



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

LUCAS PRADO BARRETO

Efeito da temperatura e da formulação oleosa na germinação e virulência de conídios de *Metarhizium anisopliae* a *Rhipicephalus sanguineus*

**Goiânia
2014**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Lucas Prado Barreto

Título do trabalho: Efeito da temperatura e da formulação oleosa na germinação e virulência de conídios de *Metarhizium anisopliae* a *Rhipicephalus sanguineus*.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 19 / 08 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LUCAS PRADO BARRETO

Efeito da temperatura e da formulação oleosa na germinação e virulência de conídios de *Metarhizium anisopliae* a *Rhipicephalus sanguineus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes
Co-orientadora: Dr^a. Walquíria Arruda

**Goiânia
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Prado Barreto, Lucas

Efeito da temperatura e da formulação oleosa na germinação e virulência de conídios de *Metarhizium anisopliae* a *Rhipicephalus sanguineus* [manuscrito] / Lucas Prado Barreto. - 2014.
74 f.

Orientador: Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes; co-orientadora Dr^a. Walquíria Arruda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2014.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Carrapato. 2. Formulação. 3. Fungo entomopatogênico. 4. Termotolerância. I. Kort Kamp Fernandes, Dr. Éverton, orient. II. Título.

CDU 576.8

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Lucas Prado Barreto

Orientador (a): Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes

Co-orientador (a): Dr^a. Walquíria Arruda

Membros:

1. Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes

2. Dr^a. Eliane Dias Quintela

3. Prof^a. Dr^a. Lígia Miranda Ferreira Borges

Data: 08/10/2014



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LUCAS PRADO BARRETO - Aos oito dias do mês de outubro do ano de 2014 (08/10/2014), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Drs. ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES, ELIANE DIAS QUINTELA e LÍGIA MIRANDA FERREIRA BORGES, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“EFEITOS DA TEMPERATURA E DA FORMULAÇÃO SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* NA CUTÍCULA DE *Rhipicephalus sanguineus*”**, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **PARASITOLOGIA**, de autoria de **LUCAS PRADO BARRETO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora:

Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes
Dra. Eliane Dias Quintela
Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

Aprovado (a) / Reprovado (a)

APROVADO

APROVADO

APROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato HABILITADO, (Habilitado ou não Habilitado), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 26 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

EFEITO DA TEMPERATURA E DA FORMULAÇÃO OLEOSA NA GERMINAÇÃO E VIRULÊNCIA DE CONÍDIOS DE METARHIZIUM ANISOPLIAE A RHIPICEPHALUS SANGUINEUS.

Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes (IPTSP/UFG)
Dra. Eliane Dias Quintela (EMBRAPA/GO)
Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges (IPTSP/UFG)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por guiar meus caminhos e me dar forças todos os dias.

Ao Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes, pela excelente orientação, pelos valiosos ensinamentos não apenas no âmbito científico, e pela confiança depositada desde o início do mestrado.

A Prof^ª. Dr^ª. Walquíria Arruda, pela excelente co-orientação, disponibilidade e valiosos ensinamentos. Desde o início, sempre motivou e auxiliou na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wolf Christian Luz, por me receber no laboratório pela primeira vez e pelas contribuições para conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública pela oportunidade.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

A FAPEG e CNPq, pelo financiamento.

A todos os membros do Laboratório de Patologia de Invertebrados da UFG, especialmente, Fabrício Moreira Alves, Flávia Regina Santos da Paixão, Cíntia das Chagas Bernardo, Elen Muniz e Juscelino Rodrigues, pelas contribuições, pelo apoio e amizade firmada durante esses anos.

Aos membros dos Laboratórios de Entomologia e Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão, especialmente, Gabriel Moura Mascarin, Newton Noronha e Márcio Cortês, que além da contribuição científica, abriram as portas do laboratório para execução de parte do trabalho.

As técnicas do Laboratório de Microscopia de Alta Resolução da UFG, Tatiane e Nayara pela ajuda, paciência e contribuição neste trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Goiânia, pela ótima recepção e contribuição na obtenção de carrapatos.

A minha família, em especial meus pais, Aluizio da Silva Barreto e Meire Maria do Prado Barreto, pelo exemplo, apoio, amor e confiança sempre depositados.

Aos meus amigos, Gabriel Felipe Feitosa Ferreira e Rodrigo Marcos, pela amizade, motivação e companheirismo de longa data. “É nós brothers”.

Agradeço a todos vocês e também aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	viii
FIGURAS E TABELAS	xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 – INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – Carrapatos	3
2.2 – O gênero <i>Rhipicephalus</i>	4
2.2.1 – Características gerais	4
2.2.2 – <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
2.2.3 – Importância na saúde humana e animal	5
2.2.4 – Métodos de controle de <i>R. sanguineus</i>	7
2.3 – Os fungos entomopatogênicos	8
2.3.1 – Fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos	12
2.3.2 – Um fator limitante do controle microbiano: altas temperaturas	14
2.3.3 – Formulações de conídios	16
3 – JUSTIFICATIVA	17
4 – OBJETIVOS	18
4.1 – Objetivo geral	18
4.2 – Objetivos específicos	18
5 – MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 – Isolados fúngicos	19
5.2 – Cultivo dos isolados e preparo das suspensões conidiais	19
5.3 – Carrapatos utilizados nos bioensaios	20
5.4 – Testes <i>in vitro</i> para avaliação da termotolerância de conídios	20
5.5 – Efeito do tratamento térmico de conídios no percentual de germinação de conídios de <i>M. anisopliae</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	21
5.6 – Efeito do tratamento térmico de formulações na germinação ou virulência de conídios de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>R. sanguineus</i>	22
5.7 – Fixação e dissecação de carrapatos	25
5.7.1 – Fixação	25
5.7.2 – Dissecação	26
5.8 – Microscopia	27
5.8.1 – Microscopia de Fluorescência	27
5.8.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
5.9 – Análises estatísticas	28
6 – RESULTADOS	30
6.1 – Termotolerância de conídios <i>in vitro</i>	30
6.2 – Efeito do tratamento térmico no percentual de germinação de conídios de <i>M. anisopliae</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	33

6.3 – Viabilidade de conídios	36
6.4 - Efeito do tratamento térmico de formulações na germinação ou virulência de conídios de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>R. sanguineus</i>	36
7 – DISCUSSÃO	43
8 – CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Morfologia dos carrapatos pertencentes à família Ixodidae	3
Figura 2. Representação dos grupos do bioensaio	24
Figura 3. Etapas do procedimento de fixação das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . A - C representam a injeção de fixador no interior da fêmea ingurgitada. D - F, tubos contendo fêmea ingurgitada imersa em fixador para posterior armazenamento em refrigerador (4 °C)	26
Figura 4. A – D representam as etapas do procedimento de dissecação das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	27
Figura 5. Cutículas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> imersas em 1,5 mL de Calcofluor White M2R a 2% (v/v)	28
Figura 6. Perfil da germinação relativa de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> (IP119), expostos previamente por 2 (a), 4 (b) ou 6 (c) horas a $45 \pm 0,5$ °C e incubados em BDAY a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 0, 12, 18, 24, 36 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem exposição ao calor). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições	31
Figura 7. Perfil da germinação relativa de conídios de <i>Metarhizium robertsii</i> (ARSEF 2575), expostos previamente por 2 (a), 4 (b) ou 6 (c) horas a $45 \pm 0,5$ °C e incubados em BDAY a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 0, 12, 18, 24, 36 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem exposição ao calor). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições	32
Figura 8. Percentual de germinação de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> (IP 119), expostos ou não ao estresse térmico ($45 \pm 0,5$ °C), nos substratos avaliados: cutícula de <i>R. sanguineus</i> e meio de cultivo artificial (BDAY). Médias na mesma coluna seguidas de diferentes letras (a – c) são significativamente diferentes entre si, pelo teste Student-Newman-Keuls à 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$)	33
Figura 9. Microfotografias de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> (IP 119) sobre cutículas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Em A - D estão representados alguns grupos tratados com conídios sem exposição ao calor, sendo 24, 36, 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Em E - H estão representados os grupos tratados com conídios expostos ao calor, nos mesmos tempos de incubação, respectivamente	35
Figura 10. Conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> (IP 119) sobre cutículas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Em A e B, estão representadas as cutículas que receberam conídios que não	

foram expostos a temperatura de 45°C, referentes aos tempos de incubação 36 e 48 horas, respectivamente. As setas vermelhas apontam para apressórios que se tornaram visíveis a partir de 36 h de incubação em temperatura ótima (27 °C) 36

Figura 11. Germinação de conídios de *M. anisopliae* (IP 119) suspensos em água ou óleo, expostos ou não ao calor (45 ± 0,5°C) por 4 horas e incubados a 27 ± 1°C e UR ≥ 80%, sobre a cutícula de *R. sanguineus*. Em a, percentual de germinação em todos os grupos avaliados. Em b, percentual de germinação relativa dos conídios suspensos em água ou óleo. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem exposição ao calor). O erro padrão foi calculado considerando-se as duas repetições 40

Figura 12. Eletromicrografias de conídios de *M. anisopliae* (IP 119) sobre a cutícula de *R. sanguineus*. A e B representam as cutículas tratadas com conídios suspensos em água e não expostos ao calor (controles), referentes aos tempos de incubação 48 e 72 h, respectivamente. Em A1 e B1, cutículas tratadas com conídios suspensos em água e expostos ao calor (45 °C por 4 h), nos tempos de 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Em C e D, conídios germinados provenientes de suspensão aquosa sem exposição ao calor, com 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Setas vermelhas apontam para emaranhados de conídios, as setas azuis para tubos germinativos e setas laranja para apressórios. A Seta amarela indica uma possível penetração do tubo na cutícula do carrapato 41

Figura 13. Eletromicrografias de conídios de *M. anisopliae* (IP 119) sobre a cutícula de *R. sanguineus*. A e B representam as cutículas tratadas com conídios suspensos em óleo e não expostos ao calor (controles), referentes aos tempos de incubação 48 e 72 h, respectivamente. Em A1 e B1, cutículas tratadas com conídios suspensos em óleo e expostos ao calor (45 °C por 4h), nos tempos de 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Em C e D, conídios germinados provenientes de suspensão oleosa exposta ou não ao calor, respectivamente, no tempo de 72 h de incubação. Setas vermelhas apontam para emaranhados de conídios, as setas azuis para tubos germinativos e setas laranja para apressórios 42

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo 19

Tabela 2. Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* submetidas a tratamento tópico com *Metarhizium anisopliae* s.s. (IP 119) suspenso em água (Tween 80, 0.01%) ou óleo mineral puro (Impex®), na concentração de 1 × 10⁸ conídios mL⁻¹. Antes do tratamento das fêmeas, as suspensões foram mantidas em constante temperatura de 27° ± 1°C ou submetidas a temperatura de 45 ± 0,5 °C por 4 horas. Depois do tratamento, as fêmeas foram incubadas em temperatura constante de 27 ± 1 °C e UR ≥ 80%. Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (P > 0,05). Quando n < 30 significa que as fêmeas morreram antes de realizar postura 38

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
BDAY	Batata, Dextrose, Ágar + Extrato de Levedura (Yeast)
°C	Graus Celsius
g	Gramas
h	Horas
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
μL	Micro litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNK	Student-Newman-Keuls
UFG	Universidade Federal de Goiás
UR	Umidade Relativa

RESUMO

Relatos da resistência do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* a bases químicas utilizadas para controle tem sido comuns. Neste contexto, os fungos entomopatogênicos surgem como uma alternativa ao uso exclusivo do controle químico; entretanto, calor e outros fatores ambientais podem limitar a eficácia dos fungos. Sendo assim, o presente estudo avaliou o efeito do calor sobre a germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* IP 119 quando suspensos em puro óleo mineral (Impex[®]) ou em água (Tween 80, 0,01%) e aplicados sobre a cutícula de *R. sanguineus* (*in vivo*) ou em meio de cultivo BDAY (*in vitro*). Em seguida, a resposta dos testes *in vivo* foi comparada a dos testes *in vitro*, e bioensaios foram realizados para verificar a virulência do isolado IP 119 para fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*. Suspensões conidiais de *M. anisopliae* em água ou óleo, ajustadas a 10^8 conídios ml^{-1} , foram expostas a 0 h (controle) ou 4 h a $45 \pm 0,5$ °C em banho-maria e, em seguida, inoculadas individualmente na superfície dorsal de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*. Os indivíduos foram incubados a 27 ± 1 °C e UR > 80% por 0, 12, 18, 24, 36, 48 ou 72 h. Em paralelo, alíquotas das suspensões conidiais aquosas (controle ou 45°C) foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDAY. As amostras foram incubadas na mesma temperatura e pelos mesmos períodos de tempo descritos acima. Após cada período de incubação, os carrapatos correspondentes foram fixados e dissecados, retirando-se um fragmento da cutícula dorsal. Cutículas que receberam conídios suspensos em água, e expostos ou não ao calor, foram processadas para microscopia de fluorescência para avaliação da germinação. Cutículas que receberam conídios suspensos em água ou óleo, e expostos ou não ao calor, foram processadas para microscopia eletrônica de varredura para avaliação da germinação. A germinação de conídios em BDAY foi avaliada por microscopia de contraste de fase. Um mínimo de 300 conídios por cutícula ou por placa foi avaliado para calcular o percentual de germinação. Verificou-se que quando conídios foram expostos ao calor, um maior percentual de germinação foi observado em BDAY (61,5%) em comparação com a cutícula do carrapato (13%), 72 h após a inoculação. Apressórios foram observados 36 h após a inoculação, apenas em conídios que não foram expostos ao calor. Na cutícula de *R. sanguineus*, o percentual de germinação de conídios suspensos em óleo mineral e expostos ao calor foi maior em comparação ao percentual de germinação de conídios suspensos em água, em todos os tempos de incubação investigados. Com 36 h de incubação, a germinação média de conídios suspensos em óleo chegou a 16,3%, enquanto conídios suspensos em água apresentavam 2,2% de germinação. Em contrapartida, nos controles, o percentual de germinação de conídios suspensos em água ou óleo diferiu nos tempos de 48 e 72 h de incubação, onde a germinação sobre a cutícula também foi maior em conídios suspensos em óleo. *M. anisopliae* quando suspenso em óleo e exposto ou não ao calor apresentou percentual de controle de fêmeas maior que o observado nas suspensões aquosas. Sendo assim, os resultados demonstraram: marcante atraso na germinação dos conídios suspensos em água e expostos a 45 °C em comparação aos conídios suspensos em óleo mineral; a formulação oleosa de conídios quando exposta ou não ao calor mostrou-se mais efetiva para controle de *R. sanguineus*. Ainda, conídios suspensos em água germinaram mais rapidamente quando inoculados em BDAY do que quando foram aplicados sobre a cutícula do carrapato. Neste sentido, permite-se inferir que o efeito negativo do calor sobre a germinação de conídios suspensos em água foi maior quando os conídios foram aplicados sobre a cutícula do artrópode do que seria previsto nos testes *in vitro*, e os conídios sofreram menor interferência do calor quando suspensos em óleo. Portanto, conclui-se que o óleo mineral protege os conídios contra a ação do calor e potencializa a germinação do fungo na cutícula de *R. sanguineus*.

Palavras-chave: Carrapato, formulação, fungo entomopatogênico, termotolerância.

ABSTRACT

Resistance of the tick *Rhipicephalus sanguineus* to chemicals is commonly reported. Entomopathogenic fungi emerge as an alternative to the exclusive use of chemical acaricides for tick control; however, heat and other environmental factors may limit the efficacy of fungi. Thus, the current study evaluated the effect of heat on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* IP 119 when suspended in pure mineral oil (Impex®) or in water (Tween 80, 0.01%) and applied to the cuticle of *R. sanguineus* (*in vivo*) or in artificial medium PDAY (*in vitro*). Then, the results obtained with tests *in vivo* were compared to the results obtained with tests conducted *in vitro*, and finally, experiments were conducted to verify the virulence of *M. anisopliae* IP 119 for *R. sanguineus* engorged females. Conidial suspensions of *M. anisopliae* in water or oil, adjusted to 10^8 conidia ml^{-1} , were exposed to 0 (control) or 4 h to 45 ± 0.5 °C in a water bath, and then, individually inoculated onto the dorsal surface of *R. sanguineus* engorged females. The samples were incubated at 27 ± 1 °C and RH > 80% for 0, 12, 18, 24, 36, 48 or 72 h. In parallel, aliquots of the aqueous conidial suspensions (control or 45 °C) were inoculated onto PDAY medium in Petri plates. The samples were incubated at the same temperature and for the same time periods described above. After each incubation time, ticks were fixed and dissected, i.e., a fragment of the dorsal cuticle was removed. Cuticles that received conidia suspended in water, exposed or not to heat, were processed for fluorescence microscopy for evaluation of conidial germination. Cuticles that received conidia suspended in water or oil, exposed or not to heat, were processed for scanning electron microscopy for evaluation of conidial germination. Conidial germination on PDAY plates was assessed using a phase-contrast microscope. A minimum of 300 conidia per cuticle or plate was evaluated for calculation of percent germination. When conidia were exposed to heat, a high percentage of germination was observed in PDAY medium (61.5%) in comparison to the tick cuticle (13%), 72 h after inoculation. Appressoria were observed 36 h after inoculation, only in conidia that were not exposed to heat. On tick cuticle, the percentage of germination of conidia suspended in mineral oil and exposed to heat was high in comparison to the percentage of germination of conidia suspended in water, at all incubation times investigated. At 36 h of incubation, the mean percentage of germination of conidia suspended in oil reached 16.3%, whereas conidia suspended in water reached only 2.2%. Conversely, in the control groups (ticks treated with conidia not exposed to heat), the percentage of germination of conidia suspended in water or oil differed at 48 and 72 h of incubation, where germination was also high for conidia suspended in oil and inoculated on the tick cuticle. *M. anisopliae* conidia suspended in oil exposed or not to heat showed control percentage greater than the observed with aqueous suspensions. Thus, the results showed a significant delay in germination for conidia suspended in water and exposed to 45 °C in comparison to conidia suspended in mineral oil; in this sense, the oil formulation of conidia when exposed or not to heat proved to be more effective for controlling *R. sanguineus* engorged females. Moreover, conidia suspended in water germinated faster when inoculated in PDAY than when they were applied to the tick cuticle. Therefore, the results indicated that the negative effect of heat on conidial germination was more expressive when conidia were suspended in water and applied to the arthropod cuticle than it would be predicted by the *in vitro* thermotolerance tests. Also, conidia suffered less interference from heat exposures when suspended in oil. In conclusion, mineral oil protects conidia against the heat effects and enhances the fungal germination on the cuticle of *R. sanguineus*.

Keywords: Tick, formulation, entomopathogenic fungus, thermotolerance.

1 – INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari, Ixodidae), além de ser amplamente distribuído no Brasil e no mundo, chama atenção pela sua importância na saúde humana e animal. É responsável por causar diversas injúrias e transmitir agentes patogênicos para seus hospedeiros, inclusive para a população humana (MERLE et al., 1998; DEMMA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2008, 2010; EREMEEVA et al., 2011).

O controle de *R. sanguineus* é feito principalmente com o uso de acaricidas químicos aplicados no meio ambiente e/ou diretamente nos cães (LABRUNA; PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). No entanto, ao longo dos anos, muitos carrapatos foram capazes de sobreviver aos tratamentos com a maioria dos produtos químicos utilizados para controle. A má utilização, como erros durante a preparação do produto e aplicação inadequada e repetida dos acaricidas químicos, são situações que mais contribuem para a seleção de populações de carrapatos resistentes (LABARTHE, 1994; LEAL et al., 2003). Na literatura, relatos da resistência de *R. sanguineus* a bases químicas comercializadas para controle, têm sido demonstrada em vários locais pelo mundo (MILLER et al., 2001; BURRIDGE et al., 2004; ESTRADA-PENA, 2005; BORGES et al., 2007).

Em vista disso, a utilização dos fungos entomopatogênicos surge como uma alternativa ao desenvolvimento da resistência e a contaminação do meio ambiente em decorrência da utilização indiscriminada e exclusiva de produtos químicos para controle de ixodídeos. O controle microbiano é promissor, e os fungos, especialmente os dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, tem sido os microrganismos mais estudados e mais promissores no controle de carrapatos, tais como: *Rhipicephalus microplus* (BITTENCOURT et al., 1999; ARRUDA et al., 2005; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008), *R. sanguineus* (PRETTE et al., 2005; GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005), *Amblyomma cajennense* s. l. (SOUZA et al., 1999; REIS et al., 2001; D’ALESSANDRO et al., 2012), *Amblyomma cooperi* (REIS et al., 2003) e *Amblyomma variegatum* (KAAYA et al., 1996; MARANGA et al., 2005).

No entanto, fatores abióticos, especialmente altas temperaturas, podem ser um obstáculo importante na utilização de fungos entomopatogênicos para controle de artrópodes pragas ou de importância para saúde humana e animal. Em alguns ambientes, altas temperaturas podem influenciar a sobrevivência e a virulência desses microrganismos e conseqüentemente, limitar a eficácia destes como agentes de biocontrole de artrópodes (FERNANDES et al., 2010; RANGEL et al., 2010; MENT et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram que a exposição de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. a 37 °C por 96 h (SANTOS, 1978; VILLACORTA, 1978) ou 45 °C por 8 h (FERNANDES et al., 2010) foi suficiente para inibir a germinação de conídios, tornando-os inviáveis. No entanto, isolados de *Metarhizium* spp., de modo geral, apresentam grande variabilidade em termotolerância. Por exemplo, conídios deste fungo, quando expostos ao calor, podem apresentar a germinação atrasada ou completamente inibida, dependendo da espécie, isolado e tempo de exposição (RANGEL et al., 2005; FERNANDES et al., 2010; KEYSER et al., 2014).

É importante ressaltar que a formulação de conídios é uma estratégia que vem sendo muito estudada para proteger esses propágulos de adversidades existentes no meio e, conseqüentemente, aumentar a sua eficiência como agentes de biocontrole de artrópodes. A adição de óleo aos conídios, por exemplo, auxilia na proteção do fungo contra baixa umidade (BATEMAN et al., 1993), elevadas temperaturas (MCCLATCHIE et al., 1994) e radiação ultravioleta (MOORE et al., 1993; ALVES et al., 1998; BATEMAN; ALVES, 2000). Em comparação a conídios formulados em água, formulações em óleo favorecem o espalhamento e a adesão dos conídios à cutícula do hospedeiro (DAVID-HENRIET et al., 1998), além de manterem a viabilidade dos conídios por mais tempo, quando mantida em condições ambientais ou sob refrigeração (PRIOR et al., 1988).

Na literatura, informações relacionadas à termotolerância de isolados de *Metarhizium* spp., em diferentes formulações, foram geradas principalmente a partir de estudos *in vitro*, com germinação de conídios sendo avaliada em meio de cultura microbiológico. O presente estudo investigou, no entanto, o desenvolvimento de conídios de *M. anisopliae* sensu stricto, formulados em água ou óleo, estressados térmicamente ou não, na cutícula de *R. sanguineus*. Ainda, este estudo avaliou se a germinação de conídios de *M. anisopliae* expostos ao calor e inoculados sobre a cutícula de *R. sanguineus* tem resposta semelhante aos testes *in vitro*, quando o meio de cultura microbiológico é usado como substrato para avaliar a germinação conidial. Por fim, o presente estudo também avaliou a eficácia de conídios deste fungo quando formulados em água ou óleo mineral, e expostos ou não ao calor, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1– Carrapatos

Os carrapatos são artrópodes pertencentes à classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida e famílias Ixodidae, Argasidae e Nuttallielidae, sendo que esta última não tem representantes relatados no Brasil (SERRA-FREIRE, 2001). São ectoparasitos e todas as espécies alimentam-se de sangue de vertebrados, principalmente mamíferos, mas podem ocorrer em aves, répteis e anfíbios (FLECHTMANN, 1985; MASSARD; FONSECA, 2004).

A família Ixodidae compreende gêneros importantes como *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Dermacentor*, todos já relatados no Brasil (SERRA-FREIRE, 2001). Nesta família, o dimorfismo sexual é acentuado, cujo os machos apresentam um escudo dorsal, que cobre todo o seu dorso (Figura 1). Nas fêmeas, larvas e ninfas, o escudo dorsal não vai além do propodossoma (FLECHTMANN, 1985).

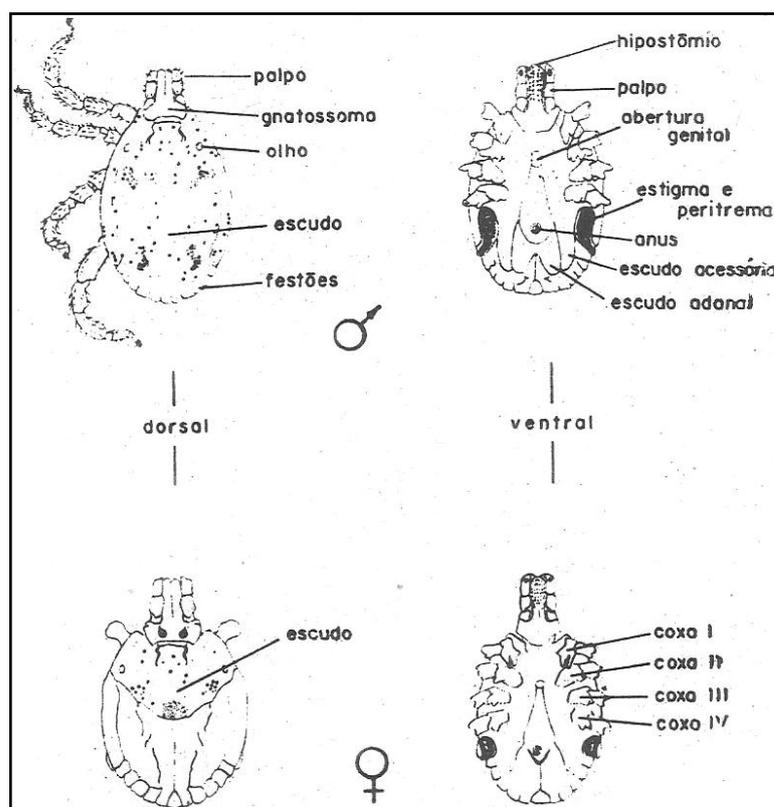


Figura 1. Morfologia dos carrapatos pertencentes à família Ixodidae. Fonte: FLECHTMANN, 1985, p. 18.

Ao contrário da família Ixodidae, os membros da família Argasidae apresentam dimorfismo sexual pouco evidente, em que as fêmeas são maiores que os machos. São destituídos de escudo dorsal, apresentando uma cutícula coriácea, de superfície granulosa, mamilada ou com tubérculos (FLECHTMANN, 1985). No Brasil, só há registros de argasídeos dos gêneros *Argas*, *Ornithodoros* e *Otobius* (SERRA-FREIRE, 2001).

Os ixodídeos são cosmopolitas, e no Brasil encontram-se amplamente distribuídos. Estão diretamente envolvidos como importantes parasitos do homem e de animais domésticos e silvestres, além de atuarem como vetores de patógenos para seus hospedeiros (SERRA-FREIRE, 2001). No Brasil, em ambiente rural e urbano, é comum a presença de cães parasitados por *Rhipicephalus sanguineus* e por carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA; PEREIRA, 2001; MASSARD; FONSECA, 2004). Em áreas de pastagem, na pecuária bovina, a infestação predominante é por *Rhipicephalus microplus* enquanto na pecuária equina, predominam *Amblyomma cajennense* s.l. e *Dermacentor nitens* (MASSARD; FONSECA, 2004).

O ciclo biológico dos carrapatos envolve duas fases, sendo uma fase parasitária e outra não parasitária ou de vida livre. Algumas espécies de carrapato, monoxenas, dependem de um único hospedeiro para desenvolverem-se; outras espécies, heteroxenas, no entanto, necessitam de mais de um hospedeiro para desenvolverem os diferentes estágios e completarem seu ciclo biológico (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006).

2.2 – O gênero *Rhipicephalus*

2.2.1 – Características gerais

O gênero *Rhipicephalus* abrange aproximadamente 70 espécies de carrapatos, quase todos com origem na região Afrotropical. Compreende os carrapatos que apresentam palpos e rostro curtos, com base do gnatosoma geralmente hexagonal. Possuem escudo geralmente sem ornamentação, olhos e festões presentes, coxa I bífida e os machos com um par de placas adanais desenvolvidas e um par rudimentar. Os peritremas têm forma de vírgula tanto nos machos quanto nas fêmeas e situam-se após o quarto par de pernas (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). *R. sanguineus* e *R. microplus* são as espécies que representam este gênero no Brasil (GARCIA et al., 2004).

2.2.2 - *Rhipicephalus sanguineus*

Conhecido como “carrapato do cão” ou “the brown dog tick”, *R. sanguineus* é um Ixodídeo amplamente distribuído no Brasil e no mundo, sendo descrito na literatura como um dos principais parasitos do cão doméstico. Além da preferência por cães, seu hospedeiro principal, *R. sanguineus* pode realizar hematofagia no homem e em outros mamíferos, podendo também parasitar aves e répteis (LABRUNA; PEREIRA, 2001; LOULY et al., 2006; DANTAS-TORRES, 2008; 2010; SZABÓ et al., 2008).

Em cães, *R. sanguineus* pode parasitar qualquer região do corpo do animal, sendo mais frequente entre dobras da pele, como no tecido interungular, dobras do ouvido externo, axilas, períneo, pregas do pescoço, da região periocular e na face interna do ouvido externo. Em grandes infestações, espalham-se por toda a superfície corporal do hospedeiro (SERRA-FREIRE, 2001).

O ciclo de vida desse artrópode, em condições favoráveis, pode completar-se em 63 dias. São necessários três hospedeiros para completar o ciclo, pois todas as mudas são realizadas fora dos hospedeiros. A fêmea põe, em uma única vez, dois mil a três mil ovos, e em geral a postura é realizada em partes altas do ambiente onde vivem os cães, como frestas próximas ao telhado ou forro dos canis, sendo raramente feitas no solo. Cerca de três dias depois de abandonarem o hospedeiro, as fêmeas ingurgitadas iniciam a postura, que dura em torno de 21 a 29 dias. A eclosão das larvas tem início em cerca de 17 a 60 dias, e as larvas podem suportar jejum por até 253 dias. Essas larvas ao se fixarem ao hospedeiro, ingurgitam-se em dois a sete dias e depois abandonam o hospedeiro, e após cinco a 23 dias, mudam para o estágio de ninfa, podendo suportar um jejum por até 183 dias. Tais ninfas, ao fixarem no hospedeiro, ingurgitam-se em quatro a nove dias e logo em seguida abandonam o hospedeiro para sofrerem ecdise e atingirem o estágio adulto, por volta de 11 a 73 dias, e podem sobreviver até 568 dias sem se alimentar (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006).

2.2.3 – Importância na saúde humana e animal

Os carrapatos destacam-se por causarem injúrias de vários tipos, sendo: 1) injúria direta, causada pelo dano produzido no couro dos hospedeiros e pela exanguinação, resultando frequentemente em anemia dos animais parasitados; 2) inoculação de toxinas nos animais parasitados e no homem; 3) transmissão de agentes patogênicos, tais como vírus,

bactérias (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Borrelia*) e protozoários (*Babesia* spp.) para seus hospedeiros e para o homem (FLECHTMANN, 1985; COUTINHO et al., 2005).

Rickettsia rickettsii é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória, causadora da chamada febre maculosa em humanos. A enfermidade recebe diferentes nomes nos locais por onde ocorre, sendo conhecida como Rocky Mountain spotted fever nos Estados Unidos, febre manchada no México, febre de Tobia na Colômbia e febre maculosa brasileira, no Brasil. O carrapato é o hospedeiro natural, reservatório e vetor desta bactéria. O homem é hospedeiro acidental e não é considerado reservatório da doença, além de não colaborar com a propagação do agente (MELLES et al., 1992; VRANJAC, 2002).

No Brasil a febre maculosa é a principal zoonose transmitida por carrapatos e é de notificação obrigatória. Tem sido relatada em vários estados, com maior número de casos nos estados de Minas Gerais e São Paulo (SINAN 2013). Frequentemente transmitida por *A. cajennense* s.l. e *Amblyomma aureolatum*, outras espécies de carrapatos tem sido relatadas como potenciais vetoras de *R. rickettsii*, sendo elas: *Amblyomma dubidatum*, *Amblyomma ovale* e *R. sanguineus* (SZABÓ et al., 2013).

A infecção em humanos ocorre com a picada do carrapato infectado que, ao final de sua alimentação, após ficar aderido por um período de 6 a 10 horas, elimina grande quantidade de secreções digestivas. Acredita-se que a transmissão da bactéria seja feita especialmente pelos estágios de larva e ninfa deste ixodídeo, pois a picada de carrapatos adultos é dolorosa e isso leva as pessoas parasitadas a retirarem o carrapato antes do tempo suficiente para transmissão das bactérias. A transmissão também pode ocorrer por contato com o conteúdo gástrico do carrapato, caso o mesmo seja esmagado, por exemplo, no momento de sua retirada (DEL FIOL, 2010). As manifestações comuns da febre maculosa após o período de incubação são febre, cefaleia e exantema. A doença progride com lesões no sistema nervoso central, pulmões e rins, se não for tratada precocemente depois da primeira semana (MELLES et al., 1992, VRANJAC, 2002). Desde 1990, o número de óbitos no Brasil por febre maculosa aumentou ao longo dos anos, chegando a 50 confirmações no ano de 2012. No entanto, em 2013, até o meio do ano, houve um considerável decréscimo, com 3 óbitos confirmados (SINAN 2013).

Se tratando de *R. sanguineus*, altas infestações em cães provocam desde leves irritações até anemia em decorrência da ação espoliadora, além de ser hospedeiro intermediário e vetor de *Babesia canis*, causadora da babesiose canina; de *Rangelia vittalli*, agente da doença conhecida como “nambiuvu”; de *Rickettsia canis*, da riquetisiose canina e

Ehrlichia canis, da erlichiose canina (SERRA-FREIRE, 2001; SERRA-FREIRE; MELLO, 2006; DANTAS-TORRES, 2008). Alguns estudos já foram realizados para elucidar a participação de *R. sanguineus* no ciclo da leishmaniose canina. No entanto, o papel deste ixodídeo como vetor ainda não é claro (COUTINHO et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2012). Em ambiente domiciliar e peridomiciliar, o homem convive com o principal hospedeiro de *R. sanguineus*, e sabe-se que este ixodídeo é um potencial vetor de babesias e riquetsias para o homem (ROZENTAL et al., 2002).

Uma série de trabalhos tem relatado a importância médica de *R. sanguineus*. Além de desencadear reações alérgicas ou inflamatórias relacionadas às picadas, principalmente de larvas e ninfas, e ocasionar lesões nos locais de fixação, atua na Europa como vetor da bactéria *Rickettsia conorii*, agente etiológico da febre botonosa ou também chamada febre escaro-nodular (MERLE et al., 1998), e de *R. rickettsii*, agente da febre maculosa, nos Estados Unidos (DEMMA et al., 2005) e México (EREMEEVA et al., 2011).

No Brasil, *R. sanguineus* é considerado como potencial vetor de *R. rickettsii* (ROZENTAL et al., 2002) e de *Borrelia* sp., agente da borreliose de Lyme *similar* (YOSHINARI et al., 1997), para humanos. Estas confirmações ganham especial importância, tendo em vista a existência de relatos sobre humanos sendo parasitados por este carrapato no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2006; LOULY et al., 2006). Ainda, ensaios de laboratório demonstraram que *R. sanguineus* é um competente vetor de *R. rickettsii* (PIRANDA et al., 2011), e estudos moleculares e de isolamento em cultura de células, demonstraram a infecção natural deste carrapato com *R. rickettsii* em áreas endêmicas de febre maculosa no Brasil (CUNHA et al., 2009; OGRZEWALSKA et al., 2012).

2.2.4 – Métodos de controle de *R. sanguineus*

O controle de *R. sanguineus* em cães é feito principalmente com uso de drogas carrapaticidas aplicadas no meio ambiente e/ou nos cães (LABRUNA; PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Estudos já foram feitos para testar a eficácia de acaricidas no controle de *R. sanguineus*. Os resultados deixam claro que cepas deste carrapato de diferentes origens apresentam diferenças na suscetibilidade aos acaricidas. Tais diferenças podem ser explicadas pela variação biológica e genética que existe nas cepas de *R. sanguineus*, provenientes de diferentes locais (SZABÓ et al., 2005).

Nos Estados Unidos, testando uma série de acaricidas no controle de *R. sanguineus*, Burrige et al. (2004) detectaram maior sensibilidade dos carrapatos ao fipronil, carbaril e ciflutrina, com mortalidade de 100%, 24 h após o tratamento. Amitraz e selamectina foram os acaricidas menos eficazes contra adultos de *R. sanguineus*. Miller et al. (2001), testando uma cepa proveniente do Panamá, detectaram resistência dos carrapatos a maioria dos produtos testados, dentre eles o amitraz, enquanto o fipronil foi o único acaricida ao qual a cepa panamenha não desenvolveu resistência. Na Espanha, Estrada-Pena (2005) detectaram resistência do carrapato ao propoxur e deltametrina e sensibilidade ao amitraz em todas as cepas investigadas. No Brasil, Borges et al. (2007) testaram cinco acaricidas comumente utilizados para controle de *R. sanguineus* em Goiânia, e detectaram a resistência da maioria das cepas a cipermetrina, deltametrina e ao coumafós, e não detectaram resistência dos carrapatos ao amitraz.

Muitos carrapatos, ao longo dos anos, foram capazes de sobreviver a tratamentos com a maioria dos produtos químicos utilizados para controle. A má utilização, como preparo e aplicação inapropriada e repetida dos acaricidas químicos, é uma das situações que mais contribuem para a seleção de populações de carrapatos resistentes, além da contaminação do homem, do meio ambiente e da presença e acúmulo de resíduos em produtos de origem animal e vegetal (LABARTHE, 1994; LEAL et al., 2003).

Nos últimos anos tem sido estudado e demonstrado experimentalmente o uso de microrganismos como uma medida alternativa e promissora para controle integrado de carrapatos. O uso de agentes microbianos para controle de carrapatos auxilia na redução dos impactos causados ao meio ambiente advindo do uso indiscriminado e exclusivo de acaricidas químicos. Neste sentido, várias espécies de fungos entomopatogênicos são conhecidas por atacar e matar carrapatos ixodídeos, mas apenas algumas espécies tem sido largamente estudadas (OSTFELD et al., 2006; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

2.3 – Os fungos entomopatogênicos

Os primeiros testes com fungos que infectam insetos, chamados de fungos entomopatogênicos, foram feitos no século XIX, em 1878 - 1879, pelo russo Metchnikoff, que avaliou o potencial de *Metarhizium anisopliae* para o controle de larvas do besouro praga do trigo, *Anisoplia austriaca* (ALVES, 1998). Atualmente, existem inseticidas e acaricidas biológicos à base de fungos, chamados genericamente de micoinseticidas e micoacaricidas,

sendo comercializados em diferentes países (FARIA; MAGALHÃES, 2001). Em um estudo de revisão, Faria e Wraight (2007) apresentaram uma lista de 171 produtos, micoinseticidas e micoacaricidas, desenvolvidos em todo o mundo, nas últimas quatro décadas.

A estimativa é de que existam mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos no mundo, sendo responsáveis por 80% das doenças que acometem artrópodes. Tais espécies são distribuídas em pelo menos 90 gêneros, sendo que a maioria possivelmente ocorre no Brasil. A ocorrência natural desses organismos, tem sido no Brasil e em outros países, um fator importante na redução das populações de insetos pragas (ALVES, 1998).

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados como agentes de controle microbiano, principalmente para controle de pragas agrícolas (HUMBER et al., 1981). No entanto, estudos recentes os mostram como promissores agentes de controle de artrópodes de importância na saúde humana e animal, como insetos (LUZ et al., 2003; LUZ; BATAGIN, 2005; LAZZARINI et al., 2006; LUZ et al., 2007; LELES et al., 2012) e carrapatos (BITTENCOURT et al., 1999; SOUZA et al., 1999; PRETTE et al., 2005; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; D'ALESSANDRO et al., 2012; CAMARGO et al., 2012).

Os fungos entomopatogênicos se destacam por uma série de características peculiares e bastante desejáveis para utilização no controle microbiano de artrópodes. O uso de fungos é viabilizado por possuírem grande variabilidade genética, não serem prejudiciais ao homem e outros animais homeotermos, possuírem grande capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente, podendo ser levados pelos diferentes agentes de disseminação para locais muito distantes, seu largo espectro podendo causar epizootias naturais, e por infectarem diferentes estágios de desenvolvimento de insetos e carrapatos, desde o ovo até o adulto (ALVES, 1998; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Outra peculiaridade dos fungos é não depender da ingestão dos conídios pelos artrópodes. A penetração também ocorre via cutícula, ao contrário de outros patógenos, que penetram apenas por via oral. Algumas espécies de fungos são altamente virulentas e a maioria é altamente especializada na penetração via cutícula, através da atividade de enzimas e pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório. No entanto, a relação patógeno-hospedeiro depende muito de condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta e, ainda, das condições nutricionais e susceptibilidade do hospedeiro (ALVES, 1998).

O modo de infecção dos fungos entomopatogênicos é bastante característico. Primeiramente, o propágulo fúngico se adere a cutícula do artrópode, graças a enzimas presentes na superfície do conídio, que alteram a superfície da cutícula do artrópode, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (ST. LEGER et al., 1991). Encontrando condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrição, os conídios germinam, formando um tubo germinativo. A velocidade do processo germinativo depende do isolado, das condições ambientais e do passado térmico do conídio (ALVES, 1998).

Em alguns fungos após a germinação, ocorre uma dilatação das hifas na extremidade do tubo germinativo, formando uma estrutura denominada apressório. Nesta fase, ocorre migração do conteúdo citoplasmático para a extremidade do tubo germinativo, tornando-se um local de elevada atividade metabólica, com a presença de mitocôndrias, ribossomos e outros componentes nucleares. Cabe ressaltar, que na parte inferior do apressório, pode ocorrer uma diferenciação da hifa, tornando-a mais fina e saliente. A esta nova estrutura formada, dá-se o nome de grampo de penetração, o qual tem a função de iniciar o processo de penetração na cutícula. Nem todos os fungos apresentam tal estrutura (ALVES, 1998).

Na penetração, estão envolvidos processos físicos e químicos. Os físicos envolvem a pressão mecânica da hifa terminal através do apressório e grampo de penetração, que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas da cutícula. Os químicos, resultam da elaboração de proteases, lipases e quitinases, que facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). De modo geral, o local de penetração preferencial dos fungos são as membranas intersegmentais do abdome dos insetos. Entretanto, aparelho bucal, espiráculos, ânus, sifão respiratório e tarsos também são locais de penetração (ALVES, 1998).

Após a penetração é iniciado o processo de colonização do corpo do hospedeiro pelo fungo. A hifa que penetra sofre um engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente na hemocele, diferenciando em corpos hifais. Durante a colonização, os fungos secretam toxinas que podem afetar as células e as reações do hospedeiro, como é o caso das enzimas chamadas destruxinas, que intensificam o processo patogênico de fungos do gênero *Metarhizium* (WANG et al., 2004). Neste estágio, os hospedeiros desencadeiam na hemocele as suas reações celulares e humorais de defesa contra a presença do patógeno. Os sintomas causados pela infecção fúngica incluem perda da sensibilidade, perda da coordenação dos movimentos e paralisia, culminando na morte do hospedeiro (ALVES, 1998).

Após a morte do artrópode, em decorrência da perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos e ação de toxinas, o fungo cresce interiormente e todos os tecidos são penetrados por hifas filamentosas. Com o esgotamento dos recursos, as hifas começam a emergir pelos espiráculos e usando pressão mecânica, saem através das áreas mais fracas da cutícula, geralmente região intersegmentar, e depois por áreas mais grossas. Com algum tempo, os micélios cobrem todo o corpo. Associado ao crescimento micelial, ocorre sob condições favoráveis de temperatura e umidade, a esporulação ou conidiogênese do fungo, cujo o tempo de produção de conídios depende do fungo. Formados os conídios, estes se dispersam pelo ambiente, auxiliados por fatores bióticos e abióticos, continuando o ciclo do fungo (ALVES, 1998; CHANDLER et al., 2000).

O mecanismo de infecção fúngica em carrapatos se assemelha com o mecanismo observado em insetos. Bittencourt et al. (1995) constataram que a principal forma de penetração do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l. em *R. microplus* é pela cutícula, e Dutra et al. (2004) complementam, reportando que este mesmo fungo infecta insetos e carrapatos através de uma combinação de estruturas especializadas e da degradação da cutícula, sendo que enzimas como proteases e quitinases, são consideradas fatores chave no processo de penetração. Após a penetração, o fungo invade os órgãos internos, produz micotoxinas e mata o hospedeiro (KAAYA et al., 1991).

Alguns estudos feitos com auxílio de microscopia eletrônica de varredura têm ajudado a compreender este processo de infecção de fungos entomopatogênicos sobre insetos (MOINO JR et al., 2002; NEVES; ALVES 2004; MELO et al., 2007) e carrapatos (BITTENCOURT et al., 1999; GARCIA et al., 2004; ARRUDA et al., 2005). A maioria destes estudos comprovam dados anteriores que relatam a existência de regiões da cutícula mais propícias para penetração dos fungos. Em cupins da espécie *Cornitermes cumulans*, *M. anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* s.l. penetram mais rapidamente em regiões que a cutícula é mais maleável do que em regiões que a cutícula é mais enrijecida. Tal fato pode ser explicado pela provável baixa produção de exoenzimas pelos isolados investigados, que são importantes no processo de degradação da cutícula (NEVES; ALVES, 2004). Em pulgas, *Ctenocephalides felis felis*, as membranas intersegmentais do abdome são os locais de predileção para penetração de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. (MELO et al., 2007). Em carrapatos, sabe-se que a penetração é pela cutícula, porém não há relatos de alguma região ao longo da cutícula destes artrópodes que seja preferencial para penetração do fungo, como mostrado para os outros artrópodes citados acima.

Na patologia de artrópodes, a microscopia de fluorescência também tem ajudado a compreender os processos de infecção fúngica em insetos (BUTT, 1987). O uso de corantes específicos, chamados sondas fluorescentes ou fluorocromos, tem sido de grande valor em vários estudos, inclusive na patologia de insetos. Existem corantes que se ligam a componentes da parede celular, a lipídios, núcleo, organelas, cálcio, calmodulina, e aqueles que indicam viabilidade celular. No entanto, a escolha de um fluorocromo vai depender da estrutura ou moléculas que se deseja analisar, pois estes corantes possuem funções específicas (BUTT et al., 1989; ALVES, 1998).

Calcofluor White M2R é um corante que se liga fortemente a β -glucanas (KRITZMAN et al., 1978), que são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos filamentosos e cereais (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Muito utilizado por corar a parede celular de fungos, estudos demonstraram que este fluorocromo facilita a rápida localização de esporos e locais de penetração dos fungos, além de aumentar a detecção de lesões melanóticas na cutícula do hospedeiro (BUTT, 1983, 1987). Corantes de parede celular, como exemplo Calcofluor White M2R, Uvitex BOPT e Tinopal LPW, podem ser de valor inestimável em estudos micológicos, pois facilitam a identificação e o estudo de propágulos fúngicos no solo ou em superfícies de plantas e insetos, além de auxiliar na contagem de esporos e no estudo da germinação e penetração em plantas e na cutícula de insetos (BUTT, 1983, 1987; BUTT et al., 1989).

2.3.1 – Fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos

Uma alternativa ao desenvolvimento da resistência e a contaminação do meio ambiente em decorrência da utilização exclusiva de produtos químicos para controle de ixodídeos, é a utilização de patógenos, inimigos naturais de carrapatos, em especial, os fungos entomopatogênicos. Várias espécies de fungos são naturalmente associadas à carrapatos e algumas espécies demonstram alta virulência em condições de laboratório. Nos últimos anos, estudos *in vitro* têm demonstrado, em sua maioria, a atividade desses fungos em ovos, larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas de várias espécies de carrapatos que ocorrem na América do Sul (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Os resultados indicaram o potencial de algumas espécies como agentes para o controle de carrapatos (SAMISH; REHACEK, 1999; CHANDLER et al., 2000; SAMISH et al., 2004; GARCIA et al., 2005; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Neste contexto, os fungos, especialmente os dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, tem sido os microrganismos mais estudados e mais promissores no controle de carrapatos, tais como: *R. microplus* (BITTENCOURT et al., 1999; ARRUDA et al., 2005; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008), *R. sanguineus* (GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005; PRETTE et al., 2005), *A. cajennense* s.l. (SOUZA et al., 1999; REIS et al., 2001; REIS et al., 2004; D’ALESSANDRO et al., 2012), *Amblyomma cooperi* (REIS et al., 2003) e *Amblyomma variegatum* (KAAYA et al., 1996; MARANGA et al., 2005).

Apesar da resposta eficaz de vários isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* ter sido mostrada para várias espécies de carrapato em condições de laboratório, a maioria dos estudos foram conduzidos com o carrapato *R. microplus*. Tais fungos, são patogênicos para todas as fases de desenvolvimento dos carrapatos e sobretudo, ovos e larvas são as fases mais suscetíveis à infecção. Porém, como mostrado para muitos outros artrópodes, existem espécies e linhagens de fungos com virulência alta e específica para diferentes espécies e estágios de carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Trabalhos com microscopia, principalmente microscopia eletrônica de varredura, tem sido inovadores e conclusivos para compreensão do processo de infecção fúngica em carrapatos. O modo de penetração é pela cutícula, assim como mostrado para outros artrópodes e confirmado pelo trabalho pioneiro de Bittencourt et al. (1999), mostrando a adesão, germinação e formação de apressório de *M. anisopliae* s.l. sobre a cutícula de *R. microplus*, e pelo trabalho de Arruda et al. (2005), que mostraram as etapas da infecção, e com auxílio da histopatologia, mostraram as alterações morfológicas que ocorrem na cutícula de *R. microplus* durante a infecção por *M. anisopliae*. A invasão intensa dos tecidos adjacentes por hifas comprovou que este fungo é capaz de produzir alterações morfológicas significativas na cutícula, confirmando assim, a patogenicidade de *M. anisopliae* para *R. microplus*.

Em *R. sanguineus*, Garcia et al. (2004) verificaram a forma de adesão e penetração de *M. anisopliae* na cutícula deste artrópode e as conseqüentes lesões causadas por este processo nos tecidos internos do ixodídeo por análises histopatológicas e de microscopia eletrônica de varredura. Observaram ainda que a germinação dos conídios ocorreu 18 h após a inoculação e que o fungo penetrou o carrapato através da cutícula 48 h após a infecção experimental. Após a penetração, o fungo promoveu colonização difusa no corpo do hospedeiro sem preferência por tecidos específicos, com consideráveis lesões nos tecidos internos, como o rompimento da parede intestinal e o vazamento do conteúdo para a hemocele. A morte do hospedeiro ocorreu

entre 96 e 120 h pós-infecção e o fungo esporulou sobre o cadáver por volta de 120 a 144 h pós-infecção.

Garcia et al. (2005) descreveram, também por microscopia eletrônica de varredura e histopatologia, o processo de colonização e as lesões no interior de ovos de *R. sanguineus* infectados por *M. anisopliae*. Observaram que a maioria dos ovos (67%) apresentaram conídios germinados 18 h após inoculação e a penetração ocorreu 5 dias após a infecção, em 92,6% dos ovos. As hifas começaram a surgir na superfície 7 dias pós-infecção em 87% dos ovos, chegando a 100% no 9º dia. Nas análises histopatológicas os autores não observaram lesões consideráveis, mas houve significativa redução (53,9%) na eclosão dos ovos infectados.

2.3.2 – Um fator limitante do controle microbiano: Altas temperaturas

O desempenho dos fungos entomopatogênicos é afetado por uma variedade de fatores ambientais bióticos e abióticos; dentre os fatores abióticos, a temperatura é um dos mais importantes (FERNANDES et al., 2008). Em alguns ambientes, altas temperaturas podem influenciar a sobrevivência e a virulência de fungos entomopatogênicos, limitando a eficácia desses patógenos como agentes de biocontrole de artrópodes (FERNANDES et al., 2010; RANGEL et al., 2010; MENT et al., 2011).

No campo, os fungos entomopatogênicos podem ser expostos ao calor por contato direto com a radiação solar, ou indiretamente por condução de calor no solo (RANGEL et al., 2005). Segundo Fernandes et al. (2008), o calor associado com a radiação ultravioleta danifica o conídio e contribui para falhas em programas de controle biológico de insetos. Logo, a seleção de isolados naturalmente termotolerantes ajudaria a melhorar a eficácia dos fungos.

Para *M. anisopliae*, a faixa ideal de temperatura para germinação de esporos, crescimento vegetativo e esporulação encontra-se entre 24 e 30 °C (WALSTAD et al., 1970; DIMBI et al., 2004). Alguns trabalhos demonstraram que a exposição de diferentes isolados deste fungo a 37 °C foi suficiente para inibir a germinação de conídios, tornando-os inviáveis quando submetidos a mais de 96 h a esta temperatura (SANTOS, 1978; VILLACORTA, 1978). No entanto, espécies e isolados de *Metarhizium* apresentam grande variabilidade quanto a termotolerância. Por exemplo, conídios tratados termicamente podem apresentar a germinação atrasada ou completamente impedida, dependendo da espécie do fungo, isolado e

tempo de exposição (RANGEL et al., 2005; FERNANDES et al., 2010; KEYSER et al., 2014).

A maioria dos fungos entomopatogênicos cresce entre 10 e 40 °C e tem temperatura ótima para germinação de esporos, crescimento vegetativo e esporulação entre 25 e 35 °C (COONEY; EMERSON, 1964). Vieira et al. (2009) avaliaram diferentes temperaturas na germinação de conídios de *Metarhizium acridum* (= *M. anisopliae* var. *acridum*) e monitoraram o crescimento das colônias por diferentes horas. Constataram que as temperaturas de 25, 28 e 30 °C proporcionaram maiores taxas de esporulação e elevados percentuais de germinação dos conídios, além do desenvolvimento mais rápido das microestruturas somáticas e reprodutivas (hifas, anastomoses, apressórios, conidióforos e conídios elipsóides), sendo assim, consideradas temperaturas ótimas para *M. acridum*. Em temperaturas mais elevadas, de 40 °C e 45 °C, os autores não detectaram esporulação, germinação, nem desenvolvimento de nenhuma microestrutura.

Fernandes et al. (2010) investigaram a termotolerância de diversos isolados de *Metarhizium* spp., e mostraram que quando expostos a 45 °C, dependendo do tempo de exposição dos conídios, alguns isolados se mostraram termotolerantes, e outros, apresentaram considerável queda na germinação depois de 8 h de exposição. No entanto, alguns isolados mostraram-se mais termosensíveis e não houve germinação de conídios expostos por período de 6 h a mesma temperatura.

No estudo de Rangel et al. (2010), foram determinados os limites máximos de temperatura para germinação e crescimento de três isolados de *M. acridum*, e um de *M. robertsii*, *M. anisopliae* e *Aspergillus nidulans*. Constataram que a maioria das espécies de *Metarhizium* germinou bem em 35 e 36 °C, mas em comparação com 28 °C, o crescimento se mostrou mais lento, exceto para um dos isolados de *M. acridum*. Todas as espécies de *Metarhizium* apresentaram germinação de conídios prejudicada a 38 e 40 °C, porém os conídios de um dos isolados de *M. acridum* (ARSEF 324) foram consideravelmente os mais termotolerantes. Nenhum dos isolados de *M. anisopliae* e *M. robertsii* produziram colônias visíveis durante 10 dias a 38 °C. Todas as espécies de *Metarhizium* mantidas a 38 ou 40 °C por 10 dias voltaram a crescer quando transferidas para 28 °C, e todas elas esporularam.

Ainda neste mesmo estudo, a 42°C por 10 dias, apenas dois isolados de *M. acridum* (ARSEF 324 e 3609) cresceram após o retorno a 28 °C, mas com algum atraso. Com isso, foi constatado que conídios germinaram nas temperaturas estressantes, mas o crescimento micelial foi prejudicado ou interrompido logo após a germinação. No entanto, quando

transferidos para uma temperatura ótima, eles produziram colônias e conídios. Em contraste, o fungo *A. nidulans* a 42 °C germinou e cresceu bem menos, mas foi muito mais termotolerante do que os isolados de *Metarhizium* spp. investigados.

2.3.3 – Formulações de conídios

A formulação de conídios é uma estratégia que vem sendo muito estudada por aumentar a eficiência dos fungos como agentes de controle de artrópodes. Existem, por exemplo, grandes vantagens em associar óleo aos conídios. A adição de óleo auxilia na proteção do fungo contra adversidades existentes no meio, como baixa umidade (BATEMAN et al., 1993; BATEMAN, 1994), elevadas temperaturas (MCCLATCHIE et al., 1994) e radiação ultravioleta (MOORE et al., 1993; ALVES et al., 1998; BATEMAN; ALVES, 2000). Em comparação com conídios formulados em água, formulações em óleo favorecem o espalhamento e a adesão dos conídios na cutícula do hospedeiro (DAVID-HENRIET et al., 1998), além de manterem a viabilidade dos conídios por mais tempo, quando mantida em condições ambientais ou sob refrigeração (PRIOR et al., 1988).

Os efeitos positivos da associação de fungos entomopatogênicos e óleo tem sido relatados, como o aumento da mortalidade em triatomíneos (LUZ; BATAGIN, 2005), gafanhotos (LOMER et al., 2001) e moscas-brancas (MALSAM et al., 2002); aumento da atividade ovicida em *Aedes aegypti* (ALBERNAZ et al., 2009) e no carrapato *Rhipicephalus annulatus* (SAMISH et al., 2014); aumento do efeito patogênico contra diferentes estágios de vida do carrapato *R. microplus* (ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

O uso efetivo de patógenos em programas de controle de pragas ou controle de artrópodes de importância na saúde humana e animal requer a seleção de isolados tolerantes à faixa de temperatura encontrada no ecossistema em questão e a busca por uma formulação, visando aumentar a viabilidade dos conídios e conseqüentemente permitir uma melhor utilização a campo (FARGUES et al., 1997), além da necessidade de elaboração de um modo de aplicação coerente e eficaz. Como exemplo, em ambientes com temperatura abaixo de 15 °C, o ideal é que sejam selecionados isolados ativos nesta temperatura para utilização em ambientes de clima temperado (SOARES et al., 1983). Por outro lado, a seleção de linhagens com atividade patogênica acima de 30°C, se mostrou ideal para controle de gafanhotos em um deserto no oeste da África (MCCLATCHIE et al., 1994).

3 – JUSTIFICATIVA

Rhipicephalus sanguineus é uma espécie de carrapato de grande importância médica e veterinária por causar diversas injúrias e transmitir agentes patogênicos para seus hospedeiros, inclusive para a população humana. Visando reduzir os problemas causados pelo uso indiscriminado e exclusivo de acaricidas químicos, dentre eles a contaminação do meio ambiente e a seleção de populações de carrapatos resistentes, torna-se necessário a busca por métodos alternativos de controle, mais eficientes, menos tóxicos ao homem e aos animais, e de menor impacto ambiental. Uma das alternativas mais investigadas na atualidade é a utilização de fungos entomopatogênicos. Esse grupo de microrganismos possui características bastante peculiares como a grande variabilidade, ocorrência natural, infectam diferentes fases de desenvolvimento de artrópodes, além de não induzirem a seleção de indivíduos resistentes.

Apesar da eficiência comprovada de isolados fúngicos para controle de carrapatos em testes laboratoriais e de campo, sabe-se que fatores bióticos e abióticos influenciam na eficácia de fungos entomopatogênicos em programas de controle de artrópodes praga ou de importância na saúde humana e animal. Dentre esses fatores, a temperatura elevada do ambiente pode ser um importante limitador dos agentes microbianos de controle. Alguns estudos mostram que temperaturas entre 40 e 45 °C, que podem ser alcançadas naturalmente durante as horas mais quentes do dia, podem atrasar a germinação de conídios, e dependendo do isolado fúngico e do tempo de exposição, a germinação de conídios pode ser completamente inibida. Essas informações foram geradas basicamente a partir de estudos *in vitro*, com cultivo dos conídios em meio de cultura microbiológico.

No entanto, na literatura não existe informação sobre o efeito do calor no desenvolvimento de conídios na cutícula de carrapatos, ou de outros artrópodes. Além disso, evidências sugerem que a formulação em óleo confere proteção aos conídios durante a exposição à temperaturas extremas. Sendo assim, o atual estudo buscou investigar o efeito da exposição prévia ao calor sobre o desenvolvimento de conídios de *M. anisopliae* s.s. formulados em água ou óleo e inoculados sobre a cutícula de *R. sanguineus*. Além disso, buscou-se demonstrar se a germinação de conídios de *M. anisopliae* expostos ao calor e inoculados sobre a cutícula de *R. sanguineus* têm resposta semelhante aos testes *in vitro*, quando o meio de cultura microbiológico é usado como substrato para avaliar a germinação conidial. Tais conhecimentos irão contribuir para novos estudos e possivelmente, para o desenvolvimento de medidas de controle integrado de carrapatos.

4 – OBJETIVOS

4.1 – Objetivo geral

Contribuir para o incremento do controle microbiano de carrapatos com fungos entomopatogênicos considerando aspectos de formulação e termotolerância de conídios.

4.2 - Objetivos específicos

- i) Avaliar o efeito do calor sobre a germinação de conídios de *M. anisopliae* s.s. suspensos em água ou óleo, tendo-se meio de cultura (testes *in vitro*) ou a cutícula de *R. sanguineus* (testes *in vivo*) como substrato;
- ii) Avaliar o efeito do calor sobre o tempo de formação de apressórios de *M. anisopliae* na cutícula de *R. sanguineus*, quando conídios são suspensos em água ou óleo;
- iii) Comprovar a virulência de *M. anisopliae* para fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* após exposição térmica de conídios suspensos em água ou óleo, e comparar a eficácia das suspensões.

5 – MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – Isolados fúngicos

Foram utilizados dois isolados de *Metarhizium* spp. Um deles, IP 119, foi escolhido por mostrar melhor virulência para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em uma triagem com isolados originários do Centro-Oeste brasileiro (Muniz e Fernandes, dados não publicados). Este isolado provém de amostra de solo coletada em área de cerrado de Goiás e permanece depositado na coleção de fungos do Laboratório de Patologia de Invertebrados, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) - UFG. O outro isolado avaliado, ARSEF 2575, foi utilizado como padrão para comparação nos testes de termotolerância, e encontra-se depositado na ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF/USDA, Estados Unidos (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium* spp. utilizados neste estudo.

Isolado	Espécie	Origem	Ano
IP 119	<i>M. anisopliae</i>	Solo, Norte de Goiás - Brasil.	2000
ARSEF 2575	<i>M. robertsii</i>	Coleoptera, Carolina do Sul - Estados Unidos.	1988

5.2 – Cultivo dos isolados e preparo das suspensões conidiais

Os isolados foram cultivados em placas de Petri de vidro (95 × 15 mm) contendo 23 mL de meio batata dextrose ágar (BDA) (Difco Laboratórios, Sparks, MD, EUA) suplementado com 1 gL⁻¹ de extrato de levedura (Technical, Difco) (BDAY) a 27°C durante 15 dias em escotofase.

Os conídios foram colhidos com auxílio de uma espátula e suspensos em água contendo polioxietileno sorbitano monooleato (Tween 80, Labsynth Prod. para Lab. Ltda, Diadema, SP) a 0,01%, ou em puro óleo mineral (Impex, Labimpex Ind. e Com. de Prods. p/ Lab. Ltda., Diadema, SP). As suspensões conidiais foram rigorosamente agitadas, quantificadas em câmara de Neubauer, e ajustadas à concentração de 1 x 10⁸ conídios mL⁻¹, para os ensaios com fêmeas ingurgitadas, e 1 x 10⁷ conídios mL⁻¹ para os ensaios de termotolerância *in vitro*.

5.3 – Carrapatos utilizados nos bioensaios

Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, coletadas de cães naturalmente infestados e mantidos no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Goiânia e de Aparecida de Goiânia. Após as coletas, as fêmeas foram levadas ao laboratório, lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, enxaguadas em água destilada estéril, secas em papel toalha e acondicionadas em placas de Petri estéreis.

5.4 – Testes *in vitro* para avaliação da termotolerância de conídios

Para ambos isolados avaliados, IP 119 e ARSEF 2575, alíquotas de 2 mL das suspensões conidiais aquosa ou oleosa a 1×10^7 conídios mL⁻¹, foram transferidas individualmente para tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca (16 × 125 mm - Pyrex, Corning), sendo 4 tubos para suspensão oleosa e 4 tubos para suspensão aquosa. Três tubos de cada suspensão foram imediatamente colocados em banho maria a $45 \pm 0,5$ °C, e um tubo de cada formulado mantido a 27 ± 1 °C (controle). A temperatura foi monitorada com um data logger HOBO H8[®] (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) durante toda a exposição ao calor. Depois de 0 (controle), 2, 4 ou 6 h de exposição, as suspensões foram processadas para remover o óleo a fim de facilitar a avaliação da germinação dos conídios em meio BDAY, de acordo com Oliveira (2009).

O procedimento descrito por Oliveira (2009) consistiu em transferir 1 mL das suspensões para um tubo tipo Falcon de 15 mL, adicionar 100 µL de emulsificante da General Chemicals (PR, Brasil) e 9 mL de uma solução aquosa de Tween 80 a 0,05%. As suspensões foram vigorosamente agitadas em vortex e centrifugadas a 4.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e todo processo repetido mais uma vez. Por fim, o sobrenadante foi descartado e os conídios ressuspensos com a adição de 1 mL de Tween 80 a 0,05%. Em seguida, uma alíquota de 20 µL de cada suspensão e tempo de exposição foi inoculada (sem espalhamento) no centro de placas de Petri (35 × 10 mm) contendo 4 mL de meio BDAY acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, TX, EUA) e cloranfenicol (0,05% p/v). A baixa concentração de benomyl no meio não é prejudicial à germinação inicial dos conídios, mas inibe o crescimento excessivo dos tubos germinativos, permitindo assim monitorar a germinação de conídios mesmo após várias horas de incubação.

As placas foram incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 0, 12, 18, 24, 36 ou 48 h no escuro. Em seguida, uma gota de azul de algodão e uma lamínula foram colocadas no centro de cada placa, e a germinação dos conídios examinada em microscópio de luz com magnitude de 400×. As suspensões controle não foram expostas ao calor, mas foram inoculadas em meio BDAY acrescido de benomyl e cloranfenicol e incubadas a 27 ± 1 °C no escuro pelos mesmos períodos de tempo descritos acima. Um mínimo de 300 conídios por placa foi avaliado, e a percentagem relativa de germinação foi calculada fazendo-se uma relação do percentual de germinação de conídios expostos ao calor ($45 \pm 0,5$ °C) com o percentual de germinação de conídios não expostos (controle), de acordo com a seguinte equação: Germinação Relativa (%) = $(W_t/W_c) \times 100$, onde W_t é o número médio de conídios germinados em cada placa exposta ao calor por um período t de tempo, e W_c é o número médio de conídios germinados nas placas pertencentes ao grupo controle (BRAGA et al., 2001). O experimento inteiro foi repetido três vezes em datas diferentes, com novos conídios para cada ensaio.

5.5 – Efeito do tratamento térmico no percentual de germinação de conídios de *M. anisopliae* in vivo e in vitro

Neste experimento, 2 mL da suspensão conidial aquosa a 1×10^8 conídios mL⁻¹ de *M. anisopliae* IP 119, foi transferida para um tubo de ensaio de vidro com tampa de rosca (16 × 125 mm - Pyrex, Corning) e imediatamente colocado em banho maria a $45 \pm 0,5$ °C por 4 h. A temperatura foi monitorada com um data logger HOBO H8® (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) durante toda a exposição ao calor. Uma suspensão aquosa controle de 2 mL a 1×10^8 conídios mL⁻¹ não foi exposta ao calor.

Catorze fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram separadas em placas de Petri de vidro em dois grupos de sete carrapatos. As fêmeas foram imobilizadas nas placas com auxílio de fita de dupla face adesiva. Os dois grupos foram submetidos a tratamento tópico com 2 µL de suspensão conidial aquosa sob o dorso da fêmea, sendo um grupo controle, com suspensão sem exposição ao calor, e o outro grupo, com suspensão previamente exposta ao calor ($45 \pm 0,5$ °C por 4 h). As placas foram em seguida incubadas em câmara úmida a 27 ± 1 °C e UR $\geq 98\%$. Cada fêmea dentro dos grupos corresponde a um tempo de incubação, que foi: 0, 12, 18, 24, 36, 48 ou 72 h. Após cada um desses períodos, cada carrapato correspondente foi fixado, dissecado (item 5.7) e processado para microscopia de

fluorescência (item 5.8.1), para avaliação da germinação dos conídios e da formação de apressório na cutícula do carrapato.

Em paralelo, para os testes *in vitro*, as mesmas suspensões utilizadas para tratamento dos carrapatos foram diluídas (10^5 conídios mL^{-1}) e uma alíquota de 20 μL foi inoculada (sem espalhamento) em placas de Petri (35×10 mm) contendo 4 ml de meio BDAY acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, TX, EUA) e cloranfenicol (0,05% p/v). Foram utilizadas catorze placas, sendo que sete delas corresponderam a suspensão aquosa sem exposição ao calor (controle) e outras sete, com suspensão exposta previamente a $45 \pm 0,5$ °C. As placas foram incubadas pelos mesmos intervalos de tempo descritos acima, 27 ± 1 °C e UR $\geq 98\%$, por 0, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 h no escuro. Em seguida, uma gota de azul de algodão e uma lamínula foram colocadas no meio de cada placa, e a germinação dos conídios observada em microscópio de luz com magnitude de $400 \times$.

Um mínimo de 300 conídios por placa ou por cutícula foi avaliado para calcular o percentual de germinação, obtido através da divisão do número de conídios germinados pelo total de conídios contados, e esse resultado multiplicado por 100 (ALVES, 1998). O experimento foi repetido quatro vezes em dias diferentes, com novos conídios para cada repetição.

5.6 – Efeito do tratamento térmico de formulações na germinação ou virulência de conídios de *M. anisopliae* sobre *R. sanguineus*

No primeiro experimento, foi avaliado o efeito do tratamento térmico de suspensões aquosas ou oleosas de conídios de *M. anisopliae* IP 119 sobre a germinação na cutícula de *R. sanguineus*. Uma alíquota de 2 mL da suspensão conidial aquosa ou oleosa de *M. anisopliae* IP 119 a 1×10^8 conídios mL^{-1} , foi transferida individualmente para um tubo de ensaio de vidro com tampa de rosca (16×125 mm - Pyrex, Corning) e imediatamente colocado em banho maria a $45 \pm 0,5$ °C por 4 h. A temperatura foi monitorada com um data logger HOBO H8[®] (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) durante toda a exposição. Uma suspensão aquosa ou oleosa controle de 2 mL a 1×10^8 conídios mL^{-1} não foi exposta ao calor.

Doze fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram separadas em placas de Petri de vidro em quatro grupos de três carrapatos. As fêmeas foram imobilizadas nas placas com

auxílio de esparadrapo. Os grupos foram submetidos a tratamento tópico com 2 µL de suspensão conidial a 1×10^8 conídios mL⁻¹ (aproximadamente 2 mil conídios) sob o dorso de cada fêmea. Dois grupos foram tratados com suspensão conidial aquosa, sendo um grupo controle, com suspensão sem exposição ao calor, e outro com suspensão previamente exposta ao calor ($45 \pm 0,5$ °C por 4 h). Os outros dois grupos foram tratados com suspensão conidial oleosa, sendo um grupo controle, com suspensão sem exposição ao calor e outro com suspensão previamente exposta ao calor ($45 \pm 0,5$ °C por 4 h). As placas com as fêmeas tratadas foram, em seguida, incubadas em câmara úmida a 27 ± 1 °C e UR $\geq 98\%$ por 36, 48 ou 72 h. Cada fêmea dentro dos grupos correspondeu a um tempo de incubação.

Após cada período de incubação, cada indivíduo correspondente foi fixado, dissecado (item 5.7) e processado para microscopia eletrônica de varredura (MEV) (item 5.8.2), para avaliação da germinação dos conídios e da formação de apressório na cutícula do carrapato. Para avaliar a germinação dos conídios foram tiradas 15 fotos de cada amostra visualizada no microscópio e posteriormente, a contagem foi feita pelas fotos. Um mínimo de 300 conídios por cutícula foi avaliado para calcular o percentual de germinação e, consecutivamente, a germinação relativa de acordo com Braga et al. (2001). O experimento inteiro foi repetido duas vezes em ocasiões diferentes, usando novos conídios para cada ensaio.

No segundo experimento, foi avaliado o efeito do tratamento térmico sobre conídios de *M. anisopliae* IP 119 suspensos em água ou óleo mineral, na virulência para fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*. Alíquotas de 2 mL das suspensões conidiais, aquosa ou oleosa a 1×10^8 conídios mL⁻¹, foram processadas como no experimento anterior, sendo expostas ou não ao calor ($45 \pm 0,5$ °C por 4 h).

Para minimizar o efeito da diferença de peso entre as fêmeas ingurgitadas, foi utilizado o método de Intervalo de Classe (IC) (SAMPAIO, 2002). Para cálculo do IC as fêmeas foram pesadas individualmente e os valores máximos e mínimos observados foram utilizados como demonstrado na fórmula: IC = Amplitude dos valores obtidos na amostra / Número de Classes utilizadas. A amplitude dos valores obtidos na amostra é a diferença dos valores máximo e mínimo observados dentro dos pesos das fêmeas, e o número de classes é o número de fêmeas utilizadas para cada grupo do bioensaio. As fêmeas ingurgitadas foram separadas segundo o peso em 6 grupos, cada um com 15 fêmeas. Cada fêmea foi novamente pesada e imobilizada no fundo de placas de Petri com auxílio de esparadrapo.

Os grupos foram divididos em: 1) Controles, em que as fêmeas foram tratadas individualmente com 2 µL de água contendo Tween 80 a 0.01% ou puro óleo mineral (sem

adição de conídios); 2) Fêmeas tratadas individualmente com 2 μL da suspensão aquosa ou oleosa a 10^8 conídios mL^{-1} , sem exposição ao calor; 3) Fêmeas tratadas com 2 μL da suspensão aquosa ou oleosa a 10^8 conídios mL^{-1} , previamente exposta ao calor ($45 \pm 0,5$ °C por 4 h). As placas com os carrapatos tratados foram em seguida incubadas em câmara úmida a 27 ± 1 °C e UR $\geq 98\%$ (Figura 2).

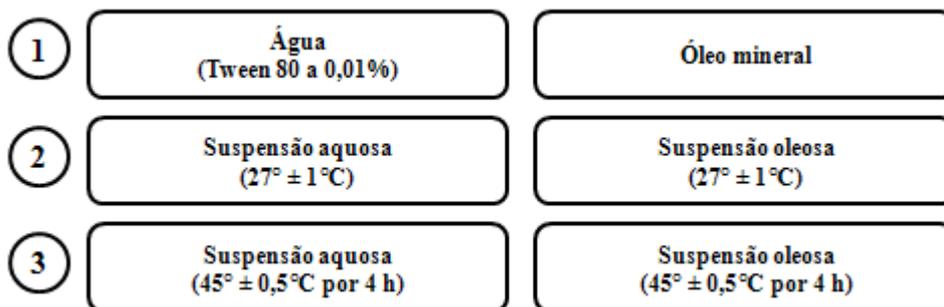


Figura 2. Representação dos grupos do bioensaio.

A postura de ovos de cada fêmea foi coletada e pesada diariamente, sendo transferida para o seu respectivo tubo de ensaio (16×125 mm) vedado com algodão hidrófilo. Os tubos foram mantidos em câmara úmida a 27 ± 1 °C e UR $> 98\%$ para posterior avaliação da eclosão das larvas. Com o início da eclosão, os tubos foram avaliados diariamente através de uma avaliação subjetiva da quantidade de larvas eclodidas em relação à massa total de ovos, com o auxílio de um estereomicroscópio. O percentual de eclosão recebeu valores com intervalo de 5%, entre 0% e 100% (FERNANDES et al., 2006). Ao término da postura, as quenóginas foram pesadas e colocadas em placas de Petri de acordo com o tipo de tratamento que receberam. As placas foram mantidas em câmara úmida à 27 ± 1 °C para avaliação do crescimento do fungo sobre a cutícula.

Os seguintes parâmetros biológicos foram investigados: peso inicial da fêmea ingurgitada; peso da postura total; período de postura (compreendido entre a postura do primeiro e a do último ovo); peso da quenógina (determinado três dias após o término da postura) e percentual de eclosão larval. A partir desses dados, foi calculado o índice de produção de ovos (IPO) e o índice nutricional (IN), conforme metodologia de Bennett (1974), pelas seguintes equações: $\text{IPO} = \text{peso da massa de ovos (g)} / \text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)} \times 100$; e $\text{IN} = \text{peso da massa de ovos (g)} / \text{peso da teleógina (g)} - \text{peso da quenógina (g)} \times 100$. Em complemento, foi calculado a reprodução estimada (RE) e o percentual de controle, conforme metodologia descrita por Drummond et al. (1971), usando as seguintes equações: $\text{RE} = \text{peso}$

da massa de ovos (g) / peso da teleógina (g) × % eclosão larvas × 20.400; Percentual de controle = RE média do grupo controle – RE média do grupo tratado / RE média do grupo controle × 100. No entanto, a constante da RE foi alterada (20.000 para 20.400), pois esse valor se refere a *R. sanguineus* (FUJISAKI et al., 1976). Duas repetições foram realizadas em dias diferentes, com novos conídios para cada repetição.

Para ambos experimentos descritos acima, uma alíquota de 20 µL da suspensão conidial aquosa usada para tratamento das fêmeas ingurgitadas, nas duas repetições, foi diluída para 10⁵ conídios mL⁻¹ e inoculada (sem espalhamento) individualmente em placas de Petri (35 × 10 mm) contendo 4 mL de meio BDAY acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, TX, EUA) e cloranfenicol (0,05% p/v), para avaliação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* IP 119. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h a 27 ± 1 °C e UR ≥ 80%. Em seguida, uma gota de azul de algodão e uma lamínula foram colocados no meio da placa, e a germinação dos conídios observada em microscópio de luz com magnitude de 400 ×. Um mínimo de 300 conídios foi avaliado para calcular o percentual de germinação, segundo Alves, 1998.

5.7 – Fixação e dissecação de carrapatos

Após os tratamentos, referentes as avaliações descritas nos itens 5.5 e 5.6, os carrapatos foram fixados e dissecados para os procedimentos de avaliação da germinação na cutícula.

5.7.1 – Fixação

Com auxílio de uma agulha de insulina, aproximadamente 50 µL de fixador foi injetado no interior de cada fêmea. O fixador foi composto por 2% glutaraldeído (v/v), 2% paraformaldeído (v/v), 3% de sacarose (p/v) em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2. Em seguida, cada fêmea foi colocada em um tubo tipo Falcon (15 mL) contendo 2 mL do fixador (Figura 3). As amostras foram então mantidas por 10 dias em refrigerador (4°C).

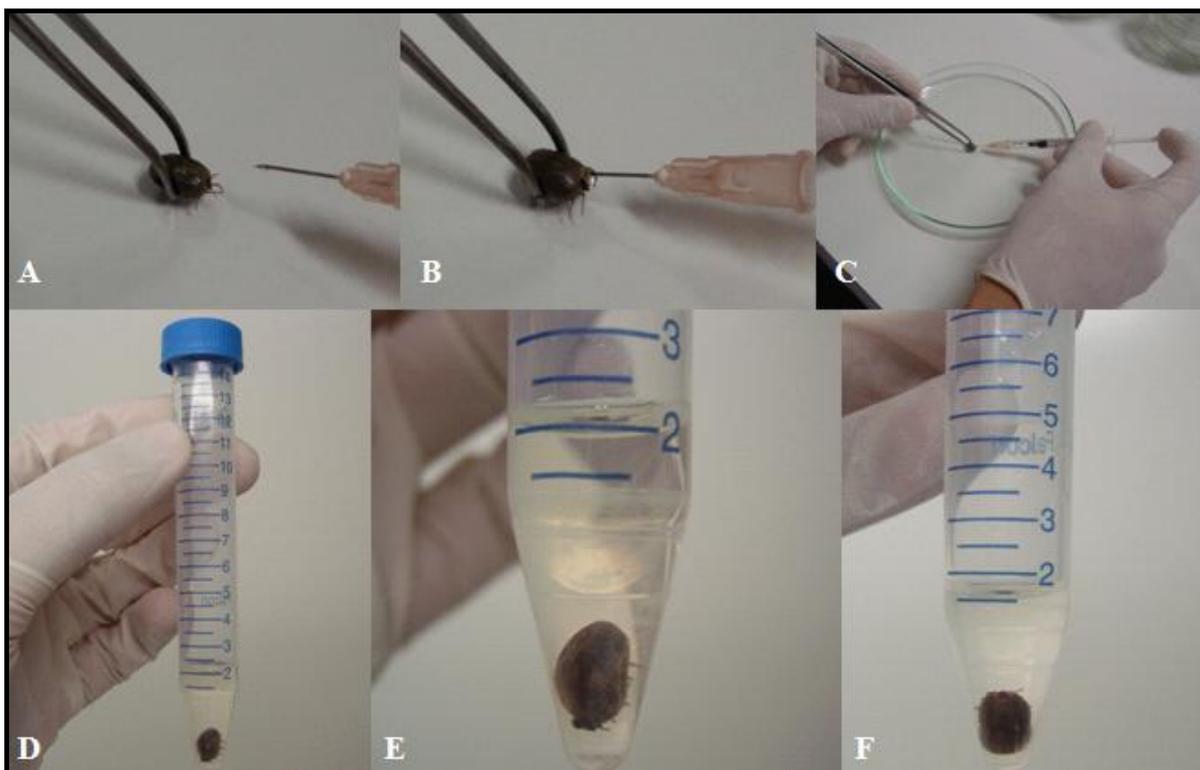


Figura 3. Etapas do procedimento de fixação das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. A - C representam a injeção de fixador no interior da fêmea ingurgitada. D - F, tubos contendo fêmea ingurgitada imersa em fixador para posterior armazenamento em refrigerador (4 °C).

5.7.2 – Dissecação

Após o tempo de fixação, as amostras foram dissecadas, retirando-se um fragmento da cutícula dorsal das fêmeas, com auxílio de alfinete entomológico, pinças e lâmina de bisturi (Tam. 24) (Figura 4). Após o procedimento, as amostras foram lavadas três vezes (15 minutos cada) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2).

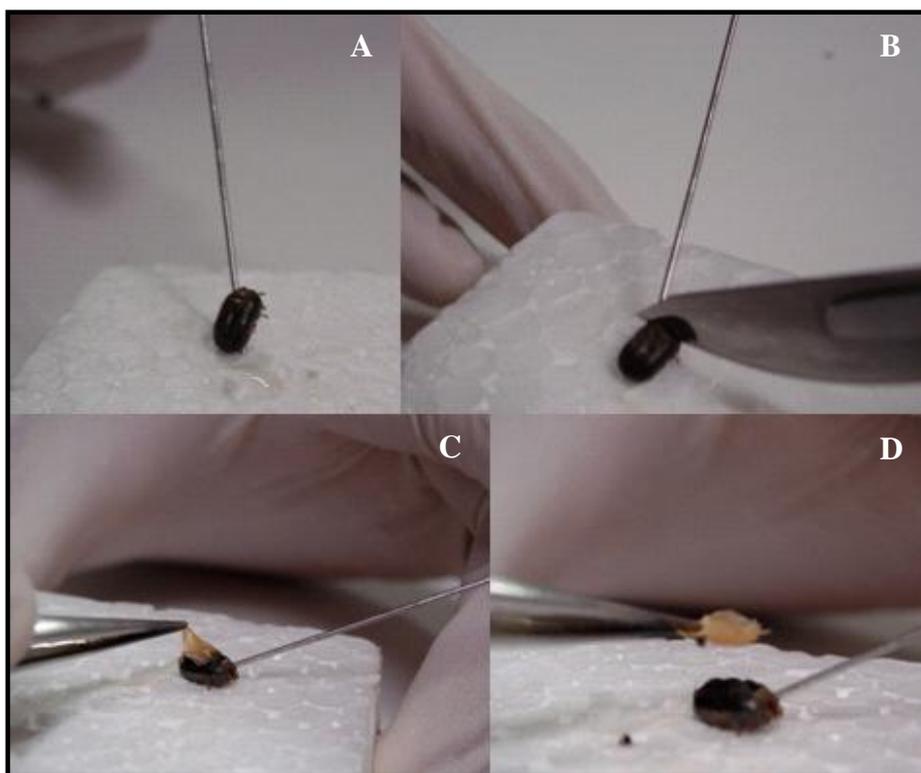


Figura 4. A – D representam as etapas do procedimento de dissecação das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*.

5.8 – Microscopia

5.8.1 - Microscopia de Fluorescência

Os carrapatos submetidos ao teste avaliando o efeito do tratamento térmico no percentual de germinação de conídios de *M. anisopliae in vivo* e *in vitro* (item 5.5) foram processados como no item 5.7. Após as lavagens em tampão, as cutículas foram colocadas em poços de uma placa de cultivo celular contendo 1,5 mL do corante fluorescente Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, SP, Brasil) a 2% (v/v) (Figura 5). As amostras foram mantidas “overnight” no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, as cutículas foram montadas em lâminas de microscopia, cobertas com lamínula, analisadas e fotomicrografadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i) no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão, localizado na cidade de Santo Antônio de Goiás.

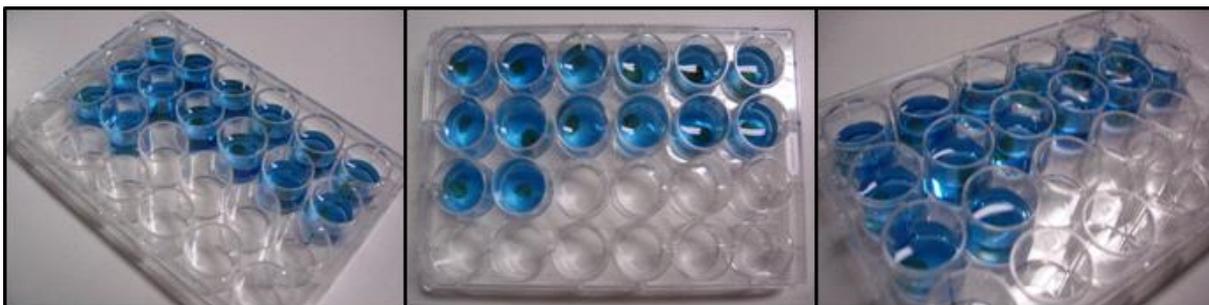


Figura 5. Cutículas de *Rhipicephalus sanguineus* imersas em 1,5 mL de Calcofluor White M2R a 2% (v/v).

5.8.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os carrapatos submetidos ao teste avaliando o efeito do tratamento térmico de suspensões aquosas ou oleosas de conídios de *M. anisopliae* IP 119 sobre a germinação na cutícula de *R. sanguineus* (item 5.6) foram processados como no item 5.7. Após as lavagens em tampão, as cutículas foram desidratadas em uma série gradual de soluções de etanol (30, 50, 70, 80, 90 e 100%), permanecendo por 15 minutos em cada solução e passando duas vezes no etanol 100%. Posteriormente, para secagem, as amostras foram colocadas separadamente em tubos de Eppendorf, contendo aproximadamente 500 μ L de Hexametildisilazano (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), sendo mantidas imersas por 6 minutos. Em seguida, o líquido foi retirado e os tubos mantidos abertos para evaporação do reagente. Com a secagem, as amostras foram submetidas a metalização, sendo montadas em um stub e revestidas com carbono em um sputter-aplicator (Denton Vacuum, Desk V). Ao final, as cutículas das fêmeas foram analisadas e eletromicrografadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 6610 em uma voltagem de aceleração de 20 kV no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás.

5.9 – Análises estatísticas

Os dados paramétricos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls (SNK). Foram feitas as seguintes comparações: 1) Germinação relativa dos conídios suspensos em água ou óleo e expostos ao calor por 2, 4 ou 6 h (item 5.4); 2) Germinação dos conídios na cutícula de *R. sanguineus* e no meio BDAY, suspensos em água e expostos ou não ao calor por 4 h (item 5.5); 3) Germinação dos conídios na cutícula de *R. sanguineus* suspensos em água ou óleo mineral e expostos ou não ao calor

por 4 h (item 5.6); 4) Peso inicial das fêmeas ingurgitadas e período de postura (item 5.6). Dados não paramétricos (índice de produção de ovos, índice nutricional e percentual de eclosão, item 5.6) foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK). Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

6 – RESULTADOS

6.1 – Termotolerância de conídios *in vitro*

O isolado de *M. anisopliae* (IP 119) se mostrou bastante tolerante ao calor quando suspenso em óleo mineral, em todos os tempos de exposição. Ao contrário, o calor de 45 °C foi suficiente para promover um considerável atraso e redução na germinação dos conídios suspensos em água. Em todos os tempos de exposição ao calor, 2, 4 ou 6 h, houve diferença significativa na germinação relativa (GR) média entre as duas suspensões em todos os tempos de incubação. Na exposição por 2 h a 45 °C, a GR média dos conídios suspensos em óleo foi de 66% nas primeiras 12 h de incubação, enquanto nos conídios suspensos em água a GR média foi de 7,5% ($F_{1,4} = 19,75$; $P = 0,0113$) (Figura 6 a).

Na exposição por 4h a 45 °C, a GR média dos conídios suspensos em óleo foi de 64,4% nas primeiras 12 h, enquanto os conídios suspensos em água ainda não haviam germinado, neste mesmo período de incubação ($F_{1,4} = 1263,03$; $P < 0,001$). Com 24 h de incubação, os conídios suspensos em água começaram a germinar, apresentando uma GR média de 2,2%, enquanto os conídios suspensos em óleo já estavam quase todos germinados, apresentando uma GR média de 93,9% ($F_{1,4} = 108,01$; $P = 0,0005$) (Figura 6 b).

Assim como na exposição por 4 h ao calor, na exposição por 6 h os conídios suspensos em água só começaram a germinar após 24 h de incubação, apresentando uma GR média de 2%, enquanto os conídios suspensos em óleo apresentavam uma GR média de 83%, neste mesmo tempo de incubação ($F_{1,4} = 26,98$; $P = 0,0065$) (Figura 6 c).

O outro isolado avaliado, *M. robertsii* ARSEF 2575, se mostrou bastante tolerante ao calor quando suspenso em óleo mineral ou em água, em todos os tempos de exposição. Apesar dos conídios terem germinado aparentemente mais rápido quando suspensos em óleo, não houve diferença significativa na germinação relativa média entre as duas suspensões em todos os tempos de incubação e de exposição ao calor ($P > 0,05$) (Figura 7).

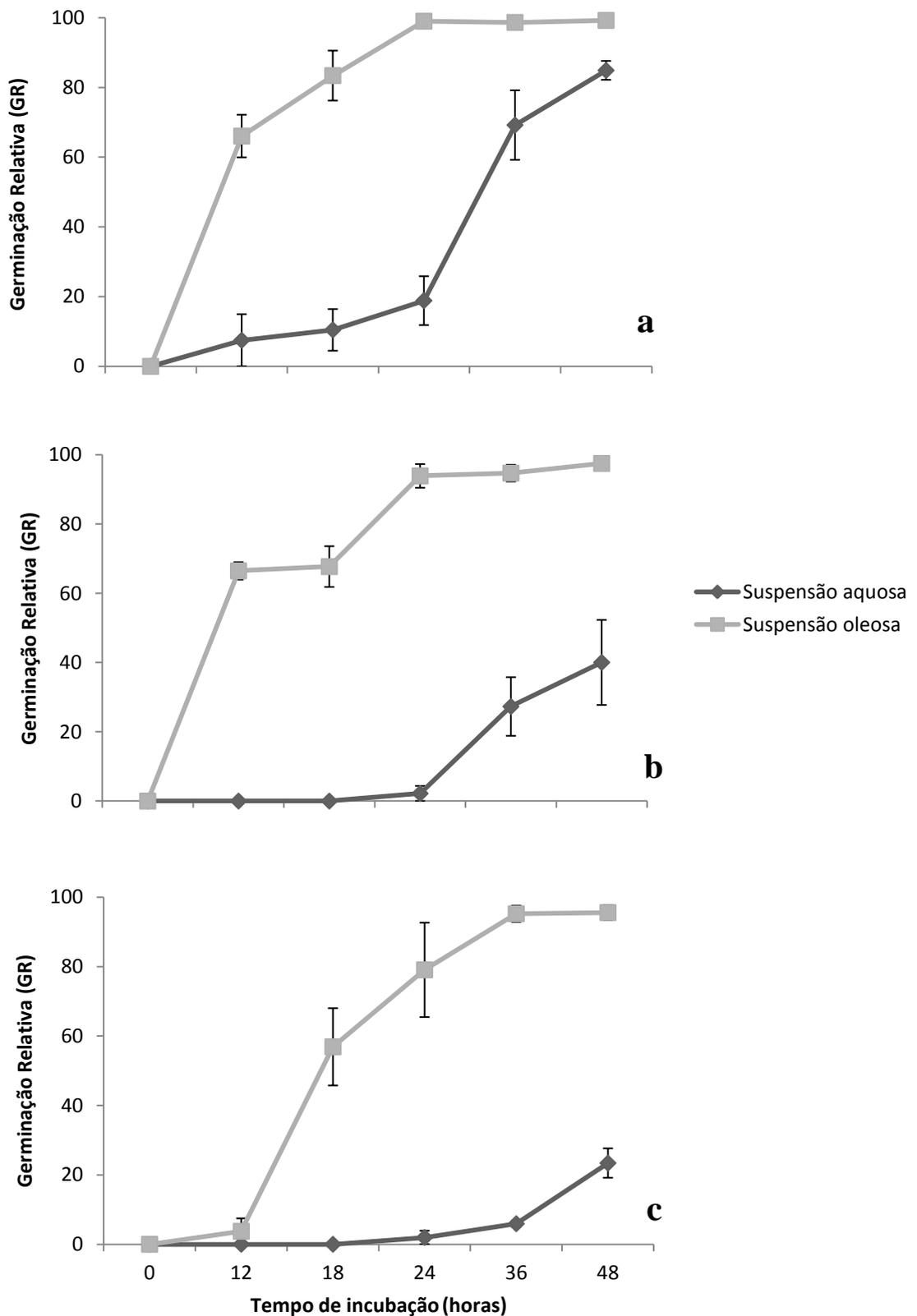


Figura 6. Perfil da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* (IP119), expostos previamente por 2 (a), 4 (b) ou 6 (c) horas a $45 \pm 0,5$ °C e incubados em BDAY a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 0, 12, 18, 24, 36 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem exposição ao calor). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições.

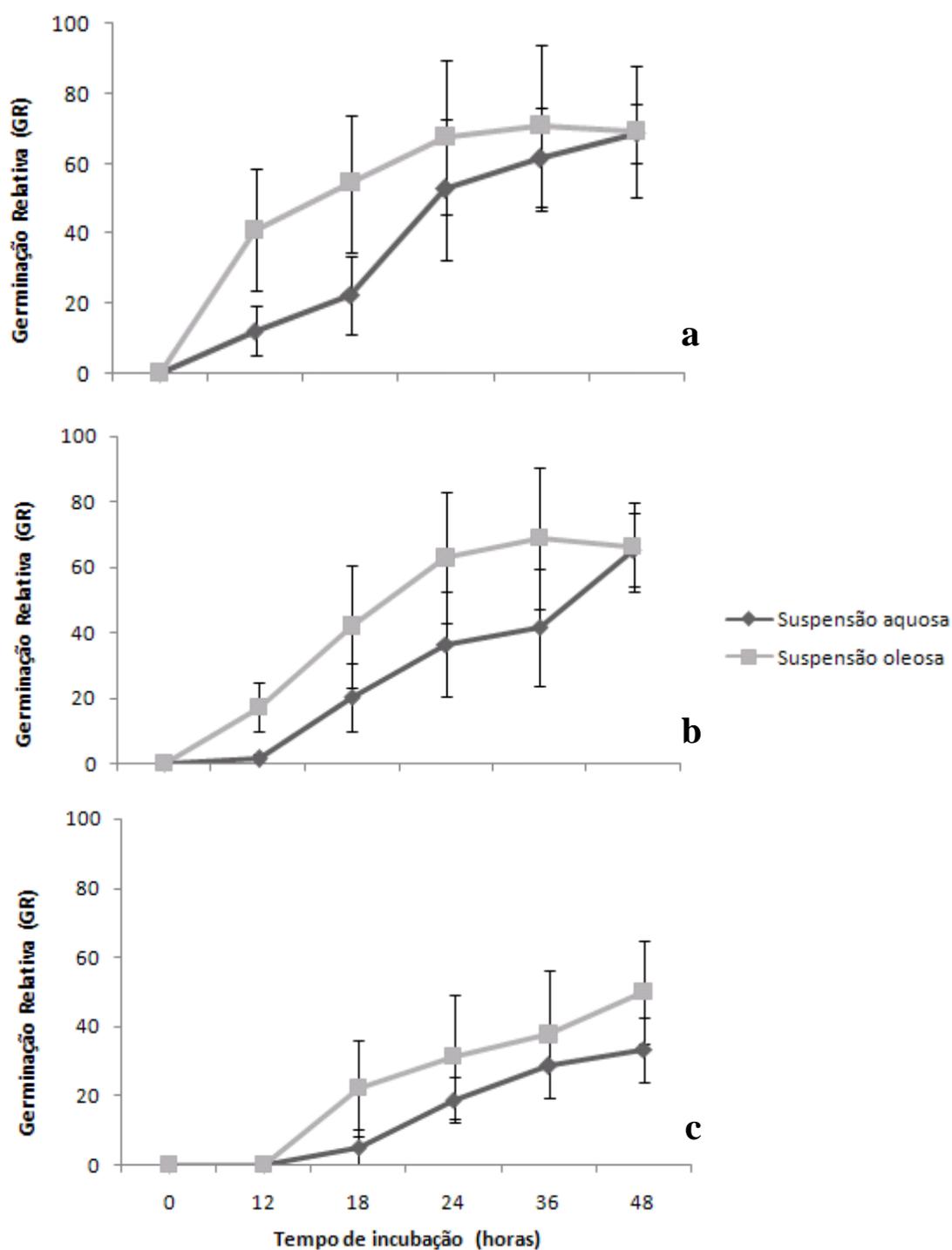


Figura 7. Perfil da germinação relativa de conídios de *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575), expostos previamente por 2 (a), 4 (b) ou 6 (c) horas a $45 \pm 0,5$ °C e incubados em BDAY a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ por 0, 12, 18, 24, 36 ou 48 h. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem exposição ao calor). O erro padrão foi calculado considerando-se as três repetições.

6.2 – Efeito do tratamento térmico no percentual de germinação de conídios de *M. anisopliae* *in vivo* e *in vitro*

O percentual de germinação de *M. anisopliae* IP119 diferiu conforme o substrato, cutícula ou meio de cultivo (Figura 8). A percentagem de germinação de conídios não expostos a temperatura (controles) diferiram em todos os tempos de incubação, sendo que os maiores percentuais foram observados em meio de cultivo, exceto no tempo de 72 h, em que o percentual foi igual estatisticamente entre os substratos. No entanto, quando conídios foram expostos a temperatura de estresse ($45 \pm 0,5$ °C), não houve diferença significativa no percentual de germinação entre os substratos, em todos os tempos de incubação exceto 72 h, em que o percentual médio de germinação foi maior quando os conídios estavam em meio de cultivo artificial (Figura 8) ($F_{3,12} = 9,39$; $P = 0,003$).

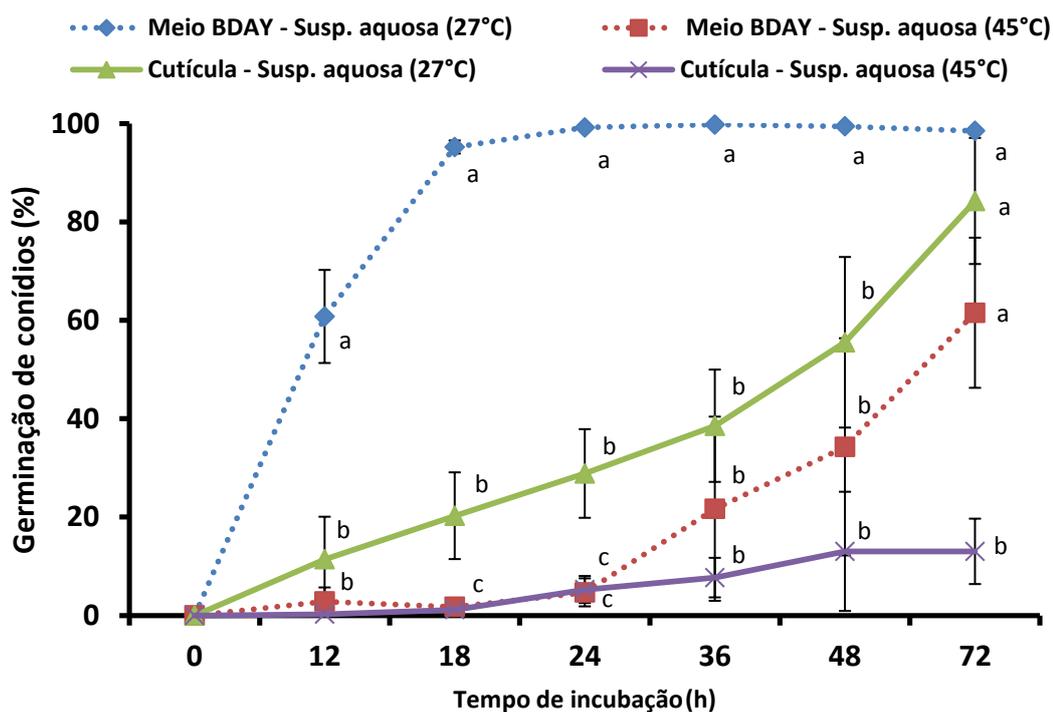


Figura 8. Percentual de germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (IP 119), expostos ou não ao estresse térmico ($45 \pm 0,5$ °C), nos substratos avaliados: cutícula de *R. sanguineus* e meio de cultivo artificial (BDAY). Médias na mesma coluna seguidas de diferentes letras (a – c) são significativamente diferentes entre si, pelo teste Student-Newman-Keuls à 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Na cutícula de *R. sanguineus*, variações no tamanho do tubo germinativo nos tempos de incubação foram evidentes (Figura 9). No controle, indivíduos tratados com conídios sem exposição ao calor, em meio a extensos tubos, conídios começavam a germinar, ou apresentavam tubo germinativo um pouco maior ou igual ao seu tamanho. A partir do tempo de 36 h de incubação, sobre a cutícula do carrapato foram visualizados apressórios quando conídios foram suspensos em água e não foram expostos previamente ao calor (Figuras 9 e 10). No entanto, nas cutículas tratadas com conídios expostos ao estresse térmico (45 °C por 4 h), não foram visualizados apressórios dentro dos tempos de incubação investigados.

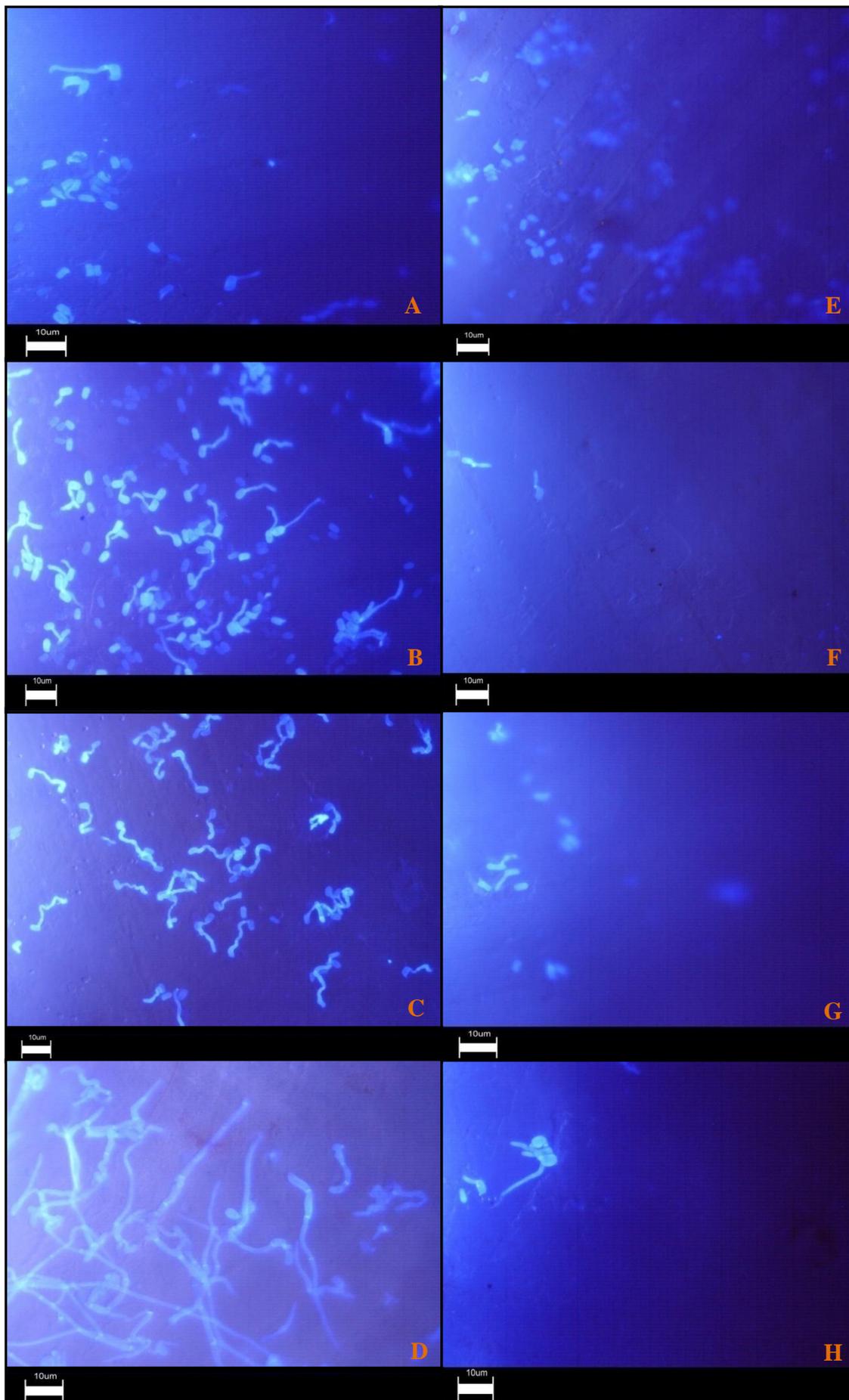


Figura 9. Microfotografias de conídios de *Metarhizium anisopliae* (IP 119) sobre cutículas de *Rhipicephalus sanguineus*. Em A - D estão representados alguns grupos tratados com conídios sem exposição ao calor, sendo 24, 36, 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Em E - H estão representados os grupos tratados com conídios expostos ao calor, nos mesmos 35 tempos de incubação, respectivamente.

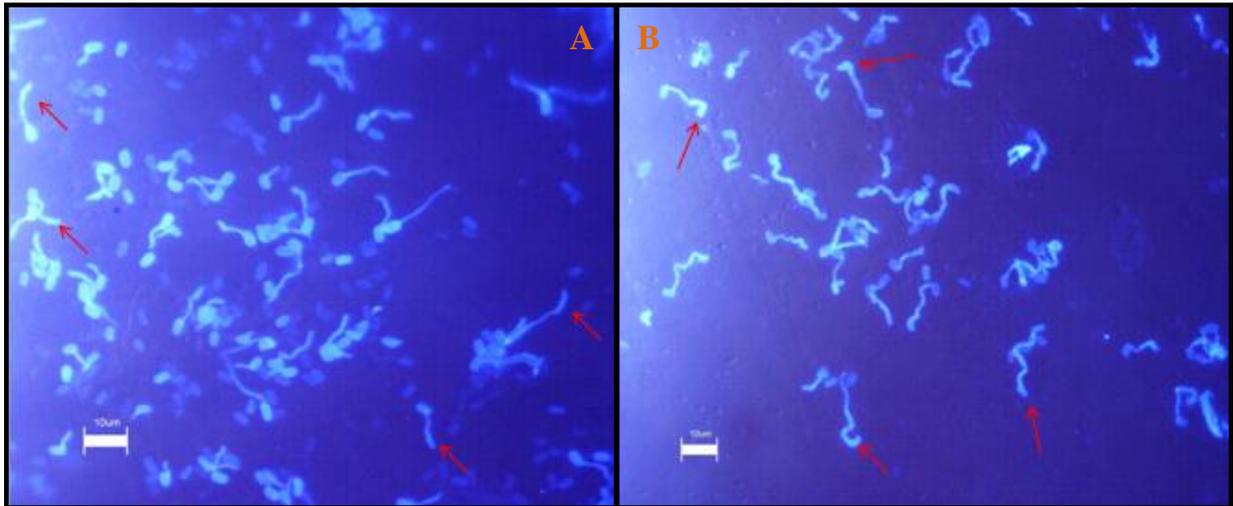


Figura 10. Conídios de *Metarhizium anisopliae* (IP 119) sobre cutículas de *Rhipicephalus sanguineus*. Em A e B, estão representadas as cutículas que receberam conídios que não foram expostos a temperatura de 45 °C, referentes aos tempos de incubação 36 e 48 horas, respectivamente. As setas vermelhas apontam para apressórios que se tornaram visíveis a partir de 36 horas de incubação em temperatura ótima (27 °C).

6.3 – Viabilidade de conídios

Os conídios das suspensões de *M. anisopliae* IP 119 utilizados nos testes de virulência ou de germinação na cutícula do carrapato (item 5.6), ambos apresentaram em média 99% de germinação, sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$, após o período de 24 h, demonstrando que as suspensões fúngicas estavam aptas a serem utilizadas.

6.4 – Efeito do tratamento térmico de formulações na virulência ou germinação de conídios de *M. anisopliae* sobre *R. sanguineus*

O experimento que avaliou o efeito do tratamento térmico de suspensões aquosas ou oleosas de conídios de *M. anisopliae* IP 119 sobre a virulência a *R. sanguineus*, demonstrou que as fêmeas ingurgitadas utilizadas nessas avaliações, não apresentaram diferença no peso inicial ($F_{5,6} = 0,04$; $P = 0,998$). No que se refere ao período de postura das fêmeas, houve diferença entre os grupos avaliados ($F_{4,5} = 16,37$; $P = 0,0045$). Os grupos que receberam tratamento com suspensão conidial aquosa ou oleosa exposta ou não ao calor, apresentaram menor período de postura em comparação aos controles (indivíduos que não receberam tratamento fúngico) (Tabela 2).

O parâmetro percentual de eclosão de larvas diferiu entre os tratamentos ($H = 27,61$; $P < 0,0001$), sendo que os maiores percentuais foram observados nos controles (indivíduos que

não receberam tratamento fúngico) e os menores nos grupos tratados com as suspensões fúngicas. O Índice de Produção de Ovos (IPO) das fêmeas tratadas com o fungo (suspensões aquosas ou oleosas) foi menor, quando comparado aos controles sem esse tratamento ($H = 74,08$; $P < 0,0001$) (Tabela 2).

O índice nutricional (IN) de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* também diferiu entre os tratamentos ($H = 57,90$; $P < 0,0001$). Os grupos tratados com suspensão conidial oleosa ou aquosa exposta ou não ao calor o IN foi significativamente menor em comparação aos grupos de fêmeas tratados com água ou óleo apenas (Tabela 2).

Com relação ao percentual de controle, os grupos de fêmeas tratados com suspensão oleosa de conídios exposta ou não ao calor, apresentaram os maiores percentuais (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* submetidas a tratamento tópico com *Metarhizium anisopliae* s.s. (IP 119) suspenso em água (Tween 80, 0.01%) ou óleo mineral puro (Impex®), na concentração de 1×10^8 conídios mL⁻¹. Antes do tratamento das fêmeas, as suspensões foram mantidas em constante temperatura de 27 ± 1 °C ou submetidas a temperatura de $45 \pm 0,5$ °C por 4 horas. Depois do tratamento, as fêmeas foram incubadas em temperatura constante de 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$. Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$). Quando $n < 30$ significa que as fêmeas morreram antes de realizar postura.

Tratamento ¹	Peso inicial das fêmeas ingurgitadas (g)	Período de postura (dias)	IPO ²	IN ³	Percentual de eclosão (%)	Percentual de controle (%)
Controle (água)	0.1217 \pm 0.004 a (n= 30)	12,4 \pm 0.43 a (n= 26)	35.84 \pm 3,71 a (n= 30)	60.14 \pm 6,55 a (n= 30)	77,3 \pm 3,95 a (n= 26)	-
Susp. Aquosa - 27°C	0.1233 \pm 0.004 a (n= 30)	4,0 \pm 0.39 b (n= 11)	7.23 \pm 2,36 bc (n= 30)	20.85 \pm 5,77 bc (n= 30)	59.09 \pm 6,13 ab (n= 11)	81,8
Susp. Aquosa - 45°C	0.1271 \pm 0.004 a (n= 30)	5,5 \pm 0.55 b (n= 14)	12.96 \pm 3,30 b (n= 30)	31.49 \pm 7,11 b (n= 30)	34.28 \pm 5,04 bc (n= 14)	84,2
Controle (óleo)	0.1237 \pm 0.004 a (n= 30)	10,7 \pm 0,58 a (n= 27)	38.22 \pm 3,41 a (n= 30)	62.69 \pm 4,64 a (n= 30)	68,07 \pm 5,56 a (n= 27)	-
Susp. Oleosa - 27°C	0.1240 \pm 0.005 a (n= 30)	4.0 \pm 0.31* (n= 03)	2.15 \pm 1,22 c (n= 30)	7,69 \pm 4,39 c (n= 30)	10.0* (n= 03)	98,9
Susp. Oleosa - 45°C	0.1285 \pm 0.004 a (n= 30)	4.0 \pm 0.50 b (n= 06)	3.85 \pm 1,99 bc (n= 30)	14.29 \pm 6,38 bc (n= 30)	13.33 \pm 3,59 c (n= 06)	94,9

(1) 27 °C: Refere-se aos grupos de fêmeas ingurgitadas tratadas com conídios sem exposição ao calor; 45 °C: refere-se aos grupos de fêmeas tratadas com conídios expostos por 4 h ao calor ($45 \pm 0,5$ °C). (2) IPO = Índice de Produção de Ovos; (3) IN = Índice Nutricional (Bennet, 1974). (*) refere-se aos parâmetros que não participaram das análises estatísticas, devido à ausência de variância, pois em uma das duas repetições as fêmeas deste grupo não iniciaram a postura. Percentual de controle foi calculado conforme metodologia descrita por Drummond et al. (1971), com modificações.

O experimento que avaliou o efeito do tratamento térmico de suspensões aquosas ou oleosas de conídios de *M. anisopliae* IP 119 sobre a germinação na cutícula de *R. sanguineus*, demonstrou diferença no percentual de germinação de conídios suspensos em água ou óleo e expostos ao calor. Quando os conídios foram suspensos em óleo mineral e expostos a 45 °C por 4 h, a percentagem de germinação foi maior quando comparado com conídios suspensos em água em todos os tempos de incubação investigados. Com 36 horas de incubação, a germinação de conídios suspensos em óleo chegava a 16,3%, enquanto conídios suspensos em água apresentavam 2,2% de germinação ($F_{3,4} = 54,78$; $P = 0,0011$). Cabe ressaltar que no tempo de 48 horas de incubação, não houve diferença significativa entre o percentual de germinação de conídios suspensos em óleo e expostos ao calor com conídios não expostos (controle) suspensos em água. Nos controles (indivíduos tratados com conídios sem exposição ao calor), o percentual de germinação em ambas suspensões diferiu nos tempos de 48 e 72 horas de incubação, em que a germinação foi maior em conídios suspensos em óleo (61,7 e 71,1%, respectivamente) do que conídios suspensos em água (32,7 e 32,6%, respectivamente) (Figura 11 a).

Em complemento, a GR média também demonstrou que conídios suspensos em óleo mineral germinaram mais rapidamente, quando comparados com conídios suspensos em água, em todos os tempos de incubação investigados. No tempo de 36 h de incubação, após a exposição a 45 °C por 4 h, a GR média dos conídios suspensos em óleo foi de 65,3%, enquanto os conídios suspensos em água a GR média foi de 8,7%, neste mesmo período de incubação (Figura 11 b).

Assim como nos resultados descritos no item anterior (6.2), na cutícula de *R. sanguineus*, variações no tamanho do tubo germinativo dos conídios foram evidentes e pouco características (Figuras 12 e 13). Nos controles, indivíduos tratados com as suspensões não expostas ao calor, em meio a extensos tubos, conídios começavam a germinar, ou apresentavam tubo germinativo um pouco maior ou igual ao seu tamanho. A maior quantidade de conídios germinados e com o tubo germinativo bastante desenvolvido, foi evidente quando conídios foram suspensos em óleo mineral (Figura 13). A partir do tempo de 36 h de incubação, foram visualizados apressórios, quando conídios foram suspensos em água ou óleo e não foram expostos previamente ao calor. No entanto, nas cutículas que foram tratadas com conídios expostos ao estresse térmico (45 °C por 4h), foram visualizados apressórios apenas em conídios suspensos em óleo mineral, dentro dos tempos de incubação investigados.

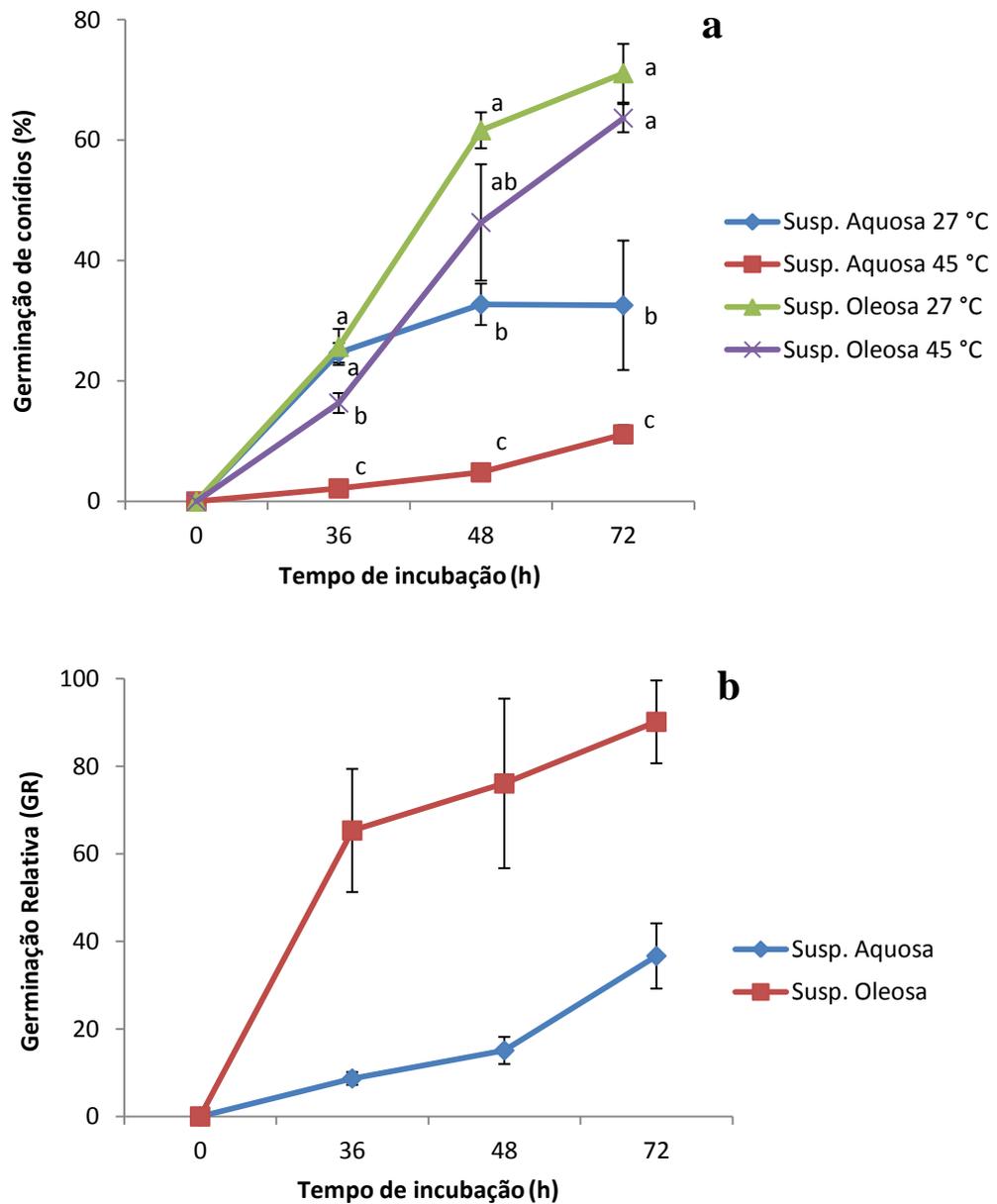


Figura 11. Germinação de conídios de *M. anisopliae* (IP 119) suspensos em água ou óleo, expostos ou não ao calor ($45 \pm 0,5$ °C) por 4 horas e incubados a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, sobre a cutícula de *R. sanguineus*. Em a, percentual de germinação em todos os grupos avaliados. Em b, percentual de germinação relativa dos conídios suspensos em água ou óleo. Germinação relativa é calculada em relação ao percentual de germinação do grupo controle (conídios sem exposição ao calor). O erro padrão foi calculado considerando-se as duas repetições.

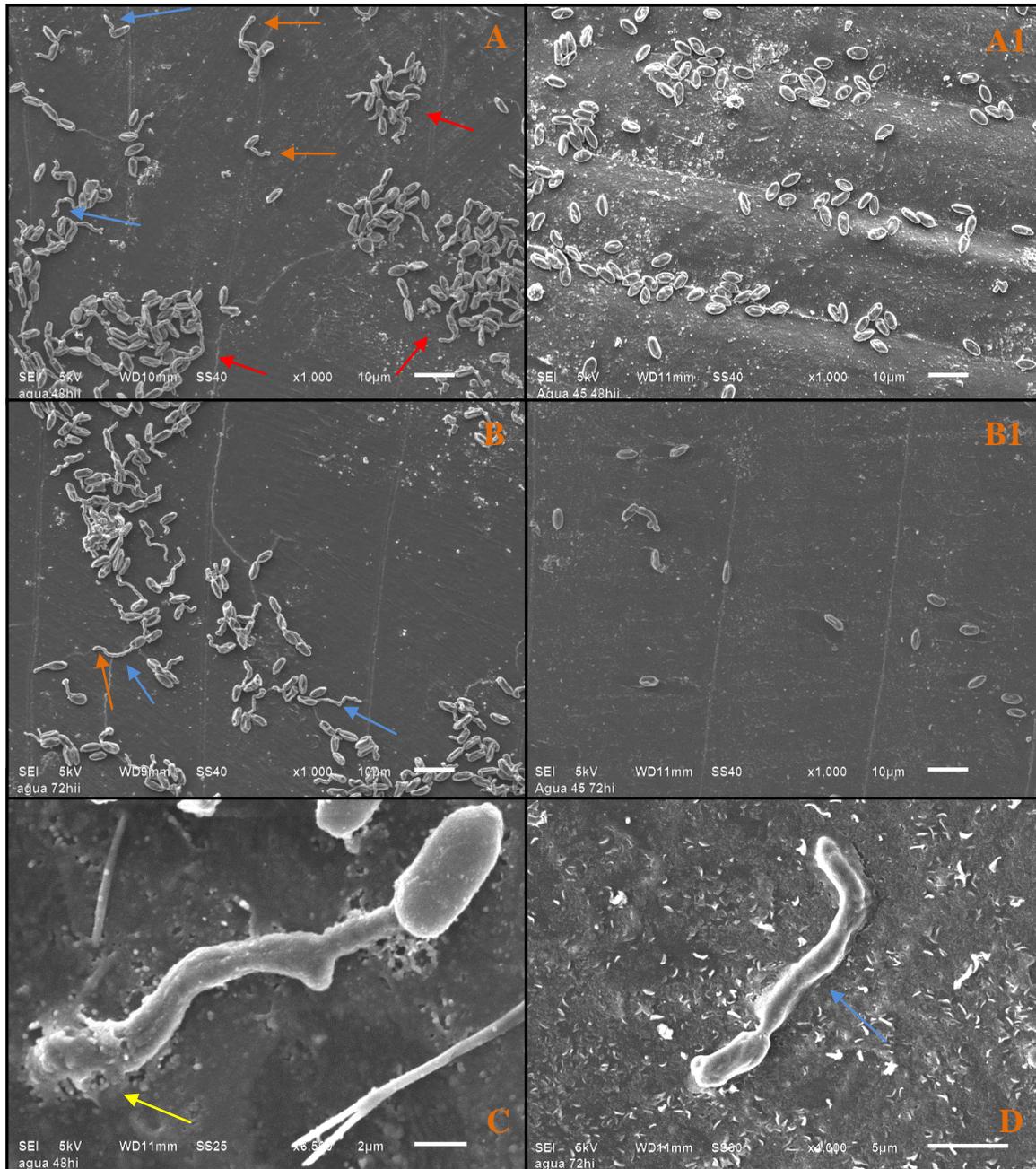


Figura 12. Eletromicrografias de conídios de *M. anisopliae* (IP 119) sobre a cutícula de *R. sanguineus*. A e B representam as cutículas tratadas com conídios suspensos em água e não expostos ao calor (controles), referentes aos tempos de incubação 48 e 72 h, respectivamente. Em A1 e B1, cutículas tratadas com conídios suspensos em água e expostos ao calor (45 °C por 4h), nos tempos de 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Em C e D, conídios germinados provenientes de suspensão aquosa sem exposição ao calor, com 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Setas vermelhas apontam para emaranhados de conídios, as setas azuis para tubos germinativos e setas laranja para apressórios. A Seta amarela indica uma possível penetração do tubo na cutícula do carrapato.

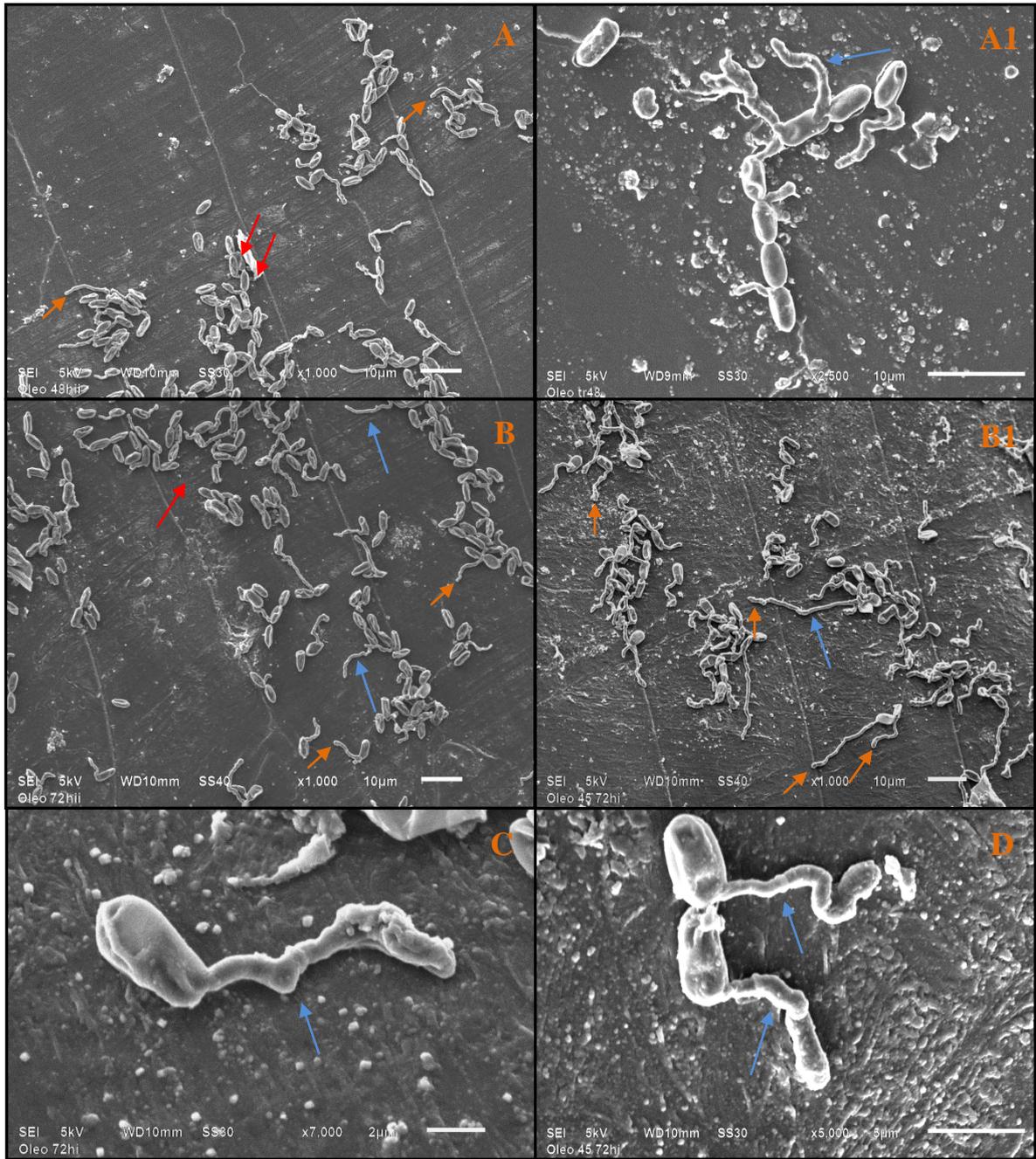


Figura 13. Eletromicrografias de conídios de *M. anisopliae* (IP 119) sobre a cutícula de *R. sanguineus*. A e B representam as cutículas tratadas com conídios suspensos em óleo e não expostos ao calor (controles), referentes aos tempos de incubação 48 e 72 h, respectivamente. Em A1 e B1, cutículas tratadas com conídios suspensos em óleo e expostos ao calor (45 °C por 4h), nos tempos de 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Em C e D, conídios germinados provenientes de suspensão oleosa exposta ou não ao calor, respectivamente, no tempo de 72 h de incubação. Setas vermelhas apontam para emaranhados de conídios, as setas azuis para tubos germinativos e setas laranja para apressórios.

7 – DISCUSSÃO

M. anisopliae IP 119 foi mais termotolerante quando formulado em óleo mineral. Com essa combinação específica, óleo e conídios, a germinação do fungo pós estresse térmico atingiu elevados percentuais em pouco tempo de incubação, quando comparado com a formulação aquosa. As vantagens da associação de conídios de fungos entomopatogênicos e óleos têm sido amplamente discutidas e mostradas na literatura, porém o quanto e como o óleo protege os conídios de fatores abióticos são desconhecidos. Acredita-se que o óleo crie um microclima ao redor do conídio que o protege de altas temperaturas, baixa umidade e radiação ultravioleta, permitindo assim, uma melhor germinação dos conídios (BROOKS et al., 2004; LUZ; BATAGIN, 2005; OLIVEIRA, 2009).

A maioria dos estudos que avaliaram termotolerância de isolados de *Metarhizium* spp. foi conduzido com conídios suspensos em água, e de modo geral, demonstraram grande variabilidade na termotolerância (ZIMMERMANN, 1982; RANGEL et al., 2005; FERNANDES et al., 2010; RANGEL et al., 2010). No presente estudo, conídios de *M. anisopliae* IP 119 quando suspensos em água e expostos previamente por 4 ou 6 horas a 45 °C, começaram a germinar com aproximadamente 24 h de incubação, enquanto os conídios suspensos em óleo apresentavam quase 100% de germinação neste mesmo tempo de incubação. Esses dados demonstram que conídios formulados em óleo mineral apresentam germinação mais rápida do que a dos conídios formulados em água, quando ambos são expostos ao calor. Sendo assim, esses resultados evidenciaram a proteção conferida pelo óleo mineral a conídios de *M. anisopliae*, e esses dados são compatíveis com os obtidos por Oliveira (2009). Por outro lado, o atraso observado na germinação de conídios suspensos em água, pode estar relacionado com a necessidade do fungo em se recuperar dos danos provocados pelo calor antes de iniciar o processo de germinação (NICHOLSON et al., 2000), e o tempo dessa recuperação, vale ressaltar, pode variar entre isolados (RANGEL et al., 2005; RANGEL et al., 2010; FERNANDES et al., 2010; KEYSER et al., 2014).

O outro isolado avaliado, *M. robertsii* ARSEF 2575, não mostrou tamanha influência da formulação sobre a germinação como foi observado para *M. anisopliae* IP 119. Apesar da germinação relativa média aparentemente ter sido maior em conídios formulados em óleo, não diferiu da germinação de conídios formulados em água, o que pode estar ligado à própria termotolerância deste isolado, que inclusive, já foi mostrada por outros autores (RANGEL et al., 2005; FERNANDES et al., 2010; RANGEL et al., 2010). ARSEF 2575 tem sido utilizado

como isolado padrão em testes de termotolerância juntamente com o isolado ARSEF 324 de *M. acridum*, pois apresentam relevante termotolerância (RANGEL et al., 2005; RANGEL et al., 2010). Neste estudo, *M. robertsii* ARSEF 2575 exposto previamente por 4 horas a 45 °C, a germinação relativa foi acima de 60% quando os conídios foram suspensos em água e incubados por 48 horas em temperatura ótima. Esses resultados corroboram com os obtidos por Fernandes et al. (2010) e Rangel et al. (2005). No entanto, estudos mostraram que quando este isolado é exposto por 12 horas a 40 °C, e incubado por 48 horas em temperatura ótima, apresenta cerca de 90% de germinação (RANGEL et al., 2005).

O presente estudo demonstrou o efeito *in vivo* de *M. anisopliae* formulado em óleo ou água, e exposto a condições de estresse térmico, sobre a virulência para o carrapato *R. sanguineus*. A maioria dos estudos disponíveis na literatura relata o efeito de formulações fúngicas aplicadas em bioensaios mantidas em condições ótimas de temperatura e umidade para o controle de carrapatos (KAAYA; HASSAN, 2000; MARANGA et al., 2005; LOPES et al., 2007; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

O atual estudo mostrou, no entanto, que a adição de óleo mineral a conídios de *M. anisopliae* IP 119 aumentou a virulência deste isolado contra *R. sanguineus*. Neste tratamento, foram obtidos os maiores percentuais de controle e diversos indivíduos morreram antes mesmo de iniciar a postura. Esse resultado é semelhante aos obtidos por Angelo et al. (2010), que avaliaram o efeito de *Lecanicillium lecanii* formulado em óleo mineral para controle de diferentes estágios de vida de *R. microplus*. A adição de óleo mineral a conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* também aumentou o efeito patogênico destes fungos contra diferentes estágios de vida dessa mesma espécie de carrapato (CAMARGO et al., 2012). Da mesma forma, Kaaya e Hassan (2000) usando *M. anisopliae* e *B. bassiana* suspensos em óleo de amendoim, observaram altas taxas de mortalidade em todas as fases de desenvolvimento de *A. variegatum* e *Rhipicephalus appendiculatus*. Esses autores obtiveram mortalidade de adultos entre 78% e 80%. No atual estudo, a alta mortalidade de adultos também foi observada quando a formulação oleosa foi utilizada, o que indica o potencial desse tipo de formulado de *M. anisopliae* IP 119 para controle de *R. sanguineus*. Cabe ressaltar, que apesar da germinação ter sido retardada pela exposição prévia de conídios ao calor, conídios formulados em água foram capazes de causar infecção e morte de carrapatos.

O aumento da termotolerância dos conídios formulados em óleo mineral foi confirmado nestes testes *in vivo*. Fêmeas de *R. sanguineus* tratadas com *M. anisopliae*

formulado em óleo e submetido à condição estressante de temperatura apresentaram, em relação ao controle, menores valores dos seguintes parâmetros biológicos: período de postura, índice nutricional, e índice de produção de ovos. Além disso, o formulado oleoso promoveu um percentual de controle de *R. sanguineus* maior que o observado pelo formulado aquoso independente da temperatura de exposição, indicando maior termotolerância dos conídios quando formulados em óleo. Cabe ressaltar, que o percentual de controle é um excelente parâmetro para avaliação do controle de populações de carrapato, pois seu cálculo baseia-se no peso da teleógina, peso da massa de ovos produzida e percentual de eclosão das larvas, sendo, portanto, um dos parâmetros mais completos, de acordo com o estabelecido por Drummond et al. (1971).

A eficácia de formulações oleosas está além do aumento da termotolerância. Auxiliam também, na proteção dos esporos fúngicos contra a rápida dessecação (BATEMAN et al., 1993; BATEMAN, 1994), radiação ultravioleta (MOORE et al., 1993; ALVES et al., 1998; BATEMAN; ALVES, 2000; HEDIMBI et al., 2008) e favorecem o espalhamento e a adesão dos conídios na cutícula hidrofóbica do artrópode hospedeiro (DAVID-HENRIET et al., 1998). Essa última característica pode explicar a maior eficiência da suspensão oleosa em comparação com a aquosa mostrada neste estudo. Entretanto, formulações a base de óleo podem ser tóxicas para artrópodes, como foi mostrado por Polar et al. (2005), que relataram a mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* por óleo de coco. No presente estudo, os grupos controle tratados apenas com óleo mineral ou água (sem adição de conídios), não diferiram estatisticamente nos parâmetros biológicos avaliados, o que permite-se inferir que não houve efeito tóxico do óleo mineral para as fêmeas ingurgitadas. Além disso, nos grupos tratados com conídios suspensos em óleo foram observados um menor período de postura, menor índice de produção de ovos, menor índice nutricional e menor percentual de eclosão, quando comparado ao grupo tratado com óleo apenas. Esses dados indicam que o elevado percentual de controle observado nestes grupos tratados com suspensão conidial oleosa, foi causado pela infecção por *M. anisopliae*.

Os resultados apresentados nos testes avaliando a germinação de conídios na cutícula de *R. sanguineus* evidenciaram o que foi demonstrado nos bioensaios relatados acima. Os dados obtidos indicam que a proteção ao calor e provavelmente a outros fatores abióticos, como exemplo inibidores naturais na cutícula dos carrapatos, é maior quando conídios são suspensos em óleo em relação a conídios suspensos em água, fatos que foram evidenciados pelo elevado percentual de germinação em pouco tempo de incubação pós-infecção. Este é

possivelmente o primeiro estudo avaliando a germinação de conídios suspensos em água ou óleo, submetidos previamente ao estresse térmico, e aplicados à cutícula de carrapatos.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi essencial para elucidação do processo de germinação sobre a cutícula de *R. sanguineus*. A técnica demonstrou diferenças entre as formulações tanto qualitativamente quanto quantitativamente. A MEV é uma importante ferramenta que já elucidou processos de desenvolvimento de fungos entomopatogênicos na cutícula de insetos (MOINO JR et al., 2002; NEVES; ALVES, 2004; MELO et al., 2007) e carrapatos (BITTENCOURT et al., 1999; GARCIA et al., 2004; ARRUDA et al., 2005), e neste estudo foi demonstrado que essa técnica também pode ser utilizada para avaliar a viabilidade de conídios sobre a cutícula de artrópodes, além de comparar a eficácia de diferentes formulações.

Os resultados dos testes de termotolerância *in vitro* e *in vivo* sugerem que em temperatura ótima ou exposto previamente ao calor, *M. anisopliae* germina mais rapidamente quando se desenvolve em substrato artificial. Apesar do atraso na germinação de conídios suspensos em água e submetidos ao estresse térmico ter sido semelhante entre os substratos, em tempos maiores de incubação os maiores percentuais de germinação foram observados em meio de cultivo.

Neste contexto, cabe ressaltar que o meio de cultivo é um substrato que fornece ao fungo nutrientes e outras condições ideais para o seu crescimento. Ao contrário, a cutícula do artrópode é uma barreira física e química para os fungos entomopatogênicos (TIAGO; FURLANETO, 2003). A cutícula muito espessa de fêmeas ingurgitadas, uma característica adquirida devido a estímulos hormonais durante o processo de ingurgitamento (FURLONG et al., 2007), e a presença de inibidores naturais e compostos fungistáticos na epicutícula de carrapatos, são fatores que podem dificultar o sucesso da infecção (KIRKLAND et al., 2004). Segundo Kirkland et al. (2004) a capacidade dos fungos em superar essas barreiras naturais, pode determinar a probabilidade de infecção bem sucedida e de virulência da cepa (KIRKLAND et al., 2004).

A epicutícula dos artrópodes é geralmente considerada um bom substrato para aderência de esporos fúngicos, em decorrência de sua natureza hidrofóbica. No entanto, alguns estudos têm destacado a complexa interação entre moléculas antimicrobianas presentes ou secretadas na cutícula e a fixação e germinação de conídios. Por exemplo, a presença de lípidios cuticulares pode promover ou inibir a fixação e germinação de esporos na cutícula de insetos e outros artrópodes (KIRKLAND et al., 2004; ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013).

Essas moléculas já foram relatadas como inibidoras da germinação de conídios de *B. bassiana* (LECUONA et al., 1997; KIRKLAND et al., 2004) e *M. anisopliae* (SOSA-GOMEZ et al., 1997). Em carrapatos, lipídios cuticulares extraídos de *A. americanum* foram responsáveis por inibir consideravelmente a germinação de conídios de *B. bassiana* (KIRKLAND et al., 2004). Neste sentido, os dados obtidos fornecem indícios que a possível presença desses inibidores naturais ou a disponibilidade limitada de nutrientes, podem ser motivos que justifiquem o atraso encontrado na germinação de conídios na cutícula de *R. sanguineus*, em comparação com a germinação em meio de cultivo, mesmo quando não expostos previamente a temperatura de estresse.

As diferenças observadas nos percentuais de germinação de conídios suspensos em água, nos experimentos 5.5 e 5.6 (Figuras 8 e 11) são, provavelmente, devido a utilização de técnicas diferentes (microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência) para avaliar a germinação de conídios na cutícula do carrapato. Por microscopia de fluorescência não foi possível a realização do experimento 5.6, pois o Calcofluor White não cora conídios cobertos com óleo. Além disso, as diferenças na germinação de conídios podem ocorrer em carrapatos de diferentes populações, uma vez que carrapatos de populações diferentes podem exibir susceptibilidade diferencial a infecção fúngica (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2012). Neste contexto, cabe ressaltar que os experimentos 5.5 e 5.6 foram realizados em diferentes ocasiões com carrapatos de diferentes locais.

M. anisopliae IP 119 forma apressório quando se desenvolve sobre a cutícula de *R. sanguineus* em condições ótimas de temperatura e umidade, 36 h pós-infecção. Garcia et al. (2004), demonstrando as etapas do processo de infecção de *M. anisopliae* em *R. sanguineus*, visualizaram apressório com 18 h pós infecção dos carrapatos com o patógeno. Entretanto, em *R. microplus*, Bittencourt et al. (1999) demonstraram pela primeira vez o mecanismo de penetração de *M. anisopliae* em carrapatos, e visualizaram apressórios na cutícula deste ixodídeo com 72 h pós tratamento. No entanto, estudos já demonstraram apressórios de *M. anisopliae* visíveis na cutícula de *R. microplus* 24 h após infecção (ARRUDA et al., 2005).

Nos testes com exposição da suspensão conidial aquosa ao calor e inoculada na cutícula do carrapato, em todos os tempos de incubação, não foram visualizados apressórios. É possível que após o estresse térmico, este isolado forme apressório na cutícula em tempos maiores de incubação, visto que, a germinação foi atrasada e com 72 h de incubação, de modo geral, os tubos germinativos apresentavam-se relativamente pequenos e aparentemente com menor diâmetro, quando comparado com tubos germinativos dos conídios não expostos ao

calor. Esses dados revelaram que a exposição ao calor, além de atrasar a germinação de conídios, também retarda a formação de apressórios.

A técnica de microscopia de fluorescência, aliada a metodologia de fixação de amostras para microscopia eletrônica de varredura, foi uma ferramenta que demonstrou bem a germinação de conídios na cutícula de *R. sanguineus*. Essa técnica, adaptada e padronizada neste estudo, pode se estender para estudos de viabilidade, germinação e penetração de fungos entomopatogênicos na cutícula de outras espécies de carrapatos e até de outros artrópodes, e assim, fornecer informações sobre o que acontece em campo, quando estes patógenos estão sobre a cutícula do hospedeiro. Alguns trabalhos feitos na década de 80 exploraram o estudo de fungos em superfícies de insetos, e demonstraram que o método da fluorescência, utilizando o Calcofluor White M2R, facilita a rápida localização de esporos e locais de penetração dos fungos, além de aumentar a detecção de lesões melanóticas na cutícula do hospedeiro (BUTT, 1983, 1987).

Alguns estudos que avaliaram *in vitro* a termotolerância de conídios reportam que os danos causados pela exposição ao calor podem afetar a eficácia de biopesticidas a base de fungos em programas de controle de artrópodes (RANGEL et al., 2005; FERNANDES et al., 2010; RANGEL et al., 2010; KEYSER et al., 2014). O presente estudo mostrou, no entanto, que os danos ocasionados pelo calor sobre os agentes fúngicos de biocontrole são possivelmente subestimados, uma vez que a germinação atrasada de conídios expostos ao estresse térmico foi mais evidente sobre a cutícula do carrapato do que a demonstrada em ensaios *in vitro* em que a germinação foi avaliada em meio de cultura artificial.

8 – CONCLUSÕES

A formulação de *M. anisopliae* IP 119 em óleo mineral favoreceu a termotolerância dos conídios, quando comparado com conídios formulados em água (Tween 80, 0,01%), tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

M. anisopliae IP119 formulado em óleo mineral e exposto ou não ao calor mostrou ser mais eficaz para controlar *R. sanguineus* em comparação ao formulado aquoso (Tween 80, 0,01%) em condições de laboratório.

O atraso na germinação de conídios expostos ao calor foi maior quando se desenvolvem sobre a cutícula de *R. sanguineus* do que sobre meio de cultivo artificial, sugerindo que o efeito negativo do calor é maior sobre a germinação de conídios na cutícula do artrópode do que seria previsto por testes de termotolerância *in vitro*.

A técnica de microscopia de fluorescência mostrou-se um método simples e eficaz para avaliação do desenvolvimento de conídios de *M. anisopliae* sobre a cutícula de *R. sanguineus*.

REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, D.A.S.; TAI, M.H.H.; LUZ, C. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.23, p.141-147, 2009.
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 pp.
- ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, v.17, n.8, p.675-679, 1998.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, É.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*. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.317-322, 2010.
- ARRUDA, W.; LÜBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Morphological Alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* Ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, p.231-244, 2005.
- BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, v.122, p.145-152, 1993.
- BATEMAN, R. Physical properties and atomisation of ULV formulations of mycoinsecticides. In: Microbial Control of Pests, 4th European Meeting (Smits, P.H., Ed.), IOBC WPRS Bulletin, v.17, p.189-192, 1994.
- BATEMAN, R.P.; ALVES, R.T. Delivery systems for mycoinsecticides using oil-based formulations. **Annals of Applied Biology**, v. 57, p.163-170, 2000.
- BENNETT, G.F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, p.52-61, 1974.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; VIEGAS, E.C.; LIMA, A.F. Isolamento e cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, a partir do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) artificialmente infectado. **Revista Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v.17, p.55-60, 1995.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v.29, p.351-354, 1999.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J.; PERALVA, S.L.F.S.; REIS, R.C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.21, p.78-82, 1999.

BORGES, L.M.F.; SOARES, S.F.; FONSECA, I.N.; CHAVES, V.V.; LOULY, C.C.B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n.1, p.87-95, jan-abr. 2007.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.78, p.98-108, 2001.

BROOKS, A.J.; MURO, M.A.; BURREE, E.; MOORE, D.; TAYLOR, M.A.; WALL, R. Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite, *Psoroptes ovis*: effects of temperature and formulation. **Pest Management Science**, Sussex, v.60, p.1043-1049, 2004.

BURRIDGE, M.J.; SIMMONS, L.A.; ALLAN, S.A. Efficacy of Acaricides for control of four tick species of agricultural and public health significance in the United States. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v.20, p. 207-219, 2004.

BUTT, T. M. **Studies on the Invasive and Developmental Processes of Five Genera of the Entomophthorales with Specific Reference to Erynia neoaphidis on the Pea Aphid, Acrythosiphon pisum Harris**. Ph.D. thesis, University of Bristol, Bristol, 1983.

BUTT, T.M. A fluorescence microscopy method for the rapid localization of fungal spores and penetration sites on insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.50, p.72-74, 1987.

BUTT, T.M.; HOCH, H.C.; STAPLES, R.C.; ST LEGER, R.J. Use of fluorochromes in the study of fungal cytology and differentiation. **Experimental Mycology**, v.13, p.303-320, 1989.

CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v.188, p.140-147, 2012.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science Technology**, v.10, p.357-384, 2000.

CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v.4, n.5, p.197-203, 1996.

COONEY, D.G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification**. Londres: W.H. Freeman, 1964. 188 p.

COUTINHO, M.; BUENO, L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.; BOTELHO, J.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.149-155, 2005.

CUNHA, C.P.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M., BARREIRA, J.D.; MASSARD, C.L.; LEMAS, E.R.S. First identification of natural infection

of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.105-108, 2009.

D'ALESSANDRO, W.B.; HUMBER, R.A.; LUZ, C. Occurrence of pathogenic fungi to *Amblyomma cajennense* in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever. **Veterinary Parasitology**, v.188, p.156-159, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brow dog tick, parasitizing humans in Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.197-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v.3, n.26, 2010.

DAVID-HENRIET, A.I.; PYE, B.J.; BUTT, T.M. Formulation and application of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of crucifer pests in Europe. In: Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes (Smits, P.H., Ed.), IOBC WPRS Bulletin v.21, p.89-90, 1998.

DEL FIOLE, F.S.; JUNQUEIRA, F.M.; ROCHA, M.C.P.; TOLEDO, M.I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.27, n.6, p.461-466, 2010.

DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.S.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; BLAU, D.M.; EREMEEVA, M.E.; DASCH, G.A.; LEVIN, M.L.; SINGLETON, J.Jr., ZAKI, S.R.; CHEEK, J.E.; SWERDLOW, D.L.; MCQUISTON, J.H. Rocky mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal of Medicine**, v.353, p.587-594, 2005.

DIMBI, S.; MANIANA, N.K.; LUZ, S.A.; MUEKE, J.M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **BioControl**, v.49, p.83-94, 2004.

DRUMMOND, R.O.; GLADNEY, W.J.; WHETSTONE, T.M.; ERNST, S.E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. **Journal of Economic Entomology**, v.64, p.686-688, 1971.

DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I.S.; VAINSTEN, M.H.V.; SCHARANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Research in Microbiology**, v.155, p.245-251, 2004.

EREMEEVA, M.E.; ZAMBRANI, M.L.; ANAYA, L.; BEATI, L.; KARPATY, S.E.; SANTOS-SILVA, M.M.; SALCEDA, B.; MAVBETH, D.; OLGUIN, H.; DASCH, G.

ARANDA, C.A. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* Ticks, Mexicali, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v.48, n.2, p.418-421, 2011.

ESTRADA-PENÃ, A. Etude de la résistance de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* aux acaricides. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.156, p.67-69, 2005.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopag nicos no Brasil. **Bioci ncias**, v. 22, p.18-21, 2001.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v.43, p.237-256, 2007.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, v. 89, p.383-392, 1997.

FERNANDES,  .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. **Parasitology Research**, v.98, p.324-332, 2006.

FERNANDES,  .K.K.; RANGEL, D.E.N.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p.69-78, 2008.

FERNANDES,  .K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, DOI 10.1007/s10493-008-9161-y, 2008.

FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal Applied Microbiology**, v.108, p.115-128, 2010.

FERNANDES,  .K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A. M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.182, p.307-318, 2011.

FLECHTMANN, C.H.W. ** caros de importância médico-veterinária**. 3^a ed., São Paulo: Nobel, 1985, 192 pp.

FUJISAKI, K.; KITAOKA, S.; MORII, T. Comparative observations on some bionomics of Japanese ixodid ticks under laboratory cultural conditions. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v.16, p.122-128, 1976.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v.159, 2007.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO AC, SZABÓ, M.P.J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, 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 *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.368-372, 2005.

HEDIMBI, M.; KAAAYA, G.P.; SINGH, S.; CHIMWAMUROMBE, P.M.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultra-violet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v.46, p.149-156, 2008.

HUMBER, R.A.; MORAES, G.J.; SANTOS, J.M. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in northeastern Brazil. **Entomophaga**, v.26, p.421-425, 1981.

KAAAYA, G.P.; KOKWARO, E.D.; MURITHI, J.K. Mortalities in adult *Glossina morsitans* experimentally infected with the entomogenous fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Discovery and Innovation**, v. 3, p.55-60, 1991.

KAAAYA, 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**, v. 67, n. 3, p.15-20, 1996.

KAAAYA, G.P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.913-926, 2000.

KEYSER, C.A.; FERNANDES, É.K.K.; RANGEL, D.E.N.; ROBERTS, D.W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy? **Journal of Invertebrate Pathology**, v.120, p.67-73, 2014.

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

KRITZMAN, G.; CHET, I.; HENIS, Y.; HUTTERMANN, A. The use of the brightner "Calcofluor White M2R new" in the study of fungal growth. **Israel Journal of Botany**, v.27, p.138-146, 1978.

LABARTHE, L. Biological control of tick populations: Review and reflections. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, p.47-52, 1994.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.6, p.24-32, 2001.

LAZZARINI, G.M.J.; ROCHA, L.F.N.; LUZ, C. Impact of moisture on *in vitro* germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v.110, p.485-492, 2006.

LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J.; VAZ JR., I.S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n.1, 2003.

LECUONA, R.; CLEMENT, J.L.; RIBA, G.; JOULIE, C.; JUAREZ, P. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* spp. on insect lipids. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.119-123, 1997.

LELES, R.N.; D'ALESSANDRO, W.B.; LUZ, C. Effects of *Metarhizium anisopliae* mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v.110, p. 1579-1582, 2012.

LOMER, C.J.; BATEMAN, R.P.; JOHNSON, D.L.; LANGENWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v.46, p.667-702, 2001.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.27-31, 2007.

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

LUZ, C.; ROCHA, L.F.N.; HUMBER, R.A. Record of *Evlachovaea* sp (Hyphomycetes) on *Triatoma sordida* in the State of Goiás, Brazil, and its activity against *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae). **Journal of Medical Entomology**, v.40, p.451-454, 2003.

LUZ, C.; BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.839-846, 2005.

LUZ, C.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; ROCHA, L.F.N.; ALBERNAZ, D.A.S.; SILVA, H.H.G. Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v.44, p.799-804, 2007.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.3, p. 631-650, jul./set. 2008.

MALSAM, O.; KILIAN, M.; OERKE, E.C.; DEHNE, H.W. Oils for increased efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control whiteflies. **Biocontrol Science and Technology**, v.12, p. 337-348, 2002.

MARANGA, R.O.; KAYA, 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**, v.159, n. 4, p.527-532, 2005.

MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, p.15-23, 2004.

MCCLATCHIE, G.V.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. **Mycological Research**, v.98, n.7, p.749-756, 1994.

MELO, D.R.; CRUZ, G.B.; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.3, p.166-170, 2007.

MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; SILVA, M.V. Febre maculosa: Isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.34, p.37-41, 1992.

MENT, D.; IRAKI, N.; GINDIN, G.; ROT, A.; GLAZER, I.; ABU-JREIS, R.; SAMISH, M.; Thermal limitations of *Metarhizium anisopliae* efficacy: selection for application on warm-blooded vertebrates. **BioControl**, v.56, n.1, p.81-89, 2011.

MERLE, C.; SOTTO, A.; BARBUAT, C.; JOURDAN, J. Disease course of Mediterranean Spotted Fever: remark on 16 cases. 7e Colloque sur le Controle Epidemiologique des Maladies Infectieuses, v.21, p.400-401, 1998.

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**, v.38, p.298-302, 2001.

MOINO JR, A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; NEVES, P.M.O.J.; PEREIRA, R.M.; VIEIRA, S. A. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Scientia Agricola**, v.59, p.267-273, 2002.

MOORE, D.; BRIGDE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annual Applied Biology**, Skapje, v.122, p.605-616, 1993.

NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**, v.33, n.1, p.51-56, Jan./Mar., 2004.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p.548-572, 2000.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D.G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; COSTA, F.B.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, p.1283-1300, 2012.

OLIVEIRA, D.G.P. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. 2009. Msc Thesis. University of São Paulo, Brazil, 2009.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N.O. Action on the surface: Entomopathogenic Fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v.4, p.357-374, 2013.

OSTFELD, R.S.; PRICE, A.; HORNBOSTEL, V.L.; BENJAMIM, M.A.; KEESING, E. Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. **Bioscience**, v.56, p.383-394, 2006.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; QUINELATO, S.B.; CAMARGO, M.G.; SA, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v.130, p.257-260, 2012.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; CANÇADO, P.H.D.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v.11, p.29-26, 2011.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRM, 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**, v.160, p.151-157, 2005.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A.C.; GARCIA, M.V.; SOARES, V.E.S. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, v.35, p.855-861, 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). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.66-72, 1988.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 88, p.116-125, 2005.

RANGEL, D.E.N.; FERNANDES, E.K.K.; DETTENMAIER, S.J.; ROBERTS, D.W. Thermotolerance of germings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium spp.* and mycelial recovery after heat stress. **Journal of Basic Microbiology**, v.50, p.344-350, 2010.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.J.;BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p.544-547, 2001.

REIS, R.C.S.; CHACÓN, S.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; FACCINI, J.L.H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, 1883 na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n. 2, p.68-70, 2003.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc.) Sorok. sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.788-791, 2004.

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, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 44, p.155-158, 2002.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p.159-182, 1999.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v.129, p.389-403, 2004.

SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.206, n.3, p.258-266, 2014.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. FEPMVZ – Editora, 2002. 265 pp.

SANTOS, A.L.L. **Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 1978. 148f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de Sao Paulo, Piracicaba.

SERRA-FREIRE, N.M. Ácaros (Carrapatos e outros). In: MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.263-281.

SERRA-FREIRE, N.M.; MELLO, R.P. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária**. 1ª ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2006. 199pp.

SOARES, G.G.; MARCHAL, M.; FERRON, P. Susceptibility of *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera, Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) at two different temperatures. **Environmental Entomology**, v.12, p.1886-1890, 1983.

SOLANO-GALLEGO, L.; ROSSI, L.; SCROCCARO, A.; MONTARSI, F.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; TROTTA, M. Detection of *Leishmania infantum* ADN mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.5, p.98, 2012.

SOUZA, E.J.; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação do efeito *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre os ovos e larvas de *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.8, n.2, p.127-132, 1999.

SOSA-GOMEZ, D.R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J.L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.31-39, 1997.

ST. LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.168-179, 1991.

SZABÓ, M.P.J.; MANGOLD, A.J.; JOÃO, C.F.; BECHARA, G.H.; GUGLIELMONE, A.A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.131-140, 2005.

SZABÓ, M.P.J.; PASCOLI, G.V.T.; JÚNIOR, O.M.; FRANCHIN, A.G.; TORGA, K. Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* parasitizing the bird *Coereba flaveola* in the Brazilian cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.543-545, mar-abr, 2008.

SZABÓ, M.P.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.27. doi:10.3389/fcimb.2013.00027, 2013.

TIAGO, P.V.; FURLANETO, M.C.O. Papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. **Alta Floresta**, v.2, n.1, p.40-51, 2003.

VIEIRA, P.D.S.; SILVA, W.M.T.; PAIVA, L.M.; ALVES-LIMA, E.A.L.; CAVALCANTE V.L.B. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação dos conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em diferentes temperaturas. **Biológico**, v.71, p.43-47, 2009.

VILLACORTA, A. Efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3 e CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 5, 1978, Bahia. **Livro de Resumos...** Bahia: 1978. p.70.

VRANJAC, A 2002. Informe Técnico: **Febre Maculosa Brasileira**. Centro de Vigilância Epidemiológica Professor Alexandre Vranjac.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBAUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.16, p.221-226, 1970.

WANG, C.; SKROBEK, A.; BUTT, T.M. Investigations on the dextruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.168-174, 2004.

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 Hospital das Clínicas da Faculdade Medicina de São Paulo**, v.52, p. 111-117, 1997.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.40, n.1, p.36-40, 1982.