

## EFICIÊNCIA DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE *Beauveria bassiana* NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS\*

Wendell Marcelo de Souza Perinotto<sup>1</sup>, Isabele da Costa Angelo<sup>2</sup>, Patrícia Silva Gôlo<sup>1</sup>, Mariana Guedes Camargo<sup>1</sup>, Fillipe Araujo de Sá<sup>3</sup>, Caio Marcio de Oliveira Monteiro<sup>1</sup>, Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues<sup>4</sup>, Simone Quinelato<sup>2</sup>, Allan Felipe Marciano<sup>4</sup> e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt<sup>5+</sup>

**ABSTRACT.** Perinotto W.M.S., Angelo I.C., Gôlo P.S., Camargo M.G., de Sá F.A., Monteiro C.M.O., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Quinelato S., Marciano A.F. & Bittencourt V. R.E.P. [Efficiency of *Beauveria bassiana* Commercial Formulation in control of *Rhipicephalus microplus* under laboratory conditions]. Eficiência de uma formulação comercial de *Beauveria bassiana* no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(Supl. 1):95-101, 2012. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

*Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite that owns both veterinary and economical importance. The control of this ectoparasite is made mainly with chemical products, that when used indiscriminately result in the development of resistant strains as well as environmental and animal products contamination. Fungal formulations have become an alternative method increasingly viable to control ticks. Accordingly, the present study aimed test the effectiveness of Boveril<sup>®</sup> WP (Wettable Powder) on *R. microplus* eggs, larvae and engorged females, using both different formulations (water and oil-based) and different conidial concentrations. The effect of Boveril<sup>®</sup> on engorged females was evaluated based on the following biological parameters: weight of eggs, egg production index and nutritional index. Nine groups, with ten repetitions each, were formed: aqueous control (CTR), oil (OL) CTR 0.5%, OL CTR 10%, aqueous Boveril<sup>®</sup>(Bb) 10<sup>7</sup>, OL Bb 10<sup>7</sup> 0.5%, OL Bb 10<sup>7</sup> 10%, aqueous Bb 10<sup>8</sup>, OL Bb 10<sup>8</sup> 0.5% and OL Bb 10<sup>8</sup> 10%. Females, eggs or larvae were immersed in one ml of conidial suspension for 3 minutes. Obtained results showed that the commercial product was effective on all *R. microplus* ticks stages, although the higher conidial concentration and the higher oil percentage have yielded the best results. Therefore, *R. microplus* eggs, larvae and engorged females are susceptible to Boveril<sup>®</sup>. This is the first report on the efficacy of a comercial product (Boveril<sup>®</sup>) to control *R. microplus* ticks.

**KEY WORDS.** Cattle ticks, biological control, mineral oil, enthomopatogenic fungi.

---

\*Recebido em 14 de novembro de 2012.

Aceito para publicação em 28 de dezembro de 2012.

<sup>1</sup> Médico-veterinário, *M.Sc.* Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mails: wendellperinotto@bol.com.br; patricia\_golo@yahoo.com.br; marianagcamargo@hotmail.com; caiosat@gmail.com

<sup>2</sup> Médica-veterinária, *D.Sc.* Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. Emails: isabeleangelo@yahoo.com.br; squinelato@gmail.com

<sup>3</sup> Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: llipesa@hotmail.com

<sup>4</sup> Curso de Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mails: caio-jr@hotmail.com; allan\_sjc@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Médica-veterinária, *PhD.* Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. +Autora para correspondência. E-mail: vaniabit@ufrj.br - bolsista CNPq.

**RESUMO.** *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita que apresenta grande importância veterinária e econômica. O controle deste carrapato é realizado com produtos químicos, cujo uso indiscriminado vem ocasionando o desenvolvimento de cepas resistentes e contaminação do meio ambiente e dos produtos de origem animal. A utilização de formulações fúngicas torna-se um método alternativo cada vez mais viável. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo testar a eficácia de Boveril® WP (pó molhável) sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, utilizando diferentes formulações (aquosa e oleosa) e concentrações conidiais. Para avaliar o efeito de Boveril® sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram observados os parâmetros reprodutivos peso da postura, índice de produção de ovos e índice nutricional. Para realização deste estudo, foram formados nove grupos (CTR Aquoso, CTR OL 0,5% e CTR OL 10% Bb 10<sup>7</sup> aquoso, Bb 10<sup>7</sup> OL 0,5%, Bb 10<sup>7</sup> OL 10%, Bb 10<sup>8</sup> aquoso, Bb 10<sup>8</sup> OL 0,5% e Bb 10<sup>8</sup> 10%) com 10 repetições cada. O tratamento consistiu na imersão dos espécimes em um ml da suspensão testada durante três minutos. A partir da análise dos dados observou-se que o produto comercial foi eficaz sobre todos os estágios de *R. microplus*, porém as maiores concentrações conidiais contendo maior percentual de óleo demonstraram os melhores resultados. Logo, ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* são susceptíveis ao produto comercial Boveril®. Este é o primeiro relato da eficácia do produto comercial Boveril® para o controle de *R. microplus*.

**PALAVRAS-CHAVE.** Carrapato dos bovinos, controle biológico, óleo mineral, fungos entomopatogênicos.

## INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, é um ectoparasito responsável por grandes perdas econômicas na pecuária brasileira estimadas em dois bilhões de dólares anuais (Grisi et al. 2002). O controle químico é a principal forma de controle destes ectoparasitos, no entanto, o uso excessivo e indiscriminado tem como conseqüências a contaminação de alimentos e do ambiente. Além disso, a seleção de indivíduos resistentes tem tornado ainda mais difícil o controle deste ixodídeo (Bullman et al. 1996, Kunz & Kemp 1994). Por isso, métodos alternativos de controle vêm ganhando cada vez mais destaque no meio agropecuário.

*Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin é um fungo cosmopolita comumente isolado do solo, insetos e plantas e são utilizados no controle de insetos-praga na agricultura (Alves 1998). Mundialmente, mais de 100 produtos baseados em fungos entomopatogênicos são comercializados para o controle de insetos (Faria & Wraight 2007). No Brasil, a formulação Boveril® WP, que contém a associação dos isolados ESALQ-PL63, ESALQ-447, é comercializada para o controle da mosca branca (*Bemisia tabaci*), do gorgulho do eucalipto (*Gonipterus platensis*) e do ácaro da ferrugem dos citros (*Pyllocoptruta oleivora*).

Estudos *in vitro* demonstraram a eficácia de *B. bassiana* sobre os diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (Bittencourt et al. 1997, Fernandes et al. 2006, Fernandes & Bittencourt 2008). No entanto, a eficácia dos fungos entomopatogênicos depende diretamente de fatores ambientais como umidade, radiação solar e temperatura (Peng & Xia 2011). A formulação dos conídios torna-se cada vez mais necessária, buscando minimizar estes intempéries, facilitar a comercialização dos entomopatogênicos e propiciar sua utilização a campo para o controle de carrapatos. Diversos autores relatam que a suspensão oleosa é mais eficaz no controle de artrópodes, pois permite uma melhor adesão dos conídios à cutícula do artrópode (Polar et al. 2005, Lopes et al. 2007, Angelo et al. 2010, Rondelli et al. 2011). Além disso, alguns óleos podem apresentar sinergismo com os fungos, por serem naturalmente tóxicos para carrapatos (Abdel-Shafy & Soliman 2004, Polar et al. 2005).

O presente estudo teve como objetivo testar a eficácia do produto comercial Boveril® WP (pó molhável) sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, utilizando diferentes formulações e concentrações conidiais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Elaboração das suspensões e quantificação dos inóculos

Para o preparo da formulação Boveril® WP (pó molhável) (MAPA nº6605), que contém a associação dos isolados ESALQ-PL63, ESALQ-447, foram seguidas as recomendações do fabricante, cuja indicação foi de uma parte de fungo para oito de água (w:v), proporcionando uma suspensão aquosa com aproximadamente 10<sup>7</sup> conídios/mL (Bb 10<sup>7</sup> Aquoso); uma segunda suspensão foi preparada na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL (Bb 10<sup>8</sup> Aquoso).

Para testar a eficácia da formulação oleosa, foram utilizadas duas concentrações de óleo mineral (Vetec®): 0,5% (concentração indicada pelo fabricante) ou 10% (concentração estabelecida pelos autores), bem como duas concentrações conidiais  $10^7$  ou  $10^8$  conídios/mL determinando os seguintes grupos: Bb  $10^7$  OL 0,5%, Bb  $10^7$  OL 10%, Bb  $10^8$  OL 0,5% e Bb  $10^8$  10%. Os grupos controle foram: água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% (CTR Aquoso) e água destilada estéril com Tween 80 a 0,01% acrescida de óleo mineral a 0,5 ou 10% (CTR OL 0,5% e CTR OL 10% respectivamente).

A quantificação das suspensões foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico segundo Alves (1998). Para avaliação da viabilidade dos conídios uma alíquota contendo 10 $\mu$ L de cada concentração conidial foi incubada em placas de Petri contendo meio BDA acrescido com 0,5% de Cloranfenicol ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa (U.R.)  $\geq 80\%$ ). O cálculo da germinação foi realizado segundo Alves (1998).

#### Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram obtidas de infestação artificial de bezerros estabulados (submetido à Comissão de Ética da UFRRJ, protocolo 2083.011620/2011-68), sem contatos recentes com carrapaticidas químicos, no município de Seropédica - RJ, Brasil. Foi realizada a assepsia da cutícula utilizando hipoclorito de sódio a 1%. Posteriormente, parte das fêmeas foi pesada e separada homogeneamente por peso para realização do bioensaio, enquanto outra parte foi acondicionada em placas de Petri e incubada a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e U.R.  $\geq 80\%$  para realização de postura para os ensaios biológicos com ovos e larvas.

#### Bioensaio com fêmeas ingurgitadas

As fêmeas ingurgitadas foram homogeneizadas quanto ao peso (utilizando a fórmula de Yule (Sampaio 2002) para determinação do número de classes) para a formação dos grupos. Foram utilizadas dez fêmeas ingurgitadas por grupo de tratamento. A metodologia utilizada para o tratamento descrita por Camargo et al. (2012). A postura foi coletada e armazenada em pequenos frascos de vidro vedados com algodão hidrófilo, mantidos em câmara climatizada ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e U.R.  $\geq 80\%$ ). Posteriormente, o percentual de eclosão das larvas foi acompanhado diariamente.

Os parâmetros biológicos avaliados foram peso

de postura (PP), percentual de eclosão das larvas (PEL), índices de produção de ovos (IPO) e nutricional (IN) (Bennett 1974). O percentual de controle de *R. microplus* exercido pelo fungo *B. bassiana* s.l. foi calculado de acordo com a fórmula de Drummond et al. (1971).

#### Ensaio biológico com ovos

Os ovos foram separados no 10º dia de postura, pesados em alíquotas de 50 mg e acondicionados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo. A metodologia de tratamento de ovos foi a mesma descrita para fêmeas ingurgitadas. O percentual de eclosão das larvas foi avaliado diariamente.

#### Ensaio biológico com larvas

Alíquotas de 50 mg de ovos foram acondicionada em tubos de ensaio e incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e U.R.  $\geq 80\%$  até a completa eclosão das larvas. Os tubos que não apresentaram eclosão superior a 95% foram descartados. A metodologia para o tratamento de larvas foi descrita por Camargo et al. (2012). O percentual de mortalidade das larvas foi observado a cada três dias após a realização do tratamento.

#### Reisolamento fúngico após o ensaio biológico

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

#### Análise estatística

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

## RESULTADOS

As suspensões utilizadas nos bioensaios apresentaram percentual de germinação em torno de 99%. Boveril® apresentou eficácia sobre fêmeas ingurgitadas, determinando o percentual de controle que variou de 9,7% até 63,9%, com a concentração

Tabela 1. Média  $\pm$  desvio padrão do peso da postura (PP); percentual de eclosão das larvas (PEL), índice de produção de ovos (IPO) e índice nutricional (IN), além do percentual de controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com diferentes formulações aquosas e oleosas ( $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL acrescidas ou não de 0,5 e 10% de óleo mineral). Os experimentos foram conduzidos a  $27 \pm 1^\circ$  C e U.R.  $\geq 80\%$ . Média e desvio padrão de 10 repetições por ensaio biológico (\*).

Tratamento	PP (mg)	PEL (%)	IPO (%)	IN (%)	% Controle
CTR Aquoso	1677 $\pm$ 0,02a	97 $\pm$ 2,91a	60,2 $\pm$ 3,14a	77,1 $\pm$ 4,61a	-
CTR OL 0,5%	1624 $\pm$ 0,02a	94,5 $\pm$ 11,92a	59,1 $\pm$ 4,44a	78,7 $\pm$ 7,08a	-
CTR OL 10%	1369 $\pm$ 0,03a	87,2 $\pm$ 15,09a	49,5 $\pm$ 9,02a	72,5 $\pm$ 5,46a	-
Bb $10^7$ Aquoso	1563 $\pm$ 0,02a	93,4 $\pm$ 8,14a	56,3 $\pm$ 5,33a	64,6 $\pm$ 4,53a	9,7
Bb $10^7$ OL 0,5%	1421 $\pm$ 0,03a	84,1 $\pm$ 26,29a	51,2 $\pm$ 9,91a	57,3 $\pm$ 9,72a	21,0
Bb $10^7$ OL 10%	443 $\pm$ 0,05b	75,0 $\pm$ 4,08a	16,6 $\pm$ 20,32b	20,5 $\pm$ 25,12b	58,2
Bb $10^8$ Aquoso	1319 $\pm$ 0,05b	82,1 $\pm$ 23,44a	47,8 $\pm$ 19,13a	53,9 $\pm$ 21,74a	32,9
Bb $10^8$ OL 0,5%	852 $\pm$ 0,07b	80,3 $\pm$ 33,72a	30,4 $\pm$ 24,56b	35,5 $\pm$ 27,18b	48,1
Bb $10^8$ OL 10%	340 $\pm$ 0,07b	75 $\pm$ 7,07a	11,9 $\pm$ 23,98b	12,9 $\pm$ 26,05b	63,9

(\*) Média seguida da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

$10^8$  conídios/mL formulada em 10% de óleo mineral (Tabela 1). Os demais tratamentos utilizando formulações oleosas também apresentaram maior percentual de controle quando comparados com suas respectivas concentrações em suspensão aquosa (Tabela 1), confirmando que o óleo potencializa a eficácia do fungo.

O peso da postura foi reduzido significativamente nos grupos tratados com a suspensão aquosa na concentração  $10^8$  conídios/mL e em todos os grupos tratados com as formulações oleosas, exceto o grupo com a menor concentração conidial e menor percentual de óleo (Bb  $10^7$  OL 0,5%) (Tabela 1). O melhor resultado foi observado no grupo tratado com a formulação oleosa 10% com a maior concentração conidial (Bb  $10^8$  OL 10%), que reduziu em 75,2% o peso da postura quando comparado com seu respectivo grupo controle.

O IPO e o IN das fêmeas ingurgitadas não foram reduzidos significativamente com as suspensões aquosas de Boveril<sup>®</sup>, no entanto todas as formulações oleosas reduziram significativamente ambos os parâmetros, exceto a formulação contendo a menor concentração conidial e menor percentual de óleo (Bb  $10^7$  OL 0,5%) (Tabela 1). O grupo tratado com maior concentração de óleo mineral e maior concentração conidial (Bb  $10^8$  OL 10%) apresentou o IPO e o IN reduzidos em aproximadamente 76% e 82,2%, respectivamente, quando comparados com o respectivo grupo controle.

O percentual de eclosão das larvas não foi alterado significativamente nos grupos de fêmeas ingurgitadas tratadas com Boveril<sup>®</sup> (Tabela 1). No entanto, no bioensaio com ovos o percentual de eclosão das larvas foi reduzido significativamente em todos os grupos tratados com Boveril<sup>®</sup> (Tabela 2). Essa

Tabela 2. Percentual de eclosão de larvas de *Rhipicephalus microplus* após o tratamento de ovos com diferentes formulações aquosas e oleosas ( $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL acrescidas ou não de 0,5 e 10% de óleo mineral). Os experimentos foram conduzidos a  $27 \pm 1^\circ$  C e U.R.  $\geq 80\%$ . Média e desvio padrão de 10 repetições por ensaio biológico (\*).

Tratamento	% Eclosão
CTR Aquoso	96,5 $\pm$ 1,58a
CTR OL 0,5%	93,7 $\pm$ 3,09a
CTR OL 10%	91,3 $\pm$ 3,84a
Bb $10^7$ Aquoso	25,0 $\pm$ 4,33b
Bb $10^7$ OL 0,5%	1,6 $\pm$ 2,12c
Bb $10^7$ OL 10%	0c
Bb $10^8$ Aquoso	17,2 $\pm$ 6,18b
Bb $10^8$ OL 0,5%	1,4 $\pm$ 1,51c
Bb $10^8$ OL 10%	0c

(\*) Média seguida da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

redução foi de 75% e 82,8% nas suspensões aquosas nas concentrações de  $10^7$  conídios/mL e  $10^8$  conídios/mL, respectivamente. A formulação oleosa contendo 0,5% de óleo mineral reduziu o percentual de eclosão em 98,4% com a menor concentração conidial, enquanto a concentração  $10^8$  conídios/mL reduziu o percentual em 98,6% quando comparado com o grupo controle. Nos grupos tratados com as formulações oleosas contendo o maior percentual de óleo (Bb  $10^7$  OL 10% e Bb  $10^8$  OL 10%) não houve eclosão das larvas (Tabela 2).

No bioensaio com larvas, a formulação oleosa contendo o maior percentual de óleo e maior concentração conidial (Bb  $10^8$  OL 10%) causou mortalidade significativa no terceiro dia ( $5,1 \pm 3,6\%$ ) e no sexto dia ( $19,0 \pm 2,0$ ) após o tratamento quando comparado com o grupo controle (Tabela 3). No nono dia após o tratamento, todos os grupos tratados com as formulações oleosas (Bb  $10^7$  OL 0,5%, Bb  $10^7$  OL 10%, Bb  $10^8$  OL 0,5% e Bb  $10^8$  OL 10%) apresentaram percentual de mortalidade significati-

va variando de 30,0% a 97,1% quando comparado com o grupo controle (Tabela 3). As formulações contendo 10% de óleo mineral apresentaram os melhores resultados, causando um percentual de mortalidade de 93,6% e 97,1% (Bb 10<sup>7</sup> OL 10% e Bb 10<sup>8</sup> OL 10%, respectivamente). As suspensões aquosas de Boveril® não causaram mortalidade significativa das larvas (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 3, 6 e 9 dias após o tratamento de larvas com diferentes formulações aquosas e oleosas (10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> conídios/mL acrescidas ou não de 0,5 e 10% de óleo mineral). Os experimentos foram conduzidos a 27 ± 1° C e U.R. ≥ 80%. Média e desvio padrão de 10 repetições por ensaio biológico (\*).

Tratamento	Dia 3	Dia 6	Dia 9
CTR Aquoso	0a	0a	0a
CTR OL 0,5%	0a	0a	0a
CTR OL 10%	0a	0a	0a
Bb 10 <sup>7</sup> Aquoso	0a	0,5 ± 1,6a	2,6 ± 4,2a
Bb 10 <sup>7</sup> OL 0,5%	0a	0,5 ± 1,6a	30,0 ± 21,2b
Bb 10 <sup>7</sup> OL 10%	0a	6,8 ± 3,2a	93,6 ± 10,2cd
Bb 10 <sup>8</sup> Aquoso	0a	0,4 ± 0,8a	4,5 ± 9,6a
Bb 10 <sup>8</sup> OL 0,5%	0a	4,1 ± 3,8a	76,5 ± 21,7c
Bb 10 <sup>8</sup> OL 10%	5,1 ± 3,6b	19,0 ± 2,0b	97,1 ± 3,6cd

(\*) Média seguida da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (P ≥ 0,05).

## DISCUSSÃO

Muitos trabalhos demonstram o uso de *Beauveria bassiana* s.l. para o controle de carrapatos *in vitro* (Bittencourt et al. 1995, Barci et al. 2009, Campos et al. 2010). Entretanto, a eficácia do fungo é influenciada por fatores como umidade relativa, temperatura ambiente, velocidade do ar, precipitação pluviométrica, tipo de suspensão, entre outros (Inglis et al. 2001, Peng & Xia 2011).

No presente estudo, foi possível determinar que a formulação oleosa do produto comercial Boveril® possui potencial para o controle *in vitro* dos diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus*. O uso de formulações oleosas potencializa a ação dos fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos, pois a presença de óleo melhora o processo de adesão conidial devido à sua característica quitinofílica. Esta característica melhora a afinidade do conídio hidrofóbico pela cutícula do carrapato, aumentando assim a infectividade e conseqüentemente a patogenicidade do fungo (Prior et al. 1998), causando danos em fêmeas, ovos e larvas em um menor período de tempo (Camargo et al. 2012).

As formulações oleosas de Boveril® reduziram a postura de *R. microplus* e conseqüentemente interferiram no IPO e no IN. A redução da oviposição pode ser considerada um dos pontos-chave para

o controle de carrapatos, já que a redução do número total de ovos, bem como da viabilidade dos mesmos, comprometerá as gerações subseqüentes e reduzirá a população de carrapatos no ambiente. Além da redução da postura, as formulações oleosas de Boveril® mostraram-se eficientes na redução do percentual de eclosão de larvas após o tratamento de ovos, favorecendo sua possível utilização para o controle a campo desta fase não parasitária de *R. microplus*. Angelo et al. (2010) também demonstraram a maior eficácia do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii* sobre os diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus* formulados em óleo mineral quando comparado com a suspensão conidial aquosa.

As formulações oleosas de Boveril® interferiram na eclosão das larvas após o tratamento de ovos, sendo que o maior percentual de óleo mineral, em ambas as concentrações conidiais, impediu a eclosão das larvas. Camargo et al. (2012) testaram a eficácia de formulações oleosas de *B. bassiana* e também observaram redução significativa de até 73% no percentual de eclosão de larvas de *R. microplus*.

Somente as formulações oleosas de Boveril® causaram mortalidade significativa das larvas de *R. microplus* atingindo 97,1% no nono dia após o tratamento. Camargo et al. (2012) testaram formulações de *B. bassiana* sobre larvas desta mesma espécie de carrapato e observaram mortalidade significativa a partir do 10° dia pós tratamento, no entanto, a mortalidade se aproximou de 100% somente no 20° dia após o tratamento. Esses resultados podem ser explicados pela variação da virulência entre os diferentes isolados utilizados em ambos os experimentos. A virulência dos isolados fúngicos para os artrópodes pode ser influenciada pela variabilidade genética destes entomopatógenos (Alves 1998, Fernandes et al. 2009), pela produção de toxinas (Scrhanck & Vainstein 2010), bem como pela produção de proteases, quitinases e lipases, conhecidas por serem determinantes importantes no processo de infecção nos fungos entomopatogênicos (Boldo et al. 2009).

As formulações oleosas de fungos entomopatogênicos podem viabilizar o emprego destes agentes a campo para o controle de *R. microplus*, já que potencializam a virulência do fungo, prolongam a persistência do patógeno a campo, melhoram a eficiência da aplicação e estendem sua vida útil, facilitando o armazenamento.

## CONCLUSÃO

A formulação comercial Boveril<sup>®</sup>, recomendada para o controle biológico de insetos praga da agricultura, apresenta eficácia *in vitro* para os diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus* quando testado na concentração indicada pelo fabricante (10<sup>7</sup> conídios/mL e 0,5% de óleo mineral). O maior percentual de óleo mineral (10%) adicionado aos conídios de *B. bassiana* presentes no Boveril<sup>®</sup> potencializa a eficácia do produto, sendo indicada para o controle *in vitro* de *R. microplus*.

**Agradecimentos.** Esta pesquisa foi executada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Agradecemos ao CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer aos M.Sc. e Doutorandos as bolsas de estudo, e a empresa Itaforte Industrial Bio-Produtos Agro-Florestais LTDA que forneceu gentilmente o produto comercial utilizado neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Shafy S. & Soliman M.M.M. Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodida: Amblyomidae) infesting cattle in Egypt. *Acarologia*, 44:23-30, 2004.
- Alves S.B. *Controle microbiano de insetos*. 2<sup>a</sup> ed. FEALQ, Piracicaba, 1998. 1163p.
- Angelo I.C., Fernandes E.K.K., Bahiense T.C., Perinotto W.M.S., Moraes A.P.R., Terra A.L.M. & Bittencourt V.R. E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 172:317-322, 2010.
- Barci L.A.G., Almeida J.E.M., Nogueira A.H.C., Zappellini L.O. & Prado A.P. Selection of isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18:7-13, 2009.
- Bennett G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, 16:52-61, 1974.
- Bittencourt V.R.E.P., Peralva S.L.F.S. & Viegas E.C. Eficácia *in vitro* dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 4:86, 1995.
- Bittencourt V.R.E.P., Souza E.J., Peralva S.L.F.S., Mascarenhas A.G. & Alves S.B. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 6:49-52, 1997.
- Boldo J.T., Junges A., Amaral K.B., Staats C.C., Vainstein M.H. & Schrank A., Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr. Genet.*, 55:551-560, 2009.
- Bullman G.M., Muños M.E. & Ambrústolo R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprehensiva y comparativa. *Vet. Argent.*, 8:3-15, 1996.
- Camargo M.G., Golo P.S., Angelo I.C., Perinotto W.M.S., Sa F.A., Quinelato S. & Bittencourt V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of entomopathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.*, 188:140-147, 2012.
- Campos R.A., Boldo J.T., Pimentel I.C., Dalfovo V., Araújo W.L., Azevedo J.L., Vainstein M.H. & Barros N.M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genet. Mol. Res.*, 9:1421-1430, 2010.
- Drummond R.O., Gladney W.J., Whetstone T.M. & Ernst S.E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. *J. Econ. Entomol.*, 64:686-688, 1971.
- Faria M.R. & Wraight S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control.*, 43:237-256, 2007.
- Fernandes E.K.K., Costa G.L., Moraes A.M.L., Zahner V. & Bittencourt V.R.E.P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitol. Res.*, 98:324-332, 2006.
- Gonzales J.C. *O controle do carrapato do boi*. 3<sup>a</sup> ed. Editora do Autor, Passo Fundo, 2003. 129p.
- Grisi L., Massard C.L., Borja G.E.M. & Pereira J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.*, 21:23-28, 2002.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Tariq M.B. & Strasser H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest, p.23-69. In: Butt T.M., Jackson C.W. & Magan N. (Eds), *Fungi as Biological Control Agents*. CABI, Wallingford, 2001.
- Kaaya G.P. Laboratory and field evaluation of entomogenous fungi for tick control. *Ann. N.I. Acad. Sci.*, 916:559-564, 2000.
- Kunz S.E. & Kemp D.H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Off. Int. Epizoot.*, 13:1249-1286, 1994.
- Lopes R.B., Alves S.B., Padulla L.F.L. & Pérez C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 16:27-31, 2007.
- Maranga R.O., Kaaya G.P., Mueke J.M. & Hassanali A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. *Mycopathologia*, 159:527-532, 2005.
- Peng G. & Xia Y. The mechanism of the mycoinsecticide diluents on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. *BioControl*, 56:893-902, 2011.
- Polar P., Kairo M.T.K., Moore D., Pegram R. & John S.

- Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160: 151-157, 2005.
- Prior C., Jollands P. & Le Patourel G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 52:66-72, 1988.
- Rondelli V.M., Pratisoli D., Polanczyk R.A., Marques E.J., Sturm G.M. & Tiburcio M.O. Associação do óleo de maçã com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 46:212-214, 2011.
- Sampaio I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2ª ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Samson R.A. & Evans H.C. Two new *Beauveria* spp. from South America. *J. Invertebr. Pathol.*, 39:93-97, 1982.
- Schrank A. & Vainstein M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56:1267-1274, 2010.
- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol. Sci. Tech.*, 17: 879-920, 2007.