,43aA	174,16aA	77,46aB	33,63 ^{**}
2	13,69bA	12,37bA	8,99bA	0,07 ^{ns}
3	10,48bA	9,23bA	0,95bA	0,31 ^{ns}
4	1,19bA	1,23bA	1,18bA	0,00 ^{ns}
5	3,09bA	4,37bA	0,37bA	0,05 ^{ns}
6	6,52bA	5,80bA	4,75bA	0,01 ^{ns}
7	2,42bA	0,04bA	0,00bA	0,02 ^{ns}
8	2,90bA	0,52bA	0,18bA	0,03 ^{ns}
9	2,86bA	4,60bA	0,41bA	0,05 ^{ns}
Teste F	34,42 ^{**}	37,59 ^{**}	7,50 ^{**}	

¹médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$);

^{ns}não significativo, ^{**}significativo 1%.

Tabela 2. Infestação dos cães com larvas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Semanas	Controle ¹	<i>Metarhizium anisopliae</i> ¹	<i>Beauveria bassiana</i> ¹	Teste F
1	45,50aA	53,01aA	25,75aB	19,14 ^{**}
2	15,42bA	13,00bA	11,23ab	0,43 ^{ns}
3	8,51bA	5,57bA	2,76bA	0,80 ^{ns}
4	7,16bA	1,43bA	0,66bA	1,22 ^{ns}
5	3,47bA	2,56bA	0,23bA	0,27 ^{ns}
6	0,90bA	0,04bA	0,19bA	0,02 ^{ns}
7	2,19bA	0,00bA	0,00bA	0,15 ^{ns}
8	3,13bA	0,52bA	0,51bA	0,22 ^{ns}
9	4,01bA	4,93bA	1,06bA	0,39 ^{ns}
Teste F	18,38 ^{**}	27,09 ^{**}	7,01 ^{**}	

¹médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$);

^{ns}não significativo, ^{**}significativo 1%.

Para a germinação de esporos dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, temperaturas baixas mostram-se mais drásticas do que temperaturas elevadas, e entre 16 e 24°C a germinação média de esporos destes fungos variou de zero a 71,56% (MONTEIRO, 1988). As condições reinantes durante a relação patógeno-hospedeiro é um dos fatores que podem determinar a duração desta interação, como umidade relativa em torno de 90% e temperatura na faixa de 23 a 28°C (ALVES, 1998). Estudando a fase reprodutiva de *B. bassiana* que é dependente da quantidade de água em torno do local onde o fungo se encontra, SOSA-GÓMEZ & ALVES (2000) observaram que a conidiogênese foi incipiente a 75% de umidade relativa.

Quando o estágio de ninfa não alimentada foi pulverizado com *B. bassiana* observou-se efeito significativo do fungo (Tabela 3), reduzindo em 61,8% o número de indivíduos da primeira à última semana pós-tratamento. Ambos os fungos promoveram alteração significativa no número de ninfas ingurgitadas apenas na primeira semana de

tratamento (Tabela 4). *B. bassiana* promoveu uma redução de 78,8% no número de ninfas, enquanto a redução obtida para *M. anisopliae* foi de 25,9%. Assim como foi observado para larvas, ocorreu uma diminuição no número de ninfas durante o período experimental, mas é possível que para isso tenham contribuído as oscilações naturais decorrentes do ciclo de vida do ácaro. LOULY et al. (2007), também observaram uma redução acentuada no número de ninfas entre maio e junho. BELLATO & DAEMON (1997b) verificaram que o período parasitário de ninfas procedentes de temperatura mais baixa foi menor do que daquelas mantidas em temperaturas mais altas. Estes mesmos autores avaliando a fase não parasitária de ninfas constataram, que a média da duração do período de ecdise diminuiu com o aumento da temperatura, assim como a longevidade em jejum (BELLATO & DAEMON, 1997a).

Apenas *B. bassiana* atuou significativamente sobre os adultos ao longo de todo o experimento (Tabela 3), reduzindo o seu número em 52,5%. Durante o período experimental ocorreu uma diminuição gradativa no número de adultos nos grupos tratados e no controle. Fato semelhante foi também observado por LOULY et al. (2007). Fatores ambientais podem contribuir para este fato, e a temperatura tem sido citada como um fator determinante que interfere na longevidade de adultos (BELLATO & DAEMON, 1997b).

Apenas *B. bassiana* atuou significativamente sobre os adultos ao longo de todo o experimento (Tabela 3), reduzindo o seu número em 52,5%. Durante o período experimental ocorreu uma diminuição gradativa no número de adultos nos grupos tratados e no controle. Fato semelhante foi também observado por LOULY et al. (2007). Fatores ambientais podem contribuir para este fato, e a temperatura tem sido citada como um fator determinante que interfere na longevidade de adultos (BELLATO & DAEMON, 1997b).

Tabela 3. Infestação de cães com ninfas e adultos não alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Tratamentos	Ninfas ¹	Adultos ¹
Controle	5,94A	18,69A
Metarhizium anisopliae	3,98AB	14,54A
Beauveria bassiana	2,27B	8,87B
Teste F	12,07**	24,18**
DMS	2,29	4,35
Semanas		
1	12,67A	27,97AB
2	8,11B	23,55AB
3	7,60B	19,94B
4	0,58C	17,16BC
5	1,83C	12,69CD
6	1,66C	8,33DE
7	2,23C	3,29E
8	0,60C	5,89DE
9	1,23C	7,49DE
Teste F	20,44**	30,00**
DMS	4,38	7,19
Interação T x S	1,72 ^{ns}	1,81 ^{ns}

¹médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey (P≥0,05)

^{ns}não significativo, **significativo 1%.

Tabela 4. Infestação dos cães com ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Semanas	Controle ¹	<i>Metarhizium anisopliae</i> ¹	<i>Beauveria bassiana</i> ¹	Teste F
1	12,13aA	8,99aB	2,57aC	29,75**
2	1,99bA	2,71bA	1,13aA	0,78 ^{ns}
3	1,33bA	0,85bA	0,37aA	0,28 ^{ns}
4	2,11bA	0,56bA	0,38aA	1,14 ^{ns}
5	2,47bA	1,14bA	0,28aA	1,53 ^{ns}
6	2,28bA	1,71bA	0,71aA	0,79 ^{ns}
7	2,41bA	0,82bA	0,95aA	0,97 ^{ns}
8	2,28bA	0,09bA	0,37aA	1,78 ^{ns}
9	2,88bA	0,66bA	0,23aA	2,53 ^{ns}
Teste F	13,31**	9,06**	0,66**	

¹médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$);

^{ns}não significativo, **significativo 1%.

Com a pulverização de *B. bassiana* nos canis foi possível observar uma redução no número de fêmeas, na segunda, quinta, oitava e nona semana experimental, chegando a 100% na oitava semana, e *M. anisopliae* promoveu redução na sétima, oitava e nona semanas, sendo que na sétima esta redução atingiu 100% (Tabela 5).

Tabela 5. Infestação dos cães com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* após pulverização dos canis, por nove semanas com suspensões de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

Semanas	Controle ¹	<i>Metarhizium anisopliae</i> ¹	<i>Beauveria bassiana</i> ¹	Teste F
2	5,41aA	4,41aA	2,16aB	10,09**
3	2,22bA	1,44bA	1,33aA	0,85 ^{ns}
4	3,33abA	2,33abA	2,00aA	1,72 ^{ns}
5	3,66abA	4,00aA	1,66aB	5,80**
6	1,33bA	0,66bA	1,33aA	0,54 ^{ns}
7	2,00bA	0,00bB	0,33aAB	4,18**
8	4,66aA	0,33bB	0,00aB	24,69**
9	5,33aA	0,33bB	0,66aB	28,47**
Teste F	9,08**	11,11**	2,29*	

¹médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P \geq 0,05$);

^{ns}não significativo, **significativo 1%.

Até o presente momento não foram encontrados na literatura ensaios para avaliar a patogenicidade de fungos para *R. sanguineus* em condições de campo. Já é sabido que em estudos conduzidos em laboratório com temperatura e umidade controladas, todos os estádios de *R. sanguineus* são altamente suscetíveis aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (BARBOSA, et al. 1997; MONTEIRO et al., 1998; SAMISH et al., 2001; GINDIN et al. 2002; GARCIA et al.; 2004; KIRKLAND, et al. 2004; GARCIA et al., 2005; PRETTE et al. 2005; REIS et al., 2005).

Este trabalho foi realizado numa época do ano onde exposições sucessivas de larvas, ninfas, adultos e ovos de *R. sanguineus* a baixa temperatura pode interferir na eclosão larval, pois segundo GLÓRIA et al. (1993), a temperatura constitui-se um dos fatores de mortalidade de carrapatos. CARNEIRO & DAEMON (2003), observaram que temperaturas baixas (18°C) podem ser a causa de variações celulares encontradas na

hemolinfa de larvas, afetando o seu metabolismo. Neste trabalho, foi possível observar que *B. bassiana* e *M. anisopliae* tem um grande potencial no controle de *R. sanguineus*, mesmo enfrentando condições não adequadas de temperatura (16,36 a 23,46°C) e umidade (56,9 a 74%) como as que ocorreram durante o período experimental (Figura 1). De acordo com LABRUNA (2004) quando se objetiva a erradicação da população de carrapatos numa determinada área, este período deve ser longo, já que observações empíricas apontam um período de quatro a seis meses, ressaltando que 95% da população de carrapatos estão no ambiente, nas fases de vida livre (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

Pode-se pensar, a priori, que a época em que o experimento foi conduzido (fim do outono e início do inverno) e a duração do período experimental (60 dias) não são favoráveis para o desenvolvimento do ciclo biológico do ácaro e para a atividade do fungo, mas proporcionou conhecer o desempenho biológico da relação patógeno-hospedeiro nesta época do ano e agregado a novas informações obtidas em ensaios conduzidos em outras épocas do ano, pode auxiliar na elaboração de um programa de controle de *R. sanguineus* por *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Um outro aspecto que merece ser comentado refere-se à metodologia empregada. Apesar de haver preferência do carrapato por algumas regiões do corpo do animal (cabeça, pescoço, dorso, orelha e espaços inter-digitais), contagens feitas em apenas um dos lados do corpo, se mostraram inadequadas, pela variação do número de carrapatos encontrados em ambos os lados do corpo dos animais. Assim, optou-se por realizar a contagem de carrapatos existentes em todo o corpo dos animais. Os canis usados para acomodar os cães ficavam muito próximos, não tinham altura adequada, mas tiveram toda sua área cuidadosamente delimitada com graxa e fitas adesivas. Apesar disso, é possível que tenham ocorrido perdas pela adesão de indivíduos nas fitas, principalmente das formas ingurgitadas de *R. sanguineus* que apresentam geotropismo negativo e isso pode ter contribuído para redução do número de carrapatos destes estádios na baias, inclusive no controle. Uma alternativa para minimizar a ocorrência de perdas seria trabalhar com canis altos e distantes um do outro.

Apesar de promissores, os resultados obtidos neste trabalho são ainda preliminares, pois representam a primeira tentativa sistemática de uso de fungos para o controle de *R. sanguineus* em condições de campo. Assim, novos trabalhos precisam ser conduzidos para viabilizar o emprego de fungos em estratégias integradas de controle do carrapato.

4. CONCLUSÕES

1) *B. bassiana* e *M. anisopliae* tem atividade patogênica para vários estádios do ciclo de vida de *R. sanguineus*, infestando naturalmente boxes contendo cães .

2) *B. bassiana* é patogênica para os estádios de larva não alimentada, larva ingurgitada, ninfa não alimentada, ninfa ingurgitada, adultos e fêmeas de *R. sanguineus*, enquanto *M. anisopliae* é patogênico para os estádios de ninfa ingurgitada e fêmeas ingurgitada.

3) O estágio de fêmea ingurgitada é susceptível a ação patogênica de ambos os fungos, e os estádios de ninfa não alimentada e adulto são foram afetados ao longo de todo o período experimental.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1998, 386p.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**, 2. ed. Piracicaba: Fealq. 1998, 853-857.

BARBOSA, J.V.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V.; FACCINI, J.L.H. Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, sobre a muda larval e sobrevivência

de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.6, p.53-56, 1997.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.; MUKAI, L.S.; ROSA, P.C. Immunisation of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.52, p.79-90, 1994.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeitos de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, 6, 1, 21-27, 1997a.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. São Paulo, 6, 1, 15-19, 1997b.

CARNEIRO, M.E.; DAEMON, E. Influência da temperatura sobre tipos celulares presentes na hemolinfa de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, 55, 5, 1-7, 2003.

ESTAT – **Sistema para análises estatísticas**, V. 2.0 (livre), 1995, Departamento de Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download2/softweres/estat/>

FERNANDES, F.F. In vitro activity of permethrin, cipermetrin and deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, 52, 621-626, 2000.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil. **Cadastro Técnico da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 8: 49- 61. 1993

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

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonization and lesions on engorged female *Rhipicephalus sanguineus*, caused by *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1513-1518, 2004.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI G.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.28, p.283-288, 2002.

GLÓRIA, M.A.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Influencia de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can., 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, 2, 85-91, 1993.

KIRKLAND, B.H.; WESTWOOD, G.S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.41, n.4, p. 705 -711, 2004.

LABRUNA, M. B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Veterinária**, Pirassununga, v.13, p. 123-124, 2004.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, Milano, n.30, p.24- 32, 2001.

LOULY, C.C.B.; FONSECA, I.N.; OLIVEIRA, V.F.; LINHARES G.F.C.; MENEZES, L.B.; BORGES, L.M.F. Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37,2 :1-8, 2007

MARQUES, R.P, MONTEIRO, A.C., PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1675-1680, 2004.

MONTEIRO, A.C. **Aspectos fisiológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na Região Amazônica (Manaus)**. 1988. 233. Tese (Doutorado) – Universidade de São Carlos, São Carlos.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.7, p.113-116, 1998.

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

REIS, R.C.S. MELO, D.R. de.; PERINOTTO, W.M. de S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade in vitro de formulações fungicas sobre ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILE, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.14, p.101-105, 2005.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M.C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N.M.; LEMOS, E.R.S. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.44, p.155-158, 2002.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.6, p.1355-1359, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D.; ALVES, S.B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassina* (Deuteromycetes: Moniliaceae), **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, 29, 3, 515-521, 2000.

WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. **Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford : Pergamon, 1993.427p.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; BONOLDI, V.L.N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D.M.B.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H.; SCHUMAKER, T.T. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v.52, p.111-117, 1997.