

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFICÁCIA DE FUNGOS E NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
TESTADOS ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO PARA
CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus*: DO LABORATÓRIO PARA O
CAMPO**

Marcos Daniel Filgueiras Gomes
Orientador: Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes

GOIÂNIA
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES
E DISSERTAÇÕES 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Marcos Daniel Filgueiras Gomes

3. Título do trabalho

Eficácia de fungos e nematoides entomopatogênicos testados isoladamente ou em combinação para controle de *Rhipicephalus microplus*: do laboratório para o campo

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Éverton Kort Kamp Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 26/01/2022, às 23:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCOS DANIEL FILGUEIRAS GOMES, Discente**, em 27/01/2022, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2650442** e o código CRC **B77CBB77**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Marcos Daniel Filgueiras Gomes

3. Título do trabalho

Eficácia de fungos e nematoides entomopatogênicos testados isoladamente ou em combinação para controle de *Rhipicephalus microplus*: do laboratório para o campo

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Everton Kort Kamp Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 22/05/2025, às 07:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Daniel Filgueiras Gomes, Usuário Externo**, em 22/05/2025, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5386104** e o código CRC **7DC645D0**.

MARCOS DANIEL FILGUEIRAS GOMES

**EFICÁCIA DE FUNGOS E NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
TESTADOS ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO PARA
CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus*: DO LABORATÓRIO PARA O
CAMPO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos

Linha de Pesquisa:

Parasitologia e doenças parasitárias dos animais de companhia, produção e selvagens

Orientador:

Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes – IPTSP/UFG

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro – IPTSP/UFG

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares – IQ/UFLA

GOIÂNIA

2021

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

Gomes, Marcos Daniel Figueiras
EFICÁCIA DE FUNGOS E NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS TESTADOS ISOLADAMENTE OU EM
COMBINAÇÃO PARA CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus*: DO
LABORATÓRIO PARA O CAMPO [manuscrito] / Marcos Daniel
Figueiras Gomes. - 2021.
xviii, 121 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes; co-orientador
Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro; co-orientador Dr. Filipe Elias
de Freitas Soares .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Carrapato dos bovinos. 2. Controle biológico. 3. Teste de campo.
4. *Metarhizium*. 5. *Heterorhabditis bacteriophora*. I. Fernandes, Éverton
Kort Kamp, orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 322 da sessão de Defesa de Tese de Marcos Daniel Filgueiras Gomes que confere o título de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração em Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos.

Aos vinte dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e um a partir da(s) 14h00min, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "Associação do fungo *Metarhizium* spp. e do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* na pastagem". Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes (IPTSP/UFMG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof.ª Dr.ª Vanessa Andaló Mendes de Carvalho (UFU), membro titular externo à instituição; Prof.ª Dr.ª Mariana Guedes Camargo (UFRRJ) membro titular externo à instituição; Prof.ª Dr.ª Cíntia das Chagas Bernardo (Integra), membro titular externo à instituição; Prof.ª Dr.ª Lígia Miranda Ferreira Borges (IPTSP/UFMG), membro titular interno ao programa. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Eficácia de fungos e nematoides entomopatogênicos testados isoladamente ou em combinação para controle de *Rhipicephalus microplus*: do laboratório para o campo



Documento assinado eletronicamente por **Éverton Kort Kamp Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2021, às 18:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lígia Miranda Ferreira Borges, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2021, às 19:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **VANESSA ANDALÓ MENDES DE CARVALHO, Usuário Externo**, em 22/12/2021, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Guedes Camargo, Usuário Externo**, em 22/12/2021, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cíntia das Chagas Bernardo, Usuário Externo**, em 22/12/2021, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2575909** e o código CRC **6273F54D**.

Referência: Processo nº 23070.063294/2021-95

SEI nº 2575909

Dedico aos meus pais, por acreditar e apoiar minhas escolhas...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Éverton por acreditar em mim e conceder a oportunidade de realizar a pós-graduação sob sua orientação. Serei eternamente grato pelos ensinamentos, brincadeiras e momentos de descontração. Meu muito obrigado!

Também não menos importante gostaria de agradecer aos meus pais, Jane e Edmundo e a minha irmã Daniela, por serem meu porto seguro, por sempre estarem ali por mim... Contar e estar com vocês nos momentos difíceis foi fundamental para a conclusão deste trabalho.... Vocês são minha fonte inspiradora! Junto a vocês, também quero deixar aqui meus agradecimentos para o resto da minha família, que mesmo distante sei que eu estive em suas orações. Eu amo vocês!

Aos amigos e colegas do LPI, deixo aqui minha admiração e gratidão pelo caminho trilhado ao longo destes anos de convivência. Agradecer ao Juscelino, Lucas, Cárita, Valesca, Pamella, Artur, Sol, Camila, Elen, Juliana e Renato. Meu grande e especial abraço!

Também venho agradecer ao Dr. Gabriel Mascarin por todo apoio ao longo dos experimentos que foram de suma importância para o fechamento do trabalho. Em sequência agradeço imensamente aos meus coorientadores Prof. Dr. Caio Monteiro e Prof. Dr. Filippe Soares que foram grandes parceiros no decorrer do projeto. Meu grande e especial obrigado!

A Embrapa Arroz e Feijão e Gado de Leite por ceder o espaço e seus funcionários para a execução dos testes em campo. Meu muito obrigado!

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Goiás em especial ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e a Escola de Veterinária e Zootecnia, e não menos importantes aos professores vinculados nestes institutos, meu muito obrigado por todos os ensinamentos. E agradeço a CAPES pela bolsa de estudos concedida sendo fundamental para minha formação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
ANEXOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xviii
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> : taxonomia, origem e distribuição geográfica	21
2.2 <i>Rhipicephalus microplus</i> : biologia, importância econômica e desafios no controle..	22
2.3 Controle biológico e suas vertentes	26
2.4 Controle biológico de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos.....	27
2.5 Controle biológico de carrapatos utilizando nematoides entomopatogênicos.....	32
2.6 Estudos da combinação de nematoides e fungos entomopatogênicos para controle de artrópodes	37
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4. REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 2: Potencial de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 para controle de <i>Rhipicephalus microplus</i>: do laboratório para o campo.....	52
RESUMO.....	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. METODOLOGIA.....	56
2.1 Obtenção e manutenção de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , isolado HP88.....	56

2.2 Avaliação da susceptibilidade de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> com diferentes níveis de ingurgitamento à infecção por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	57
2.3 Avaliação da susceptibilidade de diferentes populações de <i>Rhipicephalus microplus</i> à infecção por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.....	58
2.4 Avaliação da eficácia de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 para controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições de campo	59
2.4.1 Obtenção de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	59
2.4.2 Local de realização do estudo e preparação dos canteiros de <i>Panicum maximum</i>	60
2.4.3 Delineamento experimental.....	61
2.4.4 Características do solo	62
2.5 Análises estatísticas	63
3. RESULTADOS	64
3.1 Avaliação da susceptibilidade de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> com diferentes níveis de ingurgitamento à infecção por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	64
3.2 Avaliação da susceptibilidade de diferentes populações de <i>Rhipicephalus microplus</i> à infecção por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.....	66
3.3 Avaliação da eficácia de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 para controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições de campo	68
4. DISCUSSÃO	72
5. REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO 3: Combinação entre fungos e nematoides entomopatogênicos formulados contra <i>Rhipicephalus microplus</i>: um estudo da virulência sobre a fase não parasitária .	82
RESUMO.....	83
1. INTRODUÇÃO	84
2. METODOLOGIA.....	86
2.1 Origem dos carrapatos	86
2.2 Fungos e nematoides entomopatogênicos	87
2.3 Combinação de diferentes espécies de <i>Metarhizium</i> com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 contra fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> sob condições controladas.....	88

2.4 <i>Metarhizium roberstii</i> IP 146 combinado com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 para controle de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> sob condições controladas.....	90
2.5 Desenvolvimento fúngico de diferentes formulações granulares em meio ágar-água ou solo não esterilizado	90
2.6 Combinação de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 com <i>Metarhizium robertsii</i> IP 146 para controle da fase não-parasitária de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições de campo com diferentes condições climáticas.....	94
2.6.1 Produção da formulação inseto cadáver, da suspensão de nematoides e da formulação granular.....	94
2.6.2 Condições climáticas	95
2.6.3 Preparação das parcelas	96
2.6.4 Tratamento e recuperação de larvas nas parcelas	97
2.6.5 Persistência fúngica no solo	98
2.6.6 Persistência de nematoides no solo	99
2.7 Análises estatísticas	100
3. RESULTADOS.....	102
3.1 Combinação de diferentes espécies de <i>Metarhizium</i> com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 contra fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> sob condições controladas.....	102
3.2 <i>Metarhizium roberstii</i> IP 146 combinado com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 para controle de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> sob condições controladas.....	104
3.3 Desenvolvimento fúngico de diferentes formulações granulares sobre meio ágar-água ou solo não esterilizado	107
3.4 Combinação de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 com <i>Metarhizium robertsii</i> IP 146 para controle da fase não-parasitária de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições de campo com diferentes condições climáticas.....	108
4. DISCUSSÃO	120
5. REFERÊNCIAS	125
CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS	131

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

FIGURA 1 – Distribuição geográfica do carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i>	21
FIGURA 2 – Esquema do ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i> ilustrando a fase não parasitária, com ocorrência nas pastagens, e a fase parasitária que ocorre sobre o animal.....	23
FIGURA 3 – Larvas infestantes de <i>Rhipicephalus microplus</i> presentes em pastagem de <i>Panicum maximum</i>	24
FIGURA 4 – Representação gráfica da dinâmica populacional de <i>Rhipicephalus microplus</i> e os estágios que compõem cada fase do ciclo biológico.....	26
FIGURA 5 – Ciclo biológico de fungos entomopatogênicos pertencentes a ordem Hypocreales em fêmea ingurgitada de carrapato da família Ixodidae.....	29
FIGURA 6 – Ciclo biológico de nematoides entomopatogênicos pertencente à família Heterorhabditidae em larvas de <i>Galleria mellonella</i> L. ou em fêmea ingurgitada da família Ixodidae.....	34

CAPÍTULO 2: Potencial de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle de *Rhipicephalus microplus*: do laboratório para o campo

FIGURA 1 – Locais de origem das diferentes populações de <i>Rhipicephalus microplus</i>	59
FIGURA 2 – Parcelas de <i>Panicum maximum</i> em área da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil.....	61
FIGURA 3 – Larvas infestantes de <i>Rhipicephalus microplus</i> em uma das parcelas de <i>Panicum maximum</i>	62
FIGURA 4 – Dados climáticos da região dos experimentos coletados diariamente pela estação meteorológica ou com higrômetro.....	69
FIGURA 5 – Número médio de larvas recuperadas dos grupos tratado e controle durante as quatro semanas de estudo.....	71

CAPÍTULO 3: Combinação entre fungos e nematoides entomopatogênicos contra *Rhipicephalus microplus*: um estudo da virulência sobre a fase não parasitária

FIGURA 1 – Etapas de produção de grânulo contendo biomassa de <i>M. robertsii</i> IP 146.....	92
FIGURA 2 – Representação gráfica dos processos dos testes utilizando grânulos de microesclerodios com diferentes excipientes.....	94
FIGURA 3 – Área contendo as parcelas de 1 m ² de <i>Panicum maximum</i> utilizadas no teste de campo.....	97
FIGURA 4 – Parcelas de <i>Panicum maximum</i> com a presença de flanelas utilizadas para recuperar larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	98
FIGURA 5 – Desenvolvimento fúngico de diferentes grupos de formulações granulares de <i>Metarhizium robertsii</i> IP 146 em meio ágar-água ou solo não esterilizado.....	108
FIGURA 6 – Persistência fúngica de solo tratado em duas estações do ano (seca ou chuvosa) somente com formulação granular de <i>Metarhizium robertsii</i> ou combinado ao nematoide <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.....	109
FIGURA 7 – Dados climáticos de experimento conduzido no período chuvoso coletados ao longo de 14 semanas por data logger HOBO® presente no interior de uma parcela.....	110
FIGURA 8 – Dados climáticos do ambiente (período chuvoso) coletados diariamente pela estação meteorológica.....	111
FIGURA 9 – Impacto de tratamento realizado no período chuvoso com fungo e nematoide entomopatogênico aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens.....	113
FIGURA 10 – Impacto de tratamento realizado no período chuvoso com fungo e nematoide entomopatogênico aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens.....	114
FIGURA 11 – Dados climáticos de experimento conduzido no período seco coletados ao longo de 16 semanas por data logger HOBO® presente no interior de uma parcela.....	115
FIGURA 12 – Dados climáticos do ambiente (período seco) coletados diariamente pela estação meteorológica.....	116
FIGURA 13 – Percentual de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas por <i>H. bacteriophora</i> HP88 depositadas sobre solo proveniente de diferentes parcelas tratadas no período seco com juvenis infectantes de <i>H. bacteriophora</i> HP88 ou sua combinação com formulação granular de <i>M. robertsii</i> IP 146.....	117

FIGURA 14 – Impacto de tratamento realizado no período seco com fungo e nematoide entomopatogênico aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens.....	118
FIGURA 15 – Impacto de tratamento realizado no período seco com fungo e nematoide entomopatogênico aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens.....	119

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: Potencial de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle de *Rhipicephalus microplus*: do laboratório para o campo

TABELA 1 – Peso médio de fêmeas ingurgitadas (mg), peso da massa de ovos (mg), eclosão larval (%), índice de produção de ovos (%), reprodução estimada e percentual de controle (%) de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratados com juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 sob condições controladas.....	65
TABELA 2 – Peso inicial de fêmeas (mg), peso da massa de ovos (mg), percentual de eclosão (%), índice de produção de ovos (%), reprodução estimada e percentual de controle (%) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 sob condições controladas.....	67

CAPÍTULO 3: Combinação entre fungos e nematoides entomopatogênicos contra *Rhipicephalus microplus*: um estudo da virulência sobre a fase não parasitária

TABELA 1 – Isolados de fungos entomopatogênicos investigados no presente estudo e sua origem.....	87
TABELA 2 – Fórmula molecular, componentes e quantidade (g/L) de reagentes que compõem o meio basal, utilizado para desenvolver o meio de cultura para produzir microescleródios.....	88
TABELA 3 – Descrição das dos excipientes e microescleródios de <i>Metarhizium robertsii</i> IP 146 das diferentes formulações granulares testadas.....	91
TABELA 4 – Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. (1×10^7 mL ⁻¹ conídios/mL) combinados ou não a <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 (50 JIs/fêmea) ou tratadas com água destilada (controle).....	103
TABELA 5 – Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com <i>Metarhizium robertsii</i> IP 146 (10^6 ou 10^7 conídios mL ⁻¹) combinados ou não a <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 (15 ou 25 juvenis infectantes/fêmea) ou tratadas com água destilada (controle).....	106

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer Comissão de ética no uso de animais/CEUA.....	133
ANEXO 2 – Análise físico-química do solo utilizado nos testes de campo.....	136
ANEXO 3 – Análise microbiológica do solo utilizado nos testes de campo.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

FEPs	Fungos entomopatogênicos
NEPs	Nematoides entomopatogênicos
IP	Instituto de Patologia
JIs	Juvenis infectantes
ME	Microescleródios
LPI	Laboratório de Patologia de Invertebrados
ANOVA	Análise de variância
FDR	False-Discovery-Rate
UR	Umidade relativa
TL ₅₀	Tempo letal necessário para matar 50% da população do artrópode
TL ₉₀	Tempo letal necessário para matar 90% da população do artrópode
°C	Graus celsius
C	Carbono
N	Nitrogênio
PC	Percentual de controle
RE	Reprodução estimada
IN	Índice nutricional
IPO	Índice de produção de ovos
UFG	Universidade Federal de Goiás
CEUA	Comissão de Ética no Uso dos Animais
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

RESUMO

Fungos e nematoides entomopatogênicos são agentes bastante investigados para o controle biológico de diversas pragas, entre elas os carrapatos. O presente estudo buscou determinar a eficácia de fungos e nematoides, combinados ou não, contra fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em ensaios laboratoriais ou de campo. Assim, ensaios em condições controladas avaliaram a patogenicidade do nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 sobre fêmeas de *R. microplus* com diferentes níveis de ingurgitamento (150, 200, 250, 300 e 350 mg), e sobre fêmeas provenientes de oito diferentes populações. Além disso, um estudo em condições de campo avaliou a eficácia de *H. bacteriophora* HP88 formulados em cadáveres de *Tenebrio molitor* em reduzir a população não parasitária de *R. microplus* em pastagens. Também buscou-se determinar em condições controladas uma combinação sinérgica entre *Metarhizium* spp. e *H. bacteriophora* HP88 sobre fêmeas ingurgitadas, além de determinar uma formulação multiparticulada contendo microescleródios de *Metarhizium robertsii* IP 146 eficaz em produzir conídios e, por fim, determinar em condições de campo a eficácia da combinação desta formulação granular com juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 para controlar a população não parasitária de *R. microplus* em pastagens em diferentes estações do ano (chuvosa ou seca). Os testes de patogenicidade do nematoide em fêmeas de *R. microplus*, não mostraram variação no percentual de controle entre os grupos com diferentes níveis de ingurgitamento (valores entre 98,4% e 97,5%). Também não foram observadas diferenças de suscetibilidade entre as fêmeas provenientes de diferentes populações (percentuais de controle entre 89% e 99%). No teste de campo, a população não parasitária de *R. microplus* foi reduzida em 73,1% nas parcelas tratadas com *H. bacteriophora* HP88. Quando *Metarhizium* spp. foi combinado com *H. bacteriophora* HP88, todos os tratamentos reduziram os parâmetros biológicos das fêmeas, sendo observado apenas efeito aditivo entre as combinações. Entretanto, quando *M. robertsii* IP 146 foi combinado com *H. bacteriophora* HP88 em sub-doses, todos os tratamentos apresentaram sinergismo. O teste de campo conduzido no período chuvoso, reduziu a população de *R. microplus* nas pastagens, com eficácia de 54,09% (fungo), 38,11% (nematoide) e 46,72% (combinação). No período seco, somente o tratamento fúngico reduziu a população de *R. microplus*, com eficácia de 26,27%. Conclui-se que os entomopatógenos *M. robertsii* IP 146 e *H. bacteriophora* HP88 são agentes promissores de biocontrole da fase não parasitária de *R. microplus*, apesar da eficácia do tratamento sofrer variação de acordo com a época do ano.

Palavras-chaves: carrapatos dos bovinos; controle biológico; teste de campo

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi and nematodes are biocontrol agents widely investigated for the biological control of several pests, including ticks. This study aimed to determine the efficacy of fungi and nematodes, combined or not combined, against *Rhipicephalus microplus* engorged females under laboratory and field conditions. Bioassays under controlled conditions were conducted to evaluate the pathogenicity of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 against *R. microplus* females with different weights (150, 200, 250, 300, and 350 mg), and against females from eight different populations. In addition, a study under field conditions were conducted to evaluate the efficacy of *H. bacteriophora* HP88 formulated on *Tenebrio molitor* cadavers for controlling non-parasitic *R. microplus* on infested pastures. Likewise, a study was sought to determine, under controlled conditions, the synergistic combination between *Metarhizium* spp. and *H. bacteriophora* HP88 against *R. microplus* engorged females, as well as to determine a granular formulation containing *M. robertsii* IP 146 microsclerotia with potential to produce conidia when incubated onto different substrates. Lastly, a study was conducted to determine, under field conditions, the efficacy of combined granular formulation and *H. bacteriophora* HP88 infective juveniles (third stage) for controlling non-parasitic *R. microplus* population on infested pastures during different seasons of the year (wet or dry). Nematode pathogenicity to *R. microplus* females did not show variation of the percent control (98.4% to 97.5%) on the groups with different weights. There were also no differences on susceptibility of females from different populations (percent control between 89% and 99%) to HP88. In the field test, non-parasitic *R. microplus* population was reduced by 73.1% in the plots treated with *H. bacteriophora* HP88. Combined treatments with *Metarhizium* spp. and *H. bacteriophora* HP88 reduced biological parameters of engorged females, with additive effect detected. However, treatment with *M. robertsii* IP 146 combined with *H. bacteriophora* HP88 sub-doses demonstrated synergism. The field test conducted in the wet season reduced the non-parasitic *R. microplus* population on infested pastures, with efficacy of 54.09% (fungus only), 38.11% (nematode only), and 46.72% (fungi and nematodes combined). In the dry period, only the fungal treatment reduced *R. microplus* population, with efficacy of 26.27%. We concluded that *M. robertsii* IP 146 and *H. bacteriophora* HP88 are promising agents for biological control of the non-parasitic phase of *R. microplus*, although the treatment efficacy had varied according to the wet or dry seasons.

Keywords: cattle tick; biological control; field test

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Prejuízos acarretados pelos carrapatos dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) são bem conhecidos pela pecuária dos países subtropicais ou tropicais ao redor do mundo¹. Estes estão relacionados com gastos econômicos provenientes dos danos diretos ocasionados pela hematofagia ou suas implicações, como a redução da produção de carne e leite, depreciação do couro, subdesenvolvimento dos animais, e os danos indiretos que são provenientes da transmissão de agentes patogênicos para os bovinos^{2,3}. O controle deste parasito é frequentemente realizado com a aplicação de acaricidas químicos visando a fase parasitária do carrapato (larvas em alimentação, ninfas e adultos), geralmente sem conhecimentos técnicos e de forma incorreta, o que vem selecionando populações de carrapatos resistentes às bases químicas comercialmente disponíveis⁴⁻⁶. Nesta perspectiva, diferentes propostas de controle alternativo surgem para tentar amenizar o impacto causado por estes artrópodes, especialmente quando o principal método de redução das populações perde eficácia.

A utilização de organismos vivos para suprimir populações de artrópodes que ocasionam perdas econômicas (controle biológico) é uma proposta inovadora e vem ganhando destaque visto sua abrangência ecológica e inócua a seres humanos e outros vertebrados⁷. Fungos e nematoides entomopatogênicos são potenciais candidatos para aplicação no controle biológico de carrapatos. Fungos entomopatogênicos são microrganismos filogeneticamente diversificados, heterotróficos, eucarióticos, uni ou multicelulares, e capazes de invadir e colonizar diversos grupos de invertebrados, incluindo os carrapatos^{8,9}. Nematoides entomopatogênicos são organismos multicelulares que possuem habilidade de parasitar e causar morte em diferentes ordens de artrópodes, incluindo os carrapatos^{10,11}.

Os fungos entomopatogênicos causam mortalidade a partir da fixação de conídios (esporos assexuais responsáveis pelo início da infecção) sobre a cutícula do artrópode onde inicia-se o processo de penetração ativa através da cutícula^{8,12}. O processo de germinação sobre a epicutícula ocorre geralmente após 18 horas de contato, seguido pela formação de apressório (estrutura responsável pela penetração por pressão mecânica e enzimática) sendo a ocorrência deste processo finalizada de 18 a 48 horas pós-contato. O fungo coloniza massivamente os tecidos internos do hospedeiro provocando sua morte em 3 a 5 dias pós-contato¹². Os

nematoides entomopatogênicos após penetrar no interior do hospedeiro, causam sua mortalidade a partir da liberação de bactérias presentes em seu interior; estas são responsáveis pela produção de toxinas que provocam rápida septicemia, levando os hospedeiros à morte^{13, 14}. Apesar de diversos trabalhos reportarem a eficácia destes biocontroladores para o controle de *R. microplus* em condições controladas¹⁵⁻¹⁸, poucos estudos relatam o teste com a combinação de fungos e nematoides entomopatogênicos para o biocontrole de *R. microplus* em condições controladas ou de semi-campo^{19, 20}, e nenhum foi desenvolvido em condição de campo até o momento.

Sabe-se que realizar um controle efetivo de *R. microplus* envolve o controle dos estágios de ambas as fases do ciclo biológico; a fase parasitária em que os diferentes estágios do carrapato sobrevivem sobre o hospedeiro, compreende 5% do total de indivíduos da população presente na área, enquanto a fase não-parasitária (fêmeas completamente ingurgitadas, larvas não-alimentadas e ovos), compreende os 95% da população que estão na pastagem^{21, 22}. Apesar da maior parte da população viver na pastagem, o controle de *R. microplus* atualmente vem sendo realizado exclusivamente com enfoque em reduzir a população que está parasitando o hospedeiro²³. O controle da fase não-parasitária no Brasil torna-se um problema pois não existem produtos destinados ao controle desta população específica, seja de forma química ou biológica^{23, 24}.

Neste contexto, estudos com abordagens mais ecológicas são de extrema importância para reduzir de forma consciente as populações de *R. microplus*. A combinação de biocontroladores, fungos e nematoides entomopatogênicos, é bem estudada e aplicada para a redução de pragas com importância agrícola²⁵⁻²⁷; entretanto, pouco vem sendo relatado sobre a capacidade da combinação destes agentes em controlar carrapatos, especialmente o dos bovinos. Resultados positivos utilizando fungos e nematoides combinados para reduzir a população de pragas agrícolas em condições laboratoriais ou de campo vem sendo reportados²⁸⁻³¹. Em relação aos carrapatos, apenas um estudo realizado em condições controladas reporta o efeito desta combinação sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*³²; desta forma, para melhor entendimento e aprimoramento desta combinação, mais estudos em condições controladas ou em condições naturais são importantes para elucidar o real potencial dessa abordagem no controle de carrapatos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*: taxonomia, origem e distribuição geográfica

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, conhecido popularmente como o carrapato dos bovinos, está classificado no Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida e Família Ixodidae³³. Estudos recentes envolvendo dados morfológicos, reprodutivos, genéticos e moleculares comprovaram a existência de um complexo de espécies de cinco táxons, sendo eles: *Rhipicephalus annulatus*, *R. australis*, *R. microplus* sensu stricto (com três cladus)^{34, 35}. Sua provável origem é na Índia e na ilha de Java, na Ásia. Sua distribuição para outras localidades ocorreu devido a expedições com finalidades exploratórias realizadas no século XVI, em que bovinos infestados eram transportados e comercializados, causando assim a dispersão desta espécie para as regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, situadas entre as latitudes de 32° Norte e 32° Sul, abrangendo a América Central, América do Sul, África e Ásia²³ (Figura 1). No Brasil, a introdução deste ectoparasito ocorreu no século XVIII por meio de expedições que transportavam animais domésticos infestados; este aracnídeo encontrou aqui condições climáticas favoráveis, dispersou-se e estabeleceu-se em diferentes regiões do país^{23, 36}.

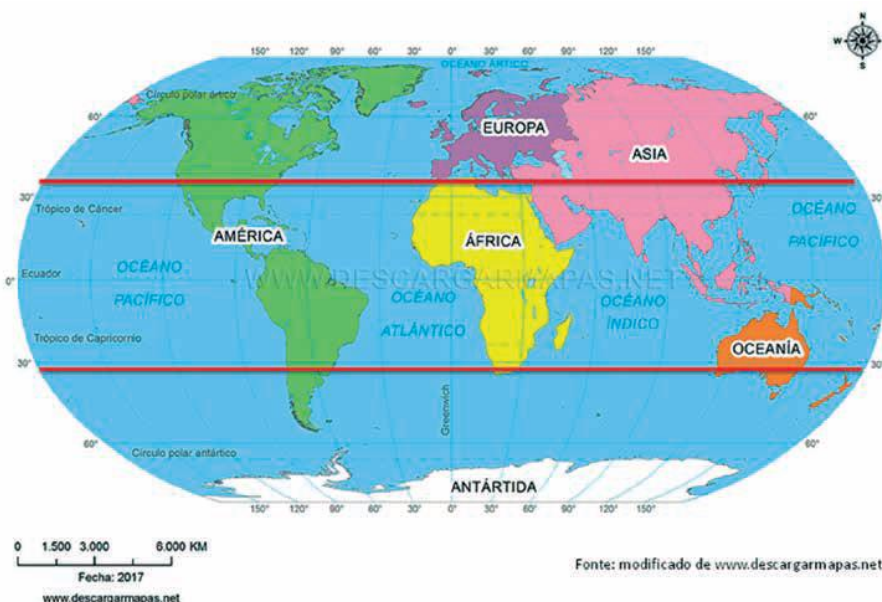


Figura 1. Distribuição geográfica do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. O espaço geográfico entre as linhas vermelhas situadas entre as latitudes 32° Norte e 32° Sul representam os locais em que o carrapato está presente. Fonte: Garcia et al.²³

2.2 *Rhipicephalus microplus*: biologia, importância econômica e desafios no controle

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é um carrapato, aracnídeo ectoparasito hematófago obrigatório de vertebrados, cujo principal hospedeiro são os bovinos. Este carrapato possui ciclo biológico monoxeno, e este divide-se em duas fases principais: uma fase não parasitária composta pelos estágios de fêmea ingurgitada, ovos e larvas não alimentadas, e uma fase parasitária constituída por larvas em alimentação, ninfas e adultos, os quais necessitam de alimentação para realização de ecdise^{37,38}.

A fase parasitária tem duração de 21 a 22 dias e inicia-se quando as larvas infestantes presentes nas pastagens entram em contato com o hospedeiro (Figura 2). Logo estas larvas se dispersam sobre o corpo do animal e começam uma busca por sítios ideais para fixação, iniciando o repasto sanguíneo³⁹. Após ingurgitamento, ainda no hospedeiro, as larvas realizam o processo de ecdise, passando para o estágio de ninfa. As ninfas também realizam a hematofagia e logo após a ecdise, sobre o mesmo hospedeiro, dão origem a fase adulta (machos e fêmeas)³⁸. Os machos continuam por cerca de dois meses sobre o animal, e dentro deste intervalo, permanecem fecundando as fêmeas^{40, 41}. As fêmeas após à cópula, uma vez repleta de sangue, separam a parte sólida do sangue (células vermelhas, brancas e plaquetas) da parte líquida (plasma), que será utilizada pela fêmea em suas funções biológicas, incluindo a maturação dos ovos. O conteúdo não utilizado será devolvido para o bovino^{37, 39}.

Após o ingurgitamento, preferencialmente nas primeiras horas do dia, a fêmea de *R. microplus* se desprende do hospedeiro e cai no solo, dando início à fase não parasitária (Figura 2)³⁸⁻⁴⁰. No solo, por fototropismo negativo, a fêmea busca lugares com baixa luminosidade, temperaturas inferiores a 30 °C e umidade relativa (UR) superior a 80% para iniciar a oviposição, sendo esta etapa do ciclo biológico completamente dependente da temperatura e da umidade relativa; grandes variações destes fatores podem ocasionar alta mortalidade das fêmeas, ovos e larvas^{21, 42}. Em média, o processo de pré-postura dura de três dias a cinco dias após o desprendimento da fêmea do hospedeiro, após este intervalo, inicia-se o período de postura que em condições controladas (27 °C e UR > 80%) tem duração média de 15 dias, entretanto quando ocorre na natureza, pode estender-se por períodos mais longos devido a variações climáticas, principalmente de temperatura e umidade⁴³. Durante o período de pré-postura, a locomoção realizada pela fêmea também sofre influência destas condições climáticas. Estudos reportam que em meses frios (inverno) o seu deslocamento é maior (120 a 590 cm) quando comparado com o verão (28 a 84 cm)⁴³. Em campo, condições ideais para

oviposição são geradas por touceiras ou estolões de capins, folhas e gravetos, que formam uma cobertura natural e fornecem um microclima adequado para início do processo de postura³⁸, de forma que, na busca por condições ideais, as fêmeas podem se enterrar no solo ou penetrar nas bases das touceiras⁴⁴.

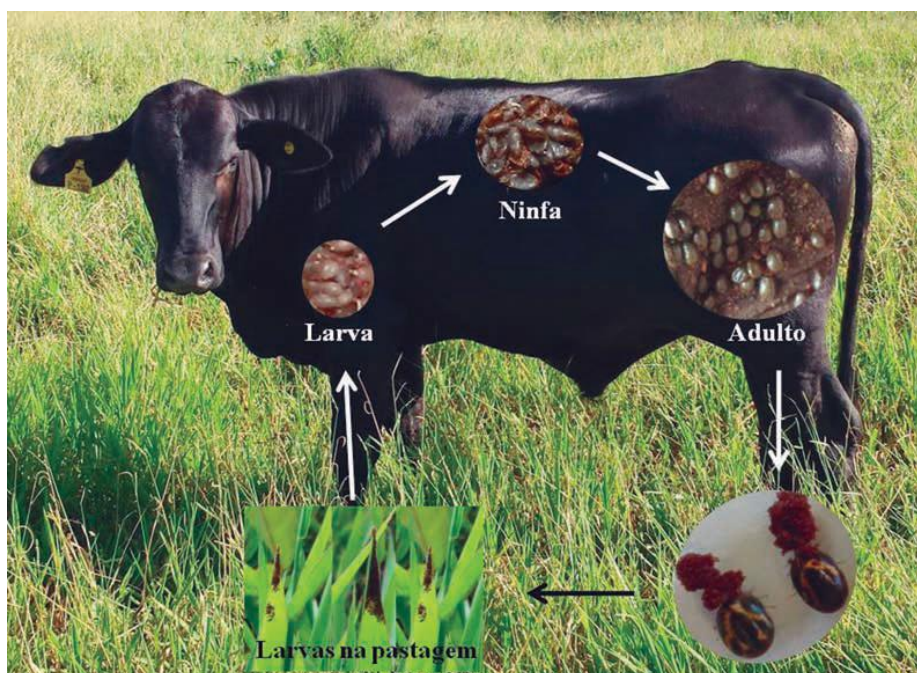


Figura 2. Esquema do ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus* ilustrando a fase não parasitária, com ocorrência nas pastagens, e a fase parasitária que ocorre sobre o animal. Fonte: Garcia et al.²³

As espécies pertencentes à família Ixodidae destacam-se das outras famílias de carrapatos e de outros artrópodes por possuírem um dos maiores potenciais bióticos existentes⁴⁵. Cada fêmea de *R. microplus* ovipõe aproximadamente 3.000 ovos durante seu período de postura (cerca de 50% de seu peso corporal)³⁹. Levando em consideração o período de maturação dos ovócitos no ovário da fêmea, a oviposição nas pastagens, o tempo de formação das larvas em seu interior e a eclosão larval, leva em média 60 dias nos meses de temperatura e umidade elevada, e 120 dias em meses com temperatura e umidade baixa³⁹. Logo após eclodidas, as larvas permanecem próximas aos ovos aguardando o enrijecimento de suas cutículas por aproximadamente sete dias. Após enrijecimento, as larvas migram para o ápice da vegetação por geotropismo negativo e fototropismo positivo, se aglomeram e permanecem viáveis por meses à espera de hospedeiros, iniciando assim a fase parasitária (Figura 3)^{37, 39}.

Estas larvas utilizam mecanismos para localizar hospedeiros susceptíveis presentes no ambiente; elas são capazes de detectar estímulos ou bioprodutos liberados pelo hospedeiro como o odor, vibrações, sombreamento ou o dióxido de carbono expirado (CO₂)³ por meio do órgão sensorial denominado órgão de Haller presente no tarso de suas pernas dianteiras. Após recebido o estímulo, ficam em posição de alerta apoiando-se na vegetação com dois pares de pernas e agitando o terceiro par em movimento de laçadas⁴⁶. Este comportamento de aglomerar no ápice das gramíneas, além de facilitar o acesso das larvas aos hospedeiros também evita ou diminui a perda de água para o ambiente e as protege contra à radiação solar⁴⁰.

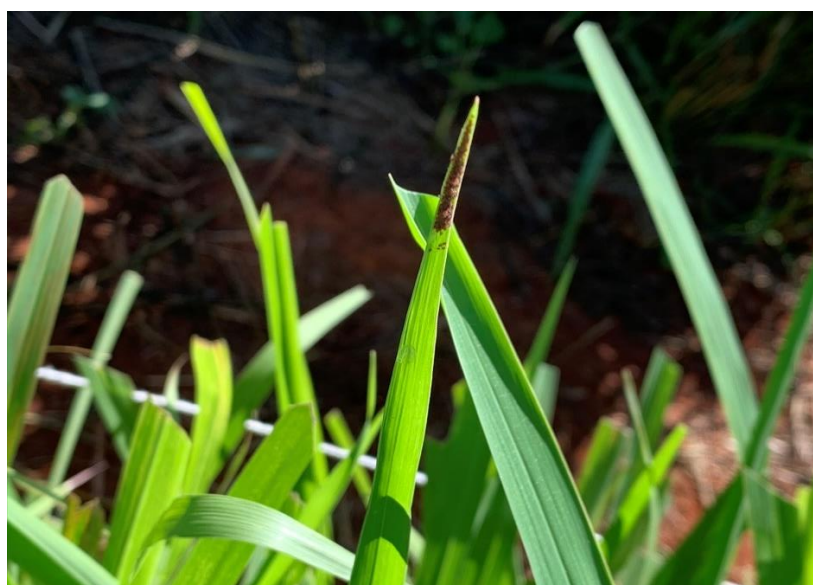


Figura 3. Larvas infestantes de *Rhipicephalus microplus* presentes em pastagem de *Panicum maximum* BRS Quênia.
Fonte: Arquivo próprio.

Do ponto de vista econômico, *R. microplus* possui maior importância na região Neotropical, causando no mundo prejuízo estimado entre 13,9 e 18,7 bilhões de dólares anualmente^{47, 48}. Somente no Brasil o prejuízo é estimado em 3,24 bilhões de dólares⁴⁹ e estes gastos estão associados à perdas na produção de carne e leite, depreciação do couro, custos com medicamentos para tratamento de miíases e de enfermidades causadas por macro e microrganismos, além de custos com carrapaticidas químicos e mão-de-obra qualificada para tratamento dos bovinos²³. Um dos grandes problemas do parasitismo por *R. microplus* é a transmissão dos agentes causadores da babesiose bovina ocasionada por protozoários

pertencentes ao gênero *Babesia* Starcovici, 1893 (Piroplasmida: Babesiidae) e da anaplasmoze bovina ocasionada por bactérias pertencentes ao gênero *Anaplasma* Theiler, 1910 (Rickettsiales: Anaplasmataceae). Estas são doenças que possuem alta morbidade e, devido a sintomatologia similar, são agrupadas em um complexo chamado “tristeza parasitária bovina” que pode levar os animais parasitados a óbito^{23, 37}.

De modo a minimizar os problemas acarretados pelos ectoparasitos, a utilização de compostos químicos torna-se uma ferramenta eficaz de controle; mediante seu rápido efeito, sua utilização difundiu-se pelo mundo tornando o método mais utilizado para esta finalidade⁵⁰. Entretanto, devido ao uso contínuo desses compostos, aliado a ausência de estudos prévios para a seleção de bases ideais e acompanhamento técnico, populações de *R. microplus* resistentes vêm sendo selecionadas^{4, 5}. Atualmente, há diversos relatos de populações de *R. microplus* resistentes a todas as bases químicas disponíveis no mercado^{51, 52}. Além do problema da seleção de populações resistentes, outros problemas são decorrentes do uso indiscriminado de acaricidas químicos, como a poluição do ambiente e intoxicação de animais e humanos^{53, 54}. Outro fator limitante para a realização do controle do carrapato dos bovinos deve-se a sua dinâmica populacional; estudos comprovam que em uma área infestada por este carrapato, apenas 5% da população encontra-se parasitando o hospedeiro, sendo estes os estágios de larva em alimentação, ninfas e adultos^{22, 38} (Figura 4). Os outros 95% estão vivendo no ambiente, sendo composto por larvas não-infestantes e infestantes, fêmeas em período de pré-oviposição ou em oviposição, e ovos em incubação^{22, 38} (Figura 4).

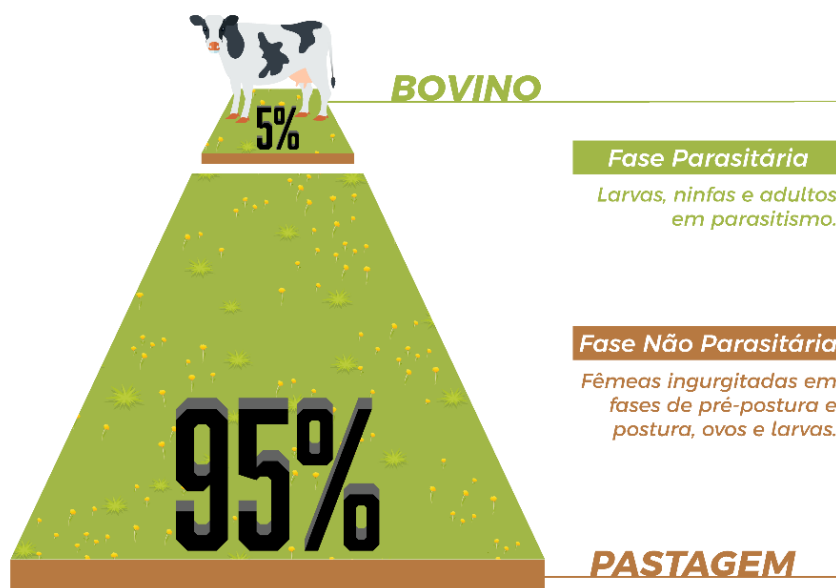


Figura 4. Representação gráfica da dinâmica populacional de *Rhipicephalus microplus* e os estágios que compõem cada fase do ciclo biológico. Fonte: Arquivo próprio.

Apesar da maior parte da população de *R. microplus* estar presente na pastagem, o seu controle atualmente vem sendo realizado exclusivamente com enfoque em reduzir a população que está parasitando o hospedeiro²³. Este método de controle direcionado somente a uma fase do ciclo do carrapato torna-se um grande gargalo no seu controle efetivo, pois desta forma a infestação de *R. microplus* pode ocorrer de forma contínua, visto que o hospedeiro já infestado, ao ser solto em um pasto infestado (ausente de tratamento), pode reinfestar-se com novas larvas ao mesmo tempo em que fêmeas ingurgitadas (presentes em seu corpo) estão caindo ao solo, tornando assim o ciclo deste ectoparasito contínuo anualmente⁵⁵. Novas alternativas de controle que visam controlar o carrapato na fase não parasitária ou parasitária vêm sendo estudadas; entre elas, pode-se citar a utilização de vacinas, uso de metabólitos de plantas (primários ou secundários) e o controle biológico por meio da utilização de organismos artropodopatogênicos, como predadores, parasitos e patógenos^{56, 57}.

2.3 Controle biológico e suas vertentes

O controle biológico é um processo definido como a utilização de qualquer organismo vivo (predadores, parasitos ou patógenos) com finalidade de reduzir, controlar ou

suprimir populações específicas de artrópodes que sejam prejudiciais e que podem tornar-se pragas⁵⁸. Quatro estratégias são empregadas para possibilitar a ação desses inimigos naturais dentro do controle biológico: 1) importação ou controle clássico, ocorre por meio da inserção de um antagonista natural em uma área em que a espécie invasora é exótica; 2) aumentativo, realizado pelo aumento da população existente de entomopatógenos no ambiente, de forma a limitar ou diminuir a população do artrópode-praga; 3) conservação, realizada por meio de modificações no manejo da área estudada visando viabilizar a permanência do inimigo natural; 4) aplicação de pesticidas biológicos, que consiste na utilização de produtos comerciais à base de entomopatógenos no ambiente em que o artrópode-alvo se encontra^{59, 60}. Todas as quatro formas de aplicação são inofensivas para humanos e outros vertebrados⁶⁰.

O sucesso da aplicação está intrinsecamente ligado ao conhecimento detalhado de diversas variáveis, como o organismo natural patogênico para a praga em questão, sua densidade populacional e a biologia de ambos (antagonista e artrópode-alvo); estes conhecimentos somados possibilitam o uso efetivo do controle biológico⁶⁰. Este processo pode se tornar permanente assim que utilizado, devido ao estabelecimento do inimigo na população e possível proteção de longo prazo contra as espécies pragas⁶¹. Além de apresentar algumas vantagens quando comparado ao controle químico, como a dificuldade dos artrópodes em desenvolver resistência aos organismos utilizados para controle, o método biológico de controle não polue o ambiente e é inócuo aos animais vertebrados⁷.

Parte do controle biológico, o controle microbiano é uma área em ascensão no âmbito da patologia de invertebrados, ciência com enfoque em enfermidades que acometem artrópodes e são ocasionadas principalmente por vírus, bactérias, nematoides e fungos entomopatogênicos⁶². Este processo se resume em utilizar patógenos como ferramenta para suprimir populações de artrópodes pragas. Para isso, é necessário identificar patógenos capazes de causar infecção e conseqüentemente morte à espécie alvo, além de buscar metodologias eficazes para a estabilização do propágulo, armazenamento sem perda de viabilidade e desenvolvimento de métodos de produção e distribuição economicamente viáveis⁶⁰.

2.4 Controle biológico de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos

Diversos programas para controle de artrópodes em campo têm utilizado fungos entomopatogênicos como antagonistas de artrópodes-pragas. No Brasil, o controle microbiano com fungos entomopatogênicos é amplamente empregado, sobretudo para controle de pragas

agrícolas, sendo *Metarhizium anisopliae* s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae) e *Beauveria bassiana* s.l. (Hypocreales: Cordycipitaceae) as espécies mais utilizadas⁶³. Entretanto, os fungos entomopatogênicos possuem capacidade de infectar e causar doenças não somente em artrópodes de importância agrícola, mas também são capazes de causar doenças em artrópodes de importância médica e veterinária^{57, 64}.

Os fungos entomopatogênicos são organismos eucariontes, heterotróficos, que podem ser uni ou multicelulares, e reproduzem de forma sexuada ou assexuada⁸. Na natureza, estes fungos podem ser encontrados parasitando artrópodes, habitando o solo, e no interior de plantas devido sua capacidade endofítica⁶⁵. Pertencem ao reino Fungi e estão distribuídos em dez filos; possui destaque o filo Entomophthoromycota, composto por 280 espécies, e Ascomycota com 64.000 espécies^{66, 67}, sendo este último responsável por aproximadamente 80% das doenças em artrópodes⁷. Entre os patógenos de artrópodes, os fungos entomopatogênicos destacam-se em programas de controle biológico, sendo capazes de aderir e infectar o hospedeiro através de sua cutícula externa^{8, 68}.

Os esporos produzidos de forma assexuada (conidiogênese), também chamados de conídios, são estruturas capazes de iniciar a infecção fúngica nos artrópodes^{8, 68}. O processo de infecção inicia-se com a adesão dos conídios à cutícula do artrópode por meio de interações eletrostáticas⁶⁹; após a adesão, ocorre o desenvolvimento do tubo germinativo e, logo após, ocorre a formação de uma estrutura de penetração denominada apressório¹². Para conseguir romper a principal barreira do hospedeiro, o fungo necessita utilizar mecanismos enzimáticos e mecânicos¹². Uma vez que o fungo realiza com sucesso a penetração através da cutícula e chega à hemocele, passa a desenvolver-se sob a forma de corpos hifais, passando a colonizar o corpo do artrópode^{70, 71}. Após colonizar, o fungo pode matar o hospedeiro por danos acometidos pelo desenvolvimento das hifas em seu interior, inanição (consumo dos nutrientes necessários à sobrevivência do artrópode) e intoxicação⁷². Caso ocorra a morte do hospedeiro, o fungo se exterioriza sob condições apropriadas de temperatura e umidade. No ambiente externo ao hospedeiro, inicia-se o processo de conidiogênese, resultando na produção de novos conídios e reiniciando o ciclo do patógeno^{73, 74} (Figura 5).

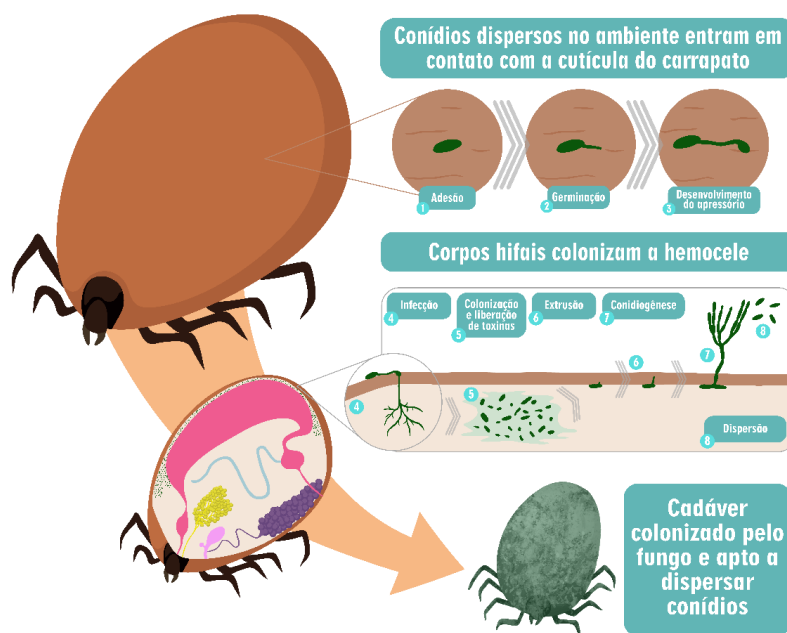


Figura 5. Ciclo biológico de fungos entomopatogênicos pertencentes a ordem Hypocreales em fêmea ingurgitada de carrapato da família Ixodidae.

Fonte: Artur Franco.

Diversos estudos reportam a eficácia destes entomopatógenos contra carrapatos em laboratório, utilizando diferentes propágulos dos fungos entomopatogênicos^{9, 16}. Entretanto, apesar da eficácia em laboratório ser comprovada, sob condições ideais para o desenvolvimento fúngico, condições climáticas frequentemente encontradas no campo podem reduzir sua eficácia no controle biológico de pragas. Nesta área, é necessário estabelecer formulações que permitam aos propágulos resistir aos efeitos abióticos extremos⁷⁵. Estes limitantes são descritos como condições ambientais climáticas ou não-climáticas, responsáveis por reduzir a eficácia dos entomopatógenos em campo^{15, 76}, tais como: radiação ultravioleta, altas temperaturas e baixa umidade relativa. Estes diferentes fatores de estresse podem impactar diretamente no desenvolvimento, na viabilidade e na virulência dos microrganismos para o controle dos artrópodes-pragas⁷⁶⁻⁷⁹, por ocasionarem danos celulares, interferindo em funções essenciais dos microrganismos⁸⁰.

A formulação é responsável por facilitar a aplicação e proteger o propágulo contra fatores abióticos que podem inviabilizá-lo⁶³, propiciando a mistura de um ativo (propágulos do fungo) com adjuvantes, visando melhorar sua distribuição, estabilização e armazenamento.

Diferentes formulações contendo propágulos fúngicos vêm sendo estudadas para viabilizar o controle de carrapatos. Trabalhos utilizando conídios de *M. anisopliae* s.l. formulados em água com polissorbato 80 (Tween 80[®]), que possui a função de dissipar os conídios hidrofóbicos, foram as primeiras formulações a despertar o interesse de pesquisadores.

Benjamin et al.⁸¹ realizaram um tratamento via aspersão de um bioproduto a base de *Metarhizium anisopliae* ESC 1 formulado em água sobre vegetação infestada artificialmente com adultos de *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) e após 6 dias de tratamento os carrapatos foram coletados e a mortalidade avaliada durante 4 semanas, obtendo no final deste período uma redução da população superior a 50%. Tratamentos consecutivos por aspersão contendo suspensão aquosa de *M. anisopliae* ESALQ 959 para o controle de larvas de *R. microplus* adicionadas artificialmente na vegetação foram realizados por Bittencourt et al.⁸² após a primeira aplicação o percentual de eficácia obtido foi de 17,42%, após a segunda 52,26% e na última aplicação 53,78%. Garcia et al.⁸³ realizaram aspersão de conídios de *M. anisopliae* E9 sobre vegetação naturalmente infestada com larvas de *R. microplus*, entretanto, o tratamento não foi eficaz em reduzir a população ambiental de larvas.

Embora haja resultados positivos na utilização de suspensões aquosas nos ensaios com carrapatos, estudos vêm demonstrando que conídios quando formulados em óleo apresentam resultados mais promissores quando comparados aos formulados em água^{79, 84}. Camargo et al.⁸⁵ avaliaram o efeito de conídios do bioproduto Metarril[®] SP Organic (isolados ESALQ 1037 e ESALQ E9) formulado em 10% de óleo mineral sobre todas as fases parasitárias de *R. microplus* em bovinos estabulados infestados artificialmente, e reportaram eficácia média de 47,74% em relação ao grupo controle água e de 40,89% em relação ao controle óleo. Outro estudo realizado por Camargo et al.⁸⁶ realizaram o tratamento por aspersão sobre bovinos a campo infestados naturalmente utilizando o mesmo bioproduto a base de conídios de *M. anisopliae* formulados em 10% de óleo mineral com adição de 1% de Tween 80[®] para controle de todas as formas parasitárias de *R. microplus*, obtendo após 24 dias do primeiro tratamento, eficácia média de 75,09% quando comparado ao grupo controle água, e eficácia de 46,59% em relação ao grupo controle óleo.

Outra formulação estudada para o controle de carrapatos utiliza gel polimerizado de celulose como veículo. Souza et al.⁸⁷ aplicou no pavilhão auricular de equídeos, a formulação de conídios de *B. bassiana* em gel e obteve redução dos diferentes estágios em até 80%, enquanto no grupo controle água ou gel puro a redução observada foi menor que 10%. Nestas pesquisas, a utilização destas tecnologias (Tween 80[®]; emulsão óleo-água e gel

polimerizado) possibilitou a obtenção de resultados positivos para a redução da população de carrapatos. Outras tecnologias estão disponíveis para formular os propágulos fúngicos, sendo elas: a) pó molhável, quando adicionado à água, forma-se uma suspensão aquosa contendo o ativo, aplicado por pulverização; b) iscas, neste tipo de formulação um atrativo é inserido de modo que ocorra a ingestão do ativo pelo artrópode-alvo; c) suspensão emulsionável, composta pelo ativo, um composto oleoso e um emulsificante, pronto para uso após diluição em água; d) grânulos, formas sólidas multiparticuladas com distribuição parcialmente uniforme que contém o ativo aderido a um transportador inerte ou com propriedades que favorecem a conidiogênese, podendo ser utilizado pelo fungo como fonte nutritiva^{88, 89}.

Faria e Wraight⁸⁹ relatam que 62,7% dos produtos biológicos disponíveis no mercado mundial que utilizam fungo como ativo são à base de esporos assexuais, e destes 41,2% são baseados exclusivamente em conídios. Outro propágulo fúngico que também merece destaque são os blastosporos, estruturas análogas aos corpos hifais encontrados naturalmente na hemocele dos artrópodes durante o processo de infecção¹⁶. Estes, possuem características que tornam sua utilização promissora no biocontrole de artrópodes: são capazes de induzir patologias em invertebrados e necessitam de menos tempo para iniciar o processo de infecção quando comparados com conídios; além disso, possuem menor custo de produção e tempo para produção em larga escala. Entretanto, apesar de não serem estruturas de resistência, formulações adequadas podem protegê-los contra fatores abióticos, além de melhorar sua eficácia em bioprodutos^{16, 90-92}. O mesmo estudo de Faria & Wraight⁸⁹ citou que apenas 4,1% dos micoinseticidas registrados no mundo são baseados exclusivamente em blastosporos. Levantamentos mais recentes mostram que no Brasil existem atualmente 82 bioprodutos registrados a base de entomopatógenos, e que 60% destes possuem propágulos de fungos como bioativo, 29% de bactérias, 10% de baculovírus e 1% de nematoides²⁴. Para o controle de ácaros e carrapatos, 28 pesticidas biológicos estão disponíveis no mercado mundial, entretanto no Brasil não existem produtos registrados para esta finalidade^{24, 89}.

Algumas espécies de fungos quando cultivadas em meio líquido específico com relação carbono nitrogênio (C:N) de 30:1 produzem agregados de hifas melanizadas, estruturas que são mais resistentes a dessecação, denominadas de microescleródios⁹³. Estes propágulos possuem reserva própria de nutrientes e, quando expostos às condições climáticas favoráveis, são capazes de produzir conídios a partir de suas hifas. Por esta característica em especial, tornou-se um candidato promissor para ser utilizado em testes para controle de artrópodes que possuem alguma fase de vida no solo⁹⁴. Visto que o solo é um ambiente favorável para o

desenvolvimento fúngico, uma vez que encontra condições amenas de temperatura e umidade devido à presença da vegetação⁹³.

Resultados positivos vêm sendo apresentados com a utilização de formulação granular contendo microescleródios para o controle de carrapatos. Behle et al.⁹⁴ avaliaram em laboratório a eficácia de formulação granular contendo microescleródios de *M. brunneum* para controle de ninfas não-alimentadas e alimentadas de *Ixodes scapularis* e obtiveram eficácia do tratamento de 56% (ninfa não alimentada) e 72% (ninfa alimentada). Assim, a utilização de grânulos torna-se uma estratégia ideal para controlar as fases de vida livre do ciclo do carrapato dos bovinos, uma vez que no ambiente estão presentes os estágios de larvas não-infestantes e infestantes, fêmeas em período de pré-oviposição, em oviposição e ovos em incubação. Os grânulos quando aplicados em ambientes com umidade e temperatura ideais, formam uma zona infectante contendo diversos focos compostos por conídios produzidos a partir dos microescleródios e, desta forma, quando qualquer estágio móvel passar, uma quantidade suficiente de conídios poderá aderir à sua cutícula e iniciar o processo de infecção^{88, 94}.

Mediante a esta perspectiva, a escolha de cada propágulo para testes em condições de campo e semi-campo deve ser baseada em conhecimentos prévios sobre a susceptibilidade do hospedeiro ao isolado/propágulo, sua virulência, e da suscetibilidade destes às condições ambientais.

2.5 Controle biológico de carrapatos utilizando nematoides entomopatogênicos

Nematoides entomopatogênicos são organismos multicelulares que possuem habilidade de parasitar e causar morte em diferentes artrópodes que tenham pelo menos uma etapa de seu ciclo biológico no solo^{10, 95}. Eles pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea) e são classificados em duas famílias: Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar, 1976. A primeira família é composta por dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinerema* Nguyen & Smart, 1994, enquanto a segunda família é formada pelo gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976.

Os nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* possuem, em seu interior, bactérias simbiontes dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente^{96, 97}. Uma vez que os juvenis infectantes de terceiro estágio (forma infectante) penetram o organismo do hospedeiro via aberturas naturais (abertura oral, ânus e espiráculos) ou por penetração ativa através da cutícula (realizada somente por alguns representantes do gênero *Heterorhabditis*⁹⁸),

liberam as bactérias que inicialmente produzem compostos com ação antifúngica e antibiótica, impedindo a competição por nutrientes com outros microrganismos^{99, 100}. Logo após sua dispersão e multiplicação, estas bactérias causam, por meio da ação de toxinas, a morte do hospedeiro^{13, 14, 101}.

Em relação as fases de vida dos nematoides entomopatogênicos, existem três fases distintas: ovo, juvenis (J1, J2, J3 e J4) e os adultos (fêmeas, machos e em alguns casos, hermafroditas)^{101, 102}. O ciclo em insetos inicia-se com a penetração dos juvenis infectantes (JIs) de terceiro estágio (J3), que ocorre através das aberturas naturais do hospedeiro ou de sua cutícula. Os JIs capazes de encontrar os hospedeiros por meio de diferentes mecanismos, como: identificação de produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura¹⁴. Após localizarem o hospedeiro, penetram e alcançam a hemocele do artrópode. Uma vez sendo bem sucedidos, os JIs liberam as bactérias presentes em seu trato alimentar, que se multiplicam e juntamente com os nematoides contribuem para sobrecarregar o sistema imunológico do inseto e, desta forma, levando-o a morte⁷⁶. Em seguida, os JIs se alimentam de tecidos e conseqüentemente das bactérias, após um tempo sofrem muda e tornam-se J4 que darão origem aos adultos hermafroditas (primeira geração). O adulto irá reproduzir e dar origem as próximas gerações; assim, estes nematoides podem completar duas a três gerações no interior do artrópode. Quando os nutrientes se extinguem, os J3 recentes (JIs) contendo as bactérias deixam o cadáver e buscam novos hospedeiros^{11, 101} (Figura 6-A). Entretanto, quando a penetração acontece nos carrapatos, ela pode ocorrer pelas duas vias: direta e indireta, mas não há produção de progênie (Figura 6-B). Alguns estudos reportam que após alcançar a hemolinfa do carrapato, os juvenis liberam as bactérias simbiotes, mas por motivos ainda desconhecidos, morrem¹⁰³.

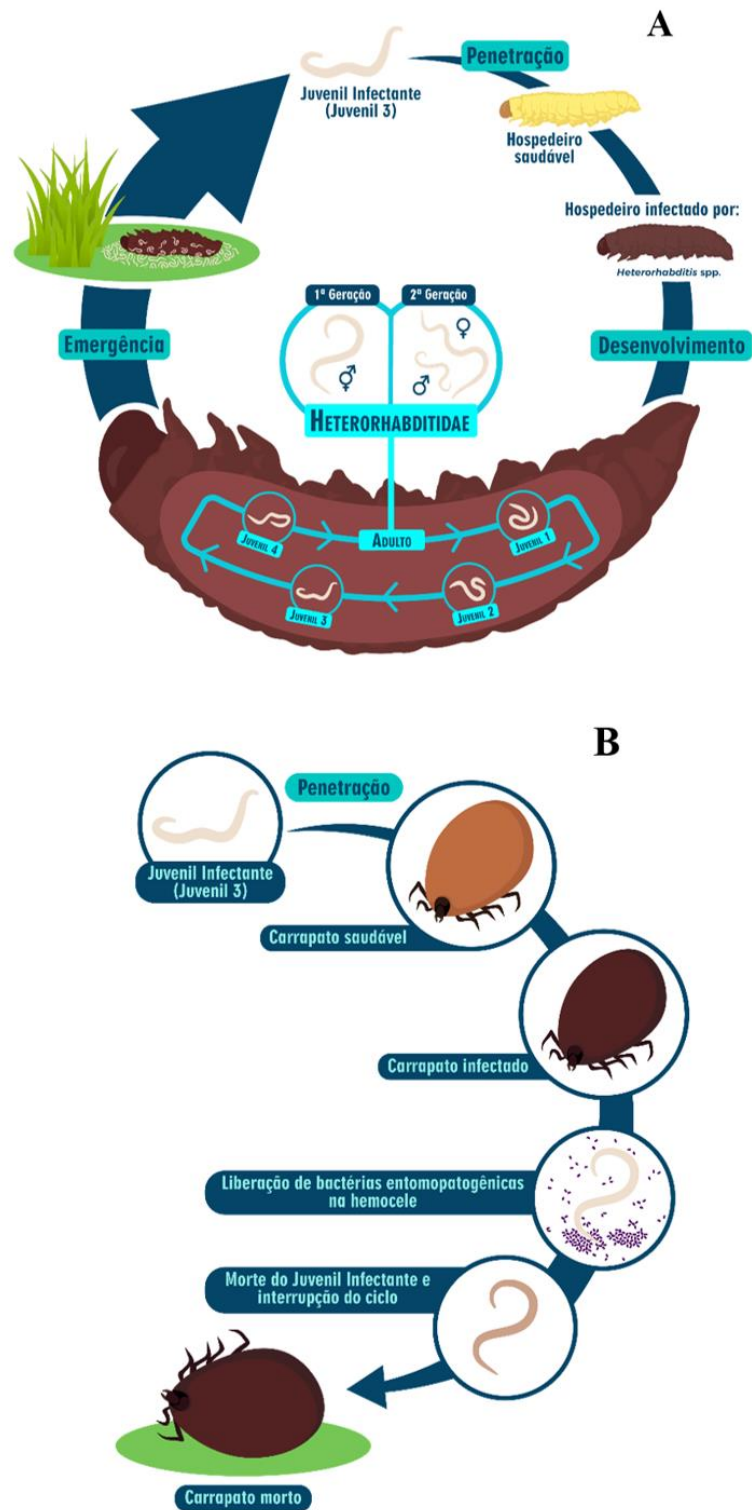


Figura 6. Ciclo biológico de nematoides entomopatogênicos pertencente à família Heterorhabditidae em larvas de *Galleria mellonella* L. (A) ou em fêmea ingurgitada da família Ixodidae (B). Fonte: Artur Franco.

Entre as diversas espécies de nematoides entomopatogênicos, três comportamentos para realizar a busca por hospedeiros susceptíveis são conhecidos, sendo eles categorizados em: 1) cruzador, realizam busca ativa pelo hospedeiro no ambiente, realizando pausas curtas para escaneamento; 2) emboscador, permanece no ambiente realizando nictação, comportamento de erguer o corpo apoiado sobre a porção posterior no substrato, de modo que a porção anterior permaneça livre “escaneando”, e quando o hospedeiro é detectado, “salta” em sua direção; 3) mistos, podem realizar busca ativa pelo hospedeiro ou realizar reconhecimento do ambiente por nictação^{13, 102, 104, 105}.

Sabe-se atualmente que a infecção por estes entomopatógenos ocorre em dezesseis espécies de ixodídeos e três de argasídeos^{54, 106, 107}. Entre os diferentes estágios dos carrapatos, os mais suscetíveis para a infecção são as fêmeas ingurgitadas, seguidas pelos adultos não ingurgitados; por outro lado, ninfas são um pouco resistentes, enquanto larvas são mais resistentes que as ninfas e ovos são totalmente resistentes^{54, 108, 109}. A utilização de nematoides entomopatogênicos para o controle do carrapato dos bovinos vem sendo bastante estudada; até o presente momento, 11 isolados foram testados, sendo cinco do gênero *Steirnermema* e seis do gênero *Heterorhabditis*¹¹⁰. Destes nematoides testados, os do gênero *Heterorhabditis* são os que apresentam melhor eficácia¹¹⁰. Monteiro et al.¹⁷ avaliaram em condições controladas a eficácia do nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 em reduzir os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e concluíram que este isolado tem alto potencial para reduzir diferentes parâmetros biológicos das fêmeas, além de promover percentuais de controle superiores a de outros isolados do gênero *Heterorhabditis* e *Steirnermema*. Outro estudo desenvolvido por Monteiro et al.¹⁸ complementou os resultados obtidos no estudo anterior, e verificou o tempo necessário para maior efetividade na redução dos parâmetros biológicos das fêmeas em condições laboratoriais e concluiu que 24 horas de exposição são necessárias para obter eficácia significativa.

Apesar de diversos resultados promissores, especialmente em condições laboratoriais, assim como os fungos entomopatogênicos, os nematoides também podem ser prejudicados pela exposição prolongada a fatores abióticos extremos, como: temperatura, radiação ultravioleta, umidade relativa e pH do solo¹⁰. Para diminuir esse efeito, formulações adequadas podem permitir o uso efetivo desta ferramenta de controle no campo²⁰. A utilização da formulação inseto cadáver (larvas de insetos infectadas com nematoides entomopatogênicos) tornou-se uma abordagem efetiva, econômica e simples quando comparada com outras formas de tratamento comumente utilizadas no campo, como as aplicações de JIs formulados em água,

realizada por meio de sistemas de irrigação ou uso de pulverizadores^{111, 112}. Juvenis infectantes provenientes destes cadáveres infectados apresentam maior capacidade dispersiva, virulência e sobrevivência no solo do que os formulados em água^{111, 112}. A aplicação da formulação inseto cadáver em ambientes com coberturas vegetais (por exemplo, pastagens) fornecem um microclima adequado para a sobrevivência dos JIs, conferindo proteção contra fatores abióticos estressantes¹¹³.

Trabalhos recentes demonstram a eficácia de nematoides formulados em inseto cadáver para controlar fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições controladas ou de semi-campo. Monteiro et al.¹⁰⁶ avaliaram o efeito de nematoides formulados em inseto cadáver (*H. bacteriophora* HP88, *Heterorhabditis indica* LPP1, *Steinernema feltiae* SN, e *S. carpocapsae* ALL) em condições controladas contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e concluíram que os nematoides veiculados em formulação inseto cadáver são eficazes contra as fêmeas, com destaque para os nematoides do gênero *Heterorhabditis* que foram os mais eficazes. Monteiro et al.²⁰ avaliaram a eficácia de quatro espécies de *Heterorhabditis* (*H. bacteriophora* HP88, *H. baujardi* LPP7, *H. indica* LPP1 e *H. bacteriophora* LPP30) contra este estágio da fase não parasitária de *R. microplus* em potes contendo *Urochloa decumbens*. Dentre os isolados testados, os mais eficazes foram *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7; no dia 12 pós-tratamento, a mortalidade das fêmeas ingurgitadas atingiu 90% ou 74%, e a postura de ovos também foi reduzida em 97,2 e 91,9%, respectivamente.

Além das limitações quando expostos a fatores abióticos adversos, os entomopatógenos ao serem utilizados como ferramenta de controle em ambientes voltados para setores como agricultura e pecuária podem enfrentar outros limitantes, como sua combinação involuntária com diferentes produtos químicos utilizados para a mesma finalidade¹¹⁴. Somadas a estas adversidades, a presença de outros entomopatógenos também pode proporcionar efeitos a essa combinação, sendo eles aditivo, sinérgico ou antagônico^{28, 29, 115}.

O efeito aditivo ocorre quando os agentes combinados atuam independentemente um do outro, em outras palavras, não existe interação entre eles¹¹⁶. Já o sinergismo ocorre quando a soma dos efeitos da combinação de dois agentes é superior aos efeitos individuais quando estes atuam sozinhos, a eficácia de um efeito sinérgico será maior do que a obtida em um efeito aditivo¹¹⁶. Antagonismo entre dois agentes ocorre quando a sua interação possui uma eficácia menor do que a obtida em um efeito aditivo, ocorrendo uma reação antagônica entre eles, reduzindo a eficácia de sua combinação¹¹⁶. Diversos fatores influenciam essas interações, como o artrópode hospedeiro, as espécies dos agentes que serão combinados, além da

quantidade de agentes utilizada e o tempo de aplicação dos agentes^{28, 29, 115}. Entretanto, os processos que induzem o sinergismo entre diferentes agentes de biocontrole, não são bem conhecidos; supõe-se que um dos agentes atue como um fator estressante. No caso da combinação entre fungos e nematoides entomopatogênicos, o fungo atuaria como o estressor debilitando o hospedeiro; desta forma, tornando o hospedeiro mais suscetível a infecção pelos nematoides^{28, 29}.

Alguns atributos dos nematoides entomopatogênicos os tornam potenciais biocontroladores de artrópodes: sua produção possui metodologia barata e simples de ser executada, sendo necessário apenas um hospedeiro susceptível ou meio de cultura adequado. Sua fácil aplicação em campo é de simples execução, seja por aplicações de suspensões aquosas ou formulação inseto cadáver, não necessitando de ferramentas específicas ou onerosas para ser realizada. Ao ser aplicado no campo, o próprio microrganismo realiza a busca ativa pelo hospedeiro, no caso o artrópode-praga, além de possuir compatibilidade com outros microrganismos e diferentes pesticidas, alta especificidade, e por não ser capaz de infectar vertebrados^{13, 102}.

2.6 Estudos da combinação de nematoides e fungos entomopatogênicos para controle de artrópodes

A utilização de fungos entomopatogênicos com o propósito de controlar pragas é uma técnica relativamente antiga quando comparada com a utilização de nematoides³¹. O primeiro relato do uso de fungo como antagonista de insetos foi em meados dos anos 1800, já a comercialização deste organismo como um micoinseticida é datada por volta do ano de 1960¹¹⁵. A utilização de nematoides entomopatogênicos para o mesmo propósito vem sendo cada vez mais estudada, com alguns casos de sucesso quando aplicados em programas de controle biológico de pragas¹¹⁷. Entretanto, pouca atenção vem sendo designada ao estudo da combinação destes entomopatógenos para controle de artrópodes¹¹⁸. Atualmente, a maioria dos estudos que investigou a combinação de fungos e nematoides entomopatogênicos para o controle de artrópodes foi realizada com insetos pertencentes as ordens Coleoptera e Lepidoptera^{26, 29, 119-121}.

De forma a aumentar a eficácia do controle biológico de pragas utilizando a combinação de fungos e nematoides entomopatogênicos, estudos com estes entomopatógenos combinados para o controle de diferentes ordens de insetos vem sendo reportados. Ansari et al.²⁸ em ensaios realizados em condições controladas ou em casa de vegetação observaram

efeitos aditivos ou sinérgicos da combinação de *M. anisopliae* CLO 53 com *H. megidis* VBM30 ou *Steinernema glaseri* NC sobre o besouro *Hoplia philanthus* Fuesslin, 1775 (Coleoptera: Scarabaeidae). Em condições controladas, Shapiro et al.¹²² investigaram a combinação de *H. indica* ou *S. carpocapsae* com *M. anisopliae*, *B. bassiana* ou *Cordyceps fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) ou com a bactéria *Serratia marcescens* sobre o besouro *Curculio caryae* Horn, 1873 (Coleoptera: Curculionidae), e obteve antagonismo em todas as combinações de patógenos, exceto *H. indica* combinado com *M. anisopliae* ou uma das concentrações de *S. carpocapsae* associadas ao fungo ou a bactéria, para os quais foram observados efeitos aditivos.

Complementando os estudos anteriores realizados em condições controladas e em casa de vegetação, Ansari et al.²⁹ avaliaram em condições de campo a eficácia da combinação de *M. anisopliae* CLO 53 ou formulação comercial de *H. bacteriophora* para reduzir a população ambiental de *H. philanthus*, os tratamentos combinados resultaram em efeitos aditivos ou sinérgicos, causando percentuais de controle superiores a 95% quando os nematoides foram aplicados quatro semanas após o fungo. Acevedo et al.³¹ investigaram, em condições controladas, a eficácia da combinação de *H. bacteriophora* JPM4 com *M. anisopliae* (isolados LPP45 ou LPP39) sobre a broca-da-cana *Diatraea saccharalis* Fabricius 1794 (Lepidoptera: Pyralidae) e observaram que quando os nematoides foram combinados com o isolado fúngico de menor virulência o tempo necessário para matar 50% (TL₅₀) e 90% da população (TL₉₀) foram os menores obtidos, sendo 1,85 ou 2,85 dias, respectivamente. Entretanto, os autores concluíram que apesar da mortalidade ser mais rápida com este tipo de combinação (nematóide virulento e fungo com menor virulência), essa combinação ocasionou um efeito negativo sobre a reprodução dos mesmos. Ansari et al.³⁰ avaliaram a combinação de *H. bacteriophora*, *S. feltiae* e *Steinernema kraussei* Steiner, 1923 (Rhabditida: Steinernematidae) com *M. anisopliae* contra o besouro *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae) e obtiveram efeitos aditivos e sinérgicos nos ensaios realizados tanto em condições controladas quanto em casa de vegetação.

Ansari et al.¹²³ realizaram um estudo em condições de campo avaliando a influência de diferentes métodos de aplicação, combinações e dosagens de produtos comerciais à base de *M. brunneum* Met52[®] (=F52), *H. bacteriophora* (Nematop[®]), *S. kraussei* (Nemasys[®]) e um inseticida a base de organofosforado (Cyren[®]) para o controle do besouro *O. sulcatus*, observaram que independente do método investigado, as dosagens mais elevadas, associadas ou não, causaram os maiores índices de mortalidade do besouro, com percentuais de controle

alcançando 100% quando *S. kraussei* e Met52[®] foram combinados. Shairra et al.¹²⁴ realizaram um estudo em condições controladas para avaliar a eficácia da combinação de *H. bacteriophora* HP88 e *Steinernema riobrave* com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* sobre larvas de terceiro ínstar de *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 (Lepidoptera: Noctuidae) e os melhores resultados obtidos pelas combinações de *B. bassiana* + HP88 e *M. anisopliae* + *S. riobrave* mostraram que quanto maior a concentração de esporos ou juvenis infectantes maior a mortalidade larval. Correa-Cuadros et al.¹²⁵ avaliaram em condições controladas o efeito da combinação de *M. anisopliae* Ma9236 e *B. bassiana* Bb9205 com *H. bacteriophora* HNI0100 sobre *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Plutellidae), e observaram efeito antagônico desta interação nos dias 0, 2 e 4 pós-tratamento, enquanto no dia 6, efeito sinérgico foi observado nos tratamentos com *B. bassiana* + *H. bacteriophora* e *M. anisopliae* + *H. bacteriophora*, com percentuais de controle de 85% e 65%, respectivamente.

Em condições laboratoriais, Wakil et al.²⁵ estudaram o efeito da aplicação isolada ou combinada de *M. anisopliae* WG-02 e *B. bassiana* WG-11 com *H. bacteriophora* sobre diferentes ínstares larvais de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) aplicados simultaneamente ou após 1 ou 2 semanas pós tratamento fúngico e observaram efeito aditivo ou sinérgico em todos os tratamentos combinados independente dos diferentes tempos de exposição, sendo os maiores graus de sinergismo obtidos sobre as larvas de menores ínstares utilizando o tratamento combinado de *B. bassiana* + *H. bacteriophora*. Em ensaios a campo, Mc Namara et al.¹²⁶ avaliaram a eficácia de um bioproduto composto por *M. brunneum* Met52[®] (=F52), *B. bassiana*, *Beauveria caledonica* 2c7b combinados com *S. carpocapsae* EN03 ou *Heterorhabditis downesi* K122 sobre o besouro *Hylobius abietis* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Curculionidae) e quando aplicados em sub-doses as combinações de *M. brunneum* + *S. carpocapsae*, *M. brunneum* + *H. downesi* e *B. caledonica* + *H. downesi* obtiveram efeito aditivo, com percentuais de controle de 58, 93 e 86%, respectivamente.

Entretanto, pouca atenção vem sendo designada ao estudo da combinação destes entomopatógenos para controle de carrapatos. Monteiro et al. destacam 23 trabalhos realizados em condições de campo ou semi-campo reportando a eficácia de diferentes formulações contendo fungos entomopatogênicos para controlar diferentes estágios de vida de carrapatos seja na fase não-parasitária ou parasitária (Monteiro et al., dados não publicados). Em relação aos nematoides entomopatogênicos, Monteiro et al. reportam 10 trabalhos realizados em condições de campo e semi-campo utilizando diferentes espécies formuladas ou não para o controle de carrapatos (Monteiro et al., dados não publicados). Em relação aos estudos

utilizando a combinação de entomopatógenos para o controle de carrapatos, alguns autores reportam esta combinação como promissora, visto que os estágios imaturos dos carrapatos são mais suscetíveis a infecções causadas por fungos, enquanto os adultos são mais suscetíveis a infecções causadas por nematoides^{127, 128}.

O Brasil possui atualmente 82 bioprodutos registrados para o controle de artrópodes-praga, entre eles 60% é composto por fungos e apenas 1% por nematoides; no entanto, nenhum destes bioprodutos está registrado para controle de carrapatos²⁴. O biocontrole de *R. microplus* é basicamente estudado com formulações de conídios voltadas para as fases parasitárias^{85, 86}. Em condições de semi-campo, novas tecnologias vindo sendo testadas para aprimorar o controle de carrapatos em sua fase não-parasitária; como a utilização de formulações granulares ou peletizadas, que podem abrir novas possibilidades para o controle em larga escala em pastagens²⁴. Até o presente momento somente dois trabalhos em laboratório foram realizados investigando a o efeito desta combinação de fungos e nematoides entomopatogênicos sobre *R. microplus*. Monteiro et al.³² avaliaram em condições controladas a eficácia da combinação de *M. anisopliae* s.l. IBCB 116 e *B. bassiana* ESALQ 986 com *H. bacteriophora* HP88 ou *H. indica* LPP1 em reduzir os parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e observaram efeitos aditivos nos grupos combinados, com percentuais de controle superiores a 90% nos grupos tratados apenas com nematoides ou nos grupos combinados. Golo et al.¹²⁹ detectaram alterações no perfil proteico de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com a combinação de *M. anisopliae* s.l. IBCB 116 e o nematoide *H. indica* LPP1.

Sendo assim, o presente estudo apresenta uma avaliação desta combinação, além de trazer novas informações sobre a interação nematoides-carrapatos e sobre o controle de carrapatos em condições de campo. Mediante as prerrogativas apresentadas, torna-se de fundamental importância o estudo das associações de diferentes entomopatógenos para o controle biológico de carrapatos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a eficácia de fungos e nematoides entomopatogênicos, combinados ou não, contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em ensaios laboratoriais ou de campo.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a eficácia de *H. bacteriophora* HP88 sobre fêmeas ingurgitadas apresentando diferentes níveis de ingurgitamento;
- Determinar a eficácia de *H. bacteriophora* HP88 sobre fêmeas ingurgitadas provenientes de diferentes populações;
- Determinar a eficácia de *H. bacteriophora* HP88 formulados em cadáveres de *T. molitor* em reduzir a população não parasitária de *R. microplus* presente em pastagens artificialmente infestadas, em condições de campo;
- Determinar uma combinação prospectiva entre *Metarhizium* spp. e *H. bacteriophora* HP88 em condições laboratoriais;
- Determinar uma formulação multiparticulada contendo microescleródios de *M. robertsii* IP 146 eficaz em produzir conídios em condições adversas;
- Determinar em diferentes condições climáticas (chuva ou seca) a eficácia da combinação de formulação multiparticulada de microescleródios de *M. robertsii* IP 146 e juvenis infectantes (terceiro estágio) de *H. bacteriophora* HP88 sobre população não parasitária de *R. microplus* presente em pastagens artificialmente infestadas, em condições de campo;
- Determinar a persistência do nematoide e do fungo no solo no experimento de campo.

4. REFERÊNCIAS

1. Cruz BC, Mendes AFL, Maciel WG, Santos IB, Gomes LVC, Felippelli G, et al. Biological parameters for *Rhipicephalus microplus* in the field and laboratory and estimation of its annual number of generations in a tropical region. *Parasitology Research*. 2020;119(8):2421-30.
2. Higa, SLO, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 2016;25:1 63–171
3. Nicholson, L. W, Sonenshine DE, Noden BH, Brown RN. Ticks (Ixodida). In: Mullen GR, Durden LA, editors. *Medical and veterinary entomology*: Academic Press; 2019. p. 792.
4. Lovis L, Reggi J, Berggoetz M, Betschart B, Sager H. Determination of Acaricide Resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Field Populations of Argentina, South Africa, and Australia with the Larval Tarsal Test. 2013.
5. Mendes EC, Mendes MC, Sato ME. Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. *Experimental and Applied Acarology*. 2013;61(3):357-69.
6. Vudriko P, Okwee-Acai J, Tayebwa DS, Byaruhanga J, Kakooza S, Wampande E, et al. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. *Parasites & Vectors*. 2016;9(1).
7. Alves SB. Fungos entomopatogênicos. In: Alves SB, editor. *Controle Microbiano de insetos*. Piracicaba - Brasil: Fealq; 1998. p. 289-382.
8. Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*2001. p. 23-70.
9. Kaaya G. Laboratory and Field Evaluation of Entomogenous Fungi for Tick Control. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;916.
10. Lacey LA, Georgis R. Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground With Comments on Commercial Production. *Journal of nematology*. 2012;44(2).
11. Dolinski C. Uso de entomopatogenic nematodes para o controle de pragas. In: Venzon M, Paula JR TJ, Pallini A, editors. *Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças*. 2006.
12. Arruda W, Lubeck I, Schrank A, Vainstein MH. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol*. 2005;37(3-4):231-44.

13. Grewal PS, Nardo EAB, Aguilera MM. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotrop entomol.* 2001;30(2):191-205.
14. Hazir S, Kaya HK, Stock SP, Keskin N. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turk J Biol.* 2003;27:181-202.
15. Fernandes EK, Bittencourt VR. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp Appl Acarol.* 2008;46(1-4):71-93.
16. Bernardo CC, Barreto LP, Silva CRS, Luz C, Arruda W, Fernandes ÉKK. Conidia and Blastospores of *Metarhizium* Spp. And *Beauveria Bassiana* s.l.: Their Development During the Infection Process and Virulence Against the Tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and tick-borne diseases.* 2018;9(5).
17. Monteiro CMO, Furlong J, Prata MCA, Soares AE, Batista ESP, Dolinski C. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology.* 2010;170:355-8.
18. Monteiro CMO, Prata MCA, Faza A, Batista ESP, Dolinski C, Furlong J. *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP88 for biological control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): the effects of different exposure times of engorged females to the nematodes. *Veterinary Parasitology.* 2012;185:364-7.
19. Marciano AF, Mascarin GM, Franco RFF, Golo PS, Jaronski ST, Fernandes ÉKK, et al. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. *Scientific Reports.* 2021;11(1).
20. Monteiro C, Coelho L, De Paula LGF, Fernandes ÉKK, Dolinski C, Bittencourt VREP, et al. Efficacy of entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulation against engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in semi-field conditions. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 2020;11(1).
21. Pereira MC, Labruna MB. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA MC, LABRUNA MB, SZABÓ MPJ, KLAFKE GM, editors. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência.* São Paulo: MEDVET; 2008. p. 15-56.
22. Powell RT, Reid TJ. Project tick control. *Queensl Agric J.* 1982;108:279-300.
23. Garcia MV, Rodrigues VS, Koller WW, Andreotti R. Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Andreotti R, Garcia MV, Koller WW, editors. *Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos.* Brasília: Embrapa; 2019. p. 17-27.
24. Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Í, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M. Current Status and Perspectives of Fungal Entomopathogens Used for Microbial Control of Arthropod Pests in Brazil. *Journal of invertebrate pathology.* 2019;165.

25. Wakil W, Yasin M, Shapiro-Ilan D. Effects of single and combined applications of entomopathogenic fungi and nematodes against *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Scientific Reports*. 2017;7:5971.
26. Dlamini BE, Malan AP, Addison P. Combined effect of entomopathogenic fungi and *Steinernema yirgalemense* against the banded fruit weevil, *Phlyctinus callosus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*. 2020:1-11.
27. Schmidt JM, Shapiro-Ilan DI, Graham C, Barwick S, Sparks A, Riley D. Entomopathogenic Nematodes and Fungi Virulence to *Cowpea Curculio* (Coleoptera: Curculionidae) Larvae. 2018.
28. Ansari MA, Tirry L, Moens M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biological control*. 2004;31(2):172-80.
29. Ansari MA, Shah FA, Tirry L, Moens M. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control*. 2006;39(3).
30. Ansari MA, Shah FA, Butt TM. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus*, control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2008;129:340-7.
31. Acevedo JPM, Samuels RI, Machado IR, Dolinski C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2007;96(2):187-92.
32. Monteiro CMO, Araújo LX, Matos RS, Golo PS, Angelo IC, Perinotto WMS, et al. Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 2013;112(10):3645-51.
33. Murrell A, Barker SC. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*. 2020;56(3):169-72.
34. Low VL, Tay ST, Kho KL, Koh FX, Tan TK, Lim YAL, et al. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasites & Vectors*. 2015;8(1):1-10.
35. Burger TD, Shao R, Barker SC. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, contains a cryptic species. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2014;76.
36. Gonzales JC. O controle do carrapato do boi. Porto Alegre 1995.
37. Brito LG, Netto FGS, Oliveira MCS, Barbieri FS. Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus*) In: Agropecuária EBP, editor. Embrapa Rondônia. 1ª ed. Rondônia: Embrapa; 1996. p. 1-21.

38. Pereira MC, Labruna MB. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: Medvet; 2008. p. 15-56.

39. Furlong J, Martins JRS, Prata MCA. Carrapatos: problemas e soluções. 1ª ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; 2005. 65 p.

40. Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Batesti DM. Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária. São Paulo: Plêiade/ FAPESP; 2001.

41. Furlong J, Prata MCA. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: Furlong J, editor. Carrapatos: problemas e soluções. 1ª ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; 2005. p. 9-20.

42. Pereira MC, Labruna MB. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: Medvet; 2008. p. 15-56.

43. Veríssimo CJ. Biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. <https://www.revistamvez-crmvspcombr/index.php/recmvz>. 2013;11:14-23.

44. Brovini CN, Furlong J, Chagas ACS. Influência dos fatores climáticos na biologia e no comportamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* a campo. *Bioscience Journal*. 2003;19(1):71-6.

45. Balashov YS. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – Vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*. 1972;8:160-376.

46. Wallade SM, Rice MJ. The Sensory Basis of Tick Feeding Behaviour. *Physiology of Ticks*1982. p. 71–117.

47. Martins JRS, Furlong J, Leite RC. Controle de carrapatos. In: Barros-Battesti, D.M.B., Arzua M, Brechara GH, editors. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical Um guia ilustrado para a identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan; 2006. p. 145–53.

48. Castro JJ. Sustainable Tick and Tickborne Disease Control in Livestock Improvement in Developing Countries. *Veterinary parasitology*. 1997;71(2-3).

49. Grisi L. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23(2):150-6.

50. Guerrero FD, Lovis L, Martins JR. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21(1):1-6.

51. Reck J, Klafke G, Marcondes, Webster A, Dall’Agnol B, et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*. 2014;201(1-2):128-36.

52. Klafke G, Webster A, Dall'Agnol B, Pradel E, Silva J, De la Canal LH, et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Tick and Tick-borne Diseases*. 2017;8(1):73-80.
53. De la Fuente J, Kocan KM. Strategies for Development of Vaccines for Control of Ixodid Tick Species. *Parasite immunology*. 2006;28(7).
54. Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. 2008:447-69.
55. Faccini JLH, Barros-Battesti DM. Aspectos gerais da biologia e identificação e carrapatos. Carrapatos de importância médica veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan; 2006. p. 5-12.
56. Hüe T, Fontfrey C. Development of a new approach of pasture management to control *Rhipicephalus microplus* infestation. *Tropical Animal Health and Production*. 2019;51(7):1989-95.
57. Beys-da-Silva WO, Rosa RL, Berger M, Coutinho-Rodrigues CJB, Vainstein MH, Schrank A, et al. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 2020;208.
58. Melo I, Azevedo J. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA; 1998.
59. Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*. 2003;61(5-6):413-23.
60. Hoddle M, Driesche V. Biological control of insect pests. *Encyclopedia of insects*. 2ª ed 2009. p. 91-101.
61. Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, Skrzecz I, Lobo SM. Baculoviruses- Re-Emerging Biopesticides. *Biotechnology advances*. 2006;24(2).
62. Scott JG, Alefantis TG, Kaufman PE, Rutz DA. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. 2000. *Pest Management Science*. 2000;56(2).
63. Filho M, Faria M, Wraight S, Silva K. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: Como estamos após quatro décadas? *Arquivos do Instituto Biológico*. 2009;76:769-79.
64. Rodrigues J, Borges PR, Fernandes ÉKK, Luz C. Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* s.l. IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on *post mortem* conidiogenesis. *Acta Tropica*. 2019;193:192-8.
65. Vega FE, Blackwell M. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*: Oxford University Press; 2005.
66. Humber RA. USDA-ARS Collection of Entomopathogenic fungal cultures – Catalog of Species. In: USDA- ARS Biological Integrated Pest Management Research RWHCfAaH, editor. Ithaca: USDA-ARS; 2013.

67. Mora MAE, Castilho AMCC, Fraga ME. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2018;84:1-10.
68. Hall RA, Papierok B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*. 1982;84(4):205-40.
69. Sosa-Gomez DR, Boucias DG, Nation JL. 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*. 1997;69(1):31-9.
70. Davidson EW, Sweeney AW. Microbial Control of Vectors: a Decade of Progress. *Journal of Medical Entomology*. 1983;20(3):235-47.
71. Samson RA, Evans HC, Latge J-P. Atlas of Entomopathogenic Fungi. 1 ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1988.
72. Gillespie AT, Claydon N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science*. 1989;27.
73. Goettel MS, Inglis GD. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA, editor. *Manual of Techniques in Insect Pathology*: Elsevier; 1997. p.213-49.
74. Butt T, Goettel M. Bioassays of entomogenous fungi. In: Navon A, Ascher KRS, editors. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. 2000. p. 141-95.
75. Alves RT, Faria M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. In: Cerrados E, editor. *Planaltina*. 2010. p. 50.
76. Stuart RJ, Barbercheck ME, Grewal PS. Entomopathogenic Nematodes in the Soil Environment: Distributions, Interactions and the Influence of Biotic and Abiotic Factors. *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. Switzerland: Springer International Publishing; 2015. p. 97-137.
77. Rangel DEN, Anderson AJ, Roberts DW. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological Research*. 2008;112:1362-72.
78. Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Braga GUL, Roberts DW. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*. 2015;61:427-40.
79. Barreto LP, Luz C, Mascarin GM, Roberts DW, Arruda W, Fernandes ÉKK. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and artificial medium. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2016;138:94-103.
80. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular cell*. 2010;40(2):253-66.
81. Benjamin MA, Zhioua E, Ostfeld RS. Laboratory and Field Evaluation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for Controlling Questing Adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 2002;39(5):723-8.

82. Bittencourt VREP, Bahiense TC, Fernandes EKK, Souza EJ. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestadas com larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2003;12(1):38-42.
83. Garcia MV, Monteiro AC, Szabó MPJ, Mochi DA, Simi LD, Carvalho WM, et al. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. Veterinary Parasitology. 2011;181:267-73.
84. Alves RT, Bateman RP, Gunn J, Prior C, Leather SR. Effects of Different Formulations on Viability and Medium-Term Storage of *Metarhizium anisopliae* Conidia. Neotrop entomol. 2002;31(1):91-9.
85. Camargo MG, Marciano AF, Sá FA, Perinotto WMS, Quinelato S, Gôlo PS, et al. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. Veterinary Parasitology. 2014;205:271-6.
86. Camargo MG, Nogueira MR, Marciano AF, Perinotto WM, Coutinho-Rodrigues CJ, Scott FB, et al. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. Vet Parasitol. 2016;223:38-42.
87. Souza EJ, Costa GL, Bittencourt VREP, Fagundes AS. Ação do fungo *Beauveria bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens* em teste de campo. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009;61(1):163-9.
88. Jaronski ST, Jackson MA. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microesclerotial granules. Biocontrol science and Technology. 2008;18:849-63.
89. Faria MR, Wraight SP. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological control. 2007;43(3):237-56.
90. Mascarin GM, Jackson MA, Kobori NN, Behle RW, Júnior ID. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. Journal of Invertebrate Pathology. 2015;127:11-20.
91. Mascarin GM, Jaronski ST. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016;32.
92. Kim JS, Je YH, Skinner M, Parker BL. An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Pest Management Science. 2013;69(5):576-81.
93. Mascarin GM, Kobori NN, Vital RCJ, Jackson MA, Quintela ED. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013;30(5):1583-90.
94. Behle RW, Jackson MA, Flor-Weiler LB. Efficacy of a Granular Formulation Containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) Microsclerotia Against

Nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*. 2013;106(1):57-63.

95. Dolinski C. Uso de nematódeos entomopatogênicos para o controle de pragas. In: Venzon M, Paula JR, Pallini A, editors. *Tecnologias Alternativas para o Controle Pragas e Doenças*. Viçosa: UFV; 2006. p. 261-89.

96. Georgis R, Manweiler SA. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. *Agricultural Zoology Reviews*. 1994;6.

97. Burnell A, Stock SP. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts — lethal pathogens of insects. *Nematology*. 2000;2(1):31-42.

98. Kaya HK, Gaugler R. *Entomopathogenic Nematodes*. 1993.

99. Chen G, Dunphy GB, Webster JM. Antifungal Activity of Two *Xenorhabdus* Species and *Photorhabdus luminescens*, Bacteria Associated with the Nematodes *Steinernema* Species and *Heterorhabditis megidis*. *Biological Control*. 1994;4(2):157-62.

100. Maxwell PW, Chen G, Webster JM, Dunphy GB. Stability and Activities of Antibiotics Produced during Infection of the Insect *Galleria mellonella* by Two Isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994;60:715-21.

101. Ferraz LCCB. Nematoides entomopatogênicos. In: Alves SB, editor. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fapesp & Fealq; 1998. p. 541-69.

102. Dolinski C, Moinor Jr A. Utilização de nematoides entomopatogênicos Nativos ou Exóticos: O Perigo das Introduções. *Nematologia Brasileira*. 2006;30:139-49.

103. Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Biological control of ticks. *Parasitology*. 2004;129(1):389-403.

104. Poinar GO, Grewal PS. History of Entomopathogenic Nematology. *J Nematol*. 2012;44(2):153-61.

105. Griffin CT. Behaviour and Population Dynamics of Entomopathogenic Nematodes Following Application. In: Campos-Herrera R, editor. *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*: Springer; 2015.

106. Monteiro CMO, Matos RS, Araújo LX, Campos R, Bittencourt VREP, Dolinski C, et al. Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 2014;203(3):310-7.

107. Yang X, Gao Z, Yu Z, Wang D, Tang Y, Li F, et al. Pathogenicity of five species of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to the ixodid tick *Dermacentor silvarum* Olenov (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Science and Technology*. 2013;23(12).

108. Samish M, Glazer I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*. 2001;17:368-71.

109. Cardoso R, Monteiro CMO, Prata MCA, Batista ESP. Effect of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) isolate Santa Rosa on the biological parameters of engorged nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Arq Inst Biol.* 2013;80:237-41.
110. Monteiro CMO, Prata MCA. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e desafios. Controle de carrapatos no pasto. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia; 2013.
111. Shapiro DI, Glazer I. Comparison of Entomopathogenic Nematode Dispersal from Infected Hosts Versus Aqueous Suspension. *Environmental Entomology.* 1996;25(6):1455–61.
112. Shapiro DI, Lewis EE. Comparison of Entomopathogenic Nematode Infectivity from Infected Hosts Versus Aqueous Suspension. *Environmental Entomology.* 1999:907–11.
113. Hussaini SS, Nagesh M, Rajeshwari R, Dar MH. Formulation of host cadavers infected with indigenous *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Heterorhabditidae: Rhabditida) isolates *Entomon.* 2004;29:339–44.
114. Koppenhöfer AM, Grewal PS. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. In: Grewal PS, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DI, editors. *Nematodes as biocontrol agents*: CABI Publishing; 2005.
115. Koppenhofer AM , Kaya HK. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biological Control* 1997;8:131-7.
116. Koppenhofer AM, Grewal PS. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. In: Grewal PS, editor. *Nematodes as biocontrol agents*. Wallingford, UK: CABI Publishing; 2005.
117. Parkman JP, Frank JH, Walker TJ, Schuster J. Classical biological control of *Scapteriscus* spp. (Orthoptera: Gryllotalpidae) *Flo Environ Entomol.* 1996;25.
118. Ansari MA, Tirry L, Moens M. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *Biological Control.* 2005;50:465-75.
119. Javal M, Terblanche JS, Conlong DE, Malan A, P. First Screening of Entomopathogenic Nematodes and Fungus as Biocontrol Agents against an Emerging Pest of Sugarcane, *Cacosceles newmannii* (Coleoptera: Cerambycidae). *Insects.* 2019;10(117):1-11.
120. Sáenz-Aponte A, Correa-Cuadros JP, Rodríguez-Bocanegra MX. Foliar application of entomopathogenic nematodes and fungi for the management of the diamond back moth in greenhouse and field. *Biological Control.* 2020;142.
121. Ansari MA, Shah FA, Butt TM. The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in strawberry growbags. *Biocontrol Science and Technology.* 2010;20(1):99-105.

122. Shapiro-Ilan DI, Jackson M, Reilly CC, Hotchkiss MW. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological control*. 2004;30(1):119-26.
123. Ansari MA, Butt TM. Influence of the application methods and doses on the susceptibility of black vine weevil larvae *Otiorhynchus sulcatus* to *Metarhizium anisopliae* in field-grown strawberries. *Biological control*. 2013;58:257-67.
124. Shairra SA, Gehan MN. Efficacy of Entomopathogenic nematodes and Fungi as Biological Control agent against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2014;24(1):247-53.
125. Correa-Cuadros JP, Sáenz-Aponte A, Rodríguez-Bocanegra MX. In vitro interaction of *Metarhizium anisopliae* Ma9236 and *Beauveria bassiana* Bb9205 with *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100 for the control of *Plutella xylostella*. *SpringerPlus*. 2016;5:2068.
126. Mc Namara L, Kapranas A, Williams CD, O'Tuama P, Kavanagh K, Griffin CT. Efficacy of entomopathogenic fungi against large pine weevil, *Hylobius abietis*, and their additive effects when combined with entomopathogenic nematodes. *Journal of Pest Science*. 2018;91:1407-19.
127. Hartelt K, Wurst E, Collatz J, Zimmermann G, Kleespies RG, Oehme RM, et al. Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: preliminary results from laboratory experiments. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008;298(1):314-20.
128. Butt TM, Wood M, Taylor JWD, Bakirci S, Hazir C, Ulug D, et al. Differential susceptibility of *Hyalomma excavatum* adults and nymphs to the entomopathogens *Metarhizium anisopliae* ARSEF 4556 and *Steinernema carpocapsae*. *International Journal of Pest Management*. 2016;62(3):261-6.
129. Golo PS, Santos ASO, Monteiro CMO, Perinotto WMS, Quinelato S, Camargo MG, et al. Lab-on-a-chip and SDS-PAGE analysis of hemolymph protein profile from *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) infected with entomopathogenic nematode and fungus. *Parasitology Research*. 2016;115(9):3459-68.

CAPÍTULO 2: Potencial de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle de *Rhipicephalus microplus*: do laboratório para o campo

Marcos Daniel Gomes Filgueiras^a; Renata Silva Matos^b; Lucas Prado Barreto^c; Gabriel Moura Mascarim^d; Pricila Vetrano Rizzo^b; Fernanda Mara Cunha Freitas^b; Márcia Cristina de Azevedo Prata^b; Caio Monteiro^{a,e}; Éverton Kort Kamp Fernandes^{a,e*}

a - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás. Avenida Esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brazil, 74690-900.

b- Embrapa Gado de leite. Av. Eugênio do Nascimento, 610 - Aeroporto, Juiz de Fora - MG, 36038-330.

c - Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brazil, 74605-050.

d - Embrapa Meio Ambiente. Rodovia SP-340, Km 127,5, Jaguariúna, São Paulo, Brazil, 13918-110.

e- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG). Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brazil, 74605-050.

*** Autor para correspondência:**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Avenida Esperança s/n, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brasil, 74690-900.

Telefone: +55 (62) 3209-6118; e-mail: evertonkort@ufg.br

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são organismos que possuem capacidade de parasitar e causar morte de diferentes artrópodes, incluindo carrapatos. O presente estudo avaliou, em laboratório, a patogenicidade do nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 sobre fêmeas de *Rhipicephalus microplus* com diferentes níveis de ingurgitamento (150, 200, 250, 300 e 350 mg), e sobre fêmeas provenientes de diferentes populações (1 a 8). Cadáveres de *Tenebrio molitor* colonizados por *H. bacteriophora* HP88 foram preparados, e foi avaliada a eficácia deste nematoide em reduzir a população de *R. microplus* em pastagens sob condições de campo. Os testes de patogenicidade do nematoide para fêmeas de *R. microplus* com diferentes níveis de ingurgitamento foram conduzidos em grupos formados por dez fêmeas ingurgitadas acomodadas em placas de Petri, contendo solo estéril, previamente tratado por aspersão com 3 mL de suspensão contendo 150 juvenis; diferentes parâmetros biológicos das fêmeas foram avaliados (peso das fêmeas e da massa de ovos e percentual de eclosão – para cálculo do percentual de controle). Redução ($P < 0,05$) dos parâmetros biológicos avaliados foram observados em todos os grupos tratados com nematoides, não sendo observada grande variação no percentual de controle entre estes grupos (valores entre 98,4% e 97,5%). Em relação ao teste com fêmeas de diferentes populações, 16 grupos foram formados, 8 tratados com NEPs (conforme descrito acima) e seus respectivos controles. Quando comparado os dados de parâmetros biológicos das fêmeas dos grupos tratados com os seus respectivos grupos controle, foi observado redução nos parâmetros biológicos; no entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados, evidenciando que as populações apresentaram susceptibilidade similar ao nematoide (percentuais de controle entre 89% e 99%). O ensaio em condições de campo foi realizado em parcelas de 1 m² de *Panicum maximum* expostas a condições ambientais naturais. Dois grupos, com 8 parcelas cada, foram formados: 1) o grupo nematoide, que recebeu tratamento no dia -7 por meio da aplicação de oito cadáveres de *T. molitor* infectados com *H. bacteriophora* HP88, e 2) o grupo controle, que não recebeu tratamento. No dia 0, seis fêmeas ingurgitadas foram distribuídas em cada parcela. Nos dias +42 a +63 a parte apical das gramíneas com a presença de larvas de *R. microplus* foram retiradas, acondicionadas em saco plástico devidamente identificado e congelados a -20°C para posterior contagem. A população não parasitária de *R. microplus* foi reduzida em 73,1% nas parcelas tratadas com *H. bacteriophora* HP88. Conclui-se que *H. bacteriophora* HP88 não apresentou diferenças de susceptibilidade em fêmeas de diferentes pesos, e de diferentes

populações, além de promover redução no número de larvas de *R. microplus* em condições de campo.

Palavras-chave: carrapato dos bovinos, controle biológico, nematoides entomopatogênicos

1. INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steirnernema* (Rhabditida) são agentes de controle biológico capazes de reduzir populações de diferentes espécies de artrópodes pragas (Doucet et al., 1998; Ehlers, 2001; Kaaya et al., 2006; Noosidum et al., 2021). A associação mutualística com bactérias patogênicas, responsável por ocasionar rápida septicemia e morte de carrapatos infectados (Samish et al., 2008; Monteiro & Prata, 2015) e o fato de habitarem o solo, ambiente onde 95% da população de carrapatos está presente, são algumas das características que tornam os NEPs potenciais candidatos para o biocontrole dos carrapatos (Monteiro & Prata, 2015; Monteiro et al., 2020).

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888), conhecido popularmente como carrapato dos bovinos, é responsável por ocasionar perdas econômicas severas na pecuária em diferentes países. Estima-se que somente no Brasil, este parasito seja responsável por perdas anuais de 3,4 bilhões de dólares (Grisi et al., 2014). Essas perdas decorrem de danos diretos (relacionados a hematofagia e suas implicações) e indiretos (relacionados a transmissão de patógenos e custos de controle), ocasionando em queda de produtividade (carne e leite) (Furlong et al., 2004; Higa et al., 2016; Nicholson et al., 2019).

Atualmente, o controle das populações de *R. microplus* vem sendo realizado majoritariamente por meio da aplicação de acaricidas químicos. Entretanto, o uso contínuo desses produtos resultou na seleção de populações de carrapatos resistentes a todas as classes químicas disponíveis no mercado (Reck et al., 2014); algumas populações foram registradas

inclusive como multirresistentes (Klafke et al., 2017). Além disso, existem preocupações a respeito da presença de resíduos de carrapaticidas químicos em alimentos de origem animal, que pode intoxicar humanos consumidores, além de contaminarem animais e o meio ambiente (Monteiro & Prata, 2015). Assim, é evidenciada a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para controle de carrapatos, e nesse aspecto, o uso de agentes biológicos é uma alternativa que vem ganhando mais espaço na agricultura e também merece ser investigada para o controle de carrapatos (Kaaya et al., 2006; Monteiro & Prata, 2015).

Diferentes estudos, em condições laboratoriais, demonstraram patogenicidade dos NEPs sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, especialmente de NEPs do gênero *Heterorhabditis* (Monteiro et al., 2010; 2014, Silva et al., 2012; Singh et al., 2018). Contudo, alguns aspectos a respeito da interação entre carrapatos e NEPs ainda não foram totalmente elucidados. Já foi demonstrado que alguns estágios de desenvolvimento dos carrapatos são mais resistentes à infecção por NEPs, sendo as fêmeas ingurgitadas a fase mais susceptível a infecção (Samish et al., 2008); contudo, ainda não existem dados comparando a susceptibilidade de fêmeas em diferentes níveis de ingurgitamento.

Diferenças de susceptibilidade entre populações de insetos utilizando entomopatógenos vem sendo relatadas desde a década de 1970, em estudos laboratoriais (Burges, 1971) e em condições de campo (Mcgaughey, 1985). Também existem dados na literatura demonstrando que existe uma grande variação na susceptibilidade de diferentes populações de *R. microplus* a infecção por fungos entomopatogênicos (Fernandes et al., 2011; Perinotto et al., 2012; Webster et al., 2017); contudo, ainda não existem investigações nesse sentido, em relação a susceptibilidade de diferentes populações de *R. microplus* à infecção por NEPs.

O uso de NEPs a campo para controle de carrapatos pode ser realizado a partir da aplicação no solo, uma vez que fêmeas ingurgitadas no momento da oviposição buscam

ambientes com alta umidade e protegido da radiação solar, características que também são favoráveis à sobrevivência dos juvenis infectantes (JIs) (Samish et al., 2008). Resultados obtidos em estudos que simulam essas condições têm demonstrado que diferentes espécies de NEPs foram eficazes contra fêmeas ingurgitadas de *R. annulatus* e *R. microplus* (Alekseev et al., 2006; Monteiro et al., 2020). Para esse tipo de aplicação, a formulação em inseto cadáver tem apresentado resultados interessantes. Nessa abordagem, cadáveres de insetos infectados por NEPs são liberados no ambiente, servindo de fonte para liberação de JIs no solo (Dolinski, 2006; Monteiro et al., 2014, 2020; Shapiro-Ilan & Dolinski, 2015).

O objetivo desse estudo foi determinar em condições controladas a eficácia de *H. bacteriophora* HP88 sobre fêmeas de *R. microplus* em diferentes níveis de ingurgitamento e a susceptibilidade de fêmeas ingurgitadas pertencentes a diferentes populações. Além disso, o presente estudo teve como objetivo investigar a eficácia de *H. bacteriophora* HP88, veiculados em cadáveres de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), sobre a fase não-parasitária de *R. microplus*, em condições de campo.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção e manutenção de *Heterorhabditis bacteriophora*, isolado HP88

O nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975, isolado HP88 foi cedido pelo Laboratório de nematologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) Darcy Ribeiro Campos de Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. O isolado foi mantido em garrafas de cultivo celular (40 mL), em alíquotas de 20 mL, e incubado em estufa do tipo B.O.D (Eletrolab[®]) a 18°C e multiplicados *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) de acordo com Lindegren et al. (1993) e Kaya and Stock (1997).

2.2 Avaliação da susceptibilidade de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* com diferentes níveis de ingurgitamento à infecção por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

Foram testadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, cepa Porto Alegre, provenientes de infestação artificial em bezerros mantidos na Fazenda Experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Gado de Leite - CEUA 11/2013). As fêmeas ingurgitadas foram distribuídas em cinco grupos contendo dez fêmeas ingurgitadas com diferentes médias de peso, a saber: 150, 200, 250, 300 e 350 mg. Para cada média de peso foi formado um grupo controle e um grupo tratado e as fêmeas foram acondicionadas individualmente em placas de Petri (6 cm de diâmetro) preenchida com 15 g de solo estéril. O tratamento foi realizado sobre o solo com a aplicação de 3 mL da suspensão de *H. bacteriophora* HP88, ajustada para a concentração de 150 JIs/fêmea, de acordo com Monteiro et al. (2013). Essa concentração foi definida por apresentar eficácia superior a 90% (Monteiro et al., 2010). No grupo controle foi feita a aspersão de 3 mL de água destilada estéril, com ausência de nematoides.

Após tratamento, as placas foram mantidas em estufa do tipo B.O.D (Eletrolab[®]) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 90\%$ para acompanhamento dos parâmetros biológicos. A coleta da postura das fêmeas foi realizada diariamente durante 15 dias e os ovos foram acondicionados em tubos de ensaio de 10 mL, vedados com algodão hidrófilo e incubados nas mesmas condições citadas anteriormente. Após 21 dias do término da oviposição, foi feita a avaliação do percentual de eclosão larval por estimativa visual (Figueiredo et al., 2018). Os seguintes parâmetros biológicos das fêmeas foram avaliados: peso da fêmea antes da oviposição, peso da massa de ovos e a eclosão larval. Os valores dos parâmetros obtidos foram utilizados para calcular o índice de produção de ovos (Bennett, 1974), reprodução estimada e percentual de controle (Drummond et al., 1971).

2.3 Avaliação da susceptibilidade de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* à infecção por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

Fêmeas ingurgitadas provenientes de diferentes populações foram testadas: populações POA (Cepa susceptível aos carrapaticidas - População 1) e Seropédica (População 2) foram obtidas por meio de infestações artificiais em bovinos na Embrapa Gado de Leite (CEUA 11/2013) e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ - CEUA 23083.009241/2011-16), respectivamente. Carrapatos das outras seis populações (3, 4, 5, 6, 7 e 8) foram obtidos por meio de coleta em bovinos naturalmente infestados, em propriedades rurais de diferentes localidades no Brasil (Figura 1).

Dezesseis grupos foram formados, cada um contendo 10 fêmeas ingurgitadas. Para cada população testada foi estabelecido um grupo tratamento e um grupo controle. O experimento seguiu o mesmo delineamento mencionado no tópico 2.2. Os carrapatos foram tratados com a mesma concentração de *H. bacteriophora* HP88, e os grupos experimentais mantidos nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa; a avaliação da susceptibilidade de *R. microplus* ao isolado HP88 foi realizada a partir dos mesmos parâmetros biológicos mencionados acima.



Figura 1. Locais de origem das diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* utilizadas no experimento descrito no tópico 2.3. População 1 - POA: Porto Alegre – RS; População 2 - Cepa UFRRJ: Seropédica – RJ; População 3 - Sacramento – MG; População 4 - São Sebastião do Alto – RJ; População 5 - Pompeu – MG; População 6 - Lima Duarte – MG; População 7 - Aiuruoca – MG e População 8 - Ivinhema - MS.

2.4 Avaliação da eficácia de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle de *Rhipicephalus microplus* em condições de campo

2.4.1 Obtenção de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Foram testadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Cepa Gyn) obtida por meio de infestações artificiais em bovinos alocados em baias da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) (CEUA 032/17) (Anexo I).

2.4.2 Local de realização do estudo e preparação dos canteiros de *Panicum maximum*

Os ensaios de campo foram realizados na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil (16°30'50,1"S 49°16'33,8"O), entre os dias 22 de julho e 03 de outubro de 2019, durante a estação seca. O clima desta região, segundo a classificação de Köppen, é Aw, tropical semi-úmido, com invernos secos e frios e verões quentes e úmidos, com precipitação média anual em torno de 1354 mm e temperatura média anual em torno de $23 \pm 0,5$ °C. As condições climáticas (temperatura máxima e mínima do ar, precipitação e radiação solar global) do ambiente foram obtidas diariamente pela estação meteorológica localizada a aproximadamente 1 km de distância do local do experimento. Os dados de umidade relativa do ar do interior da vegetação foram coletados pelo período da manhã a cada 7 dias por meio de um termohigrômetro AK28 (Akso[®], São Leopoldo, RS, Brasil), instalado no interior das parcelas.

Um mês antes de iniciar o experimento de campo, doze parcelas de *Panicum maximum* BRS Quênia medindo 1m² cada (1 metro × 1 metro; largura × altura) foram delimitadas por uma fita de fibra de 100 m de comprimento, com uso de estacas de ferro e corda. Em seguida, a altura da grama foi padronizada em aproximadamente 30 cm (superfície do solo até o ápice das folhas). Todas as parcelas estavam em área com incidência direta de sol e chuva, de forma a garantir as condições ambientais mais homogêneas possíveis. Três semanas antes do início do experimento, as folhas mortas foram retiradas e as parcelas e corredores delimitados (Figura 2). A altura da vegetação e a manutenção dos corredores entre as parcelas foram mantidas durante todo período de experimentação.



Figura 2. Parcelas de *Panicum maximum* BRS Quênia (1 × 1 metro) em área da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil.

2.4.3 Delineamento experimental

O experimento foi composto por dois grupos: 1) Grupo controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento e 2) Grupo nematoide, tratado com *H. bacteriophora* HP88. Para cada tratamento, foram realizadas seis repetições. A distribuição dos grupos nas 12 parcelas foi realizada de forma randomizada. Para a produção e aplicação de *H. bacteriophora* HP88 nos canteiros, foi utilizada a formulação inseto cadáver, utilizando larvas de *T. molitor*, de acordo com Del Valle et al. (2008) e Monteiro et al. (2014).

Uma semana antes do experimento (dia -7), oito larvas de *T. molitor* infectadas com *H. bacteriophora* HP88 foram enterradas separadamente de forma aleatória (profundidade de 5 cm) em cada parcelas referentes ao tratamento com NEPs (Monteiro et al., 2020). O grupo controle foi formado por parcelas sem a adição de cadáveres de *T. molitor* infectados por NEPs. Foram formados dois grupos (tratamento e controle), cada um com 36 fêmeas

ingurgitadas, distribuídas homogeneamente por peso ($P > 0,05$). No dia 0, seis fêmeas ingurgitadas foram adicionadas em cada parcela.

A partir do dia +7 até o dia +35 visitas na área de experimentação foram realizadas para verificar a presença de larvas de *R. microplus* na vegetação e coletar os dados de umidade no higrômetro. Nos dias +42, +49, +56 e +63, a parte apical das gramíneas com a presença de larvas de *R. microplus* foram retiradas, acondicionadas em saco plástico devidamente identificado, e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior contagem (Figura 3). As larvas foram quantificadas enquanto eram aspiradas por um aspirador de fluido cirúrgico (Aspiramax[®], Kyoto, Japão). Para certificar a ausência total de larvas nas parcelas após o 63° dia desde a introdução das fêmeas, foi realizada uma última inspeção nas parcelas.



Figura 3. Larvas infestantes de *Rhipicephalus microplus* em uma das parcelas de *Panicum maximum* BRS Quênia.

2.4.4 Características do solo

Análise granulométrica e microbiológica do solo da área experimental foram realizadas a partir de amostras coletadas em quatro parcelas (profundidade de 10 cm), de modo aleatório, e armazenadas em sacos plásticos. As amostras foram identificadas,

transportadas e armazenadas em condição ambiente no Laboratório de Patologia de Invertebrados e após uma semana, enviadas ao laboratório Solo & Companhia e JEM análise agrícola para análise (Anexo II - III).

2.5 Análises estatísticas

As análises dos resultados do presente trabalho foram realizadas com auxílio do software R versão 3.3.2 (R Core Team, 2019). Os dados laboratoriais foram analisados com o pacote *easynova* (Arnhold, 2013), sendo os dados de peso inicial das fêmeas tiveram distribuição normal e foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida de *Student-Newman-Keuls* (SNK), e os dados de peso da massa de ovos, índice de produção de ovos (IPO) e o percentual de eclosão tiveram distribuição não-normal e foram analisados por meio do teste de *Kruskall-Wallis* seguido do teste de comparação de médias *False discovery rate* (FDR) ($P < 0,05$). Para as contagens dos carrapatos no teste de campo frente à aplicação de nematoides comparado com o controle sem nematoides, os dados foram ajustados a um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial negativa (função log link), com o pacote 'MASS' (Venables e Ripley, 2002), incluindo bloco, tratamento, tempo (semana) e suas interações (tratamento x semana) como fatores fixos no preditor linear. Após análise da interação, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância, utilizando o pacote 'emmeans' (Lenth, 2020).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da susceptibilidade de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* com diferentes níveis de ingurgitamento à infecção por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

Não foram observadas diferenças significativas no peso médio das fêmeas antes da oviposição, comparando os grupos controle e tratamento, dentro da mesma classe de peso (**150 mg** - $F_{1,18} = 0,028$; $P = 0,869$ /// **200 mg** - $F_{1,18} = 0,1205$; $P = 0,7326$ /// **250 mg** - $F_{1,18} = 0,4506$; $P = 0,5106$ /// **300 mg** - $F_{1,18} = 0,1938$; $P = 0,6651$ /// **350 mg** - $F_{1,18} = 0,1589$; $P = 0,6949$), o que indica que as alterações detectadas estão correlacionadas com o efeito dos tratamentos. Foi observado que as fêmeas dos grupos tratados com *H. bacteriophora* HP88 produziram menores quantidades de ovos quando comparado com o grupo controle, pertencente a mesma classe de peso (**150 mg** - $\chi^2 = 14,3288$; $P = 0,0002$ /// **200 mg** - $\chi^2 = 13,8660$; $P = 0,0002$ /// **250 mg** - $\chi^2 = 14,3288$; $P = 0,0002$ /// **300 mg** - $\chi^2 = 14,3939$; $P = 0,0001$ /// **350 mg** - $\chi^2 = 14,9137$; $P = 0,0001$). O mesmo foi observado em relação ao índice de produção de ovos (IPO), sendo observados percentuais superiores a 50% nos grupos controle e inferior a 7% nos grupos tratados (**150 mg** - $\chi^2 = 14,3288$; $P = 0,0002$ /// **200 mg** - $\chi^2 = 13,8660$; $P = 0,0002$ /// **250 mg** - $\chi^2 = 14,3288$; $P = 0,0002$ /// **300 mg** - $\chi^2 = 14,3939$; $P = 0,0001$ /// **350 mg** - $\chi^2 = 14,9137$; $P = 0,0001$) (Tabela 1).

Em relação ao percentual de eclosão, também foram observadas diferenças significativas entre grupos tratados (< 40%) e controle (> 88%), dentro da mesma classe de peso (**150 mg** - $\chi^2 = 10,4612$; $P = 0,0012$ /// **200 mg** - $\chi^2 = 10,6352$; $P = 0,0011$ /// **250 mg** - $\chi^2 = 11,6054$; $P = 0,0007$ /// **300 mg** - $\chi^2 = 14,3939$; $P = 0,0001$ /// **350 mg** - $\chi^2 = 7,280$; $P = 0,007$). A redução na quantidade e viabilidade de ovos produzidos resultou em percentual de controle superior a 97% em todos os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Peso médio de fêmeas ingurgitadas (mg), peso da massa de ovos (mg), eclosão larval (%), índice de produção de ovos (%), reprodução estimada e percentual de controle (%) de *Rhipicephalus microplus* tratados com juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 sob condições controladas (27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$).

Pesos (mg)	Tratamento	Peso inicial das fêmeas (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	IPO*	Percentual de eclosão (%)	RE†	Percentual de controle (%) ‡
150	Controle	157,9 \pm 4,78 ^a	82,5 \pm 2,5 ^a	52,4 \pm 1,22 ^a	88,4 \pm 5 ^a	919569,3477	
	HP88	157 \pm 0,49 ^a	6,8 \pm 1,85 ^b	4,3 \pm 1,16 ^b	21,6 \pm 8,74 ^b	18698,91789	98
200	Controle	203,7 \pm 0,4 ^a	114 \pm 5,37 ^a	55,9 \pm 2,59 ^a	93,3 \pm 3,19 ^a	1044300,442	
	HP88	203,5 \pm 0,49 ^a	12,3 \pm 9,56 ^b	6,1 \pm 4,72 ^b	21,8 \pm 5,56 ^b	26352,82555	97,5
250	Controle	252,3 \pm 1 ^a	142,8 \pm 3,72 ^a	56,6 \pm 1,37 ^a	93,1 \pm 2,4 ^a	1061381,933	
	HP88	251,4 \pm 0,74 ^a	7,5 \pm 3,25 ^b	3,0 \pm 1,28 ^b	28,9 \pm 8,87 ^b	17151,47176	98,4
300	Controle	300,4 \pm 0,51 ^a	178 \pm 5,82 ^a	59,2 \pm 1,94 ^a	96,5 \pm 0,78 ^a	1143989,344	
	HP88	300,7 \pm 0,54 ^a	8,7 \pm 4,08 ^b	2,9 \pm 1,35 ^b	35,3 \pm 11,12 ^b	20426,33854	98,2
350	Controle	351 \pm 3,52 ^a	193,9 \pm 7,22 ^a	55,2 \pm 2,05 ^a	90,1 \pm 6,68 ^a	994950,4274	
	HP88	349,5 \pm 1,52 ^a	8,3 \pm 5,29 ^b	2,3 \pm 1,50 ^b	39 \pm 11,54 ^b	18523,60515	98,1

(*) IPO: Índice de produção de ovos = peso da massa de ovos (g) / peso inicial da fêmea ingurgitada (g) \times 100 (Bennet, 1974).

(†) RE: Reprodução estimada = peso da massa de ovos (g) / peso inicial da fêmea ingurgitada (g) \times percentual de eclosão larval \times 20,000 (constante que se refere ao número de larvas por grama de massa de ovos de *R. microplus*) (Drummond et al., 1971).

(‡) PC: Percentual de controle = RE média do grupo controle – RE média do grupo tratado / RE média do grupo controle \times 100 (Drummond et al., 1971).

Médias (\pm erro padrão) dentro da mesma classe de peso seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($P > 0.05$).

3.2 Avaliação da susceptibilidade de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* à infecção por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

Não foram observadas diferenças significativas ($F_{15,140} = 0,9787$; $P = 0,4808$) em relação ao peso das fêmeas ingurgitadas antes do início da oviposição (Tabela 2), nos grupos tratados e controle, nas diferentes populações, indicando que as demais alterações estão relacionadas aos tratamentos. Comparando cada população individualmente (tratamento e controle), foi observado que as fêmeas dos grupos tratamento com *H. bacteriophora* HP88 produziram menor massa de ovos do que as dos grupos controle ($\chi^2 = 128,0765$; $P < 0,0001$). Uma comparação do tratamento entre as diferentes populações de *R. microplus*, demonstrou que as fêmeas dos grupos tratados (valores entre 0 e 16 mg) produziram menos ovos ($\chi^2 = 128,0765$; $P < 0,0001$) do que as fêmeas do grupo controle (valores entre 97 e 117 mg) (Tabela 2).

Redução do IPO nos grupos tratamento também foi demonstrado em cada população de *R. microplus* testada ($\chi^2 = 129,9798$; $P < 0,0001$) e também na comparação incluindo todas as populações ($\chi^2 = 129,9798$; $P < 0,0001$), com valores entre 46 e 56% nos grupos controles, e 0 a 7,9 nos grupos tratados. Também o percentual de eclosão apresentou redução na comparação individual das populações ($\chi^2 = 76,8261$; $P < 0,0001$) com valores entre 83 e 95% nos grupos controle e 0 a 64% nos grupos tratados (Tabela 2). Em todas as populações testadas foram observados percentuais de controle superiores a 95%, exceto na população 8 (89,6%).

Tabela 2. Peso inicial de fêmeas (mg), peso da massa de ovos (mg), percentual de eclosão (%), índice de produção de ovos (%), reprodução estimada e percentual de controle (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 sob condições controladas (27 ± 1 °C e UR \geq 90%).

População	Tratamento	Peso inicial das fêmeas (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	IPO*	Percentual de eclosão (%)	RE†	Percentual de controle (%)‡
1 - POA	Controle	208,71 \pm 4,96 ^a	117,5 \pm 5,36 ^a	56,4 \pm 2,47 ^a	93,6 \pm 3,20 ^a	1047196,933	
	HP88	208,58 \pm 4,98 ^a	13,7 \pm 9,46 ^{cd}	6,6 \pm 4,67 ^{cd}	25,9 \pm 7,28 ^{ef}	32837,9674	96,9
2 - UFRRJ	Controle	208,16 \pm 12,66 ^a	110,8 \pm 8,67 ^{ab}	52,6 \pm 1,57 ^{ab}	87,9 \pm 3,24 ^{ac}	925994,2363	
	HP88	208,95 \pm 10,82 ^a	1,1 \pm 1 ^{def}	0,5 \pm 1,5 ^{def}	5 \pm 5 ^{ef}	526,5677358	99,9
3	Controle	208,68 \pm 5,40 ^a	111 \pm 4,05 ^{ab}	53,1 \pm 1,07 ^{ab}	86,8 \pm 3,44 ^{acd}	914805,9415	
	HP88	208,67 \pm 9,61 ^a	1,6 \pm 0,9 ^{def}	0,8 \pm 1,3 ^{def}	10 \pm 8,16 ^{ef}	159,3070145	99,98
4	Controle	208,03 \pm 14,78 ^a	112,2 \pm 9,69 ^a	53 \pm 1,85 ^{ab}	95 \pm 1,15 ^a	1023427,748	
	HP88	208,3 \pm 22,13 ^a	4,8 \pm 2,13 ^{ce}	2,3 \pm 1,03 ^{ce}	59 \pm 13,27 ^{de}	27191,55065	97,3
5	Controle	208,6 \pm 7,17 ^a	97,0 \pm 7,37 ^b	46,4 \pm 3,07 ^b	90,3 \pm 3,16 ^{ac}	845982,575	
	HP88	209,57 \pm 9,79 ^a	1,3 \pm 1,29 ^{ef}	0,8 \pm 0,84 ^{ef}	45 \pm 45 ^{cef}	5582,061069	99,3
6	Controle	208,46 \pm 12,67 ^a	105,8 \pm 7,76 ^{ab}	50,4 \pm 1,28 ^b	91,1 \pm 2,90 ^{ab}	923529,976	
	HP88	208,28 \pm 11,41 ^a	0 \pm 0 ^f	0 \pm 0 ^f	0 \pm 0 ^f	0	100
7	Controle	208,91 \pm 7,21 ^a	108 \pm 9,49 ^{ab}	51,2 \pm 3,52 ^{ab}	83,9 \pm 4,84 ^{bcd}	858209,6697	
	HP88	209,27 \pm 8,66 ^a	4,1 \pm 2,74 ^{def}	2,1 \pm 1,39 ^{def}	31,25 \pm 18,75 ^{ef}	12145,24606	98,6
8	Controle	208,92 \pm 10,09 ^a	111,7 \pm 10,98 ^{ab}	52,7 \pm 3,90 ^a	95 \pm 1,02 ^a	962470,0814	
	HP88	209,47 \pm 9,76 ^a	16,4 \pm 4,52 ^c	7,9 \pm 2,26 ^c	64,1 \pm 12,10 ^{cde}	100200,4773	89,6

(*) IPO: Índice de produção de ovos = peso da massa de ovos (g) / peso inicial da fêmea ingurgitada (g) \times 100 (Bennet, 1974).

(†) RE: Reprodução estimada = peso da massa de ovos (g) / peso inicial da fêmea ingurgitada (g) \times percentual de eclosão larval \times 20,000 (constante que se refere ao número de larvas por grama de massa de ovos de *R. microplus*) (Drummond et al., 1971).

(‡) PC: Percentual de controle = RE média do grupo controle – RE média do grupo tratado / RE média do grupo controle \times 100 (Drummond et al., 1971).

Médias (\pm erro padrão) dentro da mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($P > 0.05$).

3.3 Avaliação da eficácia de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle de *Rhipicephalus microplus* em condições de campo

Entre os dias -10 e +63, as médias (\pm desvio padrão) de temperatura diária (máxima e mínima), precipitação, radiação solar global e umidade relativa foram: $31,82 \pm 3,21$ °C e $18,47 \pm 2,53$ °C, 0 ± 0 mm/dia, $17,39 \pm 2,89$ MJ/m² e $23,72 \pm 10,63\%$, respectivamente (Figura 4).

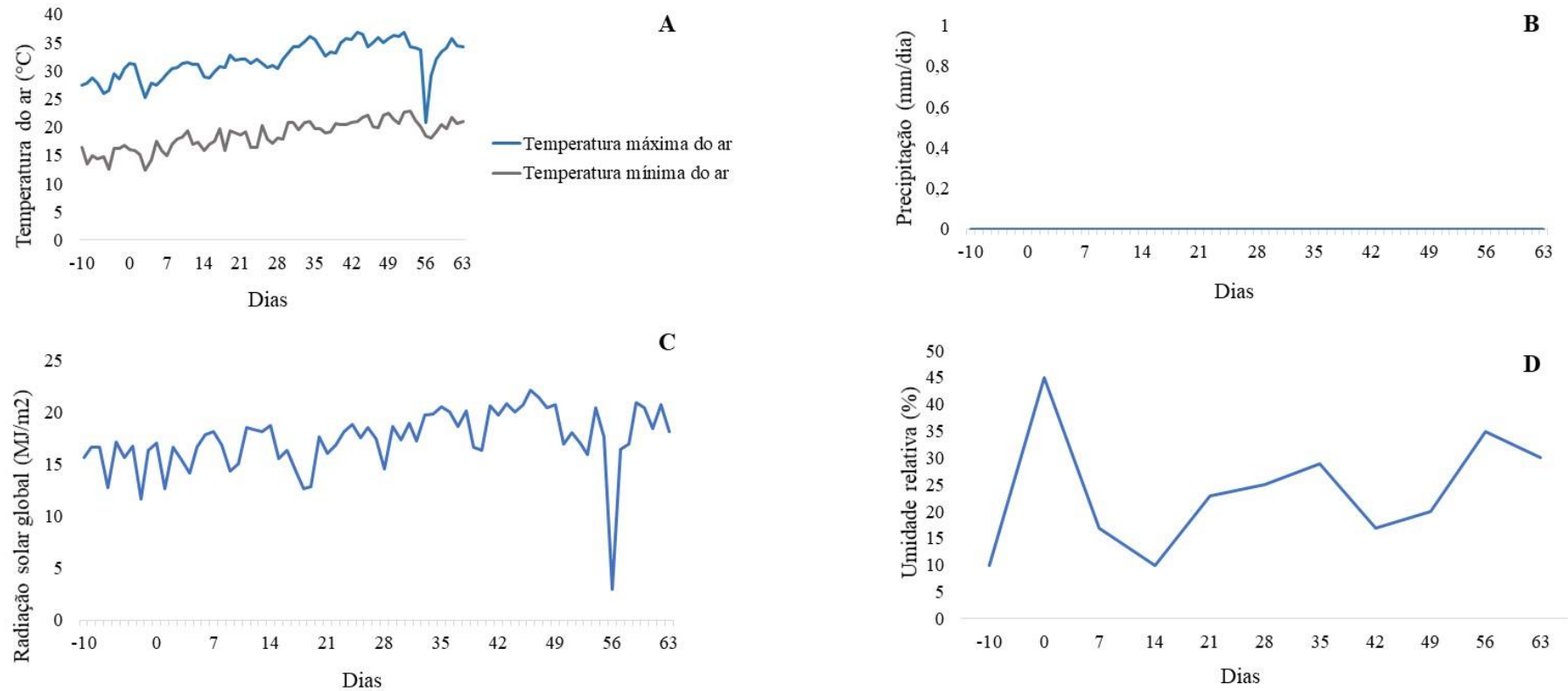


Figura 4. Dados climáticos da região dos experimentos coletados diariamente pela estação meteorológica ou com higrômetro. A) Temperatura máxima e mínima do ar (°C); B) Precipitação (mm/dia); C) Radiação solar global (MJ/m²). D) Umidade relativa do ar (%) medida por um higrômetro a cada sete dias no interior de uma das parcelas de *Panicum maximum*.

O solo utilizado para a realização dos ensaios de campo apresentou textura argilosa, sendo classificado como solo argiloso, contendo 62% de argila, 10% de silte e 28% de areia (Anexo II). Em relação a análise microbiológica foram detectadas bactérias do gênero *Bacillus* na quantidade de $1,2 \times 10^6$ UFC/g de solo. Fungos habitantes do solo como *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., e *Trichoderma* sp. foram encontrados nas seguintes quantidades 1,667, 3,667, 2,000 UFC/g de solo, e *Rhizoctonia* sp. com 5 UFC/100 g de solo. Os nematoides fitopatogênicos *Helicotylenchus* sp. e *Heterodera glycines* também foram identificados nas amostras de solo (198 e 11 em 200 mL de solo, respectivamente - Anexo III).

O número de larvas de *R. microplus* recuperadas nas parcelas tratadas com *H. bacteriophora* HP88 foram menores em todas as coletas, quando comparadas ao número de larvas obtidas nas parcelas do grupo controle ($P < 0,05$ - Figura 5- A), o que resultou em eficácia de 73,1% (Figura 5- B).

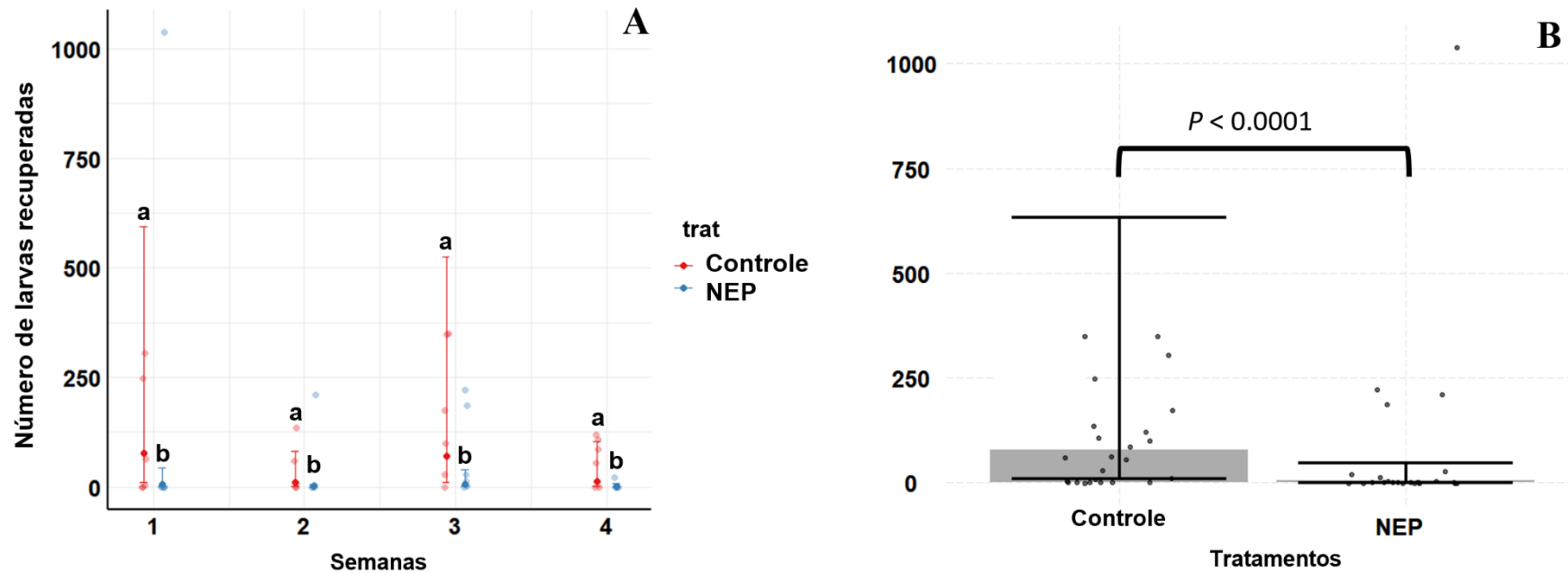


Figura 5. Número médio (\pm 95% IC) de larvas recuperadas dos grupos tratado e controle durante as quatro semanas de estudo (A) e número médio cumulativo (\pm 95% IC) de larvas após 4 semanas (B). Os tratamentos foram realizados por meio da formulação inseto cadáver (larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88). Figura A: Médias semanais de larvas recuperadas no grupo controle e tratado; B: Média total de larvas recuperadas.

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa entre si ($P < 0.05$). Na figura A, médias dos grupos controle e tratado foram comparadas dentro da mesma semana (mesma coleta).

4. DISCUSSÃO

Estudos que demonstram a patogenicidade de nematoides entomopatogênicos em carrapatos tem sido publicados, especialmente nos últimos 10 anos, e *H. bacteriophora* HP88 tem sido apontado como um dos isolados com maior potencial devido a sua elevada virulência (Monteiro et al., 2010, 2012, 2014b, 2020); entretanto, alguns aspectos referentes à sua infecção ainda não haviam sido elucidados. No presente estudo, apresentamos pela primeira vez, dados a respeito da virulência desse isolado sobre diferentes populações de *R. microplus* e sobre fêmeas em diferentes níveis de ingurgitamento, além de demonstrar a eficácia deste isolado para controle de *R. microplus* em condições de campo.

Fêmeas com diferentes níveis de ingurgitamento (150, 200, 250, 300 e 350 mg) apresentaram susceptibilidade similar ao nematoide *H. bacteriophora* HP88. Diferenças de susceptibilidade à infecção por NEPs entre os diferentes estágios de desenvolvimento dos carrapatos são descritas na literatura, sendo as fêmeas ingurgitadas as mais sensíveis à infecção (Freitas-Ribeiro et al., 2005; Samish et al., 2008; Yang et al., 2013; Monteiro et al., 2014), seguidas pelos adultos (machos e fêmeas) não alimentados (Samish et al., 2004, 2008), enquanto as ninfas são moderadamente susceptíveis (Kaaya et al., 2006; Hartelt et al., 2008; Cardoso et al., 2013). Larvas, quando comparadas com ninfas, apresentam maior grau de resistência natural à infecção (Kaaya et al., 2006) e os ovos são totalmente resistentes (Samish et al., 2004, 2008). Ao término da fase parasitária, ao se desprenderem do hospedeiro, as fêmeas ingurgitadas geralmente apresentam peso entre 150 a 360 mg, sendo englobado neste intervalo as fêmeas com os maiores índices de eficiência reprodutiva (Borges et al., 2001; Santos & Furlong, 2002). Desta forma, o controle por *H. bacteriophora* HP88 sobre as fêmeas inseridas neste intervalo de pesos

reforça o potencial deste isolado como ferramenta de controle de *R. microplus* em sua fase não parasitária.

Juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 realizam busca ativa por hospedeiros susceptíveis mediante detecção de compostos excretados (CO₂, fezes, fluidos intestinais e ácido úrico) (Grewal et al. 1993; Wang & Gaugler, 1998; O'Hallaran & Burnell, 2003); entretanto, este comportamento pode ser alterado de acordo com o tipo e a quantidade de compostos emitidos (Lewis et al., 2006; Koppenhöfer and Fuzy, 2008). Um estudo conduzido com fêmeas semi-ingurgitadas e totalmente ingurgitadas de *R. sanguineus* demonstrou que fêmeas com menores níveis de ingurgitamento emitem menos CO₂ se comparada com as maiores (Landulfo et al., 2019), desta forma, os resultados do presente trabalho mostram que não houve interferência na localização das fêmeas pelos JIs, não ocorrendo diferença de efetividade do isolado.

Fêmeas ingurgitadas de diferentes populações de *R. microplus* não apresentaram diferença de susceptibilidade à infecção por *H. bacteriophora* HP88, embora diferenças na susceptibilidade de populações de artrópodes a agentes biológicos, incluindo vírus, bactérias e fungos entomopatogênicos já tenham sido documentadas na literatura (Mcgaughey, 1985; Moscardini, 1993; Webster et al., 2017). Em *R. microplus*, já foi demonstrado que diferentes populações apresentam diferentes níveis de susceptibilidade à infecção por fungos entomopatogênicos: Fernandes et al. (2011) mostraram variação na susceptibilidade de larvas de *R. microplus* de diferentes populações à infecção pelo fungo *Beauveria bassiana* s.l., enquanto Perinotto et al. (2012) demonstraram diferenças de susceptibilidade de fêmeas e larvas de *R. microplus* de diferentes populações a *B. bassiana* s.l. (Bb 986) e *M. anisopliae* s.l. (959). Da mesma forma, em ensaio similar, Webster et al. (2017) investigaram a susceptibilidade de cepas selvagens de *R. microplus* à infecção por *M. anisopliae* s.l. e mostraram grande variabilidade na susceptibilidade das

populações ao isolado fúngico testado. Recentemente, estudos comparativos sobre a eficácia de seis espécies de nematoides entomopatogênicos para controlar uma população de *R. microplus* resistente e uma população susceptível à acaricidas químicos foram desenvolvidos em condições controladas, e em ambos estudos a eficácia do tratamento nas diferentes populações foram similares (Singh et al., 2018, 2019), e corroboram com os resultados obtidos no presente estudo.

Em relação ao ensaio de campo, cabe destacar que o experimento foi conduzido no período de seca no Centro-Oeste do Brasil, (temperatura média 31,8 °C – umidade relativa média 23,7%). Ainda assim, foi observado que o tratamento com *H. bacteriophora* HP88 ocasionou redução do número de larvas em todas as semanas de avaliação, resultando em eficácia de 73%. Mesmo em condições climáticas desfavoráveis, os JIs de *H. bacteriophora* HP88 foram capazes de infectar fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e esta eficácia possivelmente se deve a termotolerância de *H. bacteriophora* HP88. Estudos prévios reportam a capacidade deste isolado em ocasionar mortalidade em diversas pragas mesmo quando expostos a temperaturas elevadas (ex: 35 °C) (Selvan et al., 1996; Shamseldean et al., 1996); entretanto, geralmente temperaturas superiores a 32 °C dificultam sua reprodução, atividade e viabilidade (Grewal et al., 1994). Cabe destacar que essa época do ano também é desfavorável para o desenvolvimento de *R. microplus* (fêmea ingurgitada, ovos e larvas) na pastagem durante a fase não parasitária (Nicaretta et al., 2021).

A relevante eficácia da aplicação de *H. bacteriophora* HP88 para controle de *R. microplus* em sua fase não parasitária reforça o potencial desse isolado como agente de biocontrole. A virulência de *H. bacteriophora* HP88 para diferentes espécies de carrapatos tem sido documentada, incluindo registros em condições de laboratório sobre *R. annulatus*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma variegatum*, *Dermacentor nitens* e *R.*

microplus (Hill, 1998; Kaaya et al., 2006; Monteiro et al., 2014a,b) e em condições de semi-campo para *R. annulatus* e *R. microplus* (Samish et al., 1999; Alekseev et al., 2006; Monteiro et al., 2020). Monteiro et al. (2020) demonstraram que a aplicação de *H. bacteriophora* HP88 por meio de formulação inseto cadáver em vasos contendo *Urochloa decumbens* resultou em total mortalidade das fêmeas ingurgitadas dezoito dias pós tratamento e redução de postura de 97,2%. Em ensaio de casa de vegetação, Samish et al. (1999) investigaram o efeito do tratamento de nove nematoides entomopatogênicos pertencentes a diferentes espécies sobre fêmeas ingurgitadas de *R. annulatus* acondicionadas sobre vasos contendo solo e observaram que *H. bacteriophora* HP88 foi o terceiro isolado mais virulento (50 JIs/cm²) causando 82% de mortalidade após 14 dias do tratamento. Em ensaio similar, Alekseev et al. (2006) utilizaram o mesmo isolado de nematoide e constataram mortalidade de aproximadamente 70% de fêmeas ingurgitadas de *R. annulatus* após três dias de tratamento. Estes estudos conduzidos em condições de semi-campo, embora apresentem condições mais controladas corroboram com os resultados reportados em nosso teste de campo.

O teste de campo do presente estudo expôs os JIs a importantes fatores que podem ter limitado a eficácia dos NEPs, como o tipo de solo, e a umidade do solo. NEPs são organismos aquáticos e necessitam de uma película de água ao seu redor para se moverem (Norton, 1978), assim como o tipo de solo também pode influenciar em sua atividade (Kung et al., 1990; Dolinski et al., 2010). No presente estudo a ausência de chuva pode ter tornado o solo da região demasiadamente seco desfavorecendo a movimentação dos JIs; além disso, o solo argiloso da região vem sendo reportado como redutor da movimentação e infectividade dos JIs (Kung et al. 1990; Dolinski et al. 2010). No estudo de Monteiro et al. (2020), a ocorrência de precipitação durante o período de experimentação e o solo arenoso utilizado podem estar relacionados com a relevante

eficácia de HP88 (98%) no controle de *R. microplus*, já que JIs apresentam maior taxa de movimentação e infectividade em solo arenoso (Kung et al. 1990; Dolinski et al. 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que *H. bacteriophora* HP88 não apresentou diferenças de susceptibilidade em fêmeas de diferentes pesos, e de diferentes populações, além de promover redução no número de larvas de *R. microplus* em condições de campo. Novos estudos abordando a combinação de nematoides com outros agentes biológicos, como os fungos entomopatogênicos, podem trazer melhorias no controle da população da fase não parasitária de *R. microplus* em pastagens infestadas. Além disso, estudos aplicando os NEPs em pastagens destinadas a criação extensiva de bovinos precisam ser conduzidos para determinar a eficácia do tratamento em reduzir a infestação de carrapatos nos animais.

5. REFERÊNCIAS

- Alekseev, E., Glazer, I., Samish, M., 2006. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. *BioControl* 51, 507–518. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-2935-9>
- Arnhold, E., 2013. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 50, 488–492. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v50i6p488-492>
- Bennett, G.F., 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. *Acarologia* 16, 251–257.
- Borges, L.M.F., Carneiro, J.R., Gomes, A.G., Moreira, P.C., 2001. INFLUÊNCIA DO PESO INICIAL E DA ESTAÇÃO DO ANO NA CONVERSÃO EM OVOS DE FÊMEAS DE *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE). *Ciência Anim. Bras.* 2, 127–131. <https://doi.org/10.5216/cab.v2i2.263>
- Burges, H.D., 1971. Possibilities of pest resistance to microbial control agents, in: Burges, H.D., Hussey, N.W. (Eds.), *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, New York, pp. 445–457.
- Cardoso, R., Monteiro, C.M.O., Prata, M.C.A., Batista, E.S.P., 2013. Effect of the entomopathogenic nematode *Steinernema Glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) isolate Santa Rosa on the biological parameters of engorged nymphs of *Amblyomma*

- Cajennense* (Acari: Ixodidae). Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo). 80, 237–241. <https://doi.org/10.1590/s1808-16572013000200015>
- Del Valle, E.E., Dolinski, C., Barreto, E.L.S., Souza, R.M., Samuels, R.I., 2008. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. Biocontrol Sci. Technol. 18, 33–41. <https://doi.org/10.1080/09583150701721713>
- Dolinski, C., 2006. Uso de entomopatogenic nematodes para o controle de pragas, in: Venzon M, Paula Jr TJ, P.A. (Ed.), Tecnologias Alternativas Para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças. Viçosa, pp. 261–289.
- Dolinski, C., Pinto, C.C.S., Robaina, R.R., Bellini, L.L., 2010. Efeito de Substratos com Diferentes Classes Texturais na Mobilidade de *Heterorhabditis baujardi* ‘LPP7’ (Rhabditida : Heterorhabditidae). Nematol. Bras. 34, 123–128.
- Doucet, M.M.A., Miranda, M.B., Bertolotti, M.A., 1998. Infectivity of entomogenous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae). Fundam. Appl. Nematol. 21, 13–16.
- Drummond, R.O., Gladney, W.J., Whetstone, T.M., Ernst, S.E., 1971. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. J. Econ. Entomol. 64, 686–688. <https://doi.org/10.1093/jee/64.3.686>
- Ehlers, R.U., 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 623–633. <https://doi.org/10.1007/s002530100711>
- Fernandes, É.K.K., Angelo, I.C., Rangel, D.E.N., Bahiense, T.C., Moraes, Á.M.L., Roberts, D.W., Bittencourt, V.R.E.P., 2011. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. Vet. Parasitol. 182, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.046>
- Figueiredo, A., Agnolon, I.C., Lopes, L.G., Giglioti, R., Chagas, A.C.S., 2018. Comparative study of hatching estimation methods of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. Vet. Parasitol. 264, 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.10.015>
- Freitas-Ribeiro, G.M., Furlong, J., Vasconcelos, V.O., Dolinski, C., Loures-Ribeiro, A., 2005. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* santa rosa and all strains (Steinernema: Rhabditida). Brazilian Arch. Biol. Technol. 48, 911–919. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000800007>
- Furlong, J., Martins, J.R.S., Prata, M.C.A., 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. A hora veterinária 23, 53–56.
- Grewal, P. S., Gaugler, R., & Selvan, S. 1993. Host recognition by entomopathogenic nematodes: Behavioral response to contract with host feces. J. Chem. Ecol., 19(6), 1219–1231. <https://doi.org/10.1007/BF00987382>

- Grewal, P.S., Selvan, S., Gaugler, R., 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *J. Therm. Biol.* 19, 245–253. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)90047-7)
- Grewal, P.S., De Nardo, E.A.B., Aguilera, M.M., 2001. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in south America. *Neotrop. Entomol.* 30, 191–205. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200001>
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R. de S., de Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., de León, A.A.P., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 150–156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- Hartelt, K., Wurst, E., Collatz, J., Zimmermann, G., Kleespies, R.G., Oehme, R.M., Kimmig, P., Steidle, J.L.M., Mackenstedt, U., 2008. Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.10.003>
- Higa, L. de O.S., Garcia, M.V., Barros, J.C., Koller, W.W., Andreotti, R., 2016. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 25, 163–171. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612016026>
- Kaaya, G.P., Samish, M., Glazer, I., 2006. Laboratory Evaluation of Pathogenicity of Entomogenous Nematodes to African Tick Species. *Ann. New York Acad. Sci.* 303–308.
- Kaya, H.K., Stock, P.S., 1997. Techniques in insect nematology. *Man. Tech. Insect Pathol.* 281–324. <https://doi.org/10.1016/b978-012432555-5/50016-6>
- Klafke, G., Webster, A., Dall Agnol, B., Pradel, E., Silva, J., de La Canal, L.H., Becker, M., Osório, M.F., Mansson, M., Barreto, R., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., Santos, J., Reck, J., Martins, J.R., 2017. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>
- Koppenhöfer, A.M., Fuzy, E.M., 2008. Attraction of four entomopathogenic nematodes to four white grub species. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.05.003>
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K., 1990. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 401–406. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(90\)90084-J](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90084-J)
- Landulfo, G.A., Li, A.Y., Lima, A.S., Silva, N.C.S., Vale, T.L., Costa-Junior, L.M., 2019. Feeding and respiratory gas exchange of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 78, 173–179. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00383-3>

- Lenth R, Singmann H, Love J, et al (2020) emmeans : Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R Packag. version 1.15-15.
- Lewis, E.E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., Peters, A., 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biol. Control* 38, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007>
- Lindegren, J.E., Valero, K.A., Mackey, B.E., 1993. Simple In Vivo Production and Storage Methods for *Steinernema carpocapsae* Infective Juveniles. *J. Nematol.* 25, 193–197.
- Mcgaughey, W.H., 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229, 193–195. <https://doi.org/10.1126/science.229.4709.193>
- Monteiro, C.M.O., Furlong, J., Prata, M.C.A., Soares, A.E., Batista, E.S.P., Dolinski, C., 2010. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 170, 355–358. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.021>
- Monteiro, C.M.O., Prata, M.C.A., Faza, A., Batista, E.S.P., Dolinski, C., Furlong, J., 2012. *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP88 for biological control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): The effect of different exposure times of engorged females to the nematodes. *Vet. Parasitol.* 185, 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.007>
- Monteiro, C.M.O., Araújo, L.X., Matos, R.S., Golo, P.S., Angelo, I.C., Perinotto, W.M.S., Coelho Rodrigues, C.A., Furlong, J., Bittencourt, V.R.E.P., Prata, M.C.A., 2013. Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 112, 3645–3651. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3552-7>
- Monteiro, C., Araújo, L.X., Gomes, G.A., Senra, T.O.S., Calmon, F., Daemon, E., De Carvalho, M.G., Bittencourt, V.R.E.P., Furlong, J., Prata, M.C.A., 2014a. Entomopathogenic nematodes associated with essential oil of *Lippia sidoides* for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 113, 189–195. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3643-5>
- Monteiro, C., Matos, R.S., Araújo, L.X., Campos, R., Bittencourt, V.R.E.P., Dolinski, C., Furlong, J., Prata, M.C.A., 2014b. Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 203, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.003>
- Monteiro, C.M.O., Prata, M.C.A., 2015. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e desafios, in: Controle de Carrapatos Nas Pastagens. pp. 46–68.
- Monteiro, C., Coelho, L., de Paula, L.G.F., Fernandes, É.K.K., Dolinski, C., Bittencourt, V.R.E.P., Furlong, J., Prata, M.C. de A., 2020. Efficacy of entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulation against engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in semi-field conditions. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11,

101313. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101313>

- Moscardini, F., 1993. Soybean integrated pest management in Brazil. *FAO Plant Prot. Bull.* 41, 91–100.
- Nicaretta, J.E., Zapa, D.M.B., Couto, L.F.M., Heller, L.M., Cavalcante, A.S.A., Cruvinel, L.B., Melo Júnior, R.D., Ferreira, L.L., Nascimento, R.M., Soares, V.E., Borges, L.M.F., Monteiro, C.M.O., Lopes, W.D.Z., 2021. *Rhipicephalus microplus* seasonal dynamic in a Cerrado biome, Brazil: An update data considering the global warming. *Vet. Parasitol.* 296. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109506>
- Nicholson, W.L., Sonenshine, D.E., Noden, B.H., Brown, R.N., 2019. Ticks (Ixodida), *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814043-7.00027-3>
- Noosidum, A., Mangtab, S., Lewis, E.E., 2021. Biological control potential of entomopathogenic nematodes against the striped flea beetle, *Phyllotreta sinuata* Stephens (Coleoptera: Chrysomelidae). *Crop Prot.* 141, 105448. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105448>
- Norton, D.C., 1978. *Ecology of Plant-Parasitic Nematodes*. New York.
- O'Hallaran, D. M., & Burnell, A. M. 2003. An investigation of chemotaxis in the insect parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasitology*, 127(4), 375–385. <https://doi.org/10.1017/S0031182003003688>
- Perinotto, W.M.S., Angelo, I.C., Golo, P.S., Quinelato, S., Camargo, M.G., Sá, F.A., Bittencourt, V.R.E.P., 2012. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Exp. Parasitol.* 130, 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.003>
- Reck, J., Klafke, G.M., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., Vargas, R., dos Santos, J.S., de Souza Martins, J.R., 2014. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>
- Samish, M., Alekseev, E., Glazer, I., 1999. Efficacy of entomopathogenic nematode strains against engorged *Boophilus annulatus* females (Acari: Ixodidae) under simulated field conditions. *J. Med. Entomol.* 36, 727–732. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.6.727>
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2008. Anti-tick biological control agents: Assessment and future perspectives. *Ticks Biol. Dis. Control* 447–469. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511551802.021>
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2004. Biological control of ticks. *Parasitology* 129. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005219>
- Santos, A.P., Furlong, J., 2002. Competição Intraespecífica em *Boophilus microplus*. *Ciência Rural* 32, 1033–1038.

- Selvan, S., Grewal, P.S., Leustek, T., Gaugler, R., 1996. Heat shock enhances thermotolerance of infective juvenile insect-parasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Experientia* 52, 727–730. <https://doi.org/10.1007/BF01925583>
- Shamseldean, M.M., Abd-Elgawad, M.M., Atwa, A.A., 1996. Evaluation of four entomopathogenic nematodes against *Spodoptera littoralis* (Lepid., Noctuidae) larvae under different temperatures. *J. Pest Sci.* (2004). 69, 111–113. <https://doi.org/10.1007/bf01996881>
- Shapiro-Ilan, D.I., Dolinski, C., 2015. Entomopathogenic nematode application technology, in: Campos-Herrera, R. (Ed.), *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection*. Springer International Publishing, pp. 231–534.
- Silva, E.R., Monteiro, C.M.O., Reis-Menini, C., Prata, M.C.A., Dolinski, C., Furlong, J., 2012. Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Biol. Control* 62, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.05.007>
- Singh, N.K., Goolsby, J.A., Shapiro-Ilan, D.I., Miller, R.J., Thomas, D.B., Klafke, G.M., Tidwell, J.P., Racelis, A.E., Grewal, P.S., Leon, A.A.P., 2018. Efficacy Evaluation of Six Entomopathogenic Nematode Species against Engorged Females of Southern Cattle Fever Tick, *Rhipicephalus* (= *Boophilus*) *microplus*. *Southwest. Entomol.* 43, 1–17. <https://doi.org/10.3958/059.043.0119>
- Singh, N.K., Goolsby, J.A., J., Shapiro-Ilan, D.I., Miller, R.J., León, A.A.P., 2019. Comparative Efficacy of Entomopathogenic Nematodes Against a Multi-Acaricide Resistant Strain of Southern Cattle Fever Tick, *Rhipicephalus microplus*. *Southwest. Entomol.* 44, 143. <https://doi.org/10.3958/059.044.0116>
- Venables WN, Ripley BD (2002). *Modern Applied Statistics with S*, Fourth edition.
- Wang, Y., & Gaugler, R. 1998. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese Beetle Larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 72(3), 313–318. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4805>
- Webster, A., Pradel, E., Souza, U.A., Martins, J.R., Reck, J., Schrank, A., Klafke, G., 2017. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8, 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.012>
- Yang, X., Gao, Z., Yu, Z., Wang, D., Tang, Y., Li, F., Liu, J., 2013. Pathogenicity of five species of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to the ixodid tick *Dermacentor silvarum* Olenov (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 23, 1349–1361. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.838624>

CAPÍTULO 3: Combinação entre fungos e nematoides entomopatogênicos formulados contra *Rhipicephalus microplus*: um estudo da virulência sobre a fase não parasitária

Marcos Daniel Gomes Filgueiras^a; Lucas Prado Barreto^b; Valesca Henrique Lima^a; Cárita de Souza Ribeiro e Silva^b; Salorrane Miranda do Nascimento Pinto^a; Gabriel Moura Mascarin^c; Pricila Vetrano Rizzo^d; Fernanda Mara Cunha Freitas^d; Filippe Elias de Freitas Soares^e; Caio Monteiro^{a,f}; Éverton Kort Kamp Fernandes^{a,f*}

a - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás. Avenida Esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brazil, 74690-900.

b - Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brazil, 74605-050.

c - Embrapa Meio Ambiente. Rodovia SP-340, Km 127,5, Jaguariúna, São Paulo, Brazil, 13918-110.

d - Embrapa Gado de leite. Av. Eugênio do Nascimento, 610 - Aeroporto, Juiz de Fora - MG, 36038-330.

e - Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil, 37200-900.

f - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG). Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brazil, 74605-050.

*** Autor para correspondência:**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Avenida Esperança s/n, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brasil, 74690-900.

Telefone: +55 (62) 3209-6118; e-mail: evertonkort@ufg.br

RESUMO

O presente estudo avaliou, em laboratório, o efeito da combinação entre fungos entomopatogênicos pertencentes ao gênero *Metarhizium* spp. (IP 46, 119, 125, 146 e 363) e o nematoide entomopatogênico (NEP) *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Em adição, após selecionar o isolado IP 146 (*Metarhizium robertsii*) avaliou-se sua combinação em sub-doses (1×10^6 ou 1×10^7 conídios ml^{-1}) com *H. bacteriophora* HP88 (15 ou 25 NEPs/fêmea) sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Além disso, diferentes formulações granulares contendo microescleródios (ME) de *Metarhizium robertsii* IP 146 foram testadas sobre diferentes substratos para verificar a produção e a viabilidade dos conídios. Por fim, o efeito da combinação entre formulação granular contendo ME de *M. robertsii* IP 146 e juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 sobre a fase não-parasitária de *R. microplus* foi avaliado em ensaio realizado em condição de campo em diferentes estações do ano (chuvosa ou seca). Nos testes de combinação em laboratório, todos os tratamentos realizados foram eficazes em reduzir os parâmetros biológicos avaliados, sendo os melhores resultados obtidos pelos grupos nematoide e combinação. Em relação ao teste complementar utilizando sub-doses de *M. robertsii* IP 146 (10^6 ou 10^7 conídios mL^{-1}) combinados com *H. bacteriophora* HP88 (15 ou 25 NEPs/fêmea), todas as combinações testadas apresentaram efeito sinérgico. Nos testes utilizando diferentes formulações granulares (10^1 microescleródios/mg), meio ágar-água (30 mg) ou solo não esterilizado (7 mg) foram utilizados como substrato para desenvolvimento fúngico nos grânulos. Nos grânulos cultivados em meio ágar-água, resultados semelhantes para produção conidial e alta viabilidade ($> 85\%$) foram obtidos em todas as formulações testadas. No solo não esterilizado, a formulação multiparticulada composta por celulose, vermiculita, terra diatomácea e fibra vegetal foi eficaz em produzir conídios sobre este substrato. No teste de campo conduzido no período chuvoso, todos os tratamentos reduziram a população não parasitária de *R. microplus* presente nas pastagens, resultando em eficácia de 54,09% (fungo), 38,11% (nematoide) e 46,72% (combinação). No período seco, somente o tratamento fúngico reduziu a população não parasitária de *R. microplus* presente nas pastagens, com eficácia de 26,27%. Conclui-se que a combinação de *M. robertsii* IP146 e *H. bacteriophora* HP88 em condições controladas oferece melhores resultados do que seus agentes utilizados isoladamente (sinergismo), a formulação multiparticulada selecionada foi eficaz na produção de conídios quando cultivada sobre solo não

esterilizado e por fim, os entomopatógenos *M. robertsii* IP 146 e *H. bacteriophora* HP88 quando aplicados no campo atuam como agentes promissores no biocontrole da fase não parasitária de *R. microplus*, apesar da eficácia do tratamento sofrer variação de acordo com a época do ano.

Palavras-chave: *Metarhizium*, *Heterorhabditis bacteriophora*, carrapato, campo

1. INTRODUÇÃO

Variáveis bióticas ou abióticas como as condições ambientais adversas¹⁻³, competidores microbianos e a ecologia do hospedeiro podem ser fatores limitantes em programas de controle microbiano de pragas⁴. Esforços vêm sendo realizados para desenvolver ferramentas eficazes para otimizar a aplicação destes microrganismos em programas de controle biológico, como o desenvolvimento de metodologias inovadoras e de baixo custo que permitam a produção em massa destes biocontroladores⁵⁻⁷ e o desenvolvimento de soluções tecnológicas para conferir proteção contra estes fatores limitantes⁸⁻¹¹, além da utilização associada de diferentes entomopatógenos¹².

Entre os agentes utilizados para o biocontrole de pragas, destacam-se os fungos (FEPs) e os nematoides entomopatogênicos (NEPs). No que diz respeito aos FEPs, espécies do gênero *Metarhizium* possuem patogenicidade para uma ampla variedade de artrópodes¹³, e também são os fungos mais estudados para o controle de artrópodes devido a sua capacidade de penetrar ativamente através da cutícula e causar mortalidade^{14,15}. *Metarhizium* spp. são capazes de produzir diferentes tipos de propágulos como conídios e blastosporos¹⁶, e algumas espécies por fermentação líquida, produzem estruturas compostas por agregados de hifas pigmentadas conhecidas como microescleródios. Os microescleródios são estruturas mais resistentes a dessecação e que não apresentam infectividade direta aos artrópodes; entretanto, quando expostos a condições climáticas

favoráveis, produzem conídios que podem iniciar o processo infeccioso¹⁷. Os NEPs pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* (Poinar, 1975) (Rahbdtida: Heterorhabditidae) são microrganismos utilizados no controle biológico de diferentes artrópodes pragas^{18,19}, e são apontados como os NEPs com maior virulência para carrapatos²⁰⁻²². A infectividade de *Heterorhabditis* spp. se dá por meio da penetração dos juvenis infectantes (JIs) por diferentes vias; após alcançar a hemocele, os JIs liberam bactérias simbiotes responsáveis por ocasionar morte do artrópode por septicemia¹⁹. Ambos agentes já são produzidos em escala comercial e utilizados no controle de pragas em diferentes regiões do mundo^{7,23}.

Ao longo dos anos, diferentes bioformulações contendo entomopatógenos como ingrediente ativo vêm sendo desenvolvidas para viabilizar o contato de agentes infecciosos com os artrópodes que habitam ambientes sobre ou abaixo do solo²⁴. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari, Ixodidae), importante ectoparasito de bovinos²⁵, após o término de sua fase parasitária, se desprendem de seus hospedeiros e buscam microambientes com temperaturas amenas e umidade elevada para realizarem oviposição iniciando a sua fase não parasitária; estes ambientes são também propícios para a sobrevivência dos FEPs e NEPs^{8,9,26}. Partindo deste princípio, é de grande importância o desenvolvimento de estratégias que utilizem a capacidade infectiva de ambos os organismos para controlar os diferentes estágios de vida de *R. microplus* presentes no solo^{8,9,22,26}. Altos níveis de infestações são frequentemente encontrados nos bovinos, estes indivíduos não representam toda a população de *R. microplus* na área. Estimativas apontam que apenas 5% dos carrapatos parasitam o gado, enquanto 95% estão dispersos nas pastagens^{27,28}.

Apesar dos resultados promissores empregando estes biocontroladores de forma isolada, poucos estudos são desenvolvidos avaliando a combinação entre FEPs e NEPs

no controle de carrapatos^{29,30}. Essa combinação entre diferentes agentes de controle biológico tem sido utilizada como um método de otimização de resultados, visto que as aplicações combinadas de entomopatógenos pode ser uma alternativa para aumentar a eficácia dos agentes de biocontrole¹¹. A maioria dos estudos que vem sendo conduzidos investigam a combinação sobre insetos de importância agrícola, especialmente das ordens Coleoptera e Lepidoptera^{11,31-35}. Neste contexto, até o momento, nenhum estudo foi conduzido para investigar o efeito da combinação destes microrganismos formulados para controlar a fase não parasitária do carrapato bovino em condições de campo.

Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar uma combinação eficaz entre fungos e nematoides entomopatogênicos sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Em segundo lugar, o presente estudo buscou selecionar uma formulação granular contendo microescleródios de *M. robertsii* IP 146 que permita a esporulação fúngica em solo não esterilizado, e determinar a eficácia da aplicação combinada da formulação granular e juvenis do nematoide *H. bacteriophora* HP88 contra *R. microplus* durante a fase não parasitária. Em paralelo, também foi investigado a persistência do nematoide e do fungo no solo.

2. METODOLOGIA

2.1 Origem dos carrapatos

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Cepa Gyn) foram obtidas de infestações artificiais em bovinos (protocolo CEUA/UFG N° 032/17). As fêmeas ingurgitadas recuperadas da infestação foram selecionadas de acordo com sua integridade, mobilidade e ingurgitamento. As fêmeas foram pesadas e distribuídas por peso da forma mais homogênea possível entre os grupos tratamento e controle ($P > 0,05$).

2.2 Fungos e nematoides entomopatogênicos

O isolado de *Heterohabditis bacteriophora* HP88 utilizado no presente estudo foi selecionado devido sua alta virulência para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*²¹. Este isolado foi cedido pela Dra. Cláudia Dolisnki, do laboratório de Nematologia, da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e mantido no Laboratório de Patologia de Invertebrados (LPI) por meio de multiplicação em larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae)^{36,37}. As suspensões de nematoides foram preparadas com dez alíquotas de 10 µL retiradas de frasco de cultura de células de 40 mL, contendo 20 mL de suspensão aquosa. Em seguida, foi realizada contagem em microscópico óptico e calculado o número médio de JIs por amostra, e na sequência, foi realizado o ajuste para as concentrações testadas.

Os isolados de *Metarhizium* spp. (Tabela 1) foram obtidos a partir de coleção fúngica mantida no LPI. Foram cultivados em placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio batata dextrose ágar (Difco[®], Maryland, EUA) acrescido de extrato de levedura (0,1%) (Difco[®], Maryland, EUA) a 27 ± 1 °C e umidade relativa (UR) ≥ 90% por 15 dias com fotoperíodo de 12 h.

Tabela 1. Isolados de fungos entomopatogênicos investigados no presente estudo e sua origem.

Isolados	Origem
<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	
IP 46	Solo; Parque nacional das emas, Goiás, Brasil
IP 363	Solo; Terezópolis de Goiás, Goiás, Brasil
<i>Metarhizium anisopliae</i> s.str.	
IP 119	Solo; Niquelândia, Goiás, Brasil
<i>Metarhizium robertsii</i>	
IP 125	Solo; Pirenópolis, Goiás, Brasil
IP 146	Solo; Silvânia, Goiás, Brasil

IP: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, GO, Brasil.

Os conídios foram removidos da superfície do meio de cultura com uma espátula e suspensos em 10 mL de solução Tween 80 0,01% (Sigma Chemical CO.®, St. Louis, EUA). As suspensões foram agitadas em vórtex, filtradas com gaze estéril, quantificadas e ajustadas para 5×10^7 conídios mL⁻¹.

Para a produção de microescleródios, os conídios foram inoculados em meio líquido com relação carbono-nitrogênio (C:N) de 30:1 de acordo com Mascarin et al.⁵. *Metarhizium robertsii* IP 146 foi cultivado em frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 1,5 g de extrato de levedura, 53,5 mL de meio basal (Tabela 2), 36,5 mL de solução de glicose (7,3% p/v) e 10 mL de suspensão de conídios, totalizando 100 mL/frasco de acordo com Mascarin et al.⁵. Os frascos foram selados com tampões de algodão hidrofílico e agitados a 250 rpm por 4 dias em temperatura ambiente. Em seguida, a biomassa foi quantificada e utilizada em 10^4 microescleródios mL⁻¹.

Tabela 2. Fórmula molecular, componentes e quantidade (g/L) de reagentes que compõem o meio basal, utilizado para desenvolver o meio de cultura para produzir microescleródios.

Fórmula molecular	Componentes P.A.	Quantidade (g/L)
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose	200
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio	4
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio	0,6
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso	0,1
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganês (II)	0,016
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco	0,014

2.3 Combinação de diferentes espécies de *Metarhizium* com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 contra fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* sob condições controladas

Os ensaios foram compostos por 12 grupos: um grupo controle tratado com apenas solução Tween 80[®]; cinco grupos tratados com conídios dos isolados de *Metarhizium* spp. (IP 46, 119, 125, 146 ou 363); um grupo tratado com juvenis infectantes do nematoide *H. bacteriophora* (HP88), e os grupos tratados com a combinação dos isolados de *Metarhizium* spp. e *H. bacteriophora* HP88 (HP88 + IP 46, 119, 125, 146 ou 363).

Para avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos, cada grupo foi composto por 10 fêmeas previamente homogeneizadas por peso. Em seguida, cada fêmea foi colocada individualmente em poços de placas de cultura de células de 12 poços (Kasvi[®], São José do Pinhais - Paraná, Brasil). Cada poço continha duas folhas de papel de filtro no fundo. No grupo tratado com *H. bacteriophora* HP88, alíquotas de 200 µL da suspensão contendo 50 JIs/fêmea foram pipetadas nas folhas presentes no fundo dos poços.

No grupo tratado com fungos, 10 mL das suspensões (1×10^7 mL⁻¹ conídios/mL) foram distribuídos igualmente em 10 tubos Eppendorf de 1,5 mL (individualizados para cada tratamento); posteriormente, as fêmeas foram imersas na suspensões por 3 minutos e, a seguir, transferidas para os poços. Para os grupos das combinações, foram utilizados os mesmos métodos dos grupos tratados com nematoides e fungos isoladamente. O grupo controle foi imerso em 1 mL de solução 0,01% de Tween 80[®] e, a seguir, transferido para os poços. Após o tratamento, as placas foram incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$ para oviposição. A massa de ovos de cada fêmea foi colhida diariamente e colocada em tubo de ensaio de 10 mL vedado com tampão de algodão hidrofílico e incubado a 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$. Os seguintes parâmetros biológicos foram investigados: peso da fêmea antes da oviposição (mg), peso da massa de ovos (mg), peso residual da fêmea (mg) e percentual de eclosão larval. O percentual de eclosão das larvas foi estimado visualmente com uso de um estereomicroscópio a cada dois dias e avaliado com percentuais variando

de 0 a 100% com 5% de intervalo conforme relatado por Fernandes et al.³⁴ e Bernardo et al.¹⁵. Os dados coletados foram usados para calcular o índice de produção de ovos (IPO)³⁹, índice nutricional (IN)³⁹ e o percentual de controle (PC%)⁴⁰. Os experimentos foram realizados em três ensaios independentes.

2.4 *Metarhizium robertsii* IP 146 combinado com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* sob condições controladas

Para avaliar o efeito de subdoses de *M. robertsii* IP 146 combinado com *H. bacteriophora* HP88 sobre as fêmeas ingurgitadas, a mesma metodologia do teste 2.3 foi utilizada, com adaptação do número de unidades experimentais utilizadas (n=40) e das concentrações de ambos entomopatógenos: 10^6 ou 10^7 conídios mL⁻¹ e 15 ou 25 JIs/fêmea, associados ou não.

2.5 Desenvolvimento fúngico de diferentes formulações granulares em meio ágar-água ou solo não esterilizado

Diferentes combinações de excipientes (Tabela 3) foram selecionadas a partir de resultados preliminares reportados por Santos et al.¹⁰ e Fernandes et al.⁴¹. Estes foram utilizados para determinar a produção e a viabilidade dos conídios produzidos sobre os grânulos cultivados em meio ágar-água ou a quantificação das unidades formadoras de colônias derivadas do desenvolvimento fúngico dos diferentes grânulos cultivados em solo não esterilizado, de acordo com a metodologia adaptada de Jackson and Jaronski⁴² e Paixão⁴³.

Tabela 3. Descrição dos excipientes e microescleródios de *Metarhizium robertsii* IP 146 das diferentes formulações granulares testadas.

Formulações	Descrição
1	16 g celulose + 4g terra diatomácea + 20 mL suspensão
2	8g celulose + 8g vermiculita + 1g SiO ₂ + 20 mL suspensão
3	16g celulose + 4g terra diatomácea + 2g SiO ₂ + 25 mL suspensão + meio
4	8g celulose + 8g vermiculita + 1g SiO ₂ + 1g fibra vegetal + 25 mL suspensão
5	8g celulose + 8g vermiculita + 2g terra diatomácea + 1g fibra vegetal + 20 mL suspensão + meio
6	6g SiO ₂ + 6g fibra vegetal + 20 mL suspensão
7	16g celulose + 2g fibra vegetal + 20 mL suspensão + meio
8	16g vermiculita + 25 mL suspensão + meio
9	20 mL suspensão + meio

Amostras de solo foram coletadas na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (16°35'37.0"S 49°16'53.2"O) e armazenadas em sacos plásticos. As amostras foram levadas para o Laboratório de Patologia de Invertebrados, pesadas e utilizadas nos ensaios.

Os excipientes das diferentes formulações (Tabela 3) foram pesados e misturados com os microescleródios cultivado sob condições apresentadas no tópico 2.2. Diferentes pesos e volumes entre as formulações foram distribuídos devido a necessidade de formar uma massa homogênea que atravessasse uma malha de 1mm para formação dos grânulos. Após processo de passagem na malha, as diferentes formulações foram submetidas a um processo de secagem em leito fluidizado (Labmaq[®], São Paulo, Brazil) durante 25 minutos, até obterem umidade de aproximadamente 5% (Fig. 1).



Figura 1. Etapas de produção de grânulo contendo biomassa de *M. robertsii* IP 146: A) Preparo da biomassa em laboratório, contando com as etapas de quantificação dos microescleródios produzidos com diferentes excipientes; B) Processo de granulação por passagem em malha de 1 mm e secagem dos grânulos em leito fluidizado.

Para realização dos testes em meio ágar-água e solo não esterilizado, triplicatas de cada placa contendo o meio ágar-água (2g de ágar em 100 mL de água destilada) ou 5g de solo não esterilizado previamente pesados, foram utilizadas. Os substratos foram distribuídos em placas de Petri (60 × 15 mm) e utilizados para avaliação do desenvolvimento fúngico. No teste em meio ágar-água, 30 mg (10^1 microescleródios/mg) das diferentes formulações foram distribuídas sobre o substrato, e em seguida as placas foram incubadas em câmara climatizadora com 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$ por 10 dias. Nos testes em solo não esterilizado, 7 mg (10^1 microescleródios/mg) das formulações foram distribuídas sobre a superfície das amostras de solo colocadas em placas e acondicionadas em câmara climatizada a 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$ por 10 dias.

Após o décimo dia, os grânulos presentes nas placas foram coletados com uso de espátula e despejados em tubos de ensaio de 50 mL contendo 10 mL de água destilada estéril com Tween 80[®] a 0,01%. Os tubos contendo a mistura de solo + grânulos e água

(Tween 80[®] 0,01%) ou grânulos oriundos do meio ágar-água + água foram agitados em vortex por 1 minuto. Após agitação, para os testes contendo solo, alíquotas de 100 µL de cada tubo contendo os diferentes tipos granulares foram pipetadas em 900 µL de água destilada armazenada em Eppendorf de 1,5 mL. Desta forma diluída em 10⁻¹, alíquotas de 50 µL foram pipetadas no centro de Placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio CTC (39 g/L BDA; 1 g/L extrato de levedura; 0.5 g/L cloranfenicol; 0.001 g/L tiabendazol e 0.25 g/L cicloheximida)⁴⁴, e em seguida a alíquota foi espalhada com auxílio de alça de Drigalski previamente esterilizada. As placas foram incubadas a 27 ± 1 °C e UR ≥ 90% durante 7 dias.

Para os testes dos grânulos crescidos sobre o meio ágar-água, a produção conidial das diferentes formulações foi quantificada com auxílio de câmara de Neubauer, enquanto para a realização do teste da viabilidade conidial, as diferentes suspensões foram ajustadas para 1 × 10⁶ conídios mL⁻¹. Em seguida, alíquotas de 20 µL foram pipetadas no centro de placas de Petri (55 × 15 mm) contendo 8 mL de BDAL com adição de 0.002% (p/v) de benomil de acordo com Braga et al.⁴⁵ e Milner et al.⁴⁶. As placas foram incubadas a 27 ± 1 °C e UR ≥ 90% por 24 h. Após esse período, os conídios germinados foram quantificados e a partir destes foi calculada a germinação relativa de acordo com Braga et al.⁴⁵ ou a quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas contendo meio CTC (Fig. 2). Os experimentos foram realizados em três ensaios independentes.

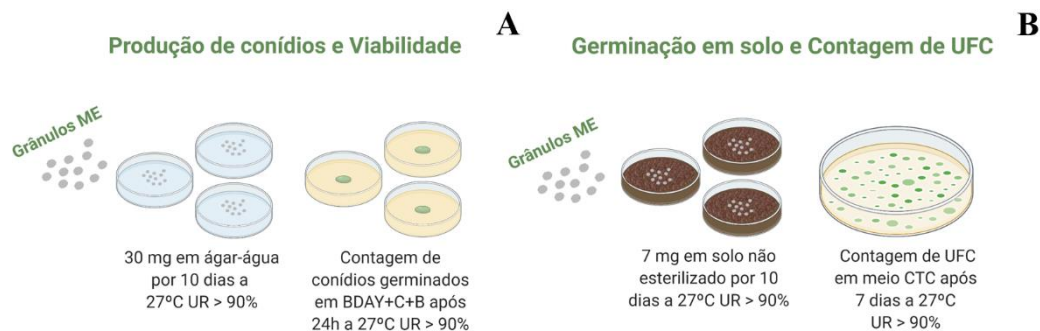


Figura 2. Representação gráfica dos processos dos testes utilizando grânulos de microescleródios com diferentes excipientes. A) Produção e viabilidade de conídios produzidos a partir dos grânulos de microescleródios de *M. robertsii* IP 146 distribuídos sobre meio ágar-água e B) Unidades formadoras de colônias a partir dos conídios produzidos dos grânulos de microescleródios de *M. robertsii* IP 146 sobre solo não esterilizado.

2.6 Combinação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 com *Metarhizium robertsii* IP 146 para controle da fase não-parasitária de *Rhipicephalus microplus* em condições de campo com diferentes condições climáticas

Os testes em condições de campo foram compostos por quatro grupos: 1) grupo controle, sem aplicação de entomopatógenos; 2) grupo tratado com suspensão aquosa do nematoide *H. bacteriophora* HP88; 3) grupo tratado com fungo em formulação granular contendo microescleródios de *M. robertsii* IP 146 e 4) a combinação de ambos tratamentos, nematoide e fungo (HP88 + IP 146).

2.6.1 Produção da formulação inseto cadáver, da suspensão de nematoides e da formulação granular

A produção de cadáveres infectados por NEPs foi realizada com a utilização de cinco grupos contendo 80 larvas de *T. molitor* acondicionadas em placas de Petri (150 × 25 mm), contendo duas camadas de papel filtro (J Prolab[®], São José dos Pinhais, Paraná,

Brasil) acondicionadas no fundo da placa. Cinco mL da suspensão estoque de nematoides foram distribuídos nos papéis filtro. Após distribuição, as placas foram seladas com Parafilm® e incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$. Após o quarto dia, larvas com sinais de infecção por *Heterorhabditis* (coloração avermelhada) foram transferidas para placas de Petri (150 × 25 mm) contendo duas camadas de papel filtro, com ausência de qualquer fonte de água e incubadas novamente sob as mesmas condições. Após permanecer em incubadora por mais quatro dias, as placas foram removidas e as larvas distribuídas sobre canos de PVC acondicionados ao fundo de bandejas de plástico com água destilada. Após o nono dia, a suspensão contendo os juvenis infectantes foi coletado e a concentração ajustada para 50 JIs/cm² de acordo com a metodologia reportada no tópico 2.2; em seguida, foram distribuídos em borrifadores manuais plásticos para serem dispersos no campo.

Em relação aos grânulos com fungo, a formulação de número 5 foi selecionada para os testes no campo com base nos resultados em laboratório. Sua produção foi realizada de acordo com a metodologia reportada no tópico 2.5. Para o tratamento utilizando a formulação multiparticulada em ambos os períodos estudados foram produzidos 160g de grânulos com $3,75 \times 10^2$ ME/g.

2.6.2 Condições climáticas

Os estudos foram desenvolvidos entre 05 de janeiro e 09 de abril de 2021 (período chuvoso) e 06 de julho a 21 de outubro de 2021 (período seco). A temperatura e umidade relativa do ar no interior da vegetação foram coletadas diariamente com utilização de um HOBO® data logger U12 durante todo o experimento. As condições do ambiente foram capturadas diariamente pela estação meteorológica localizada em

16°28'00"S e 49°17'00"O (aproximadamente 1 km de distância do local de experimentação).

2.6.3 Preparação das parcelas

Os experimentos foram realizados em área da Embrapa Arroz e Feijão – Goiânia – Goiás, Brasil, em um anexo pertencente a Embrapa Gado de Leite, localizada nas coordenadas 16°30'50.1"S e 49°16'33.8"O. Com antecedência de um mês para início do experimento, trinta e duas parcelas contendo *Panicum maximum* BRS Quênia (oito para cada tratamento) foram cortadas e padronizadas em 30 cm de altura, da superfície do solo até o topo das folhas. As parcelas foram preparadas em uma área com incidência direta de sol e chuva, com o intuito de tornar homogênea a exposição às condições ambientais entre todas as parcelas. Três semanas antes do início do experimento, foi realizada a distribuição das parcelas referente ao grupo controle e dos diferentes tratamentos, que foram distribuídos de forma randomizada. As parcelas foram delimitadas com auxílio de fita métrica de 100 m, estacas de ferro e barbante, com área de 1m² (Fig.3 A e B). Análise granulométrica e microbiológica do solo foram realizadas a partir da coleta de três amostras em pontos distintos com profundidade de 10 cm, posteriormente elas foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas para análise no Laboratório Solo & Companhia e JEM análise agrícola (Anexo II - III).



Figura 3. Área contendo as parcelas de 1 m² de *Panicum maximum* BRS Quênia utilizadas no teste de campo em área da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil. Localização: 16°30'50.1" S e 49 °16'33.8" O. A) teste realizado no período chuvoso e B) teste realizado no período seco.

2.6.4 Tratamento e recuperação de larvas nas parcelas

A formulação granular contendo microescleródios de *M. robertsii* IP 146 foi aplicada dez dias antes da distribuição das fêmeas (dia -10) nas parcelas referentes a este tratamento ou da combinação entre entomopatógenos, através de aplicação manual de 10g (distribuídos da forma mais homogênea possível), sendo utilizada a dose de $3,75 \times 10^2$ ME/g.

As suspensões aquosas com *H. bacteriophora* HP88 foram aplicadas oito dias após a aplicação fúngica (dia -2) nas parcelas referentes aos tratamentos com nematoide ou sua combinação com fungo. A concentração utilizada foi de 50 JIs/cm². No dia zero, cinco fêmeas ingurgitadas foram distribuídas em cada parcela, referente aos diferentes tratamentos e grupo controle (ausente de tratamento).

Foram realizadas visitas semanais às parcelas entre os dias +7 ao +28 (período chuvoso) ou +7 ao +35 (período seco) para coletar as informações climáticas aferidas pelo HOBO U12[®]. A recuperação das larvas referentes aos diferentes tratamentos foram

realizadas semanalmente entre os dias +35 ao +85 (período chuvoso) e +42 ao +98 (período seco). As coletas foram realizadas por meio da deposição de flanelas de cor branca ($1,0 \times 1,0$ m) sobre cada uma das parcelas por um período de 15 minutos (Fig. 4). Em seguida, elas foram removidas, embaladas em sacos plásticos previamente identificados e acondicionadas a -20°C para posterior contagem das larvas. As larvas foram quantificadas com a utilização de um aspirador de fluido cirúrgico e secreções (Aspiramax[®], Kyoto, Japão).



Figura 4. Parcelas de *Panicum maximum* BRS Quênia com a presença de flanelas utilizadas para recuperar larvas de *Rhipicephalus microplus* na área da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil.

2.6.5 Persistência fúngica no solo

A quantificação de propágulos fúngicos viáveis nas parcelas tratadas com formulação granular foi acessada através de unidades formadoras de colônias (UFC).

Amostras de solo das parcelas tratadas com fungo foram retiradas de três pontos distintos (profundidade de 10 cm), a cada duas semanas de experimento (dia +10, +23, +38, +52, +66 e +88) e armazenadas em tubos tipo Falcon de 50 mL devidamente identificados; em seguida, foram acondicionados em caixa térmica e encaminhados para o Laboratório de Patologia de Invertebrados para processamento das amostras. Do total coletado, cinco gramas de solo foram misturados com 10 mL de água destilada estéril em tubos tipo Falcon de 50 mL; desta mistura, uma diluição de 1:10 foi preparada e alíquotas de 50 µL foram coletadas com auxílio de pipetador automático e distribuídas no centro de placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio CTC⁴⁴. Após pipetagem as alíquotas foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalski previamente esterilizada. Em seguida, as placas foram devidamente identificadas e incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$ durante 7 dias. Após desenvolvimento das colônias a presença de *M. robertsii* foi confirmada por análise microscópica⁴⁷.

2.6.6 Persistência de nematoides no solo

Amostras de solo das parcelas tratadas com nematoides foram coletadas e armazenadas nas mesmas condições citadas no tópico 2.6.5. Para isolar os NEPs do solo, a técnica inseto-armadilha foi utilizada e para cada amostra 10 larvas de *T. molitor* foram adicionadas sobre 5g de solo depositado no fundo de placas de Petri (60 × 15 mm). Após realizada esta etapa as placas foram incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$ durante 7 dias. Após o sétimo dia, as larvas mortas com sintomas de infecção foram desinfetadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, colocados em placas de Petri (150 × 25 mm) contendo as duas camadas de papel filtro e incubados em câmara climatizada a 27 ± 1 °C e UR $\geq 90\%$. Após três dias, os cadáveres foram transferidos para armadilhas de White (White, 1927) para a coleta dos JIs. Em seguida, a presença ou

ausência dos JIs foi confirmada por meio da pipetagem de alíquotas da suspensão com os JIs vivos sobre lâminas e posterior visualização em microscópio óptico.

2.7 Análises estatísticas

As análises laboratoriais conduzidas no presente estudo foram realizadas no software R versão 4.1.0 (R Core Team, 2019), pacote *easyanova*⁴⁸. A normalidade dos dados foi checada com o teste de Shapiro-Wilk. Dados laboratoriais com distribuição normal foram analisados através do teste Análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparação de médias *Student-Newman-Keuls* (SNK). Nos ensaios somente os dados de peso inicial das fêmeas e a viabilidade fúngica das diferentes formulações apresentaram distribuição normal. Dados laboratoriais com distribuição não-normais foram analisados através do teste *Kruskal-Wallis* seguido do teste de comparação de médias *False discovery rate* (FDR). O peso da massa de ovos, eclosão larval, índice de produção de ovos, índice nutricional e o desenvolvimento fúngico sobre solo não esterilizado apresentaram distribuição não-normal. Os dados referentes à densidade de fungo no solo (UFC/g) foram ajustados a um modelo linear generalizado misto com transformação de $\log_{10}(x+1)$ para fins de normalização dos dados e com o fator tempo como variável aleatória. Avaliou-se neste modelo os efeitos temporal, da estação climática, do tratamento aplicado e as possíveis interações desses fatores na persistência do fungo no solo. Para os testes de campo, os dados de contagem de larvas de carrapato foram ajustados com um modelo linear generalizado (GLM) seguindo uma distribuição de quasi-Poisson (função de ligação log), incluindo os efeitos fixos de bloco, estação climática, tempo de avaliação após a aplicação dos bioagentes, tratamentos com os bioagentes sozinhos ou em combinação e as possíveis interações desses fatores. Depois disso, a análise foi realizada separadamente dentro de cada estação climática (úmida ou

seca) para avaliar o efeito dos tratamentos ao longo do tempo sobre o nível populacional de larvas no capim. Após essas análises, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância, utilizando o pacote ‘emmeans’⁴⁹.

3. RESULTADOS

3.1 Combinação de diferentes espécies de *Metarhizium* com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 contra fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* sob condições controladas

O peso inicial das fêmeas foi distribuído de forma homogênea entre os diferentes tratamentos ($F_{11,328} = 0,6259$; $P = 0,8066$) (Tabela 4). As fêmeas de todos os grupos tratados produziram menor quantidade de ovos do que as fêmeas do grupo de controle ($F_{11,327} = 59,2274$; $P < 0,001$). O peso da massa de ovos variou de 5,23 mg (HP88) a 97,08 mg (IP 125) para os grupos tratados, enquanto no grupo controle o peso médio da massa de ovos foi de 127,35 mg ($\chi^2 = 213,6815$; $P < 0,001$) (Tabela 4).

Em relação a eclosão larval, todos os grupos tratados tiveram valores inferiores aos observados no grupo controle ($\chi^2 = 87,2048$; $P < 0,001$). Os valores do índice de produção de ovos (IPO) e do índice nutricional (IN) foram inferiores em todos os tratamentos em relação ao grupo controle ($\chi^2 = 216,1101$; $P < 0,001$; $\chi^2 = 73,6668$; $P < 0,001$; respectivamente) (Tabela 4).

O percentual de controle (PC%) dos grupos tratados com fungo variou de 42,74 (IP 125) a 58,19% (IP 146), enquanto no grupo tratado com nematoides o PC foi de 97,34% (HP88). Em relação aos grupos tratados com fungos e nematoides combinados, os resultados variaram entre 94,51 (HP88 + IP 46) e 98,88% (HP88 + IP 146) (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. (1×10^7 mL⁻¹ conídios/mL) combinados ou não a *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (50 JIs/fêmea) ou tratadas com água destilada (controle). As fêmeas foram incubadas em temperatura ótima (27 °C) e umidade relativa $\geq 90\%$.

Tratamentos	Peso inicial das fêmeas (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Ecloração larval (%)	IPO*	IN**	RE†	Percentual de controle (n=30)‡
Controle	234,73 ± 7,80 ^a	127,35 ± 5,37 ^a	92,76 ± 0,79 ^a	53,55 ± 1,36 ^a	82,22 ± 1,14 ^a	994138,26	-
IP 46	232,75 ± 7,84 ^a	63,44 ± 8,76 ^c	75,18 ± 4,12 ^b	28,16 ± 3,72 ^c	46,07 ± 6,65 ^{bc}	457653,81	53,96
IP 119	235,36 ± 8,90 ^a	66,5 ± 7,84 ^c	79,80 ± 2,67 ^b	29,33 ± 3,66 ^c	58,76 ± 9,20 ^{bc}	465954,91	53,13
IP 125	253,22 ± 7,43 ^a	97,08 ± 8,49 ^{ab}	73,50 ± 3,63 ^{bc}	38,06 ± 2,49 ^b	64,54 ± 3,03 ^{cde}	569193,63	42,74
IP 146	235,31 ± 7,52 ^a	75,7 ± 6,85 ^{bc}	66,54 ± 4,39 ^{bd}	33,01 ± 2,89 ^{bc}	63,02 ± 3,11 ^b	415629,76	58,19
IP 363	235,73 ± 7,66 ^a	76,76 ± 5,39 ^{bc}	74,83 ± 4,72 ^b	33,38 ± 2,35 ^{bc}	52,46 ± 5,12 ^{bd}	533902,23	46,29
HP88	234,89 ± 7,67 ^a	5,23 ± 2,36 ^d	38,64 ± 7,95 ^{de}	2,18 ± 0,94 ^d	23,97 ± 6,50 ^e	26463,26	97,34
HP88 + IP 46	235,82 ± 7,54 ^a	11,50 ± 2,81 ^d	45,62 ± 7,05 ^{de}	4,71 ± 1,15 ^d	44,13 ± 8,22 ^{bd}	54549,51	94,51
HP88 + IP 119	234,70 ± 7,72 ^a	8,77 ± 3,48 ^d	33,08 ± 6,92 ^e	3,73 ± 1,53 ^d	31,23 ± 11,28 ^e	30173,11	96,96
HP88 + IP 125	253,78 ± 8,62 ^a	17,04 ± 4,94 ^d	25,83 ± 6,25 ^e	6,76 ± 1,94 ^d	43,60 ± 9,20 ^{be}	47055,24	95,26
HP88 + IP 146	234,78 ± 7,92 ^a	5,14 ± 2,02 ^d	24,54 ± 5,20 ^e	2,45 ± 0,98 ^d	29,64 ± 9,64 ^{de}	11132,72	98,88
HP88 + IP 363	236,62 ± 7,79 ^a	8,59 ± 2,70 ^d	51,43 ± 6,43 ^{cde}	3,52 ± 1,07 ^d	29,80 ± 6,72 ^{de}	29546,02	97,03

(*) IPO: Índice de produção de ovos = peso da massa de ovos (g)/ peso inicial da fêmea (g) × 100 (Bennet, 1974).

(**) IN: Índice nutricional: peso da massa de ovos (g)/ peso inicial da fêmea (g) – peso final da fêmea (g) × 100 (Bennet, 1974).

(†) RE: Reprodução estimada = peso da massa de ovos (g)/ peso inicial da fêmea ingurgitada (g) × percentual de ecloração larval × 20,000 (constante que se refere ao número de larvas por grama de massa de ovos de *R. microplus*) (Drummond et al., 1971).

(‡) PC: Percentual de controle = RE média do grupo controle – RE média do grupo tratado/ RE média do grupo controle × 100 (Drummond et al., 1971). Médias (± erro padrão) na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

3.2 *Metarhizium roberstii* IP 146 combinado com *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 para controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* sob condições controladas

Em relação ao peso inicial das fêmeas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{8,351} = 0,0958$; $P = 0,9993$) (Tabela 5). O peso médio da massa de ovos foi menor nas fêmeas tratadas com fungo (10^6 ou 10^7 conídios mL^{-1}) com valores de 95,67 ou 73,29 mg, respectivamente, ou em suas respectivas combinações com as diferentes concentrações de juvenis infectantes (15 ou 25), com valores variando de 42,35 ($10^7 + 25$) a 57,42 mg ($10^7 + 15$), quando comparados com o grupo controle (124,12 mg) ($\chi^2 = 123,7785$; $P < 0,001$) (Tabela 5).

Redução na eclosão larval dos ovos foi observada nos grupos tratados com fungo 10^7 conídios mL^{-1} e nematoides, 15 JIs, com valores de 81,15 ou 87,10%, respectivamente, ou em todas as combinações entre os entomopatógenos com valores variando de 72,29 (10^6 conídios $\text{mL}^{-1} + 25$ JIs) a 84,31% (10^7 conídios $\text{mL}^{-1} + 25$ JIs), quando comparados com o grupo controle (92,87%) ($\chi^2 = 30,5985$; $P = 0,0002$) (Tabela 5). Os valores do índice de produção de ovos foram menores nos tratamentos com fungo (10^6 ou 10^7), com valores de 40,49 ou 32,9%, respectivamente, ou em suas combinações com as diferentes concentrações de juvenis infectantes (15 ou 25), com valores variando de 18,14 ($10^7 + 25$) a 25,33% ($10^6 + 15$), quando comparados com o grupo controle (54,78%) ($\chi^2 = 150,2266$; $P < 0,001$) (Tabela 5). Em relação ao índice nutricional, percentuais inferiores foram observados nos grupos tratados com fungo (10^6 ou 10^7) com valores de 59,74 ou 48,51%, respectivamente, ou nas combinações com as diferentes concentrações de nematoides (15 ou 25), com valores variando de 26,66 ($10^7 + 25$) a 37,46 ($10^6 + 15$), quando comparados com o grupo controle ($\chi^2 = 157,2538$; $P < 0,001$) (Tabela 5).

O percentual de controle (PC%) dos grupos tratados com as diferentes concentrações fúngicas (10^6 ou 10^7) foi de 31,37 e 43,66%, respectivamente; os valores dos grupos tratados com as diferentes concentrações de juvenis (15 ou 25) foram de 8,49 ou 7,16%, respectivamente. Nas diferentes combinações, resultados promissores foram obtidos com percentuais variando de 57,77 ($10^6 + 15$) a 71,84% ($10^7 + 25$) (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com *Metarhizium robertsii* IP 146 (10^6 ou 10^7 conídios mL⁻¹) combinados ou não a *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (15 ou 25 juvenis infectantes/fêmea) ou tratadas com água destilada (controle). As fêmeas foram incubadas em temperatura ótima (27 °C) e umidade relativa $\geq 90\%$.

Tratamentos	Peso inicial das fêmeas (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Eclosão larval (%)	IPO*	IN**	RE†	Percentual de controle (n=40)‡
Controle	225,87 ± 6,47 ^a	124,12 ± 4,63 ^a	92,87 ± 2,42 ^a	54,78 ± 1,31 ^a	76,57 ± 1,57 ^a	1019867,702	-
10 ⁶	222,44 ± 4,89 ^a	95,67 ± 6,25 ^b	85,79 ± 3,05 ^{ab}	40,49 ± 2,95 ^b	59,74 ± 3,82 ^b	699919,6378	31,37
10 ⁷	226,87 ± 5,27 ^a	73,29 ± 5,63 ^c	81,15 ± 4,04 ^b	32,95 ± 2,51 ^{bc}	48,51 ± 3,08 ^c	574527,9412	43,66
15 JIs	228,72 ± 6,03 ^a	118,34 ± 6,89 ^a	87,10 ± 2,96 ^b	52,11 ± 2,67 ^a	72,59 ± 3,29 ^a	933277,9323	8,49
25 JIs	228,13 ± 6,16 ^a	117,06 ± 5,58 ^a	89,35 ± 2,32 ^{ab}	52,08 ± 2,35 ^a	72,64 ± 2,59 ^a	946854,2951	7,16
10 ⁶ + 15 JIs	227,06 ± 6,01 ^a	57,34 ± 8,50 ^{cd}	74,14 ± 4,95 ^b	25,33 ± 3,73 ^{cd}	37,46 ± 4,89 ^{cd}	430713,2302	57,77
10 ⁷ + 15 JIs	228,10 ± 6,06 ^a	57,42 ± 7,94 ^{cd}	75,69 ± 4,98 ^b	23 ± 3,43 ^{cd}	37,34 ± 4,84 ^{cd}	379261,4986	62,81
10 ⁶ + 25 JIs	226,94 ± 7,02 ^a	44,72 ± 9,10 ^{cd}	72,29 ± 5,35 ^b	19,24 ± 3,68 ^{cd}	31,65 ± 5,21 ^{cd}	328472,9939	67,79
10 ⁷ + 25 JIs	227,47 ± 5,80 ^a	42,35 ± 8,48 ^d	84,31 ± 3,31 ^b	18,14 ± 3,47 ^d	26,66 ± 4,58 ^d	287188,6975	71,84

(*) IPO: Índice de produção de ovos = peso da massa de ovos (g)/ peso inicial da fêmea (g) × 100 (Bennet, 1974).

(**) IN: Índice nutricional: peso da massa de ovos (g)/ peso inicial da fêmea (g) – peso final da fêmea (g) × 100 (Bennet, 1974).

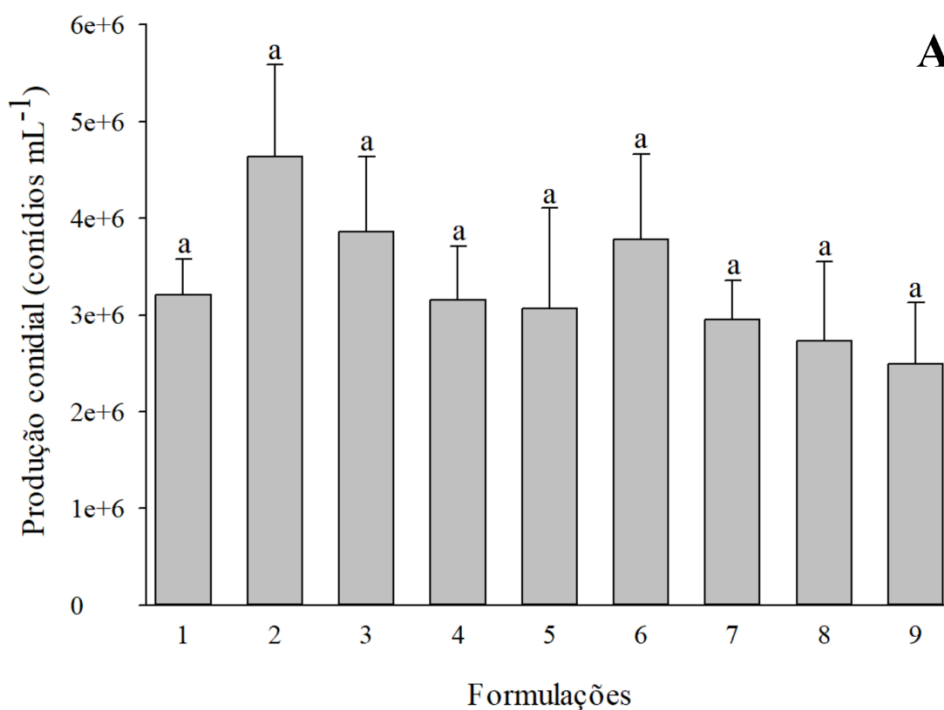
(†) RE: Reprodução estimada = peso da massa de ovos (g)/ peso inicial da fêmea ingurgitada (g) × percentual de eclosão larval × 20,000 (constante que se refere ao número de larvas por grama de massa de ovos de *R. microplus*) (Drummond et al., 1971).

(‡) PC: Percentual de controle = RE média do grupo controle – RE média do grupo tratado/ RE média do grupo controle × 100 (Drummond et al., 1971). Médias (± erro padrão) na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

3.3 Desenvolvimento fúngico de diferentes formulações granulares sobre meio ágar-água ou solo não esterilizado

Conídios produzidos pelos grânulos aplicados sobre meio ágar-água exibiram alta viabilidade (> 85%) e não foram observadas diferenças entre os grupos ($F_{8,17} = 1,5381$; $P = 0,2164$); da mesma forma, a produção de conídios de todas as formulações não diferiram quando comparadas entre si ($\chi^2 = 5,6464$; $P = 0,6868$) (Fig. 5-A).

Em relação aos testes de produção de conídios conduzidos em solo não esterilizado, as formulações 1 e 5 produziram mais colônias quando comparadas as demais ($\chi^2 = 34,1017$; $P < 0,001$); obtendo respectivamente uma produção de $1,09 \times 10^4$ e $1,75 \times 10^4$ unidades formadoras de colônias por grama de solo (Fig. 5-B).



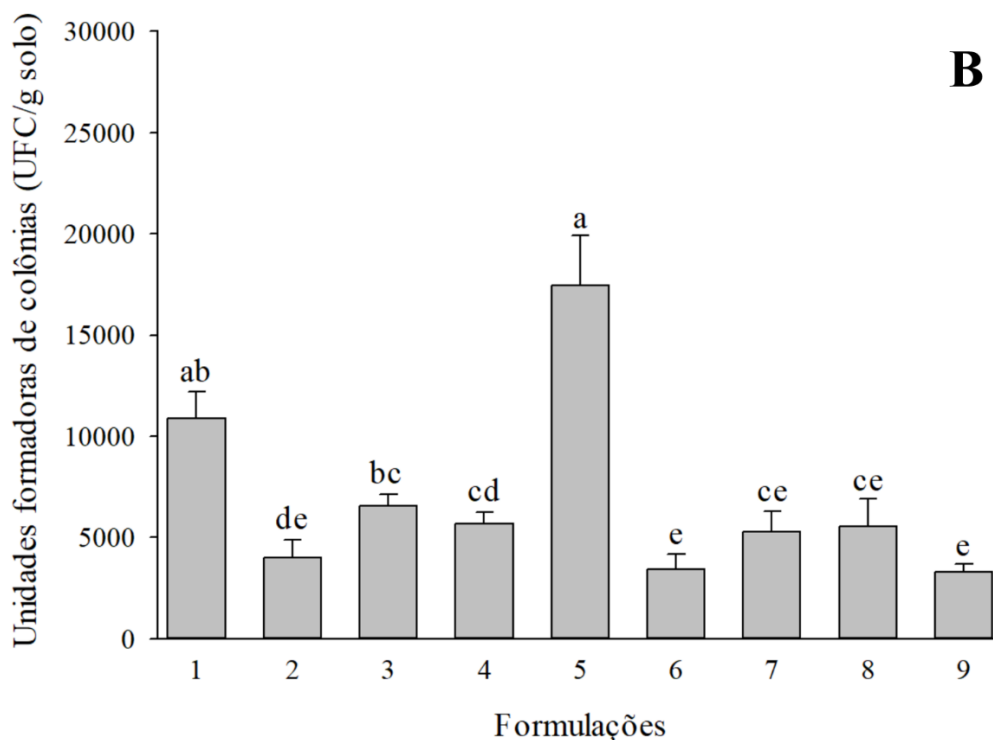


Figura 5. Desenvolvimento fúngico de diferentes grupos de formulações granulares de *Metarhizium robertsii* IP 146 em meio ágar-água ou solo não esterilizado. A) Média da produção de conídios (\pm erro padrão) de diferentes formulações granulares esporuladas em meio ágar-água; B) Unidades formadoras de colônia por grama de solo (\pm erro padrão) de diferentes formulações granulares esporuladas em solo não esterilizado. Barras (\pm erro padrão) seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

3.4 Combinação de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 com *Metarhizium robertsii* IP 146 para controle da fase não-parasitária de *Rhipicephalus microplus* em condições de campo com diferentes condições climáticas

O solo utilizado para a realização dos ensaios de campo apresentou textura argilosa, sendo classificado como solo argiloso, contendo 62% de argila, 10% de silte e 28% de areia (Anexo II). A análise microbiológica detectou bactérias do gênero *Bacillus* na quantidade de $1,2 \times 10^6$ UFC/g de solo. Fungos habitantes do solo como *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., e *Trichoderma* sp. foram encontrados nas seguintes quantidades 1,667, 3,667, 2,000 UFC/g de solo, e *Rhizoctonia* sp. com 5 UFC/100g de solo.

Nematoides fitopatogênicos foram identificados na amostra como *Helicotylenchus* sp. e *Heterodera glycines* nas quantidades de 198 e 11, respectivamente, em 200 mL de solo (Anexo III).

A persistência do fungo não foi influenciada pela combinação com o nematoide, mas foi bastante afetada pela estação chuva/seca ($F= 7,06$, $P= 0,0083$), particularmente pela estação úmida (verão), onde foi encontrado maior UFC de *Metarhizium* do que o experimento realizado na estação seca (inverno). Invariavelmente, o fungo sozinho ou aplicado junto com o nematoide exibiu diminuição drástica na persistência, conforme observado pelo número de UFC recuperadas do solo ao longo do tempo de amostragem ($F= 80,65$, $P < 0,0001$) (Fig. 6).

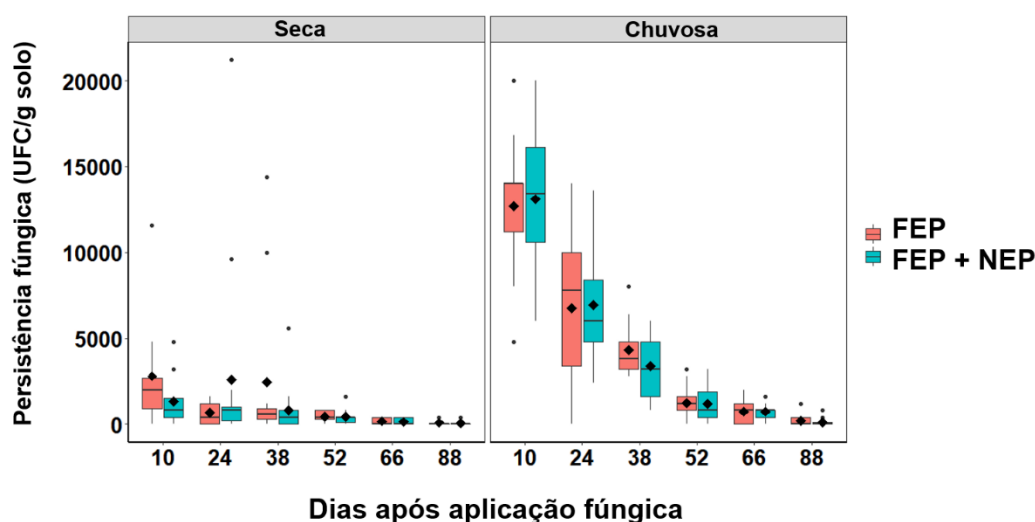


Figura 6. Persistência fúngica de solo tratado em duas estações do ano (seca ou chuvosa) somente com formulação granular de *Metarhizium robertsii* (FEP) ou combinado ao nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (NEP). Box plot de unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. robertsii* por grama de solo obtido após aplicação fúngica em condições de campo. As caixas mostram a mediana, 25° e 75° percentis, enquanto as barras de erro mostram 10° e 90° percentis, e as médias ($n = 8$) são os losangos negros.

Entre os dias -10 e +84 (período chuvoso), as médias semanais (\pm desvio padrão) de temperatura diária (A) e umidade relativa do ar (B) do interior da parcela foram $23,88 \pm 4,08$ °C e $86,09 \pm 25,47\%$, respectivamente (Fig. 7). Em relação aos dados climáticos do ambiente, as médias semanais de temperatura diária (máxima e mínima) (A), precipitação (B) e radiação solar global (C) foram $29,39 \pm 2,15$ °C e $19,09 \pm 1,15$ °C, $5,39 \pm 9,81$ mm/dia, $18,71 \pm 5,06$ MJ/m², respectivamente (Fig. 8).

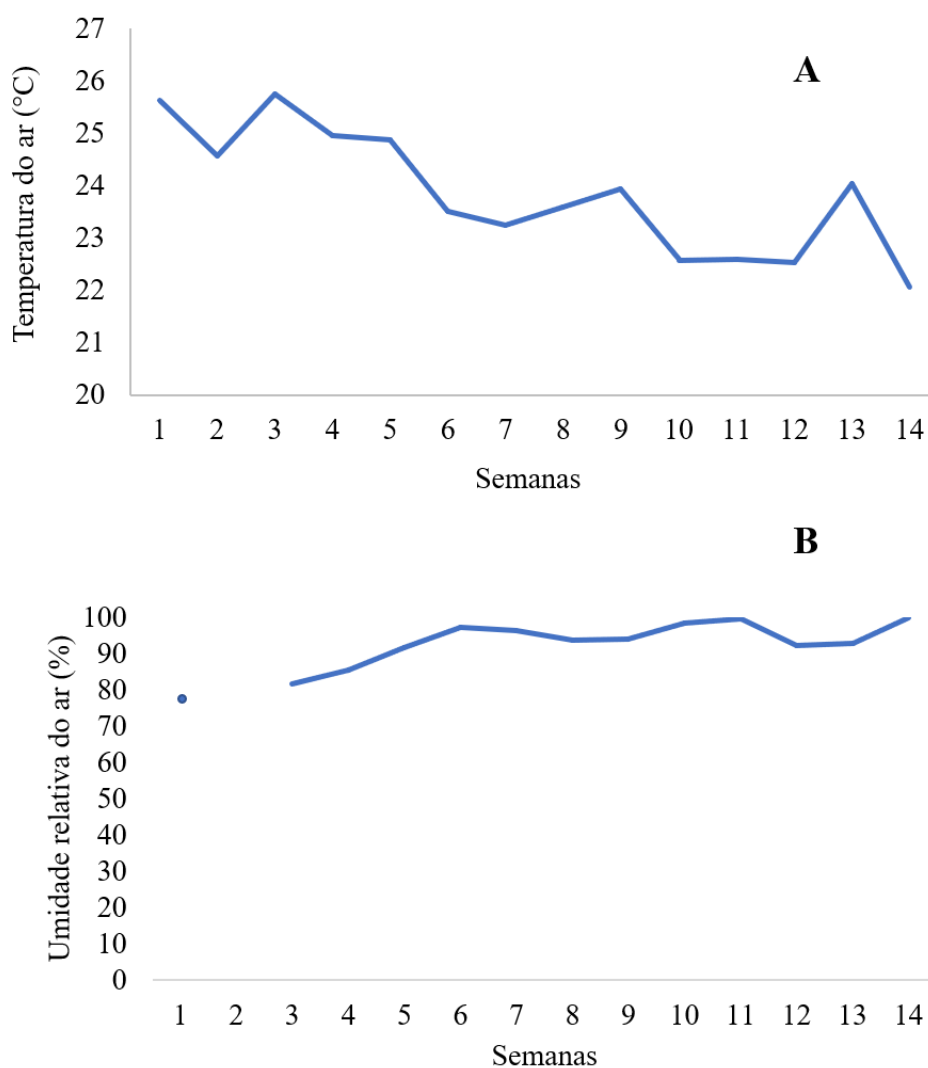


Figura 7. Dados climáticos de experimento conduzido no período chuvoso coletados ao longo de 14 semanas por data logger HOBO® presente no interior de uma parcela presente em área pertencente a Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil. A) temperatura do ar (°C); B) umidade relativa do ar (%).

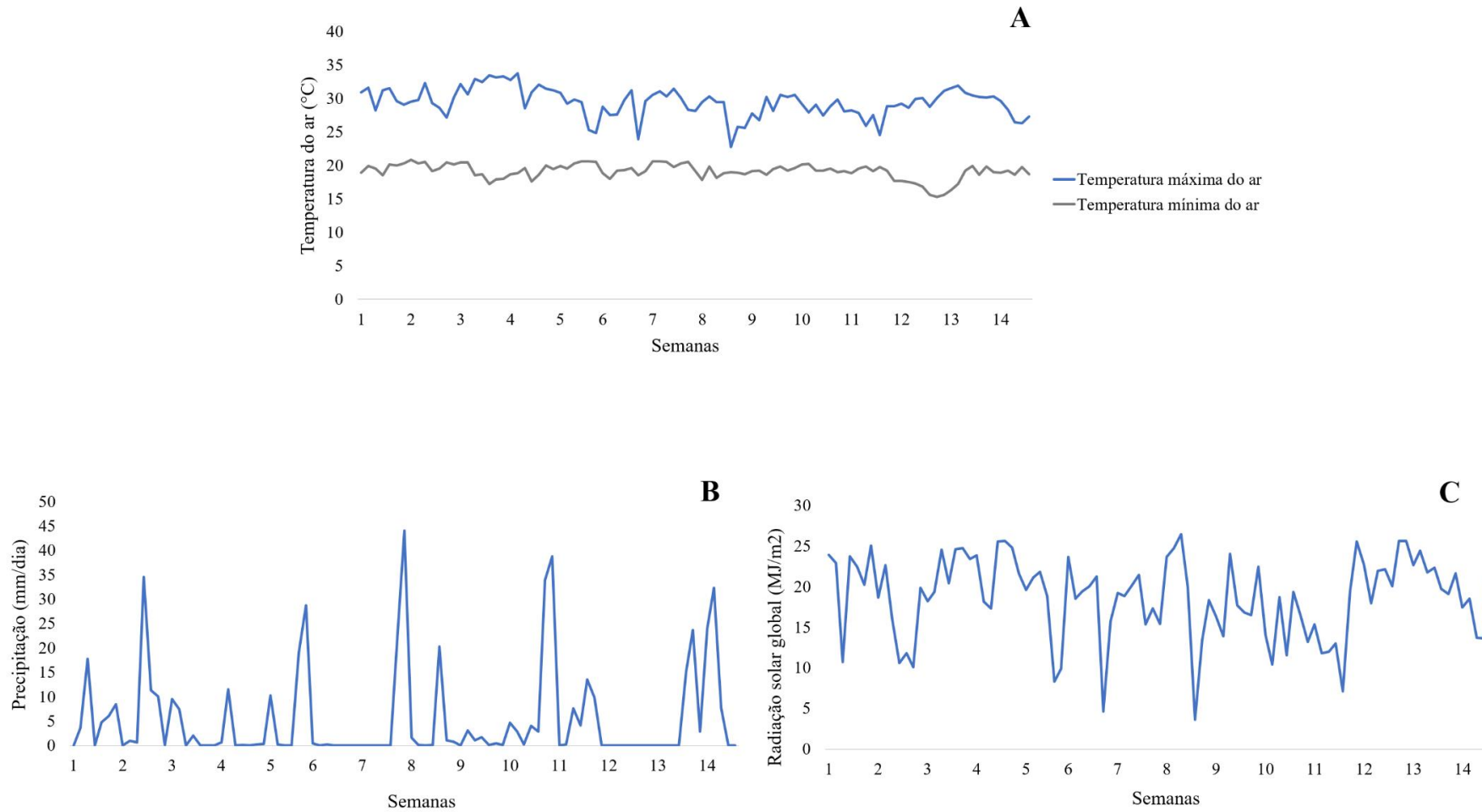


Figura 8. Dados climáticos do ambiente (período chuvoso) coletados diariamente pela estação meteorológica pertencente a Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil. A) Temperatura máxima e mínima do ar (°C); B) Precipitação (mm/dia); C) Radiação solar global (MJ/m²).

Os diferentes tratamentos realizados no período chuvoso (fungos e nematoides entomopatogênicos ou sua combinação) foram eficazes em reduzir a população não parasitária de *R. microplus* na segunda e na terceira semana (Fig. 9), com exceção do tratamento utilizando somente nematoide que apresentou redução significativa somente na segunda semana (Fig. 9). Entretanto, a análise dos dados acumulados (somatório de carrapatos em todas semanas de avaliação) mostrou que todos os tratamentos reduziram a população não parasitária de *R. microplus* presente nas pastagens, resultando em eficácia de 54,09% (fungo), 38,11% (nematoide) e 46,72% (combinação) (Fig. 10).

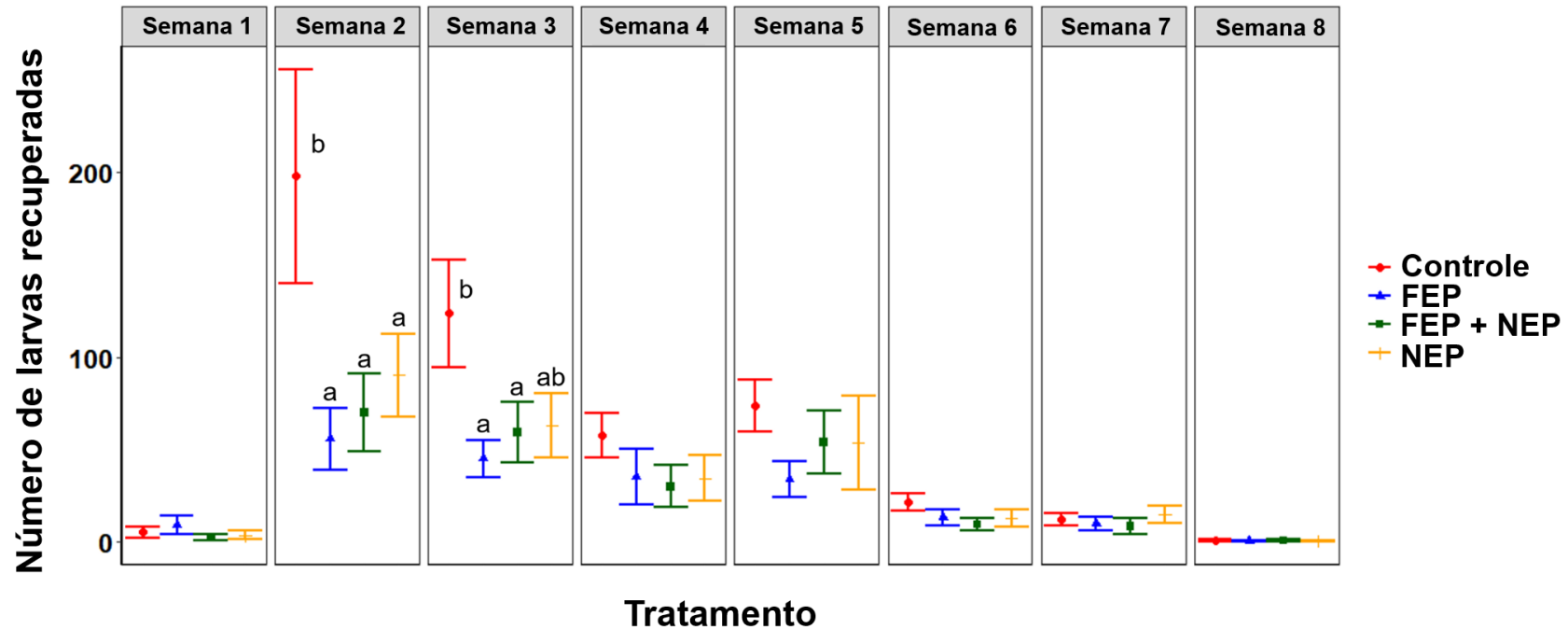


Figura 9. Impacto de tratamento realizado no período chuvoso com fungo (FEP) e nematoide entomopatogênico (NEP) aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens. Os segplots representam a média (\pm erro padrão, $n = 8$) para cada semana de avaliação. Médias seguidas por letras diferentes dentro da mesma semana diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) com base no teste Tukey HSD.

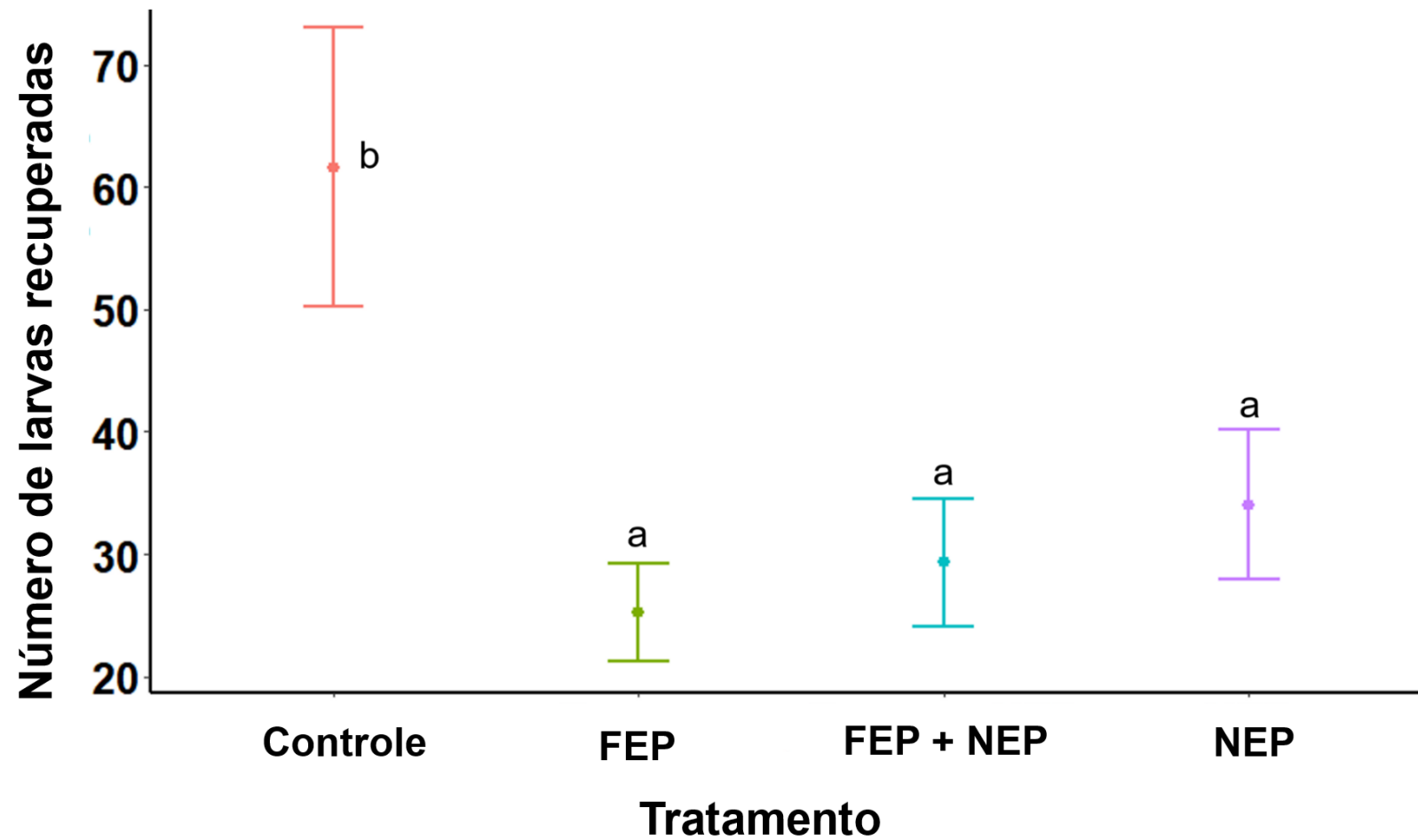


Figura 10. Impacto de tratamento realizado no período chuvoso com fungo (FEP) e nematoide entomopatogênico (NEP) aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens. Os segplots representam a média (\pm erro padrão, $n = 64$) de carrapatos recuperados para cada tratamento ao longo de todas as semanas de avaliação. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) com base no teste Tukey HSD.

Entre os dias -10 e +98 (período seco), as médias semanais (\pm desvio padrão) de temperatura diária (A) e umidade relativa do ar (B) do interior da parcela foram respectivamente, $25,34 \pm 11,35$ °C e $64,38 \pm 24,47\%$. (Fig. 11). Em relação ao ambiente, as médias semanais (\pm desvio padrão) de temperatura diária (máxima e mínima) (A), precipitação (B) e radiação solar global (C) foram $32,44 \pm 3,04$ °C e $16,74 \pm 3,70$ °C, $1,45 \pm 5,41$ mm/dia, $17,21 \pm 5,3$ MJ/m², respectivamente (Fig. 12).

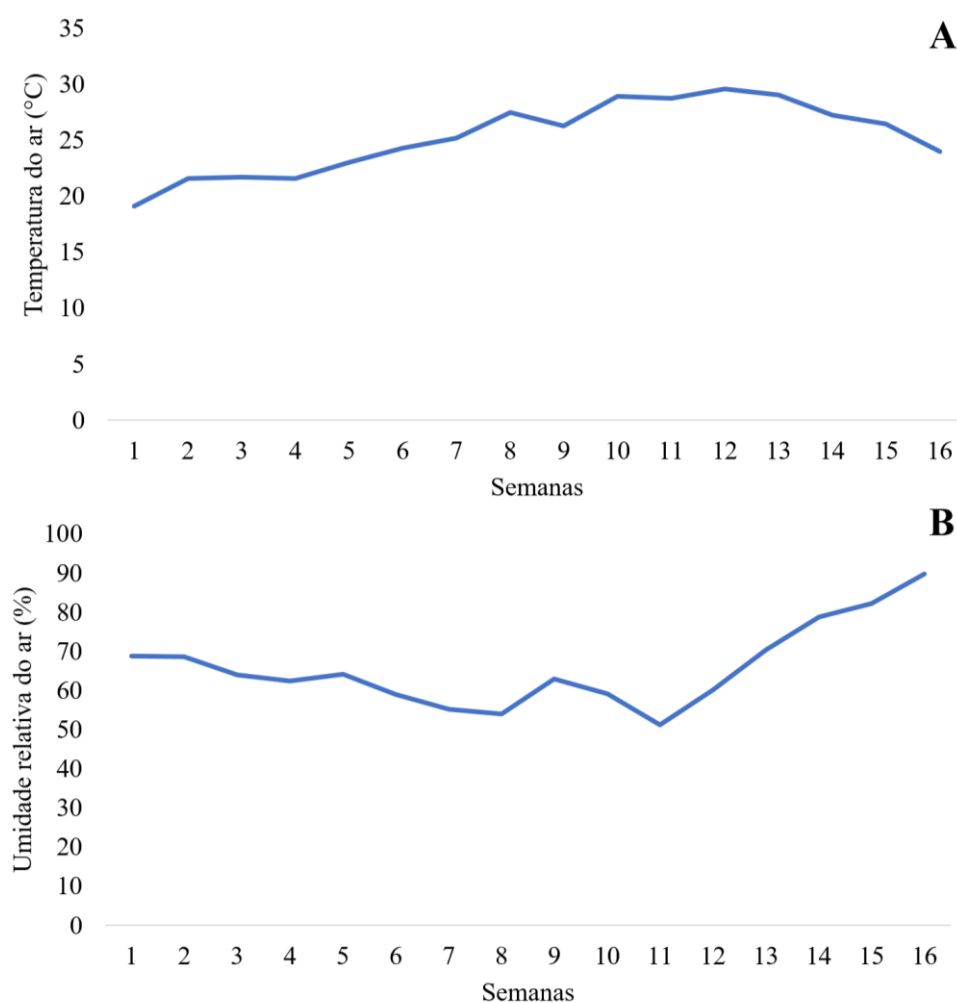


Figura 11. Dados climáticos de experimento conduzido no período seco coletados ao longo de 16 semanas por data logger HOBO® presente no interior de uma parcela presente em área pertencente a Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil. A) temperatura do ar (°C); B) umidade relativa do ar (%).

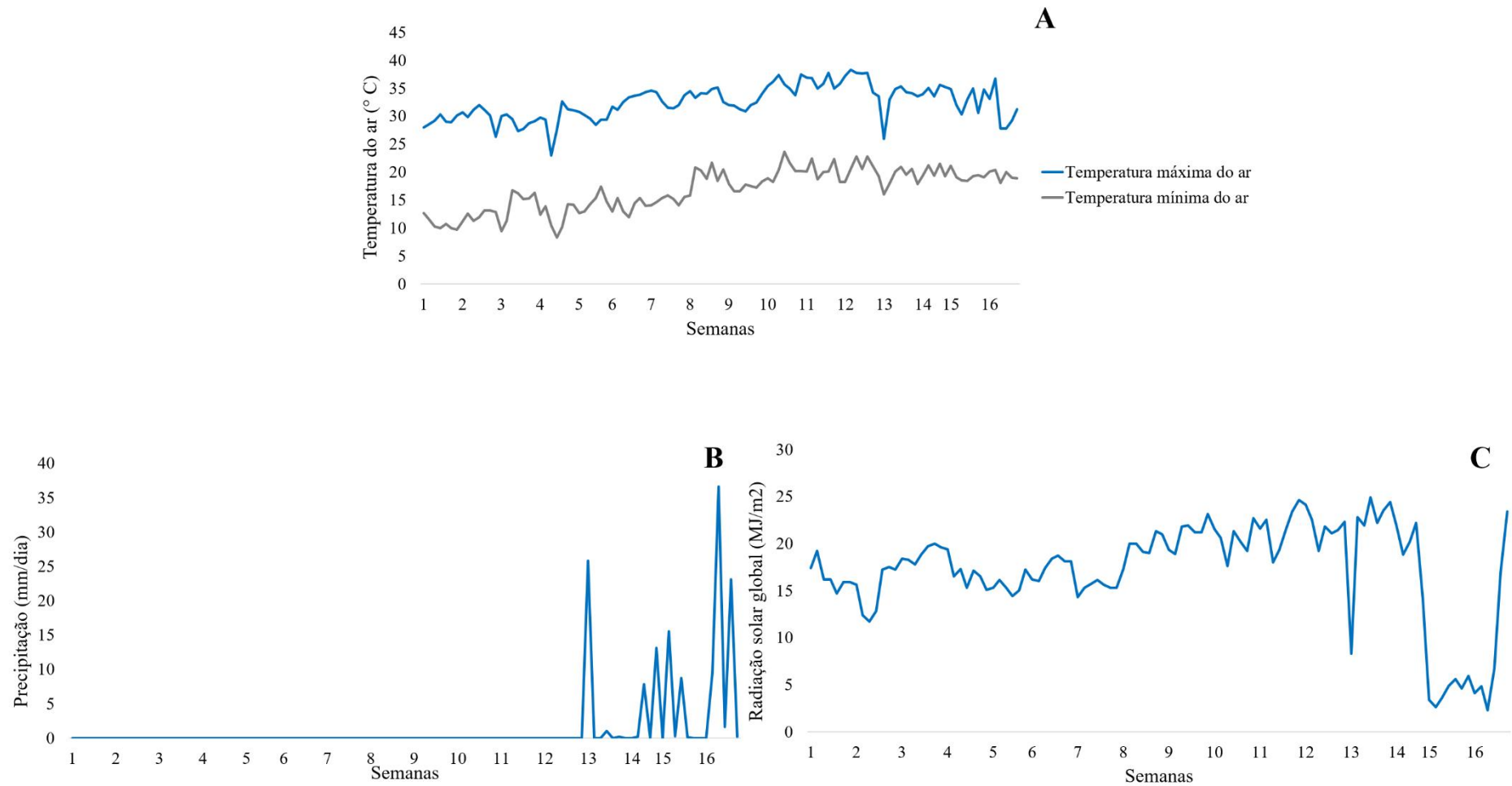


Figura 12. Dados climáticos do ambiente (período seco) coletados diariamente pela estação meteorológica pertencente a Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - Goiás, Brasil. A) Temperatura máxima e mínima do ar (°C); B) Precipitação (mm/dia); C) Radiação solar global (MJ/m²).

A prevalência de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 foi reduzida ao longo do tempo independente do tratamento (somente nematoides ou sua combinação com o fungo) (Fig. 13). Diferença significativa no percentual de larvas de *T. molitor* infectadas por *H. bacteriophora* HP88 foi observada somente no dia +24, com maior número de larvas infectadas no tratamento combinado (NEP + FEP) (Fig. 13).

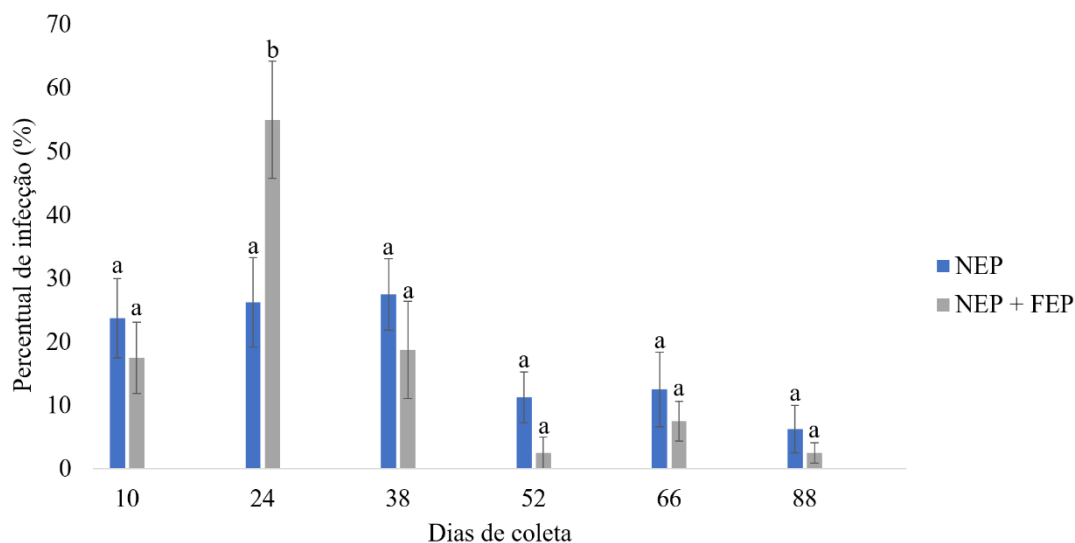


Figura 13. Percentual de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por *H. bacteriophora* HP88 (\pm erro padrão, n=10) depositadas sobre solo proveniente de diferentes parcelas (n=8) tratadas no período seco com juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 (NEP) ou sua combinação com formulação granular de *M. robertsii* IP 146 (FEP). Barras seguidas por letras diferentes no mesmo dia de avaliação diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

Em relação ao experimento conduzido no período seco, não foi observada redução significativa das larvas em nenhuma das semanas de avaliação por nenhum tratamento (Fig. 14). Entretanto, quando os dados de larvas recuperadas ao longo de todas as semanas de avaliação foram acumulados, somente o tratamento fúngico causou redução significativa na população não parasitária de *R. microplus* presente nas pastagens, o que resultou em eficácia de 26,27% (Fig. 15).

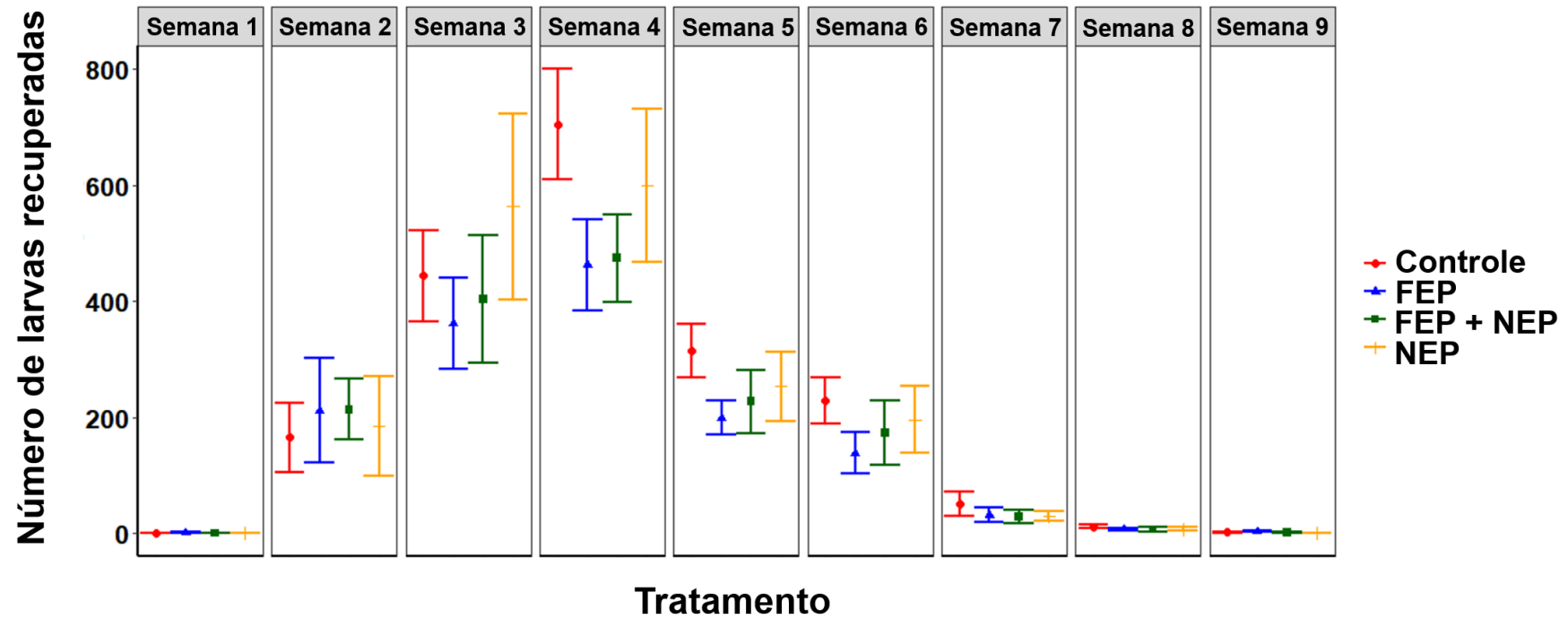


Figura 14. Impacto de tratamento realizado no período seco com fungo (FEP) e nematoide entomopatogênico (NEP) aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens. Os segplots representam a média (\pm erro padrão, $n = 8$) para cada semana de avaliação.

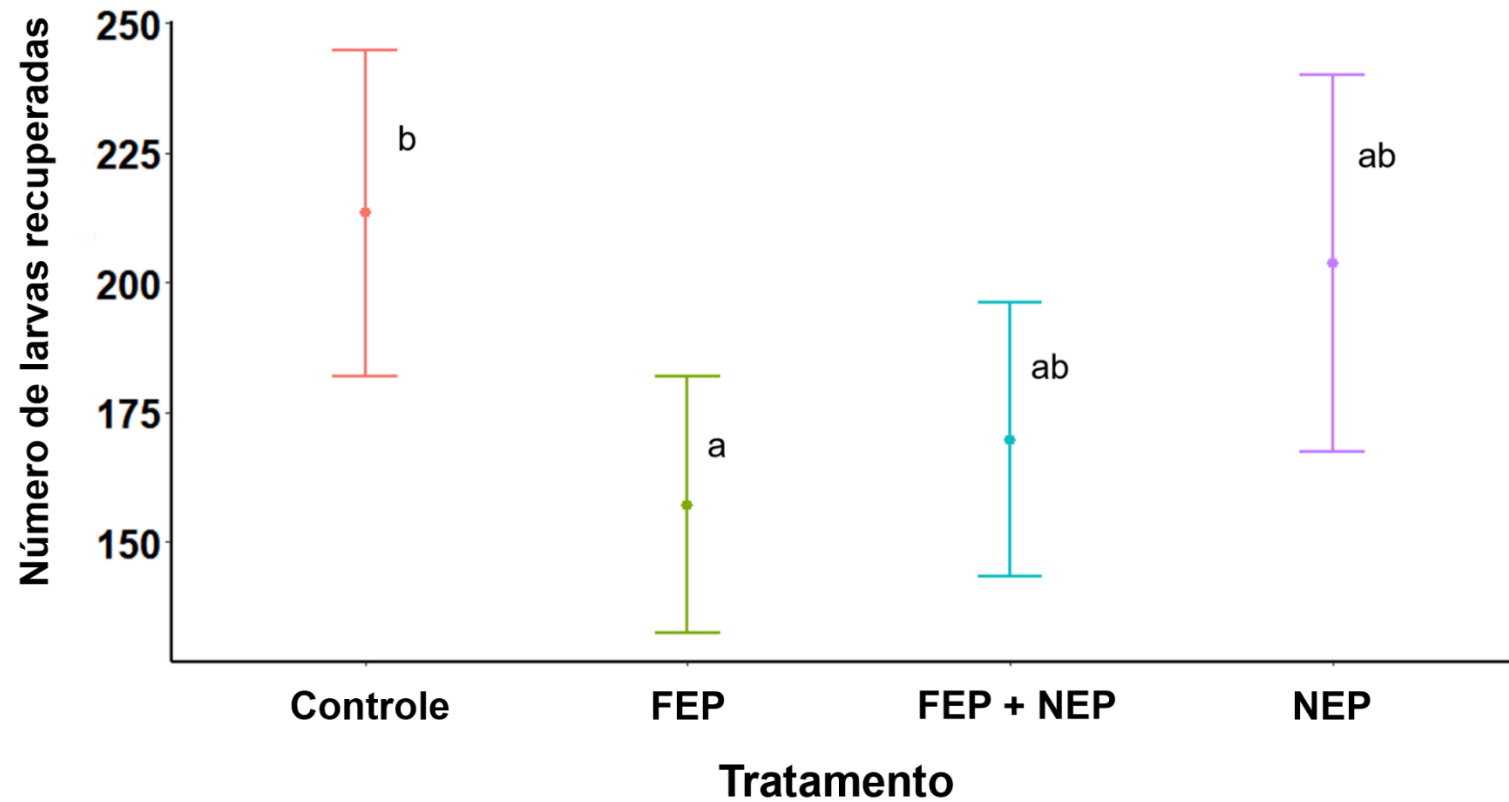


Figura 15. Impacto de tratamento realizado no período seco com fungo (FEP) e nematoide entomatoagênico (NEP) aplicados isoladamente ou em combinação na população de larvas de carrapatos recuperadas de pastagens. Os segplots representam a média (\pm erro padrão, $n = 72$) de carrapatos recuperados para cada tratamento ao longo de todas as semanas de avaliação. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) com base no teste Tukey HSD.

4. DISCUSSÃO

Poucos estudos relataram o uso de fungos e nematoides entomopatogênicos para o biocontrole de carrapatos até o momento^{29,30,50}. A maioria dos estudos que realizaram o uso combinado de fungos e nematoides tiveram como foco o controle de insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera⁵¹⁻⁵⁴. Neste sentido, este é o primeiro estudo que testou, em condições de campo, a combinação de fungos e nematoides entomopatogênicos para o controle da fase não parasitária de *R. microplus* em pastagens artificialmente infestadas.

A virulência de *M. robertsii* IP 146 contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foi demonstrada no presente estudo, e destacou o seu potencial promissor como agente de biocontrole em relação aos demais isolados fúngicos testados. Bernardo et al.¹⁵ também investigaram a virulência de *M. robertsii* IP 146 para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições controladas, e reportaram percentual de controle de 70,97% ou 97,95% em tratamento com conídios e blastosporos, respectivamente. Além de *M. robertsii* IP 146, o tratamento com *H. bacteriophora* HP88 indicou que este nematoide é um agente de biocontrole promissor, uma vez que foi capaz de reduzir o potencial biótico de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Esses dados corroboram com as informações da literatura de que *H. bacteriophora* HP88 é um isolado altamente virulento para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições laboratoriais^{21,30,55}.

Os grupos tratados com *Metarhizium* spp. combinado com *H. bacteriophora* HP88 foram altamente virulentos contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* sob condições controladas; no entanto, nenhuma interação sinérgica foi observada devido à alta eficácia obtida no grupo tratado utilizando somente nematoides, o que está de acordo com os resultados relatados por Monteiro et al.³⁰. Este estudo realizado em condições controladas avaliou a combinação da cepa HP88 (*H. bacteriophora*) ou LPP1 (*H. indica*) com IBCB 116 (*M. anisopliae*) ou ESALQ 986 (*Beauveria bassiana*) contra fêmeas

ingurgitadas de *R. microplus* e obtiveram mais de 90% de percentual de controle em todos os grupos tratados apenas com nematoides ou nos grupos tratados com os entomopatógenos combinados. Esses estudos demonstram a compatibilidade entre nematoides e fungos entomopatogênicos para controle de carrapatos, assim como outros estudos também demonstraram para controle de *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Rutelidae)¹¹; *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae)⁵⁶ e *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae)⁵⁷.

Fungos e nematoides testados em concentrações inferiores resultaram em efeito sinérgico em todas as combinações realizadas. De fato, o sinergismo observado a partir da combinação de FEP e NEP para controle de insetos vem sendo reportado em estudos desenvolvidos em condições controladas, de semi-campo e campo. Casos de sucesso vêm sendo relatados em ensaios laboratoriais e em casa de vegetação com *M. anisopliae* CLO 53 combinado com *H. megidis* ou *Steinernema glaseri* para controlar *H. philanthus*; além de estudos em condições de campo testando o mesmo isolado fúngico combinado com *H. bacteriophora* para o controle da mesma praga. Em todos esses casos foi possível observar um aumento da eficácia^{11,33}. Os mecanismos envolvidos nas interações sinérgicas entre fungos e nematoides entomopatogênicos permanecem obscuros, mas existe a hipótese de que o fungo atue como um estressor, afetando a homeostase e enfraquecendo o hospedeiro, o que torna o artrópode mais vulnerável à infecção por nematoides^{11,56}. Além disso, os hospedeiros infectados com fungo liberam mais CO₂; curiosamente, os nematoides usam esse biomarcador para encontrar suas presas e parasitá-las³⁴. Simultaneamente, outros fatores são relatados como capazes de influenciar o efeito obtido pela combinação de agentes biológicos, já que diversas variáveis podem induzir a ocorrência de sinergismo, como particularidades do hospedeiro alvo, as espécies entomopatogênicas combinadas, e o seu tempo de aplicação (simultâneo ou sequencial)⁵¹.

As diferentes formulações granulares cultivadas em meio ágar-água apresentaram resultados semelhantes quanto à produção conidial e viabilidade fúngica, indicando que os grânulos são eficazes na produção de conídios em condições adequadas de temperatura e umidade relativa^{3,16,42}. Por outro lado, algumas formulações granulares cultivadas em solo não esterilizado demonstraram maior produção de conídios do que outras. A formulação à base de celulose microcristalina (CM), terra diatomácea (TD), vermiculita (VMC) e fibra vegetal foi capaz de produzir conídios em número significativamente maior do que as demais formulações testadas. Este resultado pode estar relacionado com a alta capacidade desses compostos em reter água em quantidade adequada ao desenvolvimento do fungo. A capacidade higroscópica de CM⁵⁸, TD⁵⁹ e VMC⁶⁰ é bem conhecida e sua associação com fibra vegetal, nas proporções testadas, pode ter garantido condições favoráveis para que o fungo esporulasse em solo não esterilizado, uma vez que a umidade é fundamental para a produção, germinação e persistência ambiental de fungos entomopatogênicos⁶¹. Neste sentido, a conidiogênese nos grânulos contendo microescleródios no microambiente onde a praga alvo habita, deve levar em consideração um fator crucial, como: a necessidade de haver um alto percentual de umidade relativa do ar. Em cenários com baixa umidade, o protagonismo dos carregadores ou aditivos utilizados na formulação, podem executar um papel crucial na absorção de água a partir da umidade do ar ambiente, permitindo assim a esporulação fúngica mesmo em condições ambientais adversas³.

Nos testes de campo, a persistência fúngica sofreu um declínio significativo ao longo do tempo, com grande variação entre as estações seca e chuvosa. Esta redução é um comportamento típico em fungos entomopatogênicos¹; entretanto, uma redução drástica foi observada no período seco (inverno), que é caracterizado por temperaturas e umidades frequentemente mais baixas. Além disso, a ausência de chuva, a baixa umidade

relativa do ar e alta radiação solar são fatores comuns nesta estação na área estudada e podem reduzir a persistência de fungos entomopatogênicos¹⁻³. Desta forma, a baixa recuperação de *M. robertsii* IP 146 das parcelas neste período pode ser explicada pela sua exposição a estes fatores climáticos adversos, pois ao decorrer do experimento o tratamento ficou exposto a alta radiação solar, com média de $17,21 \pm 5,3$ MJ/m², umidade relativa do ar a $64,38 \pm 24,47\%$ e ausência de chuva. Com a ausência de chuva o solo tornou-se seco, podendo ter comprometido a germinação e a esporulação do fungo. No período chuvoso (verão), caracterizado por clima úmido e quente, o fungo se beneficiou das condições climáticas, principalmente da alta umidade do ar encontrada neste período, com média de $86,09 \pm 25,47\%$. Além disso, a temperatura média de $23,88 \pm 4,08$ °C e a precipitação de $5,39 \pm 9,81$ mm/dia podem ter favorecido o desenvolvimento fúngico sobre os grânulos de microescleródios. Alta radiação solar foi observada em ambos períodos estudados; entretanto, este efeito deletério no período chuvoso pode ter sido minimizado com maior eficiência pela presença da vegetação abundante, diferente da época seca em que a cobertura da vegetação é reduzida.

Na estação chuvosa, todos os tratamentos ocasionaram redução do número de larvas de *R. microplus* nas pastagens. Embora a persistência fúngica na estação seca tenha sido reduzida, a formulação granular de *M. robertsii* IP 146 reduziu a população não parasitária de *R. microplus*. Uma possível explicação para este resultado seria a tolerância natural que este isolado possui para as condições climáticas encontradas no centro de Goiás, pois este isolado é nativo da região e também devido à proteção oferecida pelos componentes da formulação granular contra os fatores ambientais adversos³.

A persistência dos JIs aplicados nas pastagens no período seco também sofreu declínio significativo ao longo do tempo. No campo, a persistência, a sobrevivência e o desenvolvimento dos JIs dependem diretamente de fatores abióticos, como a umidade

relativa do ar, a textura do solo e em especial a temperatura^{62,63}. As condições climáticas severas enfrentadas durante o período seco de experimentação e o solo argiloso, com pouca aeração, como o encontrado no local de experimentação, pode ter dificultado a locomoção e sobrevivência dos juvenis^{64,65}. Desta forma, estes fatores podem ter influenciado negativamente a eficácia dos JIs no campo e limitado o controle de *R. microplus* nas pastagens. Entretanto, embora a persistência dos JIs não tenha sido avaliada no período chuvoso, redução de 38,11% da população não parasitária de *R. microplus* foi observada neste período nos tratamentos com JIs. Então, sugerimos que a ocorrência de chuva, torna o solo úmido, e aumenta a umidade relativa do microambiente; além disso, a cobertura da vegetação confere maior proteção dos JIs contra a radiação solar direta, proporcionando aos JIs melhor locomoção e sobrevivência resultando no sucesso da infecção.

Estudos têm demonstrado que a dinâmica populacional de *R. microplus* vem sofrendo interferência do aumento da temperatura global ao longo dos anos⁶⁶. Carneiro et al.⁶⁷ estudaram a dinâmica populacional de *R. microplus* na década de 1990 na mesma localidade onde o presente estudo foi conduzido, e reportaram três gerações anuais deste carrapato. Nicaretta et al.⁶⁶ em estudo recente desenvolvido nesta mesma região reportaram a ocorrência de cinco gerações anuais de *R. microplus*, sendo três registradas no período chuvoso e duas no período seco.

Os resultados dos testes conduzidos em campo no período chuvoso ou seco são de extrema relevância, uma vez que o controle da população não parasitária de *R. microplus* nas pastagens pode resultar em redução de milhares de larvas nas gerações seguintes. Desta forma, com os resultados reportados no presente trabalho, pode-se concluir que a combinação de *M. robertsii* IP 146 e *H. bacteriophora* HP88 em condições controladas oferece melhores resultados do que seus agentes utilizados isoladamente

(sinergismo), a formulação multiparticulada composta por celulose, vermiculita, terra diatomácea e fibra vegetal foi eficaz na produção de conídios quando cultivada sobre solo não esterilizado e por fim, os entomopatógenos *M. robertsii* IP 146 e *H. bacteriophora* HP88 quando aplicados no campo atuam como agentes promissores no biocontrole da fase não parasitária de *R. microplus*, apesar da eficácia do tratamento sofrer variação de acordo com a época do ano. Novos estudos utilizando formulações com componentes protetores para os entomopatógenos podem trazer melhorias nos resultados obtidos no campo, além disso, estudos aplicando fungos e nematoides, combinados ou não, em pastagens destinadas a criação extensiva de bovinos precisam ser conduzidos para determinar a eficácia do tratamento em reduzir a infestação de carrapatos nos animais.

5. REFERÊNCIAS

1. Scheepmaker, J. W. A. & Butt, T. M. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. *Biocontrol Sci. Technol.* **20**, 503–552 (2010).
2. Fernandes, É. K. K., Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L. & Roberts, D. W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Curr. Genet.* **61**, 427–440 (2015).
3. Rodrigues, J. *et al.* Relative humidity impacts development and activity against *Aedes aegypti* adults by granular formulations of *Metarhizium humberti* microsclerotia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 2725–2736 (2021).
4. Vega, F. E. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* **2**, 149–159 (2009).
5. Mascarin, G. M., Kobori, N. N., de Jesus Vital, R. C., Jackson, M. A. & Quintela, E. D. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1583–1590 (2014).
6. Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W. & Delalibera Júnior, Í. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *J. Invertebr.*

- Pathol.* **127**, 11–20 (2015).
7. Mascarin, G. M. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* **165**, 46–53 (2019).
 8. Monteiro, C. *et al.* Efficacy of entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulation against engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in semi-field conditions. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **11**, 101313 (2020).
 9. Marciano, A. F. *et al.* Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. *Sci. Rep.* **11**, 1–11 (2021).
 10. Santos, T. R. *et al.* Inorganic pellets containing microsclerotia of *Metarhizium anisopliae*: a new technological platform for the biological control of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Biotechnol. Prod. Process Eng.* **105**, 5001–5012 (2021).
 11. Ansari, M. A., Tirry, L. & Moens, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biol. Control* **31**, 172–180 (2004).
 12. Acevedo, J. P. M., Samuels, R. I., Machado, I. R. & Dolinski, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* **96**, 187–192 (2007).
 13. Bischoff, J. F., Rehner, S. A. & Humber, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**, 512–530 (2009).
 14. Fernandes, É. K. K. & Bittencourt, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. Appl. Acarol.* **46**, 71–93 (2008).
 15. Bernardo, C. C. *et al.* Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **9**, 1334–1342 (2018).
 16. Jackson, M. A., Dunlap, C. A. & Jaronski, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* **55**, 129–145 (2010).
 17. Jaronski, S. T. & Jackson, M. A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Sci. Technol.* **18**, 849–863 (2008).
 18. Grewal, P. S., De Nardo, E. A. B. & Aguilera, M. M. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in south America. *Neotrop. Entomol.* **30**, 191–205 (2001).
 19. Dolinski, C. Uso de entomopathogenic nematodes para o controle de pragas. in *Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças* (ed. Venzon M, Paula Jr TJ, P. A.) 261–289 (2006).

20. Samish, M., Ginsberg, H. & Glazer, I. Anti-tick biological control agents: Assessment and future perspectives. *Ticks Biol. Dis. Control* 447–469 (2008) doi:10.1017/CBO9780511551802.021.
21. Monteiro, C. M. de O. *et al.* Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* **170**, 355–358 (2010).
22. Monteiro, C. *et al.* Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* **203**, 310–317 (2014).
23. San-Blas, E. *et al.* Entomopathogenic nematology in Latin America: A brief history, current research and future prospects. *J. Invertebr. Pathol.* **165**, 22–45 (2019).
24. Vemmer, M. & Patel, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biol. Control* **67**, 380–389 (2013).
25. Grisi, L. *et al.* Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **23**, 150–156 (2014).
26. Mastropaolo, M., Mangold, A. J., Guglielmone, A. A. & Nava, S. Non-parasitic life cycle of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Panicum maximum* pastures in northern Argentina. *Res. Vet. Sci.* **115**, 138–145 (2017).
27. Powell, R. T. & Reid, T. J. Project tick control. *Queensl. Agric. J.* **108**, 279–300 (1982).
28. Campos Pereira, M. & Labruna, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (eds. Campos Pereira, M., Labruna, M.B., S. & M.P.J., Klafke, G. M.) 169 (2008).
29. Hartelt, K. *et al.* Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 314–320 (2008).
30. Monteiro, C. M. O. *et al.* Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* **112**, 3645–3651 (2013).
31. Barberchek, M. E. & Kaya, H. K. Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *J. Invertebr. Pathol.* **55**, 225–234 (1990).
32. Ansari, M. A., Tirry, L. & Moens, M. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *BioControl* **50**, 465–475 (2005).
33. Ansari, M. A., Shah, F. A., Tirry, L. & Moens, M. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic

- nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biol. Control* **39**, 453–459 (2006).
34. Ansari, M. A., Shah, F. A. & Butt, T. M. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. *Entomol. Exp. Appl.* **129**, 340–347 (2008).
 35. Acevedo, J. P. M., Samuels, R. I., Machado, I. R. & Dolinski, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* **96**, 187–192 (2007).
 36. Lindegren, J. E., Valero, K. A. & Mackey, B. E. Simple In Vivo Production and Storage Methods for *Steinernema carpocapsae* Infective Juveniles. *J. Nematol.* **25**, 193–197 (1993).
 37. Kaya, H. K. & Stock, P. S. Techniques in insect nematology. *Man. Tech. Insect Pathol.* 281–324 (1997) doi:10.1016/b978-012432555-5/50016-6.
 38. Fernandes, É. K. K., Bittencourt, V. R. E. P. & Roberts, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp. Parasitol.* **130**, 300–305 (2012).
 39. Bennett, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Acarida: Ixodidae) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia* **16**, 52–61 (1974).
 40. Drummond, R. O., Gladney, W. J., Whetstone, T. M. & Ernst, S. E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. *J. Econ. Entomol.* **64**, 686–688 (1971).
 41. Fernandes, É. K. K. *et al.* Composição e processo de preparação multiparticulada de natureza sólida contendo microescleródios de *Metarhizium anisopliae* para controle de artrópodes-praga de importância na saúde humana, veterinária e na agropecuária e seus usos. (2017).
 42. Jackson, M. A. & Jaronski, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycol. Res.* **113**, 842–850 (2009).
 43. Paixão, F. R. S. Formulação peletizada de *Metarhizium* spp.: Produção, termotolerância e potencial no controle de *Rhipicephalus microplus*. *Goiânia* (Universidade Federal de Goiás, 2016). doi:10.5151/cidi2017-060.
 44. Fernandes, É. K. K., Keyser, C. A., Rangel, D. E. N., Foster, R. N. & Roberts, D. W. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biol. Control* **54**, 197–205 (2010).
 45. 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. *J. Invertebr. Pathol.* **78**, 98–108 (2001).
46. Milner, R. J., Huppertz, R. J. & Swaris, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium conidia*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**, 121–123 (1991).
 47. Humber, R. A. Identification of entomopathogenic fungi. in *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (ed. Lacey, L. A.) 151–187 (Academic Press, 2012).
 48. Arnhold, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* **50**, 488–492 (2013).
 49. Lenth, R., Singmann, H. & Love, J. Emmeans: Estimated Marginal Means, Aka Least-Squares Means. (2020).
 50. Butt, T. M. *et al.* Differential susceptibility of *Hyalomma excavatum* adults and nymphs to the entomopathogens *Metarhizium anisopliae* ARSEF 4556 and *Steinernema carpocapsae*. *Int. J. Pest Manag.* **62**, 261–266 (2016).
 51. Wakil, W., Yasin, M. & Shapiro-Ilan, D. Effects of single and combined applications of entomopathogenic fungi and nematodes against *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
 52. Malan, A. P., Diest, J. I. von, Moore, S. D. & Addison, P. Control Options for False Codling Moth, *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae), in South Africa, With Emphasis on the Potential Use of Entomopathogenic Nematodes and Fungi. *African Entomol.* **26**, 14–29 (2018).
 53. Schmidt, J. M. *et al.* Entomopathogenic Nematodes and Fungi Virulence to *Cowpea Curculio* (Coleoptera: Curculionidae) Larvae 1. *J. Entomol. Sci.* **53**, 152–161 (2018).
 54. Torrini, G. *et al.* Entomopathogenic fungi and nematodes against larvae of the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae): a laboratory evaluation. *Int. J. Pest Manag.* **64**, 287–293 (2018).
 55. Singh, N. K. *et al.* Efficacy Evaluation of Six Entomopathogenic Nematode Species against Engorged Females of Southern Cattle Fever Tick, *Rhipicephalus (=Boophilus) microplus*. *Southwest. Entomol.* **43**, 1–17 (2018).
 56. Mc Namara, L. *et al.* Efficacy of entomopathogenic fungi against large pine weevil, *Hylobius abietis*, and their additive effects when combined with entomopathogenic nematodes. *J. Pest Sci. (2004)*. **91**, 1407–1419 (2018).
 57. Shapiro-Ilan, D. I., Jackson, M., Reilly, C. C. & Hotchkiss, M. W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol. Control* **30**, 119–126 (2004).
 58. EK, R. & Newton, J. M. Microcrystalline Cellulose as a sponge as an Alternative Concept to the Crystallite-Gel Model for extrusion and Spheronization. *Pharm. Res.* **15**, (1998).

59. Mewis, I. & Ulrichs, C. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. *J. Stored Prod. Res.* **37**, 153–164 (2001).
60. Silva, L. P. C. *et al.* Viability of *Strongyloides venezuelensis* eggs and larvae in vermiculite containing the fungus *Duddingtonia flagrans*. *Parasitol. Res.* **116**, 2047–2051 (2017).
61. Ignoffo, C. M. Environmental Factors Affecting Persistence of Entomopathogens. *Florida Entomol.* **75**, 516 (1992).
62. Grewal, P. S. Formulation and application technology. in *Entomopathogenic Nematology* (ed. Gaugler, R.) 78–79 (CRC Press, 2002).
63. Stuart, R. J., Barbercheck, M. E. & Grewal, P. S. Entomopathogenic Nematodes in the Soil Environment: Distributions, Interactions and the Influence of Biotic and Abiotic Factors. in *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection* 1–531 (2015). doi:10.1007/978-3-319-18266-7.
64. Kung, S. P., Gaugler, R. & Kaya, H. K. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *J. Invertebr. Pathol.* **55**, 401–406 (1990).
65. Molyneux, A. S. & Bedding, R. A. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steirnerema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica* **30**, 358–365 (1984).
66. Nicaretta, J. E. *et al.* *Rhipicephalus microplus* seasonal dynamic in a Cerrado biome, Brazil: An update data considering the global warming. *Vet. Parasitol.* **296**, (2021).
67. Carneiro, J. R., Calil, F., Panicali, E. & Rodrigues, N. Ocorrência de Ixodidae e variação estacional do *Boophilus microplus* (CAN., 1888) em bovinos da bacia leiteira de Goiânia - GO. *Rev. Patol. Trop.* **21**, 235–242 (1992).

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho demonstram o protagonismo do controle biológico utilizando fungos e nematoides entomopatogênicos, combinados ou não, sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus microplus*. A demanda nacional por um método eficaz para reduzir a população não parasitária de *R. microplus* é urgente, não somente pelos prejuízos ocasionados anualmente pelo parasitismo deste carrapato, mas também pela demanda por métodos mais ecológicos que vem crescendo entre a população brasileira. Embora atualmente no mercado brasileiro dos biológicos não exista um produto comercial voltado para o controle de carrapatos, diversas pesquisas relacionadas a redução da população de vida livre de *R. microplus* presente nas pastagens vem sendo realizadas para alcançarmos um produto biológico eficaz em seu controle.

Sabe-se que as condições climáticas são fatores que podem influenciar diretamente no sucesso da utilização dos entomopatógenos em campo, no presente trabalho esta premissa foi confirmada quando as formulações foram testadas em diferentes épocas do ano; a aplicação no período chuvoso alcançou eficácia superior do que quando o tratamento foi realizado no período seco. Nestas situações, utiliza-se de métodos tecnológicos que concedam proteção contra os fatores climáticos deletérios aos entomopatógenos, como o uso de formulações.

A proposta de formular os biocontroladores demonstrou ser promissora, mas pode ser melhorada de forma a conferir maior eficácia aos entomopatógenos utilizados. Ainda existem perguntas a serem respondidas, como se a aplicação da formulação granular ou dos juvenis infectantes irá reduzir o número de carrapatos sobre os animais. Entretanto, mediante aos resultados relatados, destaca-se a inovação deste método biológico para tratamento em pastagens infestadas de carrapatos e a eficácia obtida, sendo este um estudo pioneiro a utilizar essa metodologia em testes de campo. Além disso, vale

ressaltar a importância de realizar mais estudos com foco na fase livre de *R. microplus*, pois estes atuam justamente sobre uma das grandes lacunas do controle de *R. microplus*, que é a ausência de produtos para tratamento sobre as pastagens.

A descoberta de conhecimentos relacionados a interação patógeno-hospedeiro é de extrema importância para viabilizar novas formas de controlar populações de artrópodes-pragas. Desta forma, o presente trabalho elucidou com sucesso alguns aspectos referentes à infecção por fungos ou nematoides entomopatogênicos sobre a fase não parasitária de *R. microplus*.

A execução desta tese foi importante por consolidar parcerias entre diferentes instituições, como a Embrapa Arroz e Feijão, Gado de Leite e Meio Ambiente, por meio da colaboração de analistas e pesquisadores destas instituições. Também foi importante por contribuir com a operacionalização da colônia de carrapatos com bovinos artificialmente infestados do Laboratório de Patologia de Invertebrados e Laboratório de Biologia, Ecologia e Controle de Carrapatos da UFG, resultando em dados mais confiáveis obtidos por meio da utilização de cepa local.

ANEXO I – Parecer Comissão de ética no uso de animais/CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 20 de março de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 032/17

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 10/03/17
- Título do projeto:** Associação de nematoides e fungos entomopatogênicos para o controle do carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)
- Pesquisador Coordenador no SAP:** Caio Márcio de Oliveira Monteiro/ IPTSP/UFPG
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Caio Márcio de Oliveira Monteiro/ IPTSP/UFPG
- Pesquisadores Participantes:** Éverton Kort Kamp Fernandes; Ricardo Neves Marreto; Letícia Coelho Miranda Brito; Luiza Gabriella Ferreira de Paula; Elen Regozino Muniz; Marcos Daniel Filgueiras Gomes
- Médico Veterinário/CRMV:** Luiza Gabriella Ferreira de Paula/ CRMV GO no. 6676
- Unidade onde será realizado:** IPTSP/UFPG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo geral: Avaliar eficácia da associação de nematoides e fungos entomopatogênicos para o controle do carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, bem como verificar o impacto da infecção em órgãos de fêmeas ingurgitadas, relacionados com processo reprodutivo

Objetivos específicos

- Avaliar o potencial da associação de *H. bacteriophora* HP88 com diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. para o controle de *R. microplus*, por meio de testes *in vitro*;
- Verificar o potencial da associação *H. bacteriophora* HP88 com um isolado de *M. anisopliae* s.l. para o controle de *R. microplus* por meio de teste em condições seminaturais, utilizando a formulação de inseto cadáver para aplicação do nematoide, e as formulações oleosa e peletizada para aplicação para aplicação do isolado fúngico;
- Avaliar a eficácia dessas formulações sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições seminaturais, 30 e 60 após dias a aplicação e verificar a persistência desses entomopatógenos no ambiente;
- Investigar o efeito desses isolados, associados ou não, sobre os ovários e do órgão de Gené de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas e correlacionar os dados com os parâmetros biológicos referentes a biologia reprodutiva das fêmeas ingurgitadas.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFPG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



IV - Sumário do projeto:

- ❑ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** A possibilidade de coletar *R. microplus* de bovinos infestados naturalmente não é desejada, visto que grande parte dos pecuaristas utilizam acaricidas químicos para controle de carrapatos. E estes acaricidas alteram a eficiência reprodutiva dos carrapatos, podendo interferir nos resultados obtidos.
- ❑ **Prevê Projeto Piloto:** Não será utilizado projeto piloto.
- ❑ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Serão utilizados 6 bovinos fêmeas de linhagem leiteira com 6 meses de idade.
- ❑ **Fonte de obtenção do animal:** Fazenda escola da EVZ/UFV
- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os animais serão mantidos no galpão de experimentação de grandes animais ou piquete de capim *Brachiara decumbens*, Baía individual com 10 m². Piquete: 0,5 ha.
- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não será utilizado agente infeccioso. Na manipulação dos animais será utilizado EPIs para diminuir o risco aos usuários.
- ❑ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Serão utilizados 6 bovinos (2 animais por ano), aos quais passarão por um rodízio mensal de infestação, intercalando os bovinos entre infestado (estabulado) e não infestado (piquete). O bovino estabulado será infestado com 3g (1g por 3 dias consecutivos) de larvas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, para que no 21º dia da infestação as fêmeas estejam ingurgitadas e no peso ideal para a realização dos experimentos com os carrapatos. Se o animal apresentar qualquer alteração no exame clínico diário ou nos exames laboratoriais (hemograma e hematócrito), será realizado o tratamento químico contra a infestação de carrapatos com banho de Deltametrina (25mg/animal, dose única) e tratamento de possíveis parasitas causadores da doença Tristeza Parasitária Bovina com Tetraciclina (20mg/kg) e Imidocarb (3mg/kg). O ciclo de *R. microplus* é todo no animal (monoxeno) não correndo risco de infestar outros animais. Após a coleta manual das fêmeas ingurgitadas, o bovino será solto em piquete a pasto durante 30 dias anteriores a uma nova infestação.
- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Para os bovinos envolvidos na colônia de carrapatos serão realizados hemogramas períodos mensais e exame clínico diário, caso seja detectado os parasitos (*Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*) e/ou sintomas referentes à tristeza parasitária (mucosas pálidas, apatia, emagrecimento, pirexia), os animais serão tratados com tetraciclina e imidocarb.
- ❑ **Grau de invasividade: G2**
- ❑ **Material utilizado em outros projetos:** Serão utilizados os mesmos bovinos empregados no projeto “Ação dos fatores de transcrição CreA, Msn2 e PacC na virulência de *Beauveria bassiana* contra *Rhipicephalus microplus*”, cujo processo de manutenção de colônia de carrapatos já foi aprovado pela

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



CEUA, com número de protocolo de 057/16. A metodologia será exatamente a mesma apresentada no referido projeto.

- Método de eutanásia:** Os animais não serão eutanasiados.
- Destino do animal:** Os animais ficaram à disposição da EVZ.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG:** O pesquisador apresentou toda documentação necessária para produção do parecer.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os cuidados e manejo dos animais estão de acordo com o recomendado pelo CONCEA. Os riscos serão minimizados com as práticas adotadas pelos pesquisadores.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de dezembro de 2019**.

VII - Data da reunião: 20/03/17.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

ANEXO II – Análise físico-química do solo utilizado nos testes de campo



LABORATÓRIO
Solo & Companhia

Avenida Castelo Branco nº 2275 St. Coimbra
CEP: 74530-015 - Goiânia - GO - CNPJ: 10.702.697/0001-04



Interessado
Propriedade

EVERTON KORT KAMP FERNANDES
EMBRAPA

Remetente
Cultura

PARTICULAR

Entrada
21/08/2020

Cidade/UF GOIÂNIA-GO

Emissão 04/09/2020

RESULTADO DE ANÁLISE DE SOLO

Nº Laboratório	Identificação	pH(CaCl ₂)	pH(H ₂ O)	P(Melich)	P(Resina)	K(Potássio)	K(Potássio)	Ca(Cálcio)	Mg (Magnésio)	Al (Alumínio)	Acidez Total (H + Al)	S(Enxofre)	NiCrS (Nível Crítico de S)	
1511099	AMOSTRA 1	5,50	***	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	cmol/dm ³	cmol/dm ³	cmol/dm ³	cmol/dm ³	cmol/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	
				0,80	***	140,0	0,36	2,60	1,40	0,00	2,40	***	***	
Identificação	Ca+Mg	Valor T ou CTC	Soma de Bases(S)	Sat. Bases(V)	Sat. Alumínio(m)	Ca:Mg	Ca:K	Mg:K	Ca:CTC	Mg:CTC	K :CTC	H+Al:CTC	Si(Silício)	Na(Sódio)
	cmol/dm ³	cmol/dm ³	cmol/dm ³	%	%				%	%	%	%	mg/dm ³	mg/dm ³
AMOSTRA 1	4,00	6,76	4,36	64,48	0,00	1,86	7,28	3,92	38,48	20,72	5,28	35,52	***	***
Identificação	M.O.	C.O.	Cu(Cobre)	Fe(Ferro)	Mn (Manganês)	Zn(Zinco)	NiCrZn (Nível Crítico de Zn)	B(Boro)	P (Relativo)	P (Remanescente)	NiCrP (Nível Crítico de P)	Argila	Silte	Areia
	g/Kg	g/Kg	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	(%)	mg/dm ³	mg/dm ³	g/Kg	g/Kg	g/Kg
AMOSTRA 1	18,77	10,90	4,99	45,70	18,00	2,80	***	0,15	***	***	***	620,0	100,0	280,0

Obs: O Laboratório Solo & Companhia não é responsável pela coleta de amostras, não nos responsabilizamos por erros decorrentes da coleta realizada pelo cliente, todos os resultados são referentes a amostra conforme foi entregue ao laboratório. Este relatório original só tem validade se reproduzido por completo, não garantimos a integridade de resultados emitidos de forma parcial em outros meios. Amostras ficam arquivadas por até 30 dias.

Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. EMBRAPA (2017)

P(RES)	40,0-80,0	K	60,0-180,0	Fe	40,0-80,0	Ca/Mg	2,0-5,0	Ca/CTC	48,0-60,0
P(MEL)	10,0-30,0	S	10,0-20,0	Mn	20,0-40,0	Ca/k	15,0-20,0	Mg/CTC	16,0-20,0
B	0,4-0,8	Mg	0,5-1,5	Zn	2,0-4,0	Mg/K	3,0-5,0	K/CTC	3,0-5,0
Mat. Org.	1,5-3,0	Ca	2,0-5,0	Cu	1,2-2,4	pH (H ₂ O)	6,0-6,5	pH (CaCl ₂)	5,5-6,0

Laboratório Solo & Companhia
A Companhia Certa do Produtor Rural

Laercia L. Moura Ferreira

Laercia L. Moura Ferreira
Eng. Agrônoma
CREA-GO 8903/D

ANEXO III – Análise microbiológica do solo utilizado nos testes de campo



RESULTADO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA
– PRODUTO BIOLÓGICO –
- 585/20

E-mail: jmagricola@yahoo.com.br - Fone: (62) 3093-7390 Cel.: (62) 99649-8224WhatsApp - (62) 9811-9600

Interessado: CAIO MARCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO
Propriedade: -
Responsável pela coleta: O Interessado.


Proprietário: -
Município: GOIÂNIA - GO
Data de recebimento da amostra: 27/10/2020

N. LABORATÓRIO	N. REMETENTE	UFC ¹ /g	
		<i>Bacillus sp</i>	Contaminantes
2415	-	1,2 x 10 ⁶	-

¹UFC = Unidade formadora de colônias/g.

Observação: 1 - O resultado se refere ao material enviado ao laboratório pelo interessado.
 2 - Este resultado não tem valor jurídico.

Aparecida de Goiânia, 06 de novembro de 2020.


 Dr. Marcos Augusto de Freitas
 Eng. Agrônomo/Fitopatologista
 CREA: 18051/D-GO



**RESULTADO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: FUNGOS HABITANTES DO SOLO:
- 585/20 -**

E-mail: jemagricola@yahoo.com.br - Fone: (62) 3093-7390 Cel.: (62) 9 99649-8224WhatsApp - (62) 9 9811-9600

Interessado: CAIO MARCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO
Propriedade: -
Cultura: -
Responsável pela coleta: O Interessado

Proprietário: -
Município: GOIÂNIA - GO
Data de recebimento da amostra: 27/10/2020
Composição da amostra: Solo.

N. Laboratório	N. Remetente	UFC/g de Solo ¹			UFC/100 g Solo ²	UFC/g ¹ Solo	MEG ³ Solo
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizoctonia sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
2.415	-	0	1.667	3.667	5	2.000	0

¹UFC= Unidade formadora de colônia/g Solo; ²UFC/100 g de Solo; **Análise não solicitada.

NÍVEIS DE TOLERÂNCIA – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

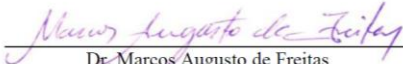
Os níveis de tolerância de UFC dos fitopatógenos por grama de solo, **NÃO DEVEM SER ANALISADOS ISOLADAMENTE**. O nível de tolerância tanto para as espécies de *Fusarium*, quanto para *Rhizoctonia sp.* varia de acordo com as outras variáveis presentes no sistema de produção: espécie cultivada, nível de resistência da cultivar, fertilidade e compactação do solo, quantidade de matéria orgânica e textura do solo, população de microrganismos antagonistas, condições do ambiente, sistema de cultivo (irrigado ou sequeiro) dentre outras.

Observação: 1) Os resultados de análise são referentes às amostras enviadas pelo interessado.

2) Este resultado não tem valor jurídico.

3) A interpretação dos níveis de fitopatógenos (nematóides e fungos) presentes no solo, não deve ser realizada de forma isolada. Esses níveis de tolerâncias, variam de acordo com as outras variáveis presentes no sistema de produção (nível de resistência da cultivar, fertilidade, matéria orgânica e textura do solo, etc.). **Esse serviço trata-se de uma consultoria e será cobrado a parte.**

Aparecida de Goiânia, 06 de Novembro de 2020.


 Dr. Marcos Augusto de Freitas
 Eng. Agrônomo/Fitopatologista
 CREA 18051/D GO



RESULTADO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: NEMATOIDES:
- 585/20 -

E-mail: jemagricola@yahoo.com.br - Fone: (62) 3093-7390 Cel.: (62) 9 99649-8224WhatsApp - (62) 9 9811-9600

Interessado: CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO
Propriedade: -
Cultura: -
Responsável pela coleta: O Interessado

Proprietário: -
Município: GOIÂNIA – GO
Data de recebimento da amostra: 27/10/2020.
Composição da amostra: Solo

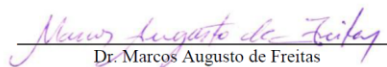
N. LABORATÓRIO	N. REMETENTE		<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Pratylenchus</i> sp.	<i>Pratylenchus brachyurus</i>	<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>Criconemella</i> sp.	<i>Heterodera glycines</i>	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	<i>Pratylenchus coffeae</i>	vida Livre
2.415	-	Solo1	0	0	0	198	0	11	0	0	88
		Raiz2	**	**	**	**	**	**	**	**	**

²Método de extração: Jenkins (1964); Coolen & D'Herde (1972); ¹Solo: 200 ml, **Quantidade de solo insuficiente para análise (< 200 ml de solo) ²raízes: 10 g, **Quantidade de raízes insuficiente para análise (< 10 g de raízes) ou ausência de raízes na amostra.

Observação: 1) Os resultados de análise são referentes às amostras enviadas pelo interessado.

2) Este resultado não tem valor jurídico.

3) A interpretação dos níveis de fitopatógenos (nematoides e fungos) presentes no solo, não deve ser realizada de forma isolada. Esses níveis de tolerâncias, variam de acordo com as outras variáveis presentes no sistema de produção (nível de resistência da cultivar, fertilidade, matéria orgânica e textura do solo, etc.). Esse serviço trata-se de uma consultoria e será cobrado a parte.


Dr. Marcos Augusto de Freitas
Eng. Agrônomo/Fitopatologista
CREA 18051/D GO

Aparecida de Goiânia, 06 de Novembro de 2020.