

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

ÉVERTON CADAVAL

**AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DOS FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS
Beauveria bassiana E *Metarhizium anisopliae* EXPOSTOS A CARRAPATICIDAS
SINTÉTICOS**

**São Gabriel
2018**

ÉVERTON CADAVAL

**AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DOS FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS
Beauveria bassiana E *Metarhizium anisopliae* EXPOSTOS A CARRAPATICIDAS
SINTÉTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Juliano Tomazzoni Boldo

**São Gabriel
2018
ÉVERTON CADAVAL**

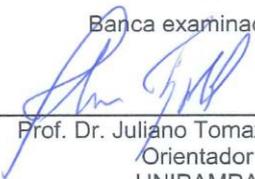
ÉVERTON CADAVAL

**AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DOS FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS
Beauveria bassiana E *Metarhizium anisopliae* EXPOSTOS A CARRAPATICIDAS
SINTÉTICOS**

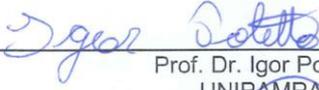
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 11 de **Dezembro** de 2018.

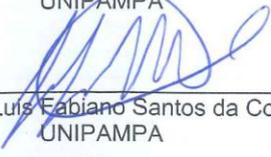
Banca examinadora:



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Igor Polleto
UNIPAMPA



Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa
UNIPAMPA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

C121a Cadaval, Éverton

Avaliação da Compatibilidade dos Fungos Entomopatógenos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* Expostos a Acaricidas Sintéticos / Éverton Cadaval.

25 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --
Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2018.

"Orientação: Juliano Tomazzoni Boldo".

1. Controle Biológico. 2. Controle Químico. 3. Compatibilidade. 4. Fluazuron. 5. Fipronil. I. Avaliação da Compatibilidade dos Fungos Entomopatógenos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* Expostos a Acaricidas Sintéticos.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo, agradeço por todo o apoio, disponibilidade, colaboração e comprometimento com o projeto. Pelos ensinamentos oferecidos e as vezes que me guiou durante a graduação. O entendimento da palavra “gratidão”, devo a sua pessoa.

Aos meus amigos mais queridos, Guilherme, Anderson, Cristiane e Samanta. Eu não sei o que teria sido de mim nesses anos sem vocês ao meu lado. Todas as minhas memórias felizes em São Gabriel derivam de momentos que passamos juntos.

A minha família, especialmente a minha mãe, Lori, por ser a pessoa extraordinária que é e me incentivar desde a infância a seguir meus sonhos e a acreditar em meu potencial. E ao meu irmão mais velho, Yuji, por todos os conselhos, por ajudar a formar a pessoa que sou hoje em dia e por fazer o máximo para que pudesse sempre aproveitar as oportunidades presentes em minha jornada até aqui.

Ao Laboratório de Proteômica Aplicada/APIPAMPA, que serviu como um segundo lar no campus, principalmente nesse último ano e as amizades que dele saíram, Darlene, Anna, Carla, Cissa e Maikel. Lembrarei sempre com carinho de vocês.

“If you stand for nothing, you'll fall for anything”.

Alexander Hamilton

RESUMO

Um dos maiores problemas no cenário da pecuária nacional é o carrapato do gado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que foi introduzido através de séculos de utilização de bovinos nas expedições exploradoras nas Américas. Hoje em dia, os prejuízos causados pela sua presença giram em torno de US\$ 3,4 bilhões anuais, causados pelo efeito do parasitismo no animal de corte, como estresse, perda de peso, danos no couro, transmissão de patógenos e, principalmente, gastos realizados em tentativas de controle químico do parasita. O controle utilizando produtos químicos é a principal forma de tratamento atualmente. Entretanto, seu uso indiscriminado pode resultar no surgimento de resistência na população dos carrapatos. Logo, para contornar esse problema, técnicas de controle biológico tem ganhado cada vez mais espaço no campo, combinadas ao controle químico, para uma maior eficácia. Entretanto, os produtos sintéticos utilizados em conjunto ao controle biológico podem, sem o devido estudo, afetar negativamente a ação dos organismos utilizados no manejo integrado, tornando o uso sinérgico inviável. Posto isto, este trabalho teve por objetivo investigar se acaricidas utilizados no controle químico do carrapato-do-gado tem efeito tóxico sobre os fungos entomopagênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Utilizando técnicas de microbiologia, foram feitos inóculos da linhagem E6 de *M. anisopliae* e das linhagens SG01, B03 e B06 de *B. bassiana* em meios de cultura misturados aos produtos químicos comerciais de formulações diferentes entre si, chamados nos testes de Formulação 1 (princípio ativo fluazuron), Formulação 2 (princípio ativo cipermetrina), Formulações 3 e 4 (princípio ativo clorpirifós) e Formulação 5 (princípio ativo fipronil). Cada um contendo um princípio ativo diferente a ser testado e com registros de venda similares. Os resultados obtidos revelam a compatibilidade de quatro dos cinco produtos testados, sendo Formulação 1 o único incompatível para o manejo integrado de pragas. Através dos dados obtidos é possível elaborar futuros planos de manejo integrado nas populações de carrapatos resistentes aos químicos isoladamente que estão distribuídas pelo país.

Palavras-Chave: Controle Biológico, controle químico, compatibilidade, cipermetrina, fluazuron, fipronil.

ABSTRACT

One of the major problems in the national livestock scenario is the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cattle tick, which was introduced through centuries of cattle use in exploratory expeditions in the Americas. Nowadays, losses caused by its presence are around US \$ 3.4 billion annually, caused by the effect of parasitism on the animal, such as stress, weight loss, damage to the skin, transmission of pathogens and, especially, expenditures incurred in attempts to control the parasite. Control using chemicals is the main form of treatment today. However, its indiscriminate use may result in the emergence of resistance in the tick population. Therefore, to overcome this problem, biological control techniques have been gaining more space in the field, combined with chemical control, for greater effectiveness. However, synthetic products used in conjunction with biological control may, without due study, negatively affect the action of the organisms used in the integrated management, making synergistic use impracticable. Therefore, the objective of this work was to investigate whether acaricides used in the chemical control of ticks have a toxic effect on the entomopagenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Using microbiology techniques, inoculants of *M. anisopliae* E6 strain and *B. bassiana* strains SG01, B03 and B06 were cultured in culture media mixed with commercial chemicals of different formulations from each other, called in the tests of Formulation 1 (active ingredient fluazuron), Formulation 2 (active ingredient cypermethrin), Formulations 3 and 4 (active ingredient chlorpyrifos) and Formulation 5 (active ingredient fipronil). Each containing a different active principle to be tested and with similar sales records. The results show the compatibility of four of the five products tested, with Formulation 1 being the only one incompatible for integrated pest management. Through the data obtained it is possible to elaborate future plans of integrated management in the populations of ticks resistant to the isolated chemical that are distributed by the country.

Keywords: Biological Control, chemical control, compatibility, cypermethrin, fluazuron, fipronil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de relatos de resistência a carrapaticidas químicos no país.....12

Figura 2 – Gráficos do crescimento vegetativo de fungos entomopatógenos expostos a carrapaticidas químicos.....18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

O carrapato-do-gado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um aracnídeo pertencente à família Ixodidae, derivado da Ásia, atualmente distribuído mundialmente, com uma forte presença nas áreas de clima tropical e subtropical, como a América do Sul (ESTRADA-PEÑA et al., 2006). É um ectoparasito que se fixa ao hospedeiro e caracteriza-se primariamente pela hematofagia de animais de sangue quente, preferencialmente bovinos (mas podendo parasitar também ovinos) e que possui ciclo de vida monoxeno, ou seja, depende de um único hospedeiro para completar todo o seu desenvolvimento (ROCHA, 1984).

O parasitismo desse carrapato pode causar em seus hospedeiros anemia e anorexia (JONSSON, 2006), imunossupressão (INOKUMA et al., 1993) e facilitar a ocorrência de miíase cutânea (RECK et al., 2014). Além disso, os carrapatos podem causar danos físicos no couro e na carne, levar à queda de produção de leite (RODRÍGUEZ-VIVAS; DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, 1998) e servir como vetor de doenças para os bovinos, entre elas a Tristeza Parasitaria Bovina (TPB), levando a um quadro de anemia severa, palidez das mucosas, icterícia, febre, prostração, abortos e muitas vezes leva o animal a óbito (MARTINS; CORREA, 1995; JONSSON et al., 2008).

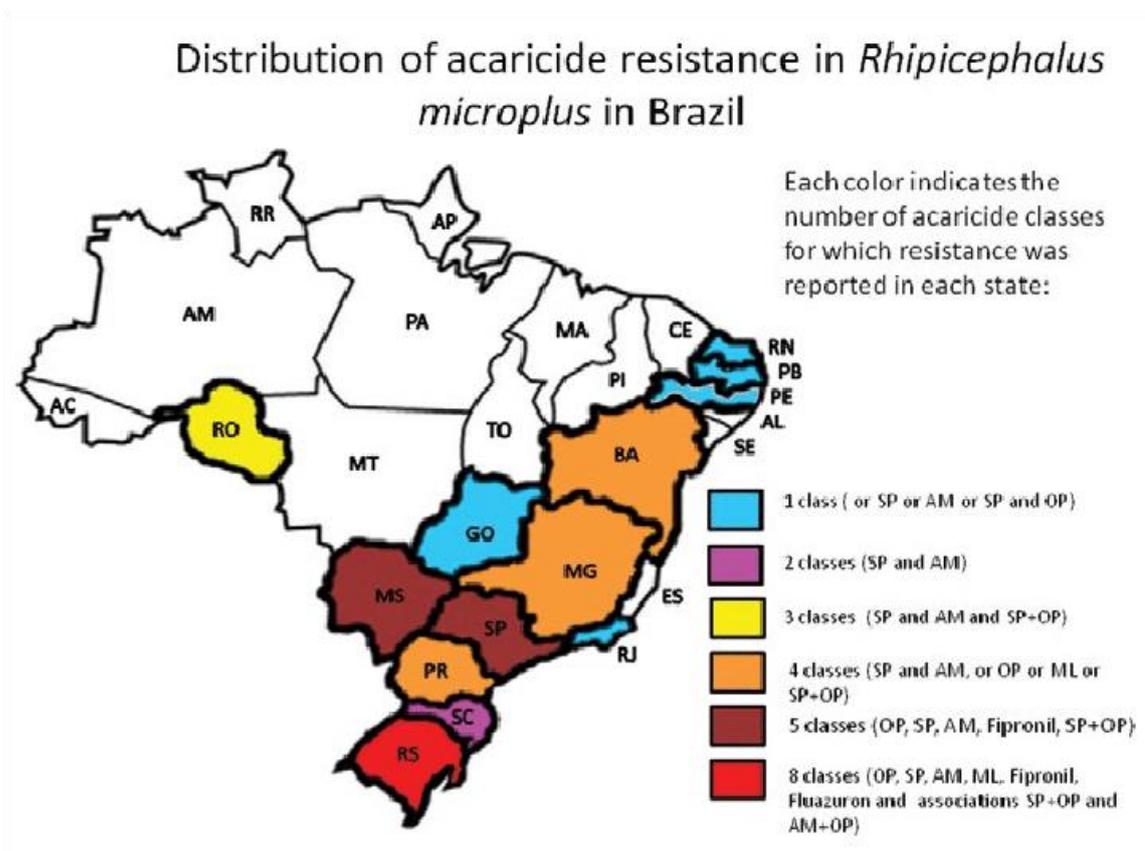
Logo, a pecuária brasileira, que conta com aproximadamente 209 milhões de cabeças de gado (ANUALPEC, 2016), tem a sua produtividade afetada pelo parasitismo do carrapato-do-gado. As perdas econômicas no Brasil nas populações de bovinos em decorrência do parasitismo de *R. (B.) microplus* chegam a US\$ 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2014). O custo para a tentativa de controle dos carrapatos também afeta o retorno financeiro aos produtores.

Com o intuito de evitar as perdas econômicas, os produtores utilizam vários métodos de combate ao parasita. O mais utilizado atualmente é o controle químico, realizado a partir do uso de carrapaticidas sintéticos, geralmente à base de organofosforados, piretróides e amidinas (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2006). Esses carrapaticidas podem conter vários princípios ativos diferentes e podem ser combinados entre si (em sua maioria), formando assim, uma forma de controle adequada ao carrapato-do-gado, se utilizada de forma correta. Dessa maneira, o mercado de parasiticidas movimenta cerca de US\$ 96 milhões anualmente, representando 34% das vendas do mercado veterinário (SINDAN, 2010). Para que os produtos utilizados no controle do carrapato possam ser considerados eficazes, eles

devem apresentar 95% de eficiência, segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA, 1987).

Entretanto, existem vários relatos do surgimento de resistência nas populações do carrapato a diferentes classes de produtos químicos (CASTRO-JANER et al., 2010; RECK et al., 2014; ALONSO-DÍAZ et al., 2006; RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2006). Isso se deve ao uso indiscriminado dos produtos, aplicação de doses incorretas (tendendo para a superdosagem), selecionando indivíduos resistentes que levam a gerações capazes de suportar os químicos completamente (FURLONG; MARTINS, 2000) e ao início tardio do tratamento, quando o gado já possui uma alta porcentagem de parasitismo. Na figura 1 estão destacados os estados onde há relatos de resistência dos carrapatos a diferentes classes de químicos, normalmente utilizados no combate as populações da praga.

Figura 1 - Mapa da distribuição da resistência a carrapaticidas por *Rhipicephalus microplus* no Brasil (HIGA, L. et al. 2015).



Além disso, esse uso exacerbado de controladores químicos pode causar danos ao ambiente e frequentemente são tóxicos para humanos, além de outros organismos não-alvo (KIRKLAND et al., 2004).

Como alternativa, métodos de controle biológico vem ganhando cada vez mais espaço. A premissa do controle biológico é a utilização de outros organismos vivos como forma do controle das populações de parasita, levando-as até níveis de existência ecológica e economicamente aceitáveis, sem causar danos ao agroecossistema. Para o controle do carrapato-do-gado já são conhecidos alguns métodos alternativos. Dentre os mais eficazes encontra-se o uso de fungos entomopatógenos, que atacam somente os artrópodes e não oferecem risco para outros animais (POLAR et al., 2005), não causam degradação ambiental e são altamente eficazes no combate aos organismos-alvo (ALONSO-DÍAZ et al., 2006; FERNANDÉZ-SALAS et al., 2016). Os fungos mais utilizados para esse fim são *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Ambos são amplamente estudados e eficientes em campo atualmente (FRAZZON et al., 2000; DUTRA et al., 2004; CAMARGO et al., 2016). Contudo, o tempo decorrido entre a aplicação do produto biológico e a cessão dos danos causados pelo carrapato pode não ser atrativo ao produtor, o que muitas vezes constitui-se em uma barreira ao uso dos entomopatógenos isoladamente.

Visando a elaboração de estratégias mais eficazes para o combate a linhagens de parasitas mais resistentes aos produtos sintéticos, estudos no campo do controle biológico de pragas vem sendo feitos de forma a aperfeiçoar programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), baseando-se na associação do controle químico e biológico, de forma a aumentar a eficácia de ambos no campo. Existem estudos que mostram que a associação dos métodos produz resultados melhores do que ambos separadamente (MOINO; ALVES, 1998; WEBSTER et al., 2015), provavelmente derivado da facilitação das infecções fúngicas por parte do efeito dos químicos sobre o sistema imunológico dos insetos (quebrando as resistências dos alvos ao fungo) (RIVERO-BORJA et al., 2018). No entanto, os efeitos podem ser indiscutivelmente negativos, causando desde a inibição do crescimento vegetativo até a ocorrência de mutações genéticas, alterando a virulência do agente de controle biológico (ALVES et al., 1998).

Para que esse efeito sinérgico seja possível, faz-se necessárias avaliações da compatibilidade entre os agentes biológico e químico, para garantir que a interação

entre os ambos seja de fato benéfica, sem que haja o comprometimento de uma ou ambas as partes.

Atualmente, no estado do Rio Grande do Sul, os produtos com maior taxa de comercialização que também possuem relatos de ineficácia crescente em campo podem ser reduzidos a cinco: Formulação 1, Formulação 2, Formulação 3, Formulação 4 e Formulação 5.

A Formulação 1 tem como princípio ativo o fluazuron, que tem ação inibidora no carrapato, particularmente nos mecanismos relacionados ao crescimento do parasita e sua produção de quitina. A Formulação 2 composta em sua maioria por cipermetrina, do grupo dos piretróides, que possuem ação semelhante aos organofosforados, atuando na inibição da enzima acetilcolinesterase, levando ao aumento de acetilcolina a níveis tóxicos no carrapato e causando um aumento da contração muscular até atingir a paralisia (ANDREOTTI et al., 2010), porém não deixando traços vestigiais nos subprodutos derivados do gado. O princípio ativo da Formulação 5 é o fipronil, da classe dos fenilpirazóis, que age bloqueando os canais controlados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico) e elimina os parasitas através da paralisação espástica (cerebral) e é utilizado nos ectoparasitos resistentes a outros produtos convencionais, como piretróides e organofosforados. Na composição da Formulação 3 a maior parte é representada pelo clorpirifós, da classe dos organofosforados. Na Formulação 4 existe a presença de citronelal, um aldeído que dá o odor característico da citronela em compostos químicos e óleos essenciais e tem propriedades de repelência de artrópodes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar a compatibilidade de três linhagens de *Beauveria bassiana* (B03, B06 e SG01) e uma de *Metarhizium anisopliae* (E6) em conjunto aos carrapaticidas químicos com maior registro de compra e relatos de resistência nas populações de carrapato do estado.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o crescimento vegetativo radial das colônias da linhagem E6 de *M. anisopliae* exposta a carrapaticidas químicos utilizados no controle químico de *R. microplus*.

Avaliar o crescimento vegetativo radial das colônias das linhagens B03, B06 e SG01 de *B. bassiana* expostas a carrapaticidas sintéticos utilizados no controle de *R. microplus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem de *Beauveria bassiana* SG01 foi isolada a partir de um inseto da ordem Hemíptera mumificado, coletado na área rural do município de Barão do Triunfo, no Rio Grande do Sul, por Maikel Bonilha Gaitkoski e gentilmente cedido ao laboratório. As linhagens de *Beauveria bassiana* B03 e B06 foram gentilmente cedidas pela Prof. Dr. Neiva Monteiro de Barros, docente da Universidade de Caxias do Sul (UCS). A linhagem E6 de *Metarhizium anisopliae* foi isolada de um inseto da espécie *Deois flavopicta* (Cercopidae), no estado do Espírito Santo e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo (ESALQ/USP).

Todas as linhagens foram cultivadas e mantidas em Meio de Cove Completo (adaptado de Cove (1966)): 0,6% NaNO₃ (m/V), 1% dextrose (m/V), 0,2% peptona (m/V), 0,05% extrato de levedura (m/V), 1,5% ágar (m/V), com adição de 2% de Solução de Sais (2,6% cloreto de potássio (m/V), 2,6% sulfato de magnésio heptaidratado (m/V) e fostato de potássio monobásico (m/V)) e 0,04% de Solução de Elementos Traços (0,004% borato de sódio heptaidratado (m/V), 0,04% sulfato de cobre pentaidratado (m/V), 0,0001% sulfato de ferro (m/V), 0,08% sulfato de manganês diidratado (m/V), 0,08% molibdato de sódio diidratado (m/V) e 0,08% sulfato de zinco diidratado (m/V)).

Os cultivos foram mantidos em incubadora com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, em temperatura constante de 28 °C até a germinação dos esporos, em torno de duas semanas.

Foram utilizados para esse estudo cinco carrapaticidas sintéticos, com diferentes princípios ativos. Todos acaricidas são amplamente comercializados e possuem relatos de resistência pelos produtores conforme Matias (2011). Os acaricidas avaliados foram identificados como Formulação 1 (fluazuron (2,5%)), Formulação 2 (cipermetrina (5%), clorpirifós (2,5%) e butóxido de piperonila (1%)), Formulação 3 (cipermetrina (5%), clorpirifós (7%) e butóxido de piperonila (1%)), Formulação 4 (cipermetrina (6%), clorpirifós (7%) e citronelal (0,5%)) e Formulação 5 (fipronil (1%)).

Os testes foram elaborados com as concentrações de 5%, 10% e 20% dos produtos em relação a quantidade de meio de cultura. Todos os experimentos foram

realizados também em meio de Cove completo (COVE, 1966) e em ambiente esterilizado de capela de fluxo.

Para que as placas tivessem a quantidade exata de meio de cultivo, o meio de Cove completo foi vertido em tubos de centrífuga de 15 mL e posteriormente vertido em placa de Petri, cobrindo seu fundo completamente. Para alcançar as dosagens calculadas de carrapaticida, o volume de meio relativo a cada volume de acaricida foi extraído do tubo com uma pipeta e substituído pela quantidade igual de produto químico.

O inóculo dos fungos nas placas foi feito através da aplicação de 10 µL de uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^5 esporos.mL⁻¹ no centro da placa, para avaliação do crescimento radial da colônia. Para a preparação da suspensão, os esporos foram retirados de uma placa com colônias maduras com uma alça de platina e transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 10 mL de emulsificador Tween 80® e homogeneizados ao produto. Essa suspensão inicial foi submetida a contagem em Câmara de Neubauer, na quadriculação 3 (0,0400 mm²), contando-se os cinco quadrantes das bordas e o do centro, da esquerda para a direita, respeitando as bordas (esporos presentes nas bordas esquerda e inferior conta-se; se presentes nas bordas direita e superior são ignorados). O valor de esporos obtido (n) foi submetido a seguinte fórmula para determinação da concentração:

$$\text{esporos.mL}^{-1} = \left(\frac{n}{5}\right) \times 2,5 \times 10^5 \times \text{fator de diluição (se houver)}$$

Novas diluições foram realizadas conforme o necessário para a obtenção da concentração de aplicação descrita acima.

A avaliação do crescimento vegetativo da colônia foi feita através da medição do raio da colônia com o auxílio de uma régua, medindo-se do centro às bordas em três diferentes direções e finalizando com a média aritmética das medidas para o resultado final.

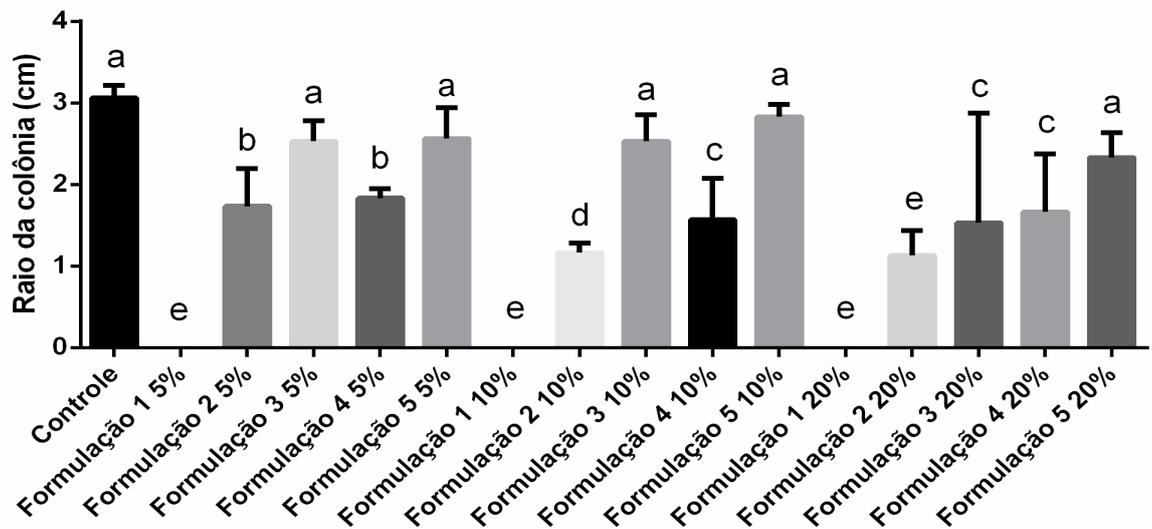
Os dados obtidos nessa contagem foram inseridos no software Prism v6.01 (fabricado por GraphPad) e submetidos a Análise de Variância (ANOVA), para determinar a existência ou não de uma diferença estatística nas médias do crescimento das colônias testes em relação ao controle e entre si.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

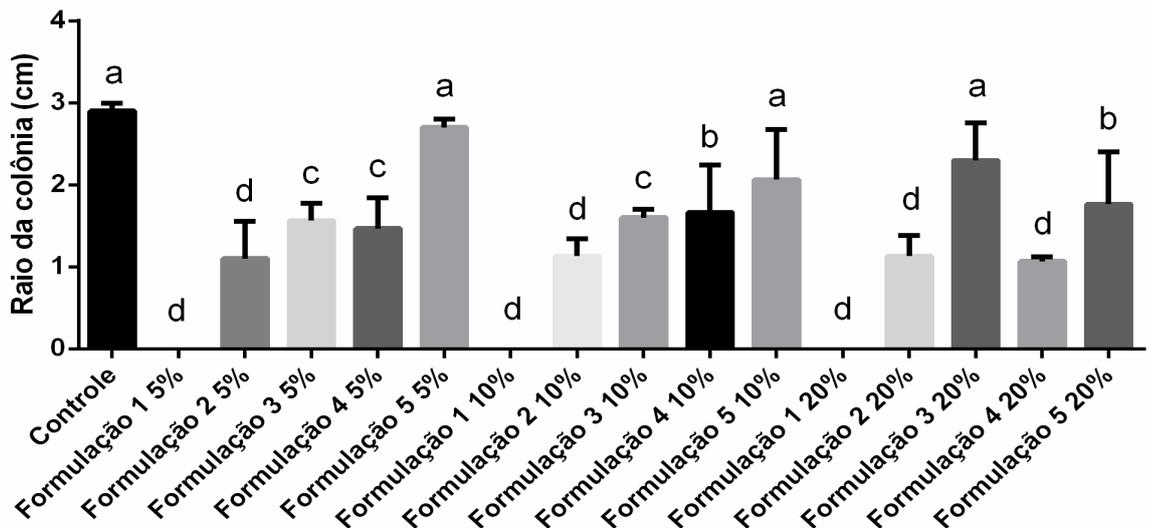
A medição do crescimento gerou valores que estão representados nos itens A, B, C e D da Figura 2.

Figura 2 - Crescimento vegetativo dos fungos entomopatógenos expostos a carrapaticidas químicos. O item A representa a linhagem E6 de *M. anisopliae*, B representa a linhagem SG01 de *B. bassiana*, C representa a linhagem B03 de *B. bassiana* e D representa a linhagem B06 de *B. bassiana*. As concentrações de 5%, 10% e 20% representam a dose de produto incorporados ao meio de cultura MCc. O controle consiste no meio sem a adição de nenhum carrapaticida. Letras distintas diferem estatisticamente por teste de ANOVA de duas vias (correção de Bonferroni) a $p < 0,05$.

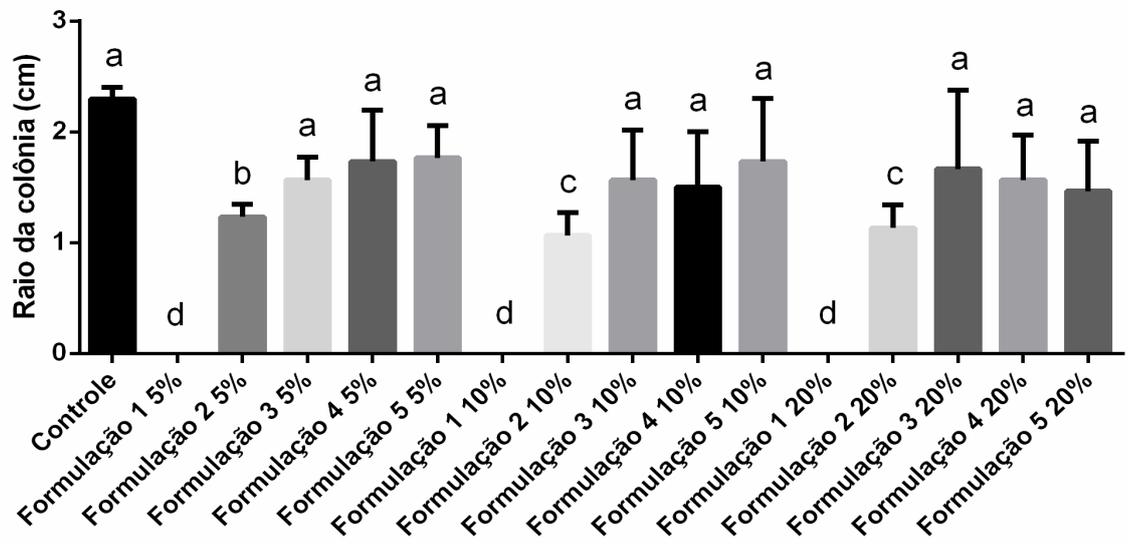
A)



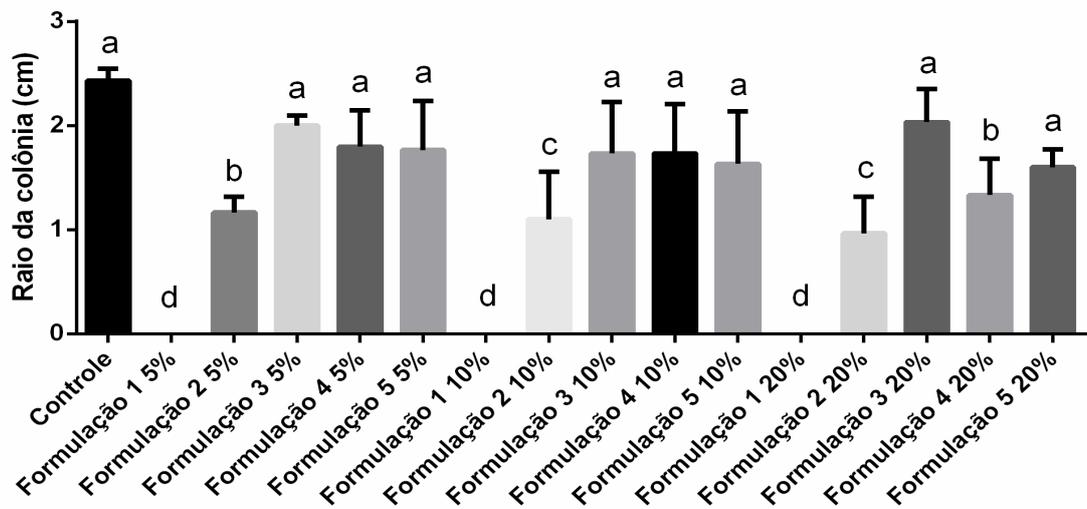
B)



C)



D)



Nota-se que em todas as linhagens e em ambas as espécies, houve a inibição completa de crescimento nos testes em conjunto ao carrapaticida de Formulação 1, mesmo nas concentrações mais baixas. Esse resultado pode ser atribuído às características do princípio ativo do produto, fluazuron, que segundo a descrição de Andreotti (2010), tem a função de interferir na produção de quitina, substância que normalmente possibilita o endurecimento da cutícula dos carrapatos; entretanto, quitina também é a responsável primária pela formação da parede celular tanto em *M. anisopliae* quanto em *B. bassiana*. Logo, o seu crescimento vegetativo e posterior

produção e maturação dos esporos é afetado pela ação inibidora do fluazuron de forma semelhante.

Nos testes realizados com a Formulação 2 houve crescimento em todas as dosagens, mesmo na dosagem mais alta testada (dobro da recomendação de uso em campo), assim como obtido em testes anteriores similares (BAHIENSE, 2006; BAHIENSE, 2008) onde o composto deltametrina (da classe dos piretróides), não só permitiu o desenvolvimento de *M. anisopliae*, como teve atuação sinérgica aumentando a mortalidade dos carrapatos quando aplicados em conjunto, mesmo nas populações resistentes ao químico. Em testes feitos por Meyling et al (2018), *B. bassiana* teve ação sinérgica com o produto alfa-cipermetrina (piretróide), elevando a mortalidade do bicho-da-farinha (*Tenebrio molitor*) a 100%, com aplicações do químico precedendo o uso dos fungos. Esses resultados estão de acordo com o atual estudo, onde a cipermetrina, também do grupo dos piretróides, não demonstrou toxicidade aos fungos testados. Porém, o crescimento dos inóculos nos meios testes foram consideravelmente diferentes, havendo uma clara diminuição no diâmetro das colônias. Foram utilizados nesse estudo acaricidas comerciais, que possuem uma formulação específica, portanto, como citado por Webster (2015), a diferença no desenvolvimento dos fungos pode ser atribuída aos diferentes componentes do produto, como solventes e estabilizadores químicos, e não necessariamente resultado da interação com o princípio ativo cipermetrina. Porém, é preciso salientar que os produtos aplicados em sinergia com os fungos são o produto comercial, e não seu princípio ativo isolado.

Tanto na Formulação 3 quanto na Formulação 4, o princípio ativo majoritário é o clorpirifós, da classe dos organofosforados. Nos testes conduzidos por Rivero-Borja et al (2018), entre a compatibilidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* diretamente com esse princípio ativo, houve um efeito sinérgico no aumento da mortalidade das larvas de lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) em resposta da aplicação do químico seguido pelos fungos. Somente quando o método de aplicação foi invertido (com o controle biológico sendo utilizado primeiro, seguido pelo uso do químico), houve uma inibição do crescimento vegetativo e da esporulação em ambos, *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Esses resultados são complementares aos resultados derivados deste estudo, onde o crescimento vegetativo não foi afetado pela presença dos carrapaticidas com clorpirifós, levando em consideração que a maior parte do meio foi composto por nutrientes propícios para o desenvolvimento dos fungos. Entretanto, no

trabalho de Oliveira et al (2003), onde foram testados alguns dos inseticidas mais utilizados nas plantações de café, a inibição da esporulação pelos produtos baseados em clorpirifós chegaram a 100%, deixando a viabilidade nula, diferenciando dos resultados encontrados nestes testes, onde houve esporulação nas placas teste, possivelmente pela diferença nas formulações dos produtos testados.

Nos resultados da Formulação 5, cujo princípio ativo é o fipronil, foi possível observar uma média de crescimento vegetativo das linhagens testadas muito similares aos valores de controle. No caso da linhagem E6 de *Metarhizium anisopliae*, o crescimento na dose 10% igualou-se ao do controle. Esse resultado é consistente com o apresentado por Moino e Alves (1998), onde o teste foi realizado diretamente com fipronil e os resultados da avaliação do crescimento vegetativo de *B. bassiana* e *M. anisopliae* não se distanciaram dos valores do controle, efeito que pode ter acontecido devido ao mecanismo de ação do fipronil, que consiste principalmente no bloqueamento dos receptores GABA, logo não tendo efeitos consideráveis sobre o crescimento do micélio dos fungos.

Outro ponto de destaque levantado pela análise dos gráficos é a diferença no crescimento vegetativo das linhagens de *B. bassiana*, que apesar de pertencerem a mesma espécie, tiveram desempenhos diferentes durante os testes. Esse resultado pode ser atribuído à variabilidade genética presente na espécie, que segundo Oliveira (2011) é aleatória, independentemente da proximidade geográfica ou de hospedeiros em comum, e pode ter grande impacto na resposta dos isolados aos químicos testados, assim como afeta o desempenho dos fungos no controle de diferentes espécies de praga (ALMEIDA, 2005).

Um aspecto importante a se levar em consideração sobre a aplicabilidade das técnicas de manejo integrado no campo é a ordem de aplicação dos diferentes elementos utilizados. Assim como constatado nos estudos de Meyling et al (2018) e Rivero-Borja et al (2018), quando os controladores químicos são utilizados pelo menos 24 horas antes dos componentes biológicos, tende a ocorrer o efeito sinérgico desejado, aumentando a mortalidade tanto de larvas quanto de indivíduos adultos. Entretanto, se o processo for invertido, o efeito dos fungos (tanto *B. bassiana* quanto *M. anisopliae*) é anulado, impossibilitando a ação em conjunto, mesmo se houver a compatibilidade entre os elementos biológicos e o princípio ativo do produto químico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes de compatibilidade entre as três linhagens de *Beauveria bassiana* e a de *Metarhizium anisopliae* em conjunto com carrapaticidas químicos, mais especificamente a avaliação do crescimento vegetativo radial das colônias, mostraram que há a compatibilidade entre os fungos e quatro dos cinco produtos químicos avaliados. Exceto pela combinação ao Acatak® (que resultou na inibição total do crescimento vegetativo dos fungos, mesmo na concentração mais baixa, 5%) todas as demais linhagens tiveram desempenho satisfatório, mesmo na concentração de 20% dos outros produtos teste.

O estudo de compatibilidade é necessário para que as técnicas alternativas de controle do parasita sejam de fato eficazes em campo, principalmente nas populações que exibem níveis elevados de resistência aos produtos químicos utilizados tradicionalmente no combate a praga.

Futuramente, planeja-se expandir os testes, adicionando testes de produção de esporos e de viabilidade de esporos produzidos, além do aumento na quantidade de produtos testados e na variação, com químicos de diferentes princípios ativos e foco nos que tem mais relatos de resistência. Além disso, testes in vivo estão em discussão, porém apenas depois dos resultados dos testes complementares em laboratório, para que sua aplicabilidade seja mais eficaz e atual, diminuindo as perdas econômicas na pecuária brasileira pelo parasitismo do carrapato.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. C. **Patogenicidade e viabilidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* Var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* Var. *acridium* ao *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae)**. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2005.
- ALONSO-DÍAZ, M.A., RODRÍGUEZ-VIVÁZ, R.I., FRAGOSO-SÁNCHEZ, H., ROSARIO-CRUZ, R. **Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas**. Arch. Med. Vet. 68 (2), 105–113, 2006.
- ALVES, S. B., JÚNIOR, A. M. **Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenius***. Cidade, 1998.
- ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Gado de Corte. Mato Grosso do Sul, 2010.
- ANUALPEC 2016. São Paulo: AgraFNP, 2016. 360 p.
- BAHIENSE, T.C., FERNANDES, E.K.K., BITTENCOURT, V.R.E.P. **Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick**. Vet. Parasitol. 141, 319–324, 2006.
- BAHIENSE, T.C., FERNANDES, E.K.K., BITTENCOURT, V.R.E.P., ANGELO, I.C., PERINOTTO, W. M. S. **Performance of *Metarhizium anisopliae* and Its Combination with Deltamethrin against a Pyrethroid-Resistant Strain of *Boophilus microplus* in a Stall Test**. Animal Biodiversity and Emerging Diseases. 1149, 242-245, 2008.
- CAMARGO, M.G., NOGUEIRA, M.R., MARCIANO, A.F., PERINOTTO, W.M., COUTINHO-RODRIGUES, C.J., SCOTT, F.B., ANGELO, I.C., BITTENCOURT, V.R. ***Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions**. Vet. Parasitol. n223, p28-42, 2016.
- CASTRO-JANER, E., RIFRAN, L., GONZALEZ, P., PIAGGIO, J., GIL, A., SCHUMAKER, T.T.S. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance to Fipronil in Uruguay evaluated by in-vitro bioassays**. Vet. Parasitol. n169, p172-177, 2010.
- COVE, D. J. **The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans***. Biochim Biophys Acta, 113(1): 51-56, 1966.
- DUTRA, V., NAKAZATO, L., BROETTO, L., SCHRANK, S.I., VAINSTEIN, H.M., SCHRANK, A. **Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle**. Res. Microbiol. 155, 245–251, 2004.
- ESTRADA-PEÑA, A., GARCIA, Z., FRAGOSO, S.H. **The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in México**. Appl. Acarol. n38, p307-316, 2006.
- FERNÁNDEZ-SALAS, A., ALONSO-DÍAZ, M.A., ALONSO-MORALES, R.A, LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.C., CERVANTES-CHÁVEZ, J.A. **Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus***. Medical and Veterinary Entomology, 2016.
- FRAZZON, G.A.P., VAZ JR, S.I., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, H.M. **In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus***. Veterinary Parasitology, n94, p117-125, 2000.

- FURLONG J., MARTINS, J.R.S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas.** Centro Nacional de Pesquisa, Gado de Leite, n. 59, p25. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 2000.
- GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R.S., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H.D., LEÓN, A.A.P., PEREIRA, J.B., VILLELA, H.S. **Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil.** Rev. Bras. Parasitol. V.23, 150-156, 2014.
- HIGA, L.O.S., GARCIA, M.V., BARROS, J.C., KOLLER, W.W., ANDREOTTI, R. **Acaricide Resistance Status of the Rhipicephalus microplus in Brazil: A Literature Overview.** Medicinal Chemistry, Vol 5, n7, p326-333, 2015.
- INOKUMA, H., KERLIN, R.L., KEMP, D.H., WILLADSEN, P. **Effects of cattletick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system.** Vet. Parasitol. n47, p107-118.
- JONSSON, N.N. **The productivity effects of cattle tick (*Boophilusmicroplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus*cattle and their crosses.** Vet. Parasitol. 137, 1–10, 2006.
- JONSSON, N.N., BOCK, R.E., JORGENSEN, W.K. **Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia.**Vet. Parasitol. 155, 1–9, 2008.
- KIRKLAND, B.H., CHO, E.M., KEYHANI, O.N. **Differential Susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.** Biologic Control, n31, p414-421, 2004.
- MATIAS, J., SOARES, M.A., GARCIA, M.V., BARROS, J.C., ADREOTTI, R. **Relação entre a comercialização e a eficiência de acaricidas no Estado de Mato Grosso do Sul.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Gado de Corte, Mato Grosso do Sul, n.28, 2011.
- MEYLING, N.V., ARTHUR, S., PEDERSEN, K.E., DHAKAL, S., CEDERGREEN, N., FREDENSBORG, B.L. **Implications of sequence and timing of exposure for synergy between the pyrethroid insecticide alpha-cypermethrin and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.** Pest Management Science, 2018.
- NUÑES, J. L., MUÑOZ-COBENAS, M. E., MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*, la garrapata comum del ganado vacuno.** Buenos Aires, 1982.
- OLIVEIRA, C.N., NEVES, P.M.O.J., KAWAZOE, L.S. **Compatibility Between the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* and Insecticides Used in Coffee Plantations.** Scientia Agricola, v.60, n.4, p.663-667, 2003.
- OLIVEIRA, D.G.P., BARCELLOS, F.G., PINTO, F.G.S., ALVES, L.F.A., HUNGRIA, M. **Genetic variability of the fungus *Beauveria* spp. isolates and virulence to the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae).** Semina: Ciências Agrárias, v.32, n.1, p157-156, 2011.
- POLAR, P., AQUINO DE MURO, M., KAIRO, T.K., MOORE, D., PEGRAM, R., JOHN, S., ROACH-BENN, C. **Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks.** Veterinary Parasitology, n134, p159-167, 2005.
- RECK J., MARKS, F.S., RODRIGUES, R.O., SOUZA, U.A., WEBSTER, A., LEITE, R.C., GONZALES, J.C., KLAFKE, G.M., MARTINS, J.R. **Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk of myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle?** Med. Vet. n113, p59-62, 2014.

- RIVERO-BORJA, M., GUZMÁN-FRANCO, A. W., RODRÍGUEZ-LEYVA, E., SANTILLÁN-ORTEGA, C., PÉREZ-PANDURO, A. **Interaction of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with chlorpyrifos ethyl and spinosad in *Spodoptera frugiperda* larvae.** Pest Management Science, n74, p2047-2052, 2018.
- ROCHA, U. F. **Biologia e controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini).** Jaboticabal: Unesp. Boletim Técnico Unesp 3ed, p35, 1984.
- RODRIGUÉZ-VIVAS, R.I., RODRÍGUEZ-AREVALO, F. **Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico.** Elsevier, 2006.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I., DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, J.L. **Grupos entomológicos de importância veterinária em Yucatán, México.** Rev. Bioméd. n9, p26-37, 1998.
- SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal. **Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal, 2010.** Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em: Abril, 2018.
- WEBSTER, A., RECK, J., SANTI, L., SOUZA, U.A., DALL'AGNOL, B., KLAFKE, G.M., BEYS-DA-SILVA, W.O., MARTINS, J.R., SCHRANK, A. **Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions.** Vet. Parasitol. n207, p3-5, 2015.