

UNIVERSIDADE DE UBERABA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS

GABRIEL HENRIQUE SANTOS SILVEIRA

**DESEMPENHO DO BIOATIVO À BASE DO FUNGO *Purpureocillium lilacinum*
BIC 0119 NO CONTROLE DO *Rhipicephalus microplus*: ENSAIOS *IN VITRO*,
CONDIÇÕES SEMINATURAIS E *IN VIVO***

UBERABA, MG

2025

GABRIEL HENRIQUE SANTOS SILVEIRA

**DESEMPENHO DO BIOATIVO À BASE DO FUNGO *Purpureocillium lilacinum*
BIC 0119 NO CONTROLE DO *Rhipicephalus microplus*: ENSAIOS *IN VITRO*,
CONDIÇÕES SEMINATURAIS E *IN VIVO***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientadora: Prof^a Dr^a Joely F. Figueiredo Bittar

Coorientador: Dr. Daniel Sobreira Rodrigues

UBERABA, MG

2025

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

- S39d Silveira, Gabriel Henrique Santos.
Desempenho do bioativo à base do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 no controle do *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro*, condições seminaturais e *in vivo* / Gabriel Henrique Santos Silveira. – Uberaba, 2025.
63 f. : il., color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.
Orientadora: Profa. Dra. Joely F. Figueiredo Bittar.
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Sobreira Rodrigues.
1. Bovino – Doenças. 2. Carrapatos. 3. Fungos entomopatogênicos. 4. Sistemas de controle biológico. I. Bittar, Joely F. Figueiredo. II. Rodrigues, Daniel Sobreira. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós -Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. IV. Título.
- CDD 636.20896

Tatiane da Silva Viana – Bibliotecária – CRB-6/3171

GABRIEL HENRIQUE SANTOS SILVEIRA

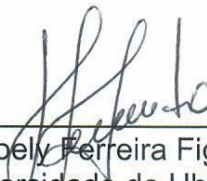
DESEMPENHO DO BIOATIVO À BASE DO FUNGO *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 NO
CONTROLE DO *Rhipicephalus microplus*: ENSAIOS IN VITRO, CONDIÇÕES
SEMINATURAIS E IN VIVO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 27/02/2025

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Ian Martin
Universidade de Uberaba

gov.br

Documento assinado digitalmente

MATIAS PABLO JUAN SZABO

Data: 13/03/2025 07:50:05-0300

Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó
Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi um desafio que só foi possível graças ao apoio e a colaboração de muitas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua conclusão.

Agradeço, primeiramente, à minha mãe, Elaine, por ser o meu alicerce, por me permitir ser quem eu sou hoje, por apoiar minhas decisões e ser meu maior exemplo de pessoa, sua dedicação me levou até aqui. Agradeço à minha família, pelo apoio e incentivo ao longo da minha vida acadêmica e pessoal.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Joely Ferreira Figueiredo Bittar, manifesto minha imensa gratidão pela oportunidade, confiança depositada em mim. Sua orientação, paciência e incentivo foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação e comprometimento serviram não apenas como guia, mas também como uma grande inspiração para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu coorientador, Dr. Daniel Sobreira Rodrigues, expresso meu sincero agradecimento pela paciência, apoio, incentivos, direcionamento e valiosos ensinamentos.

À EPAMIG – Centro-Oeste, Campo Experimental Santa Rita, meu profundo agradecimento pela estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho. Às pesquisadoras Fernanda Gomes e Karina Toledo, minha gratidão pela valiosa ajuda na condução dos experimentos e pela amizade que tornou este percurso mais leve e motivador. À Elizabete Barbosa, meu muito obrigado pelos ensinamentos e pela paciência em cada etapa da pesquisa. Sua disponibilidade para esclarecer dúvidas, auxiliar na execução das atividades e oferecer apoio nos momentos de desabafo foi fundamental para o sucesso deste trabalho. Um agradecimento especial à minha querida “mãe postiça,” Angela Felizardo. Sua generosidade e alegria tornaram minha vida durante aquele período muito mais agradável. Obrigado por tudo: pelas risadas, pelos cafezinhos, pelo acolhimento e pela ajuda imprescindível durante os experimentos. Aos alunos de iniciação científica, Felipe e Talles, registro minha gratidão pela colaboração na condução dos experimentos e pela amizade construída ao longo dessa jornada.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Alcantara, da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas, minha gratidão pelos valiosos ensinamentos, pela cessão do espaço para a esterilização do solo e por todo o auxílio prestado ao longo desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Sanidade e Produção Animal nos Trópicos (F07), meu agradecimento pela paciência, apoio e contribuição indispensável durante a realização dos experimentos.

À Biota Innovations, agradeço pela parceria, pela disponibilidade em ceder o isolado fúngico utilizado neste experimento e pelas análises realizadas, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento FAPEMIG (APQ-03623-22) pelo apoio financeiro e ao Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (CAPES PDPG $\frac{3}{4}$,) Emergencial de Consolidação Estratégica dos Programas de Pós-Graduação stricto sensu pela bolsa concedida

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um dos principais entraves da bovinocultura, impactando negativamente a produção de leite e carne no Brasil. O controle químico com carrapaticidas químicos tem sido a estratégia predominante, entretanto, o uso indiscriminado favorece o surgimento de populações resistentes, agravado pelo desconhecimento da ecologia e epidemiologia do parasito. Diante desse cenário, o desenvolvimento de alternativas biológicas é necessário. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia do bioativo a base do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 sobre os estágios evolutivos de *R. microplus* por meio de bioensaios *in vitro*, em condições seminaturais e *in vivo*. Nos testes *in vitro*, fêmeas ingurgitadas (n=10), ovos (50 mg) e larvas (n=100) foram imersos por 3 minutos em suspensões fúngicas com diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL⁻¹), utilizando-se água destilada estéril como controle. Após a remoção do excesso, as amostras foram incubadas em câmara climática para avaliação da oviposição, eclosão dos ovos, mortalidade das larvas, além do cálculo da eficiência reprodutiva e eficácia do produto. Nos bioensaios em condições seminaturais, vasos contendo *Brachiaria brizantha* foram preparados (12 vasos para o grupo controle e 12 para o grupo tratado). Grupos contendo cinco fêmeas ingurgitadas foram submetidas ao tratamento com a suspensão fúngica na concentração mais eficaz dos testes *in vitro* (10^{10} conídios mL⁻¹) ou com água destilada estéril (grupo controle) por 3 minutos e depositadas no solo de cada vaso. A eficácia do bioativo foi avaliada com base na mortalidade das fêmeas ingurgitadas e na recuperação de larvas nas gramíneas no 41º dia após o tratamento. Para avaliar o desenvolvimento e a persistência do fungo *P. lilacinum* BIC 0119 no solo, amostras foram coletadas nos dias 0, 7, 21 e 41 após o tratamento. Além disso, fêmeas ingurgitadas mortas dos bioensaios *in vitro* e em condições seminaturais foram submetidas a reisolamento fúngico para confirmar a colonização pelo fungo. Nos testes *in vivo*, bovinos foram distribuídos em dois grupos (controle e tratado), cada um com nove animais. O grupo tratado recebeu pulverização com 2,5 L da suspensão fúngica na concentração de 10^{10} conídios mL⁻¹, enquanto o grupo controle recebeu pulverização com água. A eficácia foi monitorada por contagens de fêmeas ingurgitadas (4,5–8 mm) nos dias +2, +4, +6, +9, +11, +13, +16, +18, +20, +23, +25 e +27 após o tratamento. O bioativo demonstrou maior eficácia *in vitro* na concentração de 10^{10} conídios mL⁻¹, resultando em 98% de mortalidade das fêmeas ingurgitadas, 80,69% de inibição na eclosão dos ovos e 100% de mortalidade das larvas de *R. microplus*. Em condições seminaturais, observou-se uma redução significativa ($p<0,05$) de 60% no número de fêmeas ingurgitadas viáveis no grupo tratado e uma redução de 76,01% na recuperação de larvas (n= 2423,75) em relação ao controle (n= 10106,5). O fungo persistiu no solo por até 41 dias e demonstrou capacidade de dispersão nos vasos experimentais. Os reisolamentos fúngicos das cutículas das fêmeas ingurgitadas confirmaram a colonização por *P. lilacinum* BIC 0119. No bioensaio *in vivo*, a eficácia, avaliada pela redução no número de fêmeas ingurgitadas, foi de 55,02%. Os resultados indicam que *P. lilacinum* BIC 0119 é eficaz no controle de larvas, fêmeas ingurgitadas e na redução da eclosão dos ovos de *R. microplus*, apresentando potencial para o controle do carrapato bovino e contribuindo com novas perspectivas para a bovinocultura.

Palavras-chave: Carrapato bovino; fungos entomopatogênicos; controle biológico.

ABSTRACT

The *Rhipicephalus microplus* tick is one of the main obstacles to cattle farming, negatively impacting milk and meat production in Brazil. Chemical control using acaricides has been the predominant strategy; however, indiscriminate use promotes the emergence of resistant populations, a problem exacerbated by the lack of knowledge about the parasite's ecology and epidemiology. Given this scenario, the development of biological alternatives is necessary. Thus, this study aimed to evaluate the efficacy of a bioactive formulation based on the fungus *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 against the developmental stages of *R. microplus* through in vitro bioassays, semi-natural conditions, and in vivo experiments. In the in vitro tests, engorged females ($n=10$), eggs (50 mg), and larvae ($n=100$) were immersed for 3 minutes in fungal suspensions at different concentrations (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10} conidia mL^{-1}), using sterile distilled water as a control. After removing the excess solution, the samples were incubated in a climatic chamber to evaluate oviposition, egg hatching, larval mortality, as well as the reproductive efficiency and efficacy of the product. In the bioassays under semi-natural conditions, pots containing *Brachiaria brizantha* were prepared (12 pots for the control group and 12 for the treated group). Groups of five engorged females were treated with the fungal suspension at the most effective concentration from the in vitro tests (10^{10} conidia mL^{-1}) or with sterile distilled water (control group) for 3 minutes and then placed into the soil of each pot. The bioactive efficacy was assessed based on engorged female mortality and larval recovery from the grasses on the 41st day after treatment. To evaluate the development and persistence of *P. lilacinum* BIC 0119 in the soil, samples were collected on days 0, 7, 21, and 41 post-treatment. Additionally, dead engorged females from the in vitro and semi-natural bioassays underwent fungal reisolation to confirm colonization by the fungus. In the in vivo tests, cattle were divided into two groups (control and treated), each containing nine animals. The treated group received a spray application of 2.5 L of the fungal suspension at a concentration of 10^{10} conidia mL^{-1} , while the control group was sprayed with water. Efficacy was monitored by counting engorged females (4.5–8 mm) on days +2, +4, +6, +9, +11, +13, +16, +18, +20, +23, +25, and +27 after treatment. The bioactive formulation demonstrated the highest efficacy in vitro at a concentration of 10^{10} conidia mL^{-1} , resulting in 98% mortality of engorged females, 80.69% inhibition of egg hatching, and 100% larval mortality of *R. microplus*. Under semi-natural conditions, a significant reduction ($p<0.05$) of 60% in the number of viable engorged females was observed in the treated group, along with a 76.01% reduction in larval recovery ($n=2,423.75$) compared to the control ($n=10,106.5$). The fungus persisted in the soil for up to 41 days and demonstrated the ability to disperse within the experimental pots. Fungal reisolations from the cuticles of engorged females confirmed colonization by *P. lilacinum* BIC 0119. In the in vivo bioassay, efficacy, evaluated by the reduction in the number of engorged females, reached 55.02%. These results indicate that *P. lilacinum* BIC 0119 is effective in controlling larvae, engorged females, and reducing *R. microplus* egg hatching, showing potential for cattle tick control and contributing to new perspectives for cattle farming.

Keywords: cattle tick; entomopathogenic fungi; biological control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> dividido em fase parasitária e fase não parasitária.	19
Figura 2. Características morfológicas do entomopatógeno (A) Colônias esporulantes típicas de <i>Purpureocillium lilacinum</i> , cultura de 7 dias em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e pentabiótico®; (B) Isolado de <i>P. lilacinum</i> observado sob microscopia óptica em aumento de 1000x.....	25
Figura 3. Bioensaio in vitro com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . (A) grupos de fêmeas ingurgitadas; (B) imersão das fêmeas ingurgitadas na suspensão fúngica do bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119; (C) fêmeas ingurgitadas fixadas à placa de Petri após tratamento.....	30
Figura 4. Bioensaio in vitro com ovos de <i>Rhipicephalus microplus</i> . (A) ovos separados em alíquotas de 50 mg, acondicionados em tubos de ensaio; (B) imersão dos ovos na suspensão fúngica do bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119; (C) remoção excesso de suspensão fúngica.	31
Figura 5. Preparação dos vasos para realização de bioensaio em condições seminaturais. (A) três meses antes do início do experimento, preparação dos vasos e plantio de <i>Brachiaria brizantha</i> (Syn. <i>Urochloa brizantha</i>) cv. BRS Piatã; (B) dia do experimento.....	33
Figura 6. Recuperação das larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> no ápice das hastes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Syn. <i>Urochloa bizantha</i>) cv. BRS Piatã após 41 dias do tratamento das fêmeas ingurgitadas com o bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119; A e B: setas, larvas no ápice da gramínea.	34
Figura 7. Teste a campo. (A, B) pulverização dos animais com o bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119, utilizando pulverizador estacionário motorizado; (C) bovino após o tratamento com o bioativo.	36
Figura 8. Reisolamento do fungo <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119. (A) fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> colonizadas com o bioativo à base de <i>P. lilacinum</i> BIC 0119 após o bioensaio in vitro; (B, C) procedimentos para reisolamento do fungo a partir fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i>	37
Figura 9. Viabilidade do bioativo <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 após 24 horas de incubação onde nota-se a presença de conídios (C) e do tubo germinativo (TG).....	39

Figura 10. Fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . (A) fêmeas ingurgitadas grupo controle realizando oviposição; (B) fêmeas ingurgitadas colonizada por <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119, grupo tratado.....	44
Figura 11. Fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> submetidas ao bioensaio in vitro colonizada por <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 (A, B, C, D). Fêmeas ingurgitadas submetidas ao bioensaio em condições seminaturais colonizadas por <i>P. lilacinum</i> BIC 0119 (E, F).....	45
Figura 12. Colônias de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 e colônias de fungos ambientais em meio BDA a partir de amostras de solo. (A) placa contendo colônias de fungos ambientais, D0; (B, C, D) placa contendo colônia características de <i>P. lilacinum</i> BIC 0119 e fungos ambientais, D7, D21 e D41 respectivamente;.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão dos parâmetros reprodutivos e eficácia do tratamento das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> submetidas ao bioensaio in vitro com o bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1}).....	41
Tabela 2. Valores médios e desvios padrão do peso da massa de ovos, eclodibilidade e percentual de redução da eclosão dos ovos de <i>Rhipicephalus microplus</i> após tratamento com bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1}).	42
Tabela 3. Percentual de mortalidade de larvas não alimentadas <i>Rhipicephalus microplus</i> após tratamento com bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conídios mL^{-1}).	43
Tabela 4. Valores médios e desvios padrão, em gramas, do peso de fêmeas ingurgitadas, número de larvas obtidas aos 41 dias após o tratamento proposto, eficácia do bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 no controle do <i>Rhipicephalus microplus</i>	44
Tabela 5. Número absoluto e médio de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> obtidos após o tratamento dos animais com o bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 durante o período experimental.	47
Tabela 6. Eficácias (%) diária do bioativo à base de <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 no controle do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> , em teste in vivo.	48

LISTA DE ABREVIATÖES

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NCBI National Center for Biotechnology Information

TXID Taxonomic Identifier

EPAMIG Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

UNIUBE Universidade de Uberaba

CEEA Comitê de Ética no Uso de Animais

B.O.D. *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio) ou Câmara de Crescimento Climático

B.D.A. Batata Ágar Dextrose

® Marca Registrada (*Registered Trademark*)

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO GERAL.....	16
2.1. OBJETIVO ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	17
3.2. Ciclo biológico.....	17
3.2.1. Fase não parasitária.....	17
3.2.2. Fase parasitária	18
3.3. Importância	19
3.4. Controle do <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
3.5. Controle biológico.....	21
3.5.1. Controle biológico utilizando fungo entomopatogênicos	21
3.6. O fungo <i>Purpureocillium lilacinum</i>	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Localização dos experimentos	27
4.2. Cultivo do fungo <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 para obtenção dos conídios.....	27
4.3. Preparação das suspensões fúngicas	27
4.4. Viabilidade dos conídios	28
4.5. Obtenção das formas evolutivas do <i>Rhipicephalus microplus</i>	28
4.6. Análise da eficácia do bioativo a base do fungo <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 <i>in vitro</i>	29
4.6.1. Bioensaios com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	29
4.6.2. Bioensaios com ovos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	31
4.6.3. Bioensaios com larvas não alimentadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> ...	32
4.7. Análise da eficácia do bioativo <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 em condições seminaturais.....	32
4.7.1. Preparação dos vasos e plantio de <i>Brachiaria brizantha</i>	32
4.7.2. Bioensaio em condições seminaturais	33

4.8. Teste <i>in vivo</i>	35
4.8.1. Animais experimentais	35
4.8.2. Avaliação da eficácia/desempenho do bioativo <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 no controle do carrapato <i>Rhipicephalus microplus in vivo</i>	35
4.9. Reisolamento do <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 a partir de fêmeas ingurgitadas após os bioensaios.....	36
4.10. Isolamento e identificação do <i>Purpureocillium lilacinum</i> BIC 0119 para avaliação da persistência do fungo no solo	38
4.11. Análise estatística	38
5. RESULTADOS.....	39
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

Conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2023, o Brasil possui um rebanho aproximado de 238,6 milhões de bovinos, destinados à produção de carne e leite e detém o maior rebanho comercial do mundo, além de ser o quinto maior produtor de leite e o segundo maior produtor de carne bovina em escala mundial (FAO, 2022).

A produtividade desse setor é crucial para a economia nacional. Contudo, enfrenta perdas econômicas significativas devido às parasitoses, entre elas as causadas pelo *Rhipicephalus microplus*, também conhecido como “carrapato-do-boi”, ectoparasito que afeta a cadeia produtiva de bovinos no Brasil, causando prejuízos na produção de carne, leite e couro, além de representar um risco direto para a saúde animal e gerar despesas consideráveis com o seu controle (Rodrigues; Leite, 2013; Grisi *et al.*, 2014; Calvano *et al.*, 2019).

Além de impactar sistemicamente o hospedeiro durante o parasitismo, esse parasito desempenha um papel crucial como vetor de doenças, sendo responsável pela transmissão da Tristeza Parasitária Bovina, causada pela Rickettsia *Anaplasma marginale*, e pelos protozoários intraeritrocitários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (Labruna; Machado, 2006; Garcia *et al.*, 2019).

Durante anos, têm sido realizados esforços para reduzir os impactos causados pelo *R. microplus*. O controle deste carrapato é um desafio constante na bovinocultura, demandando uma abordagem multifacetada (Jonsson; Piper; Constantinoiu, 2014; Rodríguez-Vivas; Jonsson; Bhushan, 2018). Tradicionalmente, o controle químico com carrapaticidas tem sido a principal estratégia adotada (Higa *et al.*, 2016). No entanto, a utilização de forma incorreta e indiscriminada desses produtos contribuiu para o surgimento de populações de carrapatos resistentes a estes produtos (Higa *et al.*, 2016; Valsoni *et al.*, 2021).

Devido aos desafios enfrentados pelos métodos químicos, estudos que visem a utilização de práticas alternativas de controle têm se tornado comuns, destacando-se o controle biológico por meio da utilização de fungos entomopatogênicos (Alves, 1998; Samish; Ginsberg; Glazer, 2004). Diversos fungos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* têm sido utilizados para o controle do *Rhipicephalus microplus* (Chandler *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2010; Angelo *et al.*, 2012; Camargo *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2020). Em um estudo conduzido por Nogueira *et al.* (2020), foram

avaliados dois produtos à base de *M. anisopliae* em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. A formulação oleosa foi altamente eficaz, resultando em 100% de mortalidade larval e uma redução de 61% na eclodibilidade dos ovos. Por sua vez, Campos *et al.* (2010) observaram que cepas de *B. bassiana* provocaram até 50% de mortalidade dos carrapatos em laboratório e até 32% em condições de campo.

Entre a diversidade de fungos com potencial para o controle de carrapatos, destaca-se *Purpureocillium lilacinum*, espécie pertencente ao filo Ascomycota e que ocorre naturalmente no solo e nas rizosferas de diversas culturas agrícolas, sendo frequentemente isolado de solos, vegetação em decomposição, insetos e nematoides (Luangsard *et al.*, 2011; Ângelo *et al.*, 2012; Goffré; Folgarait, 2015; Khan; Tanaka, 2023).

P. lilacinum apresenta notável adaptabilidade ambiental, com capacidade de desenvolvimento em ampla faixa de temperaturas e pH (Samson, 1974; Banu; Iyer; Gunasekaran, 2006). Tem sido extensivamente estudado como agente de biocontrole, especialmente contra nematoides fitoparasitas, como o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*) (Khan; Tanaka, 2023). Além disso, há registros de sua eficácia no controle de diversos insetos-praga, como formigas-cortadeiras (*Acromyrmex lundii*) e pulgões (*Myzus cerasi*) (Goffré; Folgarait, 2015; Kepenekci *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* demonstraram que *P. lilacinum* é eficaz contra diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (Ângelo *et al.*, 2012; Fernández-Salas *et al.*, 2019). Com base nesses resultados, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia do isolado *P. lilacinum* BIC 0119 no controle do carrapato *R. microplus*, por meio de ensaios *in vitro*, em condições seminaturais e *in vivo*.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do bioativo a base do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, *in vitro*, a ação do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 sobre os ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas (teleóginas) do *R. microplus*;
- Observar o crescimento/desenvolvimento fúngico *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 sobre teleóginas em teste *in vitro*;
- Avaliar a interferência do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 sobre a ovipostura da teleógina;
- Avaliar a ação do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 sobre as teleóginas em teste sob condições seminaturais;
- Isolar e identificar *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 no solo para avaliação da sua persistência ambiental;
- Avaliar a ação do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 sobre as teleóginas em animais naturalmente infestados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura aborda o carrapato *R. microplus*, seu ciclo biológico, impacto econômico, métodos tradicionais de controle, alternativas biológicas e, em especial, o potencial do fungo *P. lilacinum* BIC 0119 como agente de biocontrole.

3.1 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

Segundo a classificação do *National Center for Biotechnology Information* – *NCBI* (txid6941), o *R. microplus* é um organismo pertencente ao Super reino Eukariota, Reino Metazoa, Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae, Gênero *Rhipicephalus*, Subgênero *Boophilus*, Espécie *R. microplus*.

Originário da Ásia, *R. microplus* foi disseminado em grande parte dos países tropicais e subtropicais por meio da importação de gados dessa região. Sua ocorrência tem sido registrada em rebanhos bovinos de várias regiões, incluindo América Central e do Sul, África, Ásia e Oceania (Pereira; Labruna, 2008). Fatores como as condições climáticas e disponibilidade de raças europeias de bovinos, favoreceram a dispersão de *R. microplus* por todo o território brasileiro (Garcia *et al.*, 2019; Perez-Martinez *et al.*, 2023).

3.2 Ciclo biológico

O *R. microplus* é um parasito monoxênico, completando todo o seu ciclo de vida em um único hospedeiro, preferencialmente bovinos (*Bos taurus*) (Garcia *et al.*, 2019). Contudo, em ambientes com alta carga parasitária, pode ocasionalmente infestar outros animais que coexistem no mesmo ambiente (Pereira *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2016). O ciclo de vida desse ectoparasito é dividido em duas fases distintas: a parasitária e não parasitária, que se intercalam entre o hospedeiro e o ambiente (Figura 1).

3.2.1 Fase não parasitária

A Fase não parasitária ocorre no solo, e tem início com o desprendimento da fêmea ingurgitada do hospedeiro. Após a queda, a fêmea busca locais úmidos e protegidos do sol para iniciar a postura dos ovos, evitando sua dessecação (Beys-da-Silva *et al.*, 2020). O período entre o desprendimento e a eclosão dos ovos varia

conforme as condições climáticas (Pereira *et al.*, 2008). Em situações ideais, temperaturas em torno de 27°C e umidade relativa de 80–85% são favoráveis para o início da postura, após um período de pré-postura de 3 a 5 dias (Andreotti *et al.*, 2019). Cada fêmea pode depositar entre 2 e 4 mil ovos, com taxas de eclosão de 85% a 95% (Guglielmone *et al.*, 2006). O período de oviposição dura, em média 15 a 17 dias (Brovini *et al.*, 2003). Após o período de incubação, que corresponde ao período entre o início da oviposição e a eclosão dos primeiros ovos. Este período varia com a estação do ano, durando aproximadamente 30 dias no verão e 70 dias no inverno (Brovini *et al.*, 2003). Assim que eclodem, as larvas deslocam-se para o ápice gramíneas, enquanto aguardam um hospedeiro (Pereira *et al.*, 2008; Guglielmone *et al.*, 2006).

3.2.2 Fase parasitária

A fase parasitária tem início quando as larvas se fixam ao hospedeiro e termina com o desprendimento da fêmea ingurgitada. Durante esse período, ocorre uma sequência de transformações nos estágios de desenvolvimento do carrapato: as larvas evoluem para ninfas, as ninfas transformam-se em adultos, e as fêmeas adultas passam pelo processo de ingurgitamento (Guglielmone *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Beys-da-Silva *et al.*, 2019). Assim que se fixam ao hospedeiro, as larvas iniciam a alimentação. Após um período de 4 a 7, as larvas realizam a primeira ecdise, transformando-se em ninfas, caracterizadas pela presença de quatro pares de patas, mas ainda sem maturidade reprodutiva. Essa fase dura aproximadamente 7 a 9 dias. Durante os 13 dias subsequentes, as ninfas continuam a se alimentar até realizarem uma nova ecdise, dando origem à fase de metaninfa, na qual ocorre a diferenciação sexual, resultando em machos e fêmeas adultos. Em um intervalo de 14 a 16 dias, os adultos copulam, permitindo que as fêmeas fecundadas iniciem um intenso processo de alimentação, culminando no ingurgitamento. No 18º dia, algumas fêmeas ingurgitadas começam a se desprender do hospedeiro, embora a maior parte se solte no 21º dia (Hitchcock, 1955; Furlong, 2005; Pereira *et al.*, 2008; Andreotti *et al.*, 2019). Os machos podem permanecer no hospedeiro por até 70 dias após a infestação, à procura de outras fêmeas para cópula (Hitchcock, 1955). Após o desprendimento das fêmeas ingurgitadas inicia-se novamente a fase de vida não parasitária.

Figura 1. Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus* dividido em fase parasitária e fase não parasitária.



Fonte: Fotografias de estágios evolutivos cedidas por Daniel Sobreira Rodrigues; figura elaborada pelo autor (2024).

3.3 Importância

Tendo o bovino como seu principal hospedeiro, o *R. microplus*, destaca-se como o carrapato de maior importância na pecuária, acarretando significativas perdas econômicas. Conforme apontado por Grisi *et al.* (2014), estima-se que as doenças parasitárias causem prejuízos de aproximadamente US\$14 bilhões na pecuária brasileira, com cerca de US\$3,24 bilhões atribuídos especificamente ao *R. microplus*. Infestações elevadas podem resultar em perda de peso, redução na produção de leite e carne, além de depreciação do couro (Rodrigues; Leite, 2013; Calvano *et al.*, 2019). Além disso, *R. microplus* é o responsável pela transmissão de patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, que são os principais patógenos do complexo de doenças causadoras da Tristeza Parasitária Bovina, doenças que induzem extrema emaciação no gado, culminando muitas vezes em morte (Labruna; Machado, 2006; Garcia *et al.*, 2019). Em escala global, estima-se que

carrapatos e as doenças por eles transmitidas acarretem prejuízos econômicos anuais entre US\$22 e US\$30 bilhões (Lew-Tabor; Rodriguez Valle, 2016).

3.4 Controle do *Rhipicephalus microplus*

O controle do carrapato *R. microplus* é um desafio constante na pecuária nacional, demandando de uma abordagem multifacetada. Tradicionalmente, o controle químico com carrapaticidas tem sido a principal estratégia adotada. Entre as bases acaricidas mais utilizadas, encontram-se os organofosforados, piretroides, amidínicos, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis e o difluorobenzoilureia, aplicados sob formas de pulverização, *pour-on* e injetáveis (Higa *et al.*, 2019).

No entanto, essa abordagem enfrenta diversas desvantagens, incluindo o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes aos carrapaticidas, devido à falta de conhecimento da ecologia e epidemiologia do parasito associado ao uso inadequado desses produtos (Higa *et al.*, 2016; Valsoni *et al.*, 2021).

Estudos realizados em diversas regiões brasileiras documentaram níveis alarmantes de resistência, como múltipla resistência a cipermetrina, clorpirifós, amitraz e ivermectina na Paraíba (Vilela *et al.*, 2020); no Amazonas à cipermetrina e deltametrina (Souza *et al.*, 2022); em Mato Grosso do Sul, ao fluazuron, ivermectina e fipronil (Valsoni *et al.*, 2021); no Sudeste do Brasil, foi descrita resistência em São Paulo, aos piretróides sintéticos e organofosforados (Mendes; Pereira; Prado, 2007; Mendes *et al.*, 2011; Higa *et al.*, 2016). Resistência aos piretróides foi descrita em Minas Gerais e aos organofosforados no Espírito Santo (Higa *et al.*, 2016).

Diante dessas limitações, há uma crescente demanda por métodos alternativos de controle de carrapatos. Dentre as alternativas destacam-se: seleção de animais geneticamente resistentes, manejo de rebanhos, rotação de pastagens, controle imunológico por meio de vacinas e o controle biológico (Jonsson; Piper; Constantinoiu, 2014; Rodríguez-Vivas; Jonsson; Bhushan, 2018).

Para realização de um controle estratégico efetivo do *R. microplus*, deve-se compreender o ciclo de vida do carrapato e suas interações com as variações das condições ambientais, para determinar os momentos de maior vulnerabilidade da população de carrapato (Andreotti; Garcia; Koller, 2019). Assim, estudos que visem à utilização de práticas alternativas de controle têm se tornado comuns em função dos problemas relacionados aos métodos químicos tradicionais.

3.5 Controle biológico

O conceito de “Controle Biológico” foi empregado pela primeira vez por Harry Scott Smith em 1919, para designar o uso de organismos vivos no controle de insetos praga (Berti Filho; Macedo, 2011). De acordo com De Bach (1964), o controle biológico pode ser definido como “a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências”. Assim, todas as espécies de plantas e animais possuem inimigos naturais atacando seus vários estágios de vidas, conforme destacado por Parra *et al.*, (2002). Esses inimigos naturais abrangem uma ampla variedade de grupos, incluindo insetos, vírus, fungos, bactérias, nematoides, protozoários, rickettsias, micoplasmas, ácaros, aranhas, aves e mamíferos (Parra *et al.*, 2002).

Desde o início do século XX, pesquisadores têm documentado inúmeros agentes de controle biológico do *R. microplus*, incluindo, parasitoides como formigas, dípteros e nematódeos entomopatogênicos (Chagas; Furlong; Nascimento, 2002; Miranda-Miranda *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2010; Monteiro; Prata, 2015).

Diversas espécies de aves, incluindo a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), já foram relacionadas como predadoras de carrapatos (Samish; Ginsberg; Glazer, 2004), assim como bactérias, vírus e fungos (Samish; Ginsberg; Glazer, 2004; Fernández-Ruvalcaba *et al.*, 2010; Bernardo *et al.*, 2018). Entre os agentes patogênicos utilizados no manejo biológico de carrapatos, os fungos se destacam devido à sua eficácia e versatilidade.

3.5.1 Controle biológico utilizando fungo entomopatogênicos

Salientando a importância desse controle, Alves (1998) destaca o controle microbiano como a principal meta da patologia de insetos, representando um ramo do controle biológico que consiste na utilização racional de patógenos e manutenção adequada da população de pragas.

Os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano foram os fungos (Davidson, 2012). Esses organismos possuem uma ampla variabilidade genética e a capacidade de atuar em diversos estágios evolutivos de seus hospedeiros, conferindo-lhes a qualidade de agentes eficientes para o controle de pragas (Samish; Ginsberg; Glazer, 2004). Além de sua ação patogênica, a utilização desses organismos traz muitos benefícios ambientais, pois são endófitos de plantas,

antagonistas de doenças vegetais, colonizadores da rizosfera e promotores do crescimento das plantas (Vega *et al.*, 2009; Lacey *et al.*, 2015). Ademais, sua utilização auxilia na redução do uso de agrotóxicos, redução dos resíduos químicos nos alimentos e meio ambiente, segurança ao homem e outros organismos (Alves, 1998). No entanto, os fungos apresentam algumas desvantagens como, a ação lenta sobre seu hospedeiro e o potencial impacto em artrópodes não alvo (Ginsberg *et al.*, 2002).

A variabilidade dos fatores ambientais, como temperatura, umidade relativa e radiação ultravioleta, pode afetar o crescimento vegetativo, a produção de conídios e a germinação fúngica, interferindo na capacidade invasiva no artrópode alvo e consequentemente em sua virulência (Braga *et al.*, 2001; Mascarin; Pauli, 2010). A produção em massa pode ser onerosa, e a vida útil limitada de alguns produtos os tornando ainda mais caros (Samish; Ginsberg; Glazer, 2004). Contudo, muitas dessas restrições podem ser superadas por meio da seleção e recombinação genética de organismos mais tolerantes aos efeitos abióticos e mais virulentos (Mascarin; Jaronski, 2016), bem como por meio de formulações avançadas contendo óleos, umectantes, protetores de radiação ultravioleta e nutrientes para estimular a germinação e crescimento fúngico (Mascarin; Pauli, 2010).

Os fungos que apresentam patogenicidade para carrapatos provavelmente constituem um subgrupo funcional dentro do grupo de fungos patogênicos para insetos, compartilhando associações filogenéticas, mas com uma gama mais restrita de hospedeiros (Chandler *et al.*, 2000). São conhecidas aproximadamente 1.000 espécies de fungos em 56 gêneros, capazes de serem patogênicas para artrópodes (Hajek; St. Leger, 1994; Chandler *et al.*, 2000; St. Leger; Wang, 2010).

Dentre as espécies mais importantes que infectam os carrapatos na natureza estão *Beauveria bassiana* s. l., *B. brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* s.l., *Isaria fumosorosea* e *Lecanicillium lecanii* (Chandler *et al.*, 2000; Faria; Wraight, 2007; Mascarin *et al.*, 2019). No Brasil, *M. anisopliae* é o fungo mais utilizado como ingrediente ativo em biopesticidas, representando 24% dos produtos registrados, seguido por *B. bassiana*, que está presente em 13% dos produtos, e por *Trichoderma harzianum*, com 4% (Mascarin *et al.*, 2019).

Numerosos estudos têm documentado a eficácia dos fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos, tanto em laboratório quanto em condições de campo (Angelo *et al.* 2010; Angel-Sahagún *et al.* 2010; Camargo *et al.*

2012; Samish *et al.* 2014). Os ascomicetos *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* s.l. são historicamente as espécies mais caracterizadas e utilizadas no controle de carrapato (Chandler *et al.*, 2000; Faria; Wraight, 2007; Schrank; Vainstein, 2010; Mesquita *et al.*, 2023).

Nogueira *et al.*, (2020) avaliaram a eficácia de dois produtos à base de *M. anisopliae in vitro*, Metarril® SP Organic (conídios secos) e Metarril® SC Organic (conídios concentrados em óleo vegetal), nos ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. A formulação de conídios secos apresentou baixa eficácia. Em contraste, o produto com formulação oleosa demonstrou melhores resultados, alcançando 100% de mortalidade larval, redução nos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas e redução da a eclodibilidade em até 61%.

Em testes *in vivo* realizados em bovinos estabulados infestados com *R. microplus*, Camargo *et al.*, (2014) avaliaram o efeito do produto Metarril®, cujo ingrediente ativo são esporos do fungo *M. anisopliae*, e demonstraram sua eficácia na redução no número de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, com uma eficácia média de 47,74%. Já Kaaya *et al.*, (2011) observaram redução de 83% no número de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus evertsi evertsi* e *Rhipicephalus decoloratus* após tratamentos de bovinos com suspensão fúngica de *M. anisopliae*.

Campos *et al.*, (2010) investigaram a patogenicidade de cepas do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e cepas endofíticas de *Beauveria* sp. contra o carrapato bovino *R. microplus*, tanto em bioensaios *in vitro* (10^5 , 10^7 e 10^9 conídios mL⁻¹) quanto em condições de campo (10^6 conídios mL⁻¹). Os resultados indicaram que, em laboratório, a inoculação com 10^7 conídios/mL de *Beauveria* sp. resultou em uma mortalidade de 20 a 50% dos carrapatos após sete dias. Em condições de campo, a aplicação de 10^6 conídios mL⁻¹ induziu uma mortalidade de 18-32%.

O processo de infecção de um fungo entomopatogênico sobre o hospedeiro ocorre por contato, após a ligação do esporo com a cutícula do hospedeiro, realizada por meio de processos químicos (digestão enzimática) e físicos (pressão mecânica) (Schrank; Vainstein, 2010). Este inicia-se com o reconhecimento do hospedeiro suscetível pelos conídios, seguido da adesão e germinação destes na superfície do hospedeiro. Em seguida, ocorre o desenvolvimento de estruturas específicas, como o tubo germinativo e o apressório, seguido da penetração através da cutícula do hospedeiro, crescimento fúngico intenso e morte do hospedeiro (Beys-da-Silva *et al.*,

2020). O processo de germinação e infecção bem-sucedido é influenciado por diversos fatores, incluindo a suscetibilidade do hospedeiro, seu estágio de desenvolvimento, além de condições ambientais como temperatura e umidade, e também pela virulência do isolado fúngico (Zimmermann, 2007).

3.6 O fungo *Purpureocillium lilacinum*

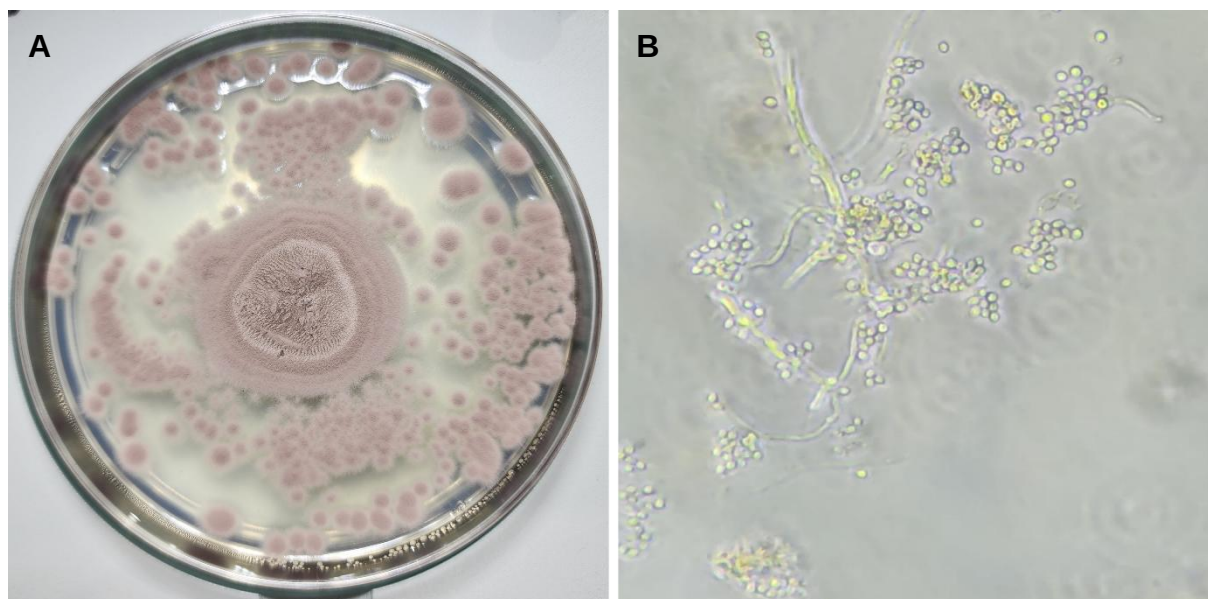
Purpureocillium lilacinum, outrora conhecido como *Paecilomyces lilacinus*, é uma espécie de fungo filamentoso, altamente adaptável, de distribuição cosmopolita, comumente isolado de solo, vegetação em decomposição, insetos e nematoides (Luangsard *et al.* 2011; Angelo *et al.* 2012; Goffré; Folgarait, 2015; Khan; Tanaka, 2023). De acordo com o *National Center for Biotechnology Information – NCBI* (txid33203), o *P. lilacinum* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales e família Ophiocordycipitaceae. Originalmente denominada como *Penicillium lilacinum* por Thom em 1910, foi posteriormente reclassificada como *Paecilomyces lilacinus* por Samson em 1974. No entanto, em 2011, Luangsa-Ard *et al.*, ao compararem as sequências do gene 18S rRNA, espaçador interno transcrito (ITS) e fator de alongação da tradução 1-a parcial (TEF) com o *P. lilacinus*, propuseram que o fungo fosse reclassificado no gênero *Purpureocillium* dentro da família Ophiocordycipitaceae.

Em condições de cultura, o crescimento ideal ocorre em temperaturas entre 26 e 30 °C, e com capacidade de desenvolvimento em uma ampla faixa de pH e diversos substratos (Samson, 1974; Banu; Iyer; Gunasekaran, 2006). As colônias atingem um diâmetro de 5 a 7 cm em aproximadamente de 14 dias a 25° C, formando uma camada basal, na qual se forma um micélio aéreo flocoso, que inicialmente apresenta uma coloração esbranquiçada, mas em decorrência da esporulação, adquire uma tonalidade que varia de rosa a lilás na porção superior da colônia (Samson, 1974). O reverso da colônia pode se apresentar incolor ou em tons similares ao dos esporos (Figura 2).

As hifas vegetativas possuem paredes lisas, hialinas e com 2,5 a 4,0 µm de largura. Os conidióforos originados de hifas submersas, possuem 400 a 600 µm de comprimento, ou surgindo das hifas aéreas apresentam metade deste comprimento (Samson, 1974; Luangsard *et al.* 2011). As células conidiogênicas fialídicas exibem um segmento basal dilatado, que afunila em um pescoço delgado. Os conídios se

dispõem em cadeias divergentes, podem ser elipsoidais a fusiformes, com paredes que variam de lisas a levemente rugosas (Samson, 1974; Luangsard *et al.* 2011).

Figura 2. Características morfológicas do entomopatógeno (A) Colônias esporulantes típicas de *Purpureocillium lilacinum*, cultura de 7 dias em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e pentabiótico®; (B) Isolado de *P. lilacinum* observado sob microscopia óptica em aumento de 1000x.



Fonte: Biota Innovations (2024).

P. lilacinum destaca-se como uma das espécies mais investigadas de seu gênero devido ao seu potencial de controle biológico. Khan e Tanaka (2023), avaliaram a eficácia do *P. lilacinum* no controle do nematoide *Meloidogyne incognita* em condições *in vitro* e seminaturais. Os resultados demonstraram que o fungo reduziu significativamente a população de nematóides, as taxas de eclosão de ovos e a sobrevivência dos nematóides. Além disso, a aplicação de *P. lilacinum* resultou em aumentos significativos no crescimento e na biomassa das plantas, indicando seu potencial como promotor de crescimento e nematicida biológico.

Além do potencial nematicida, o *P. lilacinum* tem se mostrado eficiente no controle de insetos-praga. Goffré e Folgarait (2015), investigaram o potencial de controle biológico do *P. lilacinum* no controle da formiga *Acromyrmex lundii* em condições *in vitro*. A sobrevivência das formigas tratadas foi significativamente menor, com uma taxa de mortalidade de 85,6%, e a transmissão do fungo para formigas não inoculadas foi evidenciada, com uma taxa de mortalidade de 58,5%. Kepenekci *et al.*, (2015) estudaram os efeitos *in vitro* do fungo *P. lilacinum* sobre os adultos do pulgão

Myzus cerasi. Os resultados demonstraram que o fungo ocasionou 83,64% de mortalidade após 8 dias. Esses estudos destacam o potencial do *P. lilacinum* como agente de controle biológico, capaz de atuar contra uma variedade de pragas.

No controle de carrapatos o *P. lilacinum* revela-se como uma promissora alternativa. D'Alessandro, Humber e Luz, (2012) identificaram o *P. lilacinum* infectando fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* coletadas de cavalos e em amostras de solos típicos de pastagem no Brasil, e avaliaram sua patogenicidade *in vitro* sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* e *A. cajennense*. O fungo demonstrou eficácia de 100% no controle de *R. sanguineus* e 66,6% no controle de *A. cajennense*.

Angelo *et al.*, (2012) avaliaram a eficácia *in vitro* do *P. lilacinum* contra diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus*. Os resultados indicaram que o fungo causou alteração nos parâmetros biológicos do *R. microplus*, e moderada mortalidade larval (3,0 a 67,5%). No entanto, observou-se um baixo potencial de controle sobre fêmeas ingurgitadas e na redução da taxa de eclosão dos ovos (0 a 13,50%).

Fernández-Salas *et al.*, (2019) avaliaram o efeito acaricida do *P. lilacinum* contra larvas de duas populações de *R. microplus* (multirresistente e suscetível a acaricidas químicos). O fungo demonstrou alta mortalidade nas larvas de ambas as populações, sugerindo que pode ser um adjuvante promissor no controle de *R. microplus*, incluindo as populações resistentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização dos experimentos

O produto biológico utilizado neste estudo, contendo conídios de *P. lilacinum* BIC 0119, foi cedido pela empresa Biota Innovations, localizada em Uberaba, Minas Gerais. Os bioensaios *in vitro* e em condições seminaturais foram realizados no Laboratório de Parasitologia Veterinária da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig – Centro-Oeste), situado no Campo Experimental Santa Rita (CESR), em Prudente de Moraes-MG e no Laboratório de Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba-MG. O experimento *in vivo*, foi conduzido no Campo Experimental Risoleta Neves da Epamig, localizado no município de São João del Rei-MG.

A obtenção e a manutenção das colônias de *R. microplus* para os bioensaios *in vitro* e em condições seminaturais, bem como a realização dos experimentos com os bovinos (ensaio *in vivo*) foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UNIUBE, sob o protocolo nº 013/2023 (Anexo A).

4.2 Cultivo do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 para obtenção dos conídios

A produção massal dos conídios de *P. lilacinum* BIC 0119 para utilização nos bioensaios foi realizada por cultivo em substrato sólido (arroz parboilizado). Inicialmente, 200g de arroz parboilizado foram acondicionados em sacos plásticos e autoclavados durante 1 hora a 121°C. Após o resfriamento do arroz adicionou-se 20mL de suspensão de conídios de *P. lilacinum* BIC 0119 obtida pela mistura do fungo previamente crescido em meio Batata Dextrose Ágar (pré-inóculo) e água esterilizada em cada saco de arroz. A mistura do arroz com a suspensão foi mantida em estufa B.O.D, por 14 dias a 28°C para esporulação (Vilas Boas *et al.*, 1996). Após o crescimento, o arroz foi seco em sala de secagem por 36 horas a 20°C e a separação dos conídios foi realizada de forma mecânica em extrator de esporos desenvolvido pela empresa Biota Innovations obtendo-se assim o pó de esporos que foi utilizado como ingrediente ativo nos bioensaios.

4.3 Preparação das suspensões fúngicas

Inicialmente, foi pesada uma alíquota de 1 g de conídios liofilizados e adicionada em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 99 mL de água destilada estéril com Tween 80 a 0,1%, alcançando uma diluição inicial de 10^{-2} . A suspensão foi submetida à agitação orbital a 120 rpm por 60 minutos e, posteriormente, tratada em banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida, 1 mL da suspensão foi transferido para um tubo contendo 9 mL de diluente para obter a diluição 10^{-4} , sendo as diluições subsequentes realizadas conforme necessário, utilizando ponteiras esterilizadas. A suspensão foi quantificada em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para 10^{10} conídios mL^{-1} . A partir dessa concentração inicial, foram preparadas diluições seriadas para obtenção de concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1} , utilizando 1 mL da suspensão mais concentrada, acrescida de 9 mL de água destilada estéril com Tween 80 a 0,1%, conforme descrito por Alves (1998).

4.4 Viabilidade dos conídios

A viabilidade (percentual de conídios viáveis, germinados e ativos) foi realizada para todas as suspensões conidiais nas diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1}). Para isso, uma alíquota de 100 μL de cada concentração foi transferida para placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) suplementado com antibiótico (Pentabiótico®). As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C em umidade relativa $\geq 80\%$. Após 24 horas, a leitura foi realizada por meio de visualização direta ao microscópio óptico (40x e 100x) onde se considerou conídios viáveis a presença de tubo germinativo. O cálculo da viabilidade foi realizado conforme a metodologia descrita por Pinto, Lucon e Bettioli (2019).

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Média do número de conídios viáveis}}{\text{Total de conídios}} \times 100$$

4.5 Obtenção das formas evolutivas do *Rhipicephalus microplus*

A colônia de *R. microplus* utilizada originou-se de uma cepa do Campo Experimental Santa Rita e foi mantida no Laboratório de Parasitologia Veterinária do CESR, na EPAMIG Centro-Oeste.

Para a obtenção das teleóginas destinadas aos ensaios *in vitro* e em condições seminaturais, dois bezerros da raça Girolando, sem contato prévio com carrapaticidas

por um período mínimo de 20 dias, foram submetidos à infestação com larvas provenientes de 500mg de ovos.

Após a infestação, os animais foram alojados em gaiolas e após 21 dias, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas da tela acoplada abaixo da gaiola e levadas ao Laboratório de Microbiologia para assepsia da cutícula, sendo então, submetidas à imersão com solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos, e posteriormente, secas em papel toalha e pesadas para realização dos biocarrapaticidogramas. Uma porção das fêmeas ingurgitadas foi submetida ao procedimento proposto, enquanto o restante foi mantido em placas de Petri em câmara incubadora sob temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa $\geq 80\%$ para obtenção de ovos e larvas.

4.6 Análise da eficácia do bioativo a base do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 *in vitro*

A análise da eficácia do fungo, *in vitro*, foi realizada frente às diferentes fases evolutivas do *R. microplus* (teleóginas, ovos e larvas) sendo cada teste composto por grupo controle (solução de água destilada estéril) e grupo tratado (diferentes concentrações do fungo *P. lilacinum* BIC 0119, 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1}). Cada tratamento foi constituído por três repetições e composto por 10 fêmeas ingurgitadas.

Inicialmente, os bioensaios *in vitro* foram realizados utilizando concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios mL^{-1} . Após a análise dos resultados, decidiu-se conduzir um novo experimento empregando a concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} .

Os bioensaios com ovos e larvas seguiram a metodologia utilizada por Angelo *et al.*, (2010), e os bioensaios com fêmeas ingurgitadas seguiram a metodologia utilizada por Drummond *et al.*, (1973), com modificações.

4.6.1 Bioensaios com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Cada grupo de fêmeas ingurgitadas ($n=10$) dos grupos tratados foram submersas em 10 mL da suspensão fúngica em diferentes concentrações por cinco minutos. As teleóginas do grupo controle receberam o tratamento de 10 mL de água destilada estéril. Após os tratamentos, as teleóginas foram secas em papel toalha e fixadas em decúbito dorsal, em placas de Petri, com auxílio de fita dupla face (Figura 3) e mantidas em câmara climática sob temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa

≥80%. Para avaliação dos efeitos do fungo sobre as fêmeas ingurgitadas, foram observados os seguintes parâmetros:

Peso inicial das fêmeas: valor obtido pela pesagem do grupo de dez fêmeas ingurgitadas antes do tratamento.

Peso da massa de ovos: valor referente ao peso da postura total de cada grupo de fêmea tratada.

Percentual de eclosão dos ovos: valor obtido pela da observação visual e estimativa da quantidade de larvas eclodidas em relação ao total de ovos.

Índice de produção de ovos (Bennett, 1974), determinada pela equação:

$$IPO = \frac{\text{Peso da massa de ovos (g)}}{\text{Peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times 100$$

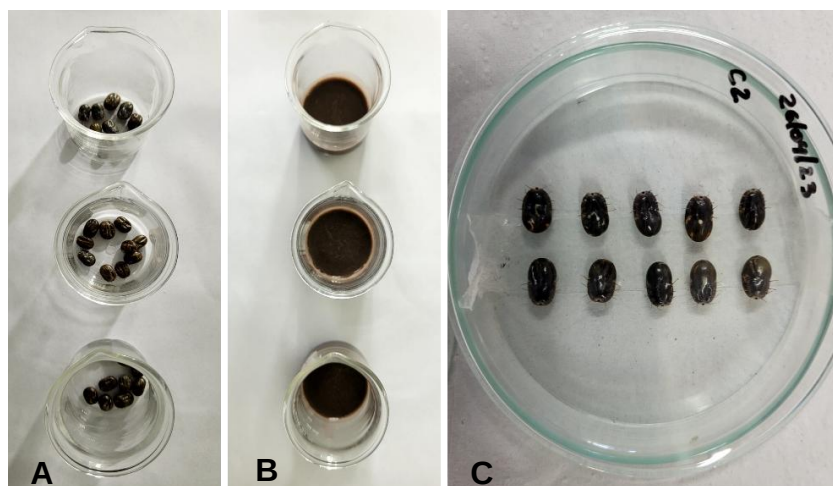
Eficiência reprodutiva (Drummond et al., 1973), determinada pela equação:

$$ER = \frac{\text{Peso da massa de ovos (g)}}{\text{Peso da massa de fêmeas (g)}} \times \% \text{ eclosão} \times 20.000$$

Eficiência do produto (Drummond et al., 1973), determinada pela equação:

$$EP = \frac{ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado}}{ER \text{ do grupo controle}} \times 100$$

Figura 3. Bioensaio in vitro com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. (A) grupos de fêmeas ingurgitadas; (B) imersão das fêmeas ingurgitadas na suspensão fúngica do bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119; (C) fêmeas ingurgitadas fixadas à placa de Petri após tratamento.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

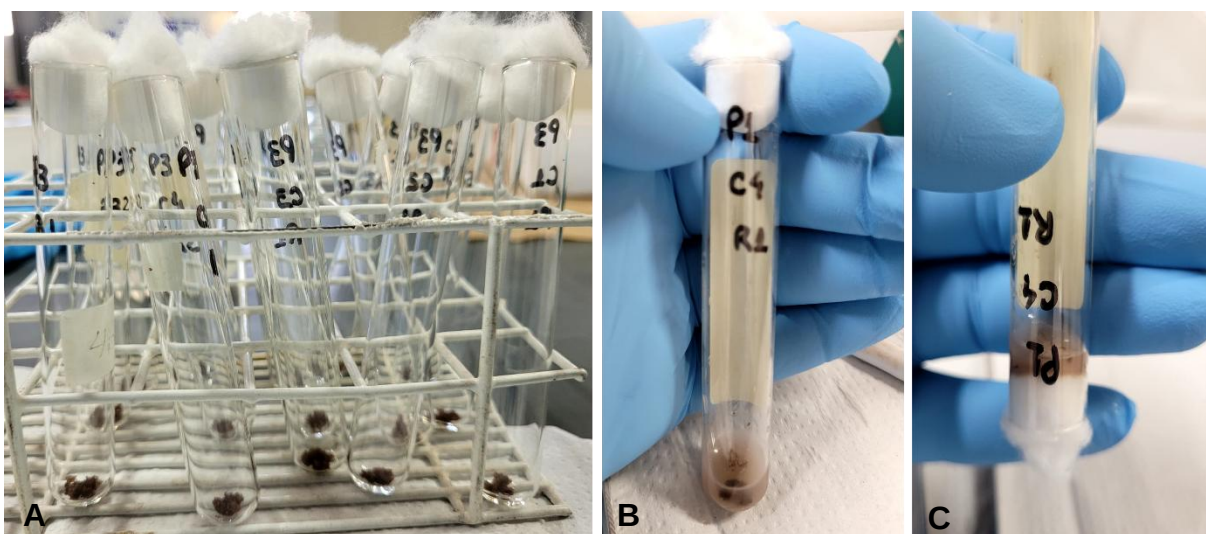
4.6.2 Bioensaios com ovos de *Rhipicephalus microplus*

As teleóginas destinadas à produção de ovos tiveram sua postura separada no décimo dia. Os ovos foram separados em alíquotas de 50 mg (aproximadamente 1000 larvas) e acondicionados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo. Em cada tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de cada concentração conidial (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1}), enquanto o grupo controle recebeu 1 mL de água destilada estéril. Os ovos foram submersos na suspensão fúngica por três minutos, e o excesso da suspensão foi removido pela inversão do tubo de ensaio para que fosse absorvido pelo algodão (Figura 4). Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara climatizada sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e a umidade relativa $\geq 80\%$. A eclosão dos ovos foi avaliada diariamente. Após finalizado o período de eclosão realizou-se a contagem das larvas e o cálculo da eficácia do produto.

Redução de eclosão (Gonzales *et al.*, 1993), determinada pela equação:

$$RE = \frac{\text{Média eclodibilidade controle} - \text{Média eclodibilidade tratado}}{\text{Média eclodibilidade controle}} \times 100$$

Figura 4. Bioensaio in vitro com ovos de *Rhipicephalus microplus*. (A) ovos separados em alíquotas de 50 mg, acondicionados em tubos de ensaio; (B) imersão dos ovos na suspensão fúngica do bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119; (C) remoção excesso de suspensão fúngica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.6.3 Bioensaios com larvas não alimentadas de *Rhipicephalus microplus*

A metodologia utilizada para o tratamento em larvas foi semelhante à descrita para os ovos. Aproximadamente 100 larvas foram colocadas em tubos de ensaios e submersas nas várias concentrações de conídios. A mortalidade larval foi avaliada em intervalos de cinco dias até o vigésimo dia após o tratamento e calculada utilizando a seguinte fórmula (Abbott, 1925):

$$Mortalidade = \frac{x - y}{x} \times 100$$

Em que x é a porcentagem de larvas vivas no grupo controle, y é a porcentagem de larvas vivas no grupo tratado, e $x - y$ é a porcentagem de larvas eliminadas pelo tratamento.

4.7 Análise da eficácia do bioativo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 em condições seminaturais

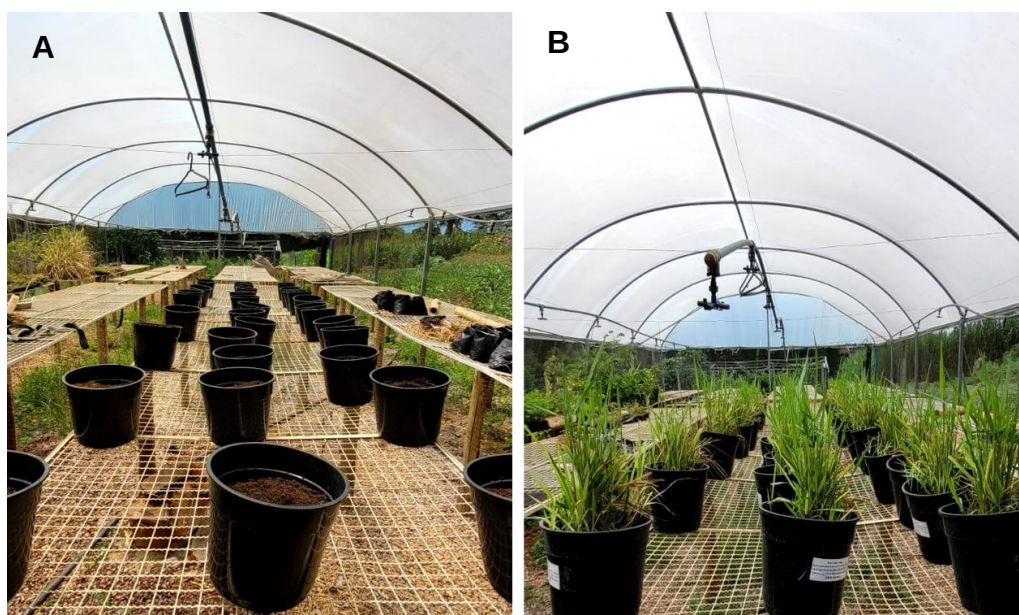
O bioensaio em condições seminaturais foi realizado conforme metodologia descrita por Bittencourt *et al.*, (2003) e Marciano *et al.*, (2021), com modificações. Esta consistiu em 24 vasos, divididos igualmente entre o grupo controle e grupo tratado. Cada vaso representou uma unidade experimental, em que foram depositadas cinco fêmeas ingurgitadas.

4.7.1 Preparação dos vasos e plantio de *Brachiaria brizantha*

Três meses antes do início do experimento, sementes de *Brachiaria brizantha* (*Syn. Urochloa brizantha*) cv. BRS Piatã foram semeadas em vasos de polipropileno com 23 cm de altura, 25 cm de largura e 20 cm de comprimento, seguindo a proporção 4Kg/ha. O solo utilizado para preencher os vasos (Terra Vegetal) foi ensacado e submetido a um processo de esterilização em autoclave vertical (Max Biomedical®) por 3 ciclos a 120°C por 1 hora, visando eliminar fungos ambientais que poderiam estar presentes nele. Todos os vasos foram mantidos em estufa agrícola e irrigados diariamente. Sete dias antes dos bioensaios, foram selecionados os vasos com cobertura vegetal homogênea e podados a altura de 35 cm e distribuídos em grupos de forma randomizada, totalizando 12 grupos controle e 12 grupos tratados (Figura 5).

Durante o período dos experimentos, os vasos só foram irrigados quando necessário, a fim de permitir a mínima condição de sobrevivência da forrageira.

Figura 5. Preparação dos vasos para realização de bioensaio em condições seminaturais. (A) três meses antes do início do experimento, preparação dos vasos e plantio de *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*) cv. BRS Piatã; (B) dia do experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.7.2 Bioensaio em condições seminaturais

No dia zero, grupos contendo cinco fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de peso médio e homogêneo, foram selecionadas, distribuídas em cada vaso submetidas ao tratamento com a suspensão fúngica de *P. lilacinum* BIC 0119 na concentração mais eficaz do teste *in vitro* (10^{10} conídios mL⁻¹) durante 3 minutos, a fim de simular um banho carrapaticida em bovinos. O grupo controle foi tratado com solução de água destilada estéril. Posteriormente, as teleóginas foram depositadas sobre os vasos experimentais. Inspeções diárias foram realizadas em cada vaso para monitorar a produção de ovos e avaliar o percentual de mortalidade das teleóginas.

Após 41 dias do tratamento e introdução das fêmeas ingurgitadas nos vasos, realizou-se, diariamente, a recuperação de larvas a partir do corte ápice das hastes de *Brachiaria brizantha*, até a não observação de larvas. O capim, contendo larvas, foi acondicionado em sacos plásticos, lacrados, identificados e congelados (Figura 6).

As larvas foram removidas do capim com o auxílio de um pincel, espalhadas em uma flanela e quantificadas com o uso de uma ponteira acoplada a uma bomba de vácuo.

Para avaliar a eficácia do bioativo à base de *P. lilacinum* BIC 0119 sobre a recuperação de larvas do *R. microplus* e as comparações entre os grupos de tratamento, foi utilizado a fórmula descrita por Bittencourt *et al.*, (2003):

$$\% \text{ Eficácia} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde A = média de larvas recuperadas no grupo controle e B = média de larvas recuperadas no grupo tratado.

Figura 6. Recuperação das larvas de *Rhipicephalus microplus* no ápice das hastes de *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa bizzantha*) cv. BRS Piatã após 41 dias do tratamento das fêmeas ingurgitadas com o bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119; A e B: setas, larvas no ápice da gramínea.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.8 Teste *in vivo*

4.8.1 Animais experimentais

A condução dos estudos *in vivo* seguiu a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para a produção, controle e emprego de antiparasitários de uso veterinário (Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997 do MAPA) (Brasil, 2012), e a metodologia descrita por Holdsworth *et al.* (2006).

Foram utilizadas 18 vacas da raça Holandesa, com idade entre 4 e 8 anos e peso entre 500 e 750 Kg, infestadas naturalmente por *R. microplus*. O número de carrapatos foi obtido por contagem de fêmeas ingurgitadas medindo entre 4,5 e 8 mm no lado esquerdo de cada animal. Os animais, com um número médio semelhante de carrapatos, foram divididos em dois grupos (controle e tratado) mantidos na mesma área, alimentados com ração, silagem de sorgo e água *ad libitum*. Os animais do grupo controle receberam pulverização apenas com água, e os do grupo tratado receberam a aplicação do bioativo *P. lilacinum* BIC 0119 na concentração de melhor eficácia no ensaio *in vitro* (10^{10} conídios mL⁻¹). O experimento, conduzido nessas condições, teve duração de 30 dias.

4.8.2 Avaliação da eficácia/desempenho do bioativo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 no controle biológico do carrapato *Rhipicephalus microplus* *in vivo*

Previamente ao experimento de eficácia, três dias anteriores ao tratamento (-3, -2 e -1), realizou-se contagens dos carrapatos com comprimento entre 4,5 e 8 mm no lado esquerdo de cada animal.

Cada animal foi pulverizado com 10g produto diluídos em 2,5 litros de água, quantidade suficiente para banhar toda a superfície corporal (Figura 7). As pulverizações foram realizadas com o auxílio de um pulverizador estacionário motorizado, cobrindo todo o corpo dos animais, de baixo para cima e na direção oposta ao crescimento dos pelos.

Para avaliar a eficácia dos tratamentos, foram realizadas contagens do número de fêmeas ingurgitadas nos seguintes intervalos após o tratamento: +2, +4, +6, +9, +11, +13, +16, +18, +20, +23, +25 e +27 dias. O cálculo da eficácia do bioativo à base de *P. lilacinum* BIC 0119 foi feito utilizando a seguinte fórmula (Henderson; Tilton, 1955):

$$Eficácia = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a}\right) \times 100$$

onde:

T_a = número médio de carrapatos recuperados dos animais tratados, após o dia do tratamento;

T_b = número médio de carrapatos recuperados dos animais tratados nos 3 dias anteriores ao tratamento;

C_a = número médio de carrapatos recuperados dos animais controle, após o dia do tratamento;

C_b = número médio de carrapatos recuperados dos animais controle nos 3 dias anteriores ao tratamento.

Figura 7. Teste a campo. (A, B) pulverização dos animais com o bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119, utilizando pulverizador estacionário motorizado; (C) bovino após o tratamento com o bioativo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.9 Reisolamento do *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 a partir de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após bioensaios

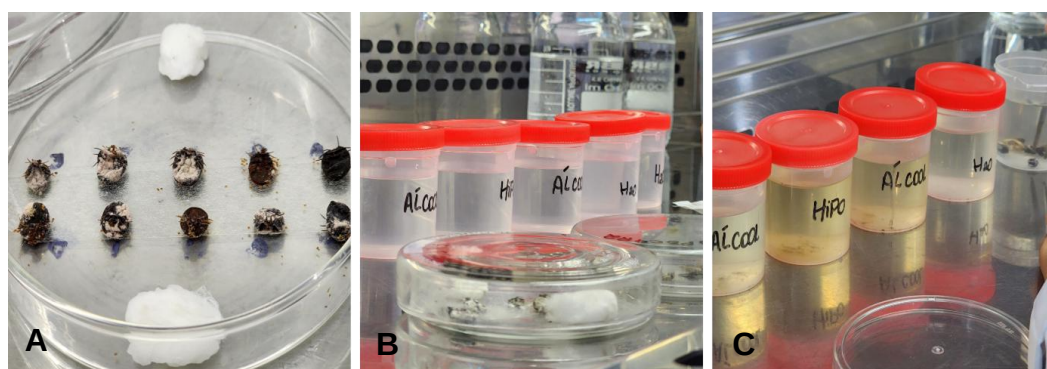
Os procedimentos de reisolamentos do *P. lilacinum* BIC 0119 a partir de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram realizados pela empresa Biota Innovations. As fêmeas ingurgitadas, submetidas aos bioensaios *in vitro* e em condições seminaturais que foram encontradas mortas nos vasos (apresentando coloração enegrecida, secas, ou sem reação a estímulos externos, além de sinais de exteriorização fúngica), foram

coletadas, acondicionadas individualmente em sacos, e identificadas de acordo com o número do vaso e o grupo experimental e enviadas para reisolamento.

Em laboratório, as cutículas dos cadáveres dos carrapatos foram lavadas em água corrente, seguidas por desinfecção pela imersão em: 1 minuto em álcool 70%, 2 minutos em hipoclorito de sódio a 1%, 30 segundos em álcool 70%, e enxágue duplo com água destilada estéril. Os cadáveres das fêmeas foram mantidos em câmaras climatizadas a $29,5 \pm 1$ °C, com umidade relativa superior a 80%, até a exteriorização fúngica, confirmando a infecção e colonização por *P. lilacinum* BIC 0119 (Figura 8). Após o crescimento fúngico sobre os carrapatos, pequenas quantidades do material fúngico foram transferidas para placas contendo Batata Dextrose Agar (BDA), visando a obtenção de culturas axênicas, facilitando a identificação do fungo com base em características morfológicas macro e microscópicas.

Para a avaliação das características macro e micromorfológicas das colônias foi utilizada a técnica de microcultivo, adaptado de Riddell (1950), com posterior observação em microscópio óptico. As características macro e micromorfológicas do *P. lilacinum* foram avaliadas seguindo as descritas na literatura por Samson (1974) e Luangsard *et al.*, (2011). Devendo apresentar macroscopicamente colônia com tonalidade inicialmente branca, adquirindo coloração rosa a lilás, após a esporulação. Microscopicamente os conídios devem apresentar formato elipsoidais a fusiformes, com paredes que variam de lisas a levemente rugosas, medindo entre 2,5-3,0 × 2,0-2,2 µm de comprimento.

Figura 8. Reisolamento do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119. (A) fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* colonizadas com o bioativo à base de *P. lilacinum* BIC 0119 após o bioensaio in vitro; (B, C) procedimentos para reisolamento do fungo a partir fêmea ingurgitada de *R. microplus*



Fonte: Biota Innovations (2024).

4.10 Isolamento e identificação do *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 para avaliação da persistência do fungo no solo

Para avaliar o desenvolvimento e a persistência do fungo *P. lilacinum* BIC 0119 no solo, amostras foram coletadas dos vasos no dia do tratamento (dia 0) e nos dias 7º, 21º e 41º após o tratamento. As amostras foram armazenadas em recipientes estéreis. O solo foi então macerado, homogeneizado, e uma alíquota de 0,35 g de cada amostra composta foi pesada em microtubos e diluída em 1 mL de solução salina a 8,5%. Em seguida, os microtubos foram submetidos a agitação vigorosa até que a suspensão apresentasse turbilhonamento. Uma alíquota de 100 µL de cada microtubo foi então transferida para placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (três placas para cada tratamento) e incubadas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 7 a 15 dias. Fragmentos das colônias isoladas foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA até a obtenção de culturas axênicas. A metodologia descrita anteriormente foi utilizada para a avaliação das características macro e micromorfológicas das colônias obtidas.

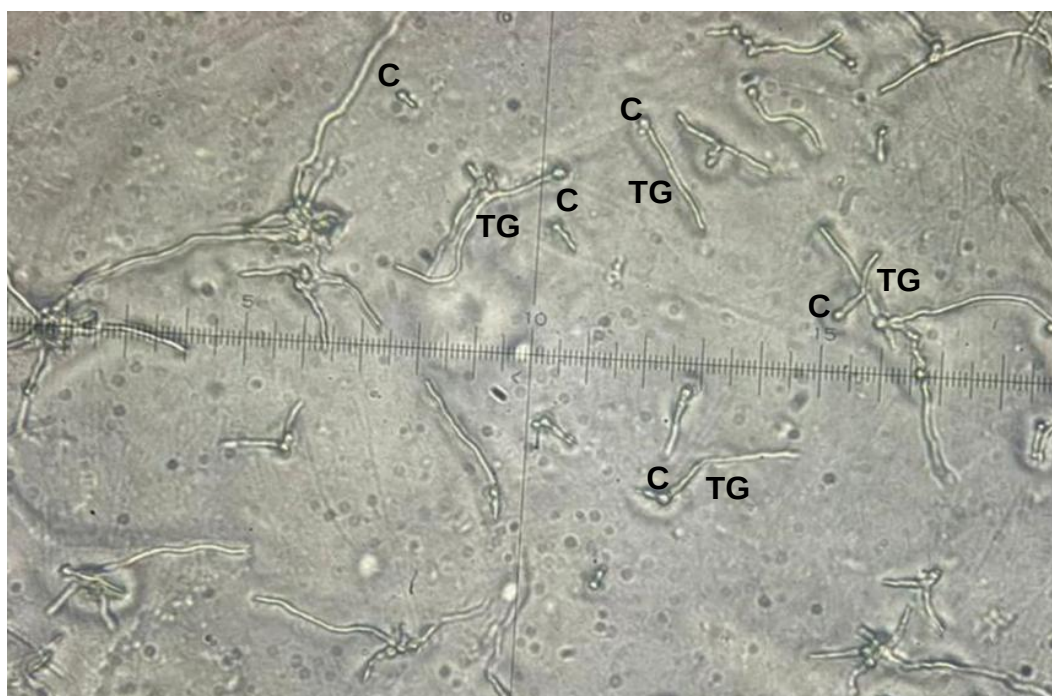
4.11 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism. Os dados obtidos foram submetidos ao teste t Student para amostras não pareadas ou análise de variância two-way (ANOVA) seguido do teste Tukey para múltiplas comparações, quando os dados apresentavam distribuição normal, e representados pela média de cada grupo. Por outro lado, quando os dados não seguiam a distribuição Gaussiana foi utilizado o teste Mann-Whitney para amostras independentes e representados pela mediana de cada grupo. Para estas análises foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Os conídios do bioativo à base de *P. lilacinum* BIC 0119 cedidos para os bioensaios com os carrapatos apresentaram viabilidade (presença de tubo germinativo) de $90,00 \pm 14,10\%$, após o período de 24 horas de incubação em câmaras climatizadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ (Figura 9).

Figura 9. Viabilidade do bioativo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 após 24 horas de incubação onde nota-se a presença de conídios (C) e do tubo germinativo (TG).



Fonte: Biota Innovations (2024).

No teste *in vitro*, a média do peso inicial das fêmeas ingurgitadas utilizadas nos bioensaios com suspensões conidiais de *P. lilacinum* BIC 0119 nas concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conídios mL^{-1} não apresentou variação significativa entre os grupos, indicando homogeneidade entre eles (Tabela 1).

Após os tratamentos, nas concentrações de 10^6 a 10^9 não se observou redução significativa no peso das massas de ovos, nem no índice de produção de ovos em comparação ao grupo controle, mas notou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de eclosão das larvas oriundas das fêmeas ingurgitadas 10^6 conídios mL^{-1} e na eficiência do bioativo nas concentrações 10^6 e 10^7 conídios mL^{-1} (Tabela 1). A eficiência do bioativo *P. lilacinum* BIC 0119, nas respectivas concentrações de

conídios foi: 15 a 46% ($29,28 \pm 16,05$), 36 a 66% ($48,00 \pm 15,85$), 5 a 62% ($31,00 \pm 29,09$), 13 a 77% ($37,00 \pm 34,55$) (Tabela 1).

Diante desses resultados, foi conduzido um novo experimento utilizando a concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} . A média de peso inicial das fêmeas ingurgitadas utilizadas nesse bioensaio não apresentou diferença significativa entre o grupo tratado e o controle. Verificou-se redução significativa no índice de produção de ovos das fêmeas ingurgitadas ($5,03 \pm 2,05$) tratadas com o bioativo à base de *P. lilacinum* BIC 0119 (Tabela 1).

Além disso, foi possível observar redução significativa nos índices de oviposição e eclosão dos ovos (Tabela 1). A redução do peso da massa de ovos foi mais acentuada no tratamento com 10^{10} conídios mL^{-1} , em que o peso da massa de ovos foi de apenas $0,11 \pm 0,05$ g, em comparação ao controle de $0,93 \pm 0,04$ g, que gerou redução significativa na eclodibilidade, com apenas 8,33% em comparação ao grupo controle (Tabela 1). E a eficiência do produto na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} foi de 98,99% (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão dos parâmetros reprodutivos e eficácia do tratamento das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* submetidas ao bioensaio in vitro com o bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1}).

	Peso fêmeas ingurgitadas (g)	Peso massa de ovos (g)	Índice de produção de ovos	Percentual de Eclosão (%)	Eficiência Reprodutiva	Eficiência do produto
Controle	$2,99 \pm 0,005a$	$1,38 \pm 0,08a$	$46,10 \pm 2,63a$	$88,33 \pm 7,64a$	$812080,59 \pm 35820,29a$	-
10^6	$2,99 \pm 0,003a$	$1,25 \pm 0,17a$	$41,75 \pm 5,73a$	$71,67 \pm 7,64a$	$603163,91 \pm 136898,23a$	$29,28 \pm 16,05b$
10^7	$2,99 \pm 0,001a$	$1,31 \pm 0,12a$	$43,87 \pm 4,05a$	$50,00 \pm 15,00b$	$439652,94 \pm 135253,89b$	$48,00 \pm 15,86b$
10^8	$2,99 \pm 0,004a$	$1,20 \pm 0,16a$	$39,92 \pm 5,43a$	$73,33 \pm 28,87a$	$584635,16 \pm 248164,66a$	$31,00 \pm 29,10a$
10^9	$2,99 \pm 0,004a$	$1,21 \pm 0,20a$	$40,57 \pm 6,63a$	$63,33 \pm 28,87a$	$537967,14 \pm 294752,42a$	$37,00 \pm 34,56a$
Controle	$2,22 \pm 0,005a$	$0,93 \pm 0,04a$	$41,93 \pm 1,70a$	$93,33 \pm 2,89a$	$783056,49 \pm 49898,02a$	-
10^{10}	$2,22 \pm 0,003a$	$0,11 \pm 0,05b$	$5,03 \pm 2,05b$	$8,33 \pm 2,89b$	$8389,90 \pm 5041,44b$	$98,99 \pm 0,60b$

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Linha tracejada: indica experimento realizado em um segundo momento.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

No bioensaio com ovos, utilizando concentrações variadas do bioativo *P. lilacinum* BIC 0119 (10^6 a 10^9), notou-se que a redução na eclosão dos ovos do carrapato *R. microplus* variou de 10,65 a 33,60% (Tabela 2). Na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} , o bioativo demonstrou eficácia significativa ($p < 0,05$), reduzindo o percentual de eclosão dos ovos em 80,69% (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão do peso da massa de ovos, eclodibilidade e percentual de redução da eclosão dos ovos de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1}).

Tratamentos	Massa de ovos	Média eclodibilidade	Redução na eclosão (%)
Controle	$0,051 \pm 0,0009a$	$89,15 \pm 17,34a$	-
10^6	$0,050 \pm 0,0003a$	$59,19 \pm 33,40a$	33,60
10^7	$0,051 \pm 0,0002a$	$79,65 \pm 19,71a$	10,65
10^8	$0,050 \pm 0,0002a$	$75,88 \pm 19,04a$	14,88
10^9	$0,050 \pm 0,0003a$	$72,51 \pm 10,42a$	18,66
Controle	$0,051 \pm 0,0009a$	$66,70 \pm 5,08a$	-
10^{10}	$0,051 \pm 0,0005a$	$12,88 \pm 6,48b$	80,69

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Linha tracejada: indica experimento realizado em um segundo momento.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Já no bioensaio com larvas não alimentadas de *R. microplus*, o percentual de mortalidade nos grupos tratados com 10^6 e 10^7 conídios mL^{-1} , variou entre 40,4% e 62,8%. Contudo, nas concentrações de 10^8 , 10^9 e 10^{10} conídios mL^{-1} , o bioativo à base de *P. lilacinum*, promoveu 100% de mortalidade larval (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de mortalidade de larvas não alimentadas *Rhipicephalus microplus* após tratamento com bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conídios mL^{-1}).

Tratamentos	Larvas vivas	Larvas mortas	Mortalidade larval (%)
Controle	99,52 ± 0,84	0,48 ± 0,84	0,48 ± 0,84a
10^6	59,60 ± 14,74	40,40 ± 14,74	40,40 ± 14,74b
10^7	37,18 ± 26,71	62,82 ± 26,71	62,82 ± 26,71b
10^8	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100 ± 0,00b
10^9	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100 ± 0,00b
Controle	94,02 ± 3,00	5,98 ± 3,00	5,98 ± 3,00a
10^{10}	0,00 ± 0,00	100,00 ± 00	100,00 ± 0,00b

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Linha tracejada: indica experimento realizado em um segundo momento.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

No bioensaio em condições seminaturais, o peso médio dos grupos das fêmeas ingurgitadas foi de 1,421g/grupo, assim as diferenças observadas nos parâmetros biológicos dos diferentes grupos durante o bioensaio em condições seminaturais, podem ser atribuídas ao tratamento aplicado (10^{10} conídios mL^{-1}). Pode-se notar redução significativa ($p < 0,05$) no número de fêmeas ingurgitadas viáveis no grupo tratado (60%) em comparação ao grupo controle, com início de mortalidade três dias após o tratamento e exteriorização fúngica sob as fêmeas ingurgitadas (Figura 10). No 41º dia, realizou-se a recuperação das larvas de *R. microplus* e notou-se redução significativa no número de larvas eclodidas no grupo tratado (2423,75) em relação ao controle (10106,5) sendo o bioativo *P. lilacinum* BIC 0119 capaz de reduzir a eclosão das larvas de *R. microplus* em 76,01% (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e desvios padrão, em gramas, do peso de fêmeas ingurgitadas, número de fêmeas ingurgitadas viáveis e número de larvas obtidas aos 41 dias após o tratamento proposto, eficácia do bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 no controle do *Rhipicephalus microplus*.

Tratamentos	Peso fêmeas ingurgitadas	Fêmeas ingurgitadas viáveis	Larvas obtidas aos 41 dias	Eficácia (%)
Controle	1,421 ± 0,003a	5,0a	10106,50a	-
Tratado	1,421 ± 0,006a	3,0b	23,75b	76,01%

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 10. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. (A) fêmeas ingurgitadas grupo controle realizando oviposição; (B) fêmeas ingurgitadas colonizada por *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119, grupo tratado.

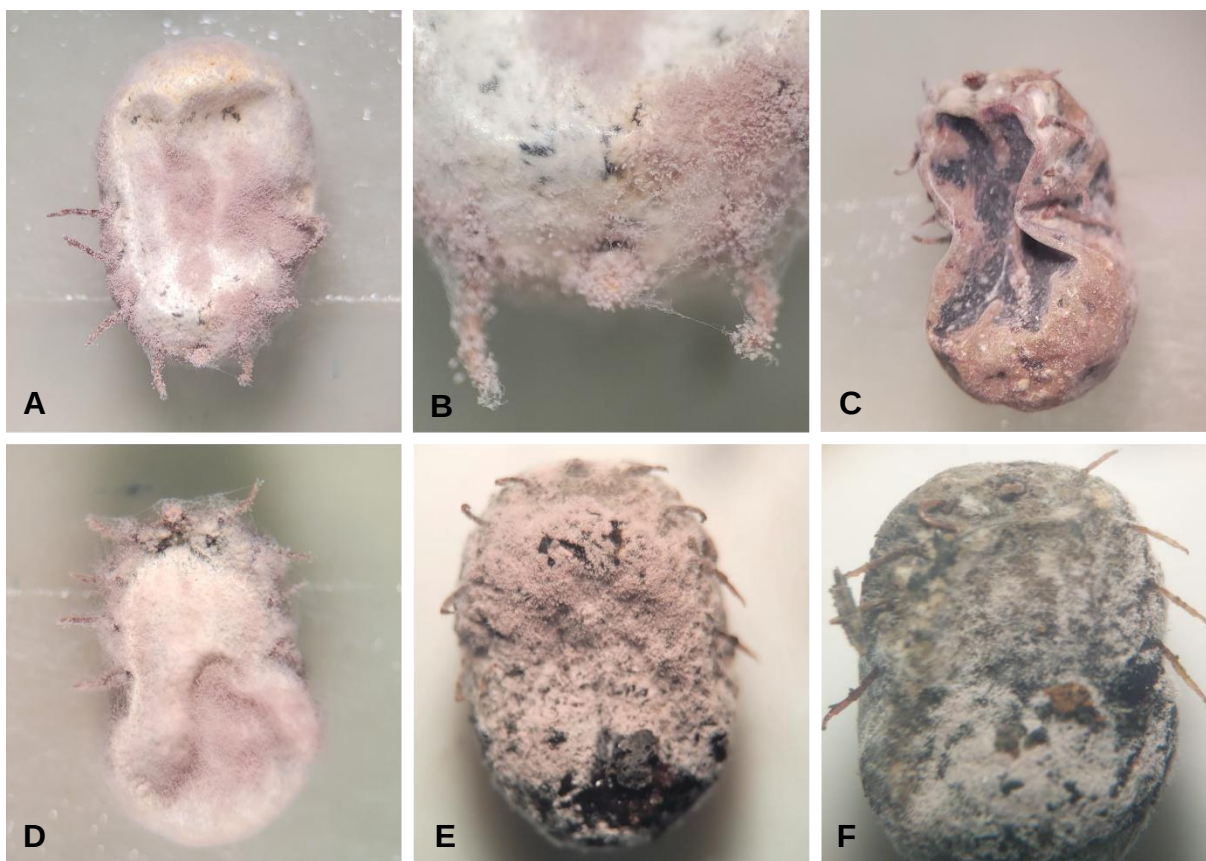


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Após realização dos tratamentos, no bioensaio *in vitro*, durante o período de postura, foi observado exteriorização fúngica a partir do 7º dia. No que se refere ao bioensaio em condições seminaturais a exteriorização fúngica na superfície das fêmeas ingurgitadas do grupo tratado foi notada a partir do 3º dia (Figura 11).

Todas as amostras submetidas ao reisolamento fúngico dos bioensaios *in vitro* e em condições seminaturais apresentaram características micromorfológicas compatíveis com a descrição de *P. lilacinum* observada na literatura (Samson, 1974; Luangsard *et al.* 2011).

Figura 11. Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* submetidas ao bioensaio *in vitro* colonizada por *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 (A, B, C, D). Fêmeas ingurgitadas submetidas ao bioensaio em condições seminaturais colonizadas por *P. lilacinum* BIC 0119 (E, F).



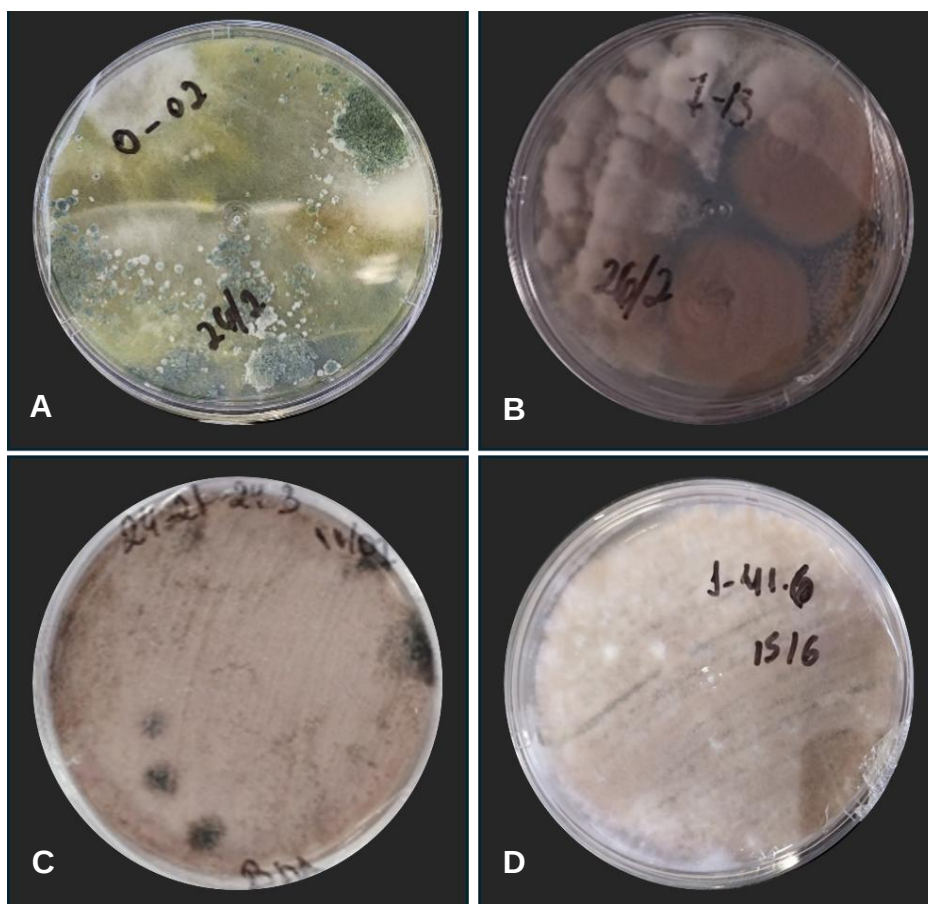
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nas amostras de solo autoclavado, coletadas de todos os grupos antes da realização dos tratamentos (dia zero), e submetidas ao isolamento fúngico, não se notou crescimento fúngico característico de *P. lilacinum* BIC 0119. Porém, observou-

se crescimento de fungo ambiental (*Trichoderma* spp) que apresentou características macromorfológicas como as descritas na literatura por Domsch; Gams; Anderson (1980) e Gams; Bisset (1998). Macroscopicamente, as colônias de *Trichoderma* spp. apresentaram micélio inicialmente branco, tornando-se cotonoso e compacto, com tufos de coloração verde variando conforme a quantidade e a pigmentação dos conídios. A coloração das colônias exibiu tons variando de verde claro a verde-escuro, características do gênero (Figura 12, A).

Nas amostras de solo coletadas no 7º dia após os tratamentos, além do fungo ambiental previamente identificado, verificou-se presença de colônias características de *P. lilacinum* BIC 0119 nas amostras de solo do grupo tratado. Nas coletas realizadas nos 21º e 41º dias após o tratamento, colônias características de *P. lilacinum* BIC 0119 foram isoladas em ambos os grupos (Figura 12).

Figura 12. Colônias de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 e colônias de fungos ambientais em meio BDA a partir de amostras de solo. (A) placa contendo colônias de fungos ambientais, D0; (B, C, D) placa contendo colônia características de *P. lilacinum* BIC 0119 e fungos ambientais, D7, D21 e D41 respectivamente;



Fonte: Biota Innovations (2024).

No teste a campo, os animais do grupo controle (n=9), nos três dias anteriores ao tratamento, tinham em média $1082,33 \pm 465,35$ carrapatos e os do grupo tratado (n=9): $1098,33 \pm 357,96$. A partir do quarto dia após o tratamento, foi possível observar uma redução no número médio de carrapatos no grupo tratado com o bioativo à base de *P. lilacinum* BIC 0119, em comparação com o grupo controle, que permaneceu até o 27º dia (Tabela 5; Figura 13). Os animais mantiveram-se saudáveis ao longo de todo o experimento, sem apresentar quaisquer alterações físicas, comportamentais ou fisiológicas que pudessem ser consideradas reações adversas aos tratamentos aplicados.

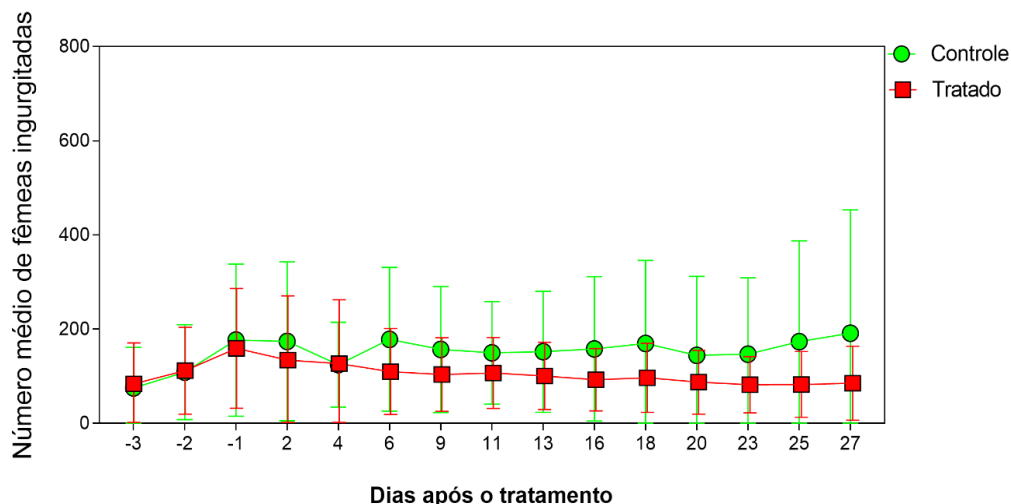
Tabela 5. Número absoluto e médio de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após o tratamento dos animais com o bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 durante o período experimental.

Dias	Número médio de carrapatos			
	Controle		Tratado	
	Número absoluto	Média $\pm$ Desvio padrão	Número absoluto	Média $\pm$ Desvio padrão
Dia -3	678	$75,33 \pm 86,10a$	775	$86,11 \pm 90,66a$
Dia -2	978	$108,67 \pm 100,54a$	1037	$115,22 \pm 96,58a$
Dia -1	1591	$176,78 \pm 161,49a$	1483	$164,78 \pm 132,92a$
Dia 2	1567	$174,11 \pm 168,66a$	1250	$138,89 \pm 142,77a$
Dia 4	1123	$124,78 \pm 90,02a$	1178	$130,89 \pm 141,67a$
Dia 6	1607	$178,56 \pm 152,74a$	1019	$113,22 \pm 95,59a$
Dia 9	1412	$156,89 \pm 133,79a$	959	$106,56 \pm 81,83a$
Dia 11	1348	$149,78 \pm 108,93a$	991	$110,11 \pm 79,09a$
Dia 13	1369	$152,11 \pm 128,42a$	931	$103,44 \pm 74,82a$
Dia 16	1423	$158,11 \pm 153,16a$	858	$95,33 \pm 69,20a$
Dia 18	1526	$169,56 \pm 176,06a$	893	$99,22 \pm 76,56a$
Dia 20	1299	$144,33 \pm 167,48a$	806	$89,56 \pm 70,78a$
Dia 23	1323	$147,00 \pm 162,14a$	756	$84,00 \pm 62,39a$
Dia 25	1562	$173,56 \pm 213,96a$	762	$84,67 \pm 72,90a$
Dia 27	1772	$191,33 \pm 261,85a$	786	$87,33 \pm 82,40a$

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 13. Número médio de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após o tratamento dos animais com o bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 durante o período experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Em relação a eficácia do bioativo à base de *P. lilacinum* BIC 0119 notou-se que até o 20ºd variou de 0 a 42,33% e após observou-se aumento gradativo da eficácia atingindo 55,02% no 27º dia (Tabela 6).

Tabela 6. Eficácias (%) diária do bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*, em teste *in vivo*.

Dias	Eficácia (%)
Dia 2	21,39a
Dia 4	00,00a
Dia 6	37,51a
Dia 9	33,07a
Dia 11	27,56a
Dia 13	32,99a
Dia 16	40,58a
Dia 18	42,33a
Dia 20	38,86a
Dia 23	43,69a
Dia 25	51,93a
Dia 27	55,02a

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6. DISCUSSÃO

O controle biológico do carrapato *R. microplus* utilizando o fungo *P. lilacinum* BIC 0119 deve-se iniciar avaliando a viabilidade dos conídios, pois segundo Alves e Faria (2010), viabilidade mínima de 80% é necessária para que ocorra o contato e a penetração do conídio através da cutícula do artrópode em até 24 horas (Zimmermann, 2007; Schrank; Vainstein, 2010). A viabilidade do bioativo *P. lilacinum* BIC 0119 ($90,00 \pm 14,10$) utilizado nos bioensaios está de acordo com a literatura, assim, pode-se afirmar que os resultados obtidos neste estudo refletem a ação do fungo sobre os estágios de desenvolvimento do carrapato. Efeito semelhante também pode ser observado nos trabalhos realizados por Angelo *et al.* (2012); Camargo *et al.* (2012); Samish *et al.* (2014), quando utilizaram conídios com viabilidade variando de 90 a 100%.

Nos bioensaios *in vitro* realizados com diferentes concentrações de conídios, pode-se notar que o fungo interferiu significativamente nos parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas, como redução no índice médio de produção de ovos e peso médio da massa de ovos na maior concentração de conídios 10^{10} conídios mL^{-1} . Segundo Bennett (1974) e Angelo *et al.* (2015), a produção de ovos está diretamente relacionada aos nutrientes ingeridos pela fêmea ingurgitada durante a fase parasitária e a energia utilizada para a produção da massa de ovos, como as fêmeas utilizadas no experimento *in vitro*, possuíam pesos semelhantes ($2,22 \pm 0,003$) a redução observada no índice de produção de ovos do grupo tratado na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} ($5,03 \pm 2,05$) em relação ao controle ($41,93 \pm 1,70$) pode ser atribuída exclusivamente ao bioativo. Resultados semelhantes foram obtidos por Camargo *et al.* (2012), que observaram uma redução no índice médio de produção de ovos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* quando tratadas com formulações de *M. anisopliae* contendo diferentes concentrações de óleo mineral 15% e a 20% ($7,0 \pm 22,14$ e $17,0 \pm 36,53$ respectivamente) na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} .

Contudo, considerando que cada fêmea ingurgitada é capaz de converter aproximadamente 50% do seu peso em massa de ovos (Garcia *et al.*, 2019), as fêmeas tratadas com o bioativo *P. lilacinum* BIC 0119 na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} não conseguiram realizar essa conversão de forma eficaz. Estudos realizados por Fiorotti de Paulo *et al.* (2018); Barboza de Almeida *et al.* (2022), com fêmeas ingurgitadas expostas ao fungo *Metarhizium* spp., observaram hifas nos ovários das teleóginas tratadas, o que promoveu alterações histológicas nos ovários.

Esses achados demonstram a necessidade de se realizar mais estudos para entender o mecanismo de atuação do fungo *P. lilacinum* BIC 0119 sobre as teleóginas.

De toda forma, a redução observada do índice de produção de ovos associado concomitantemente a redução da massa de ovos do grupo tratado na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} ($0,11 \pm 0,05$) em comparação ao controle ($0,93 \pm 0,04$) demonstra o potencial que o bioativo tem para o controle do carrapato visto que, uma única fêmea ingurgitada pode produzir entre 2.000 e 4.000 ovos após o ingurgitamento total (Guglielmone *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram relatados por Campos *et al.* (2010), que observaram uma redução na massa de ovos ($0,56 \pm 0,01$ a $0,95 \pm 0,03$) ao utilizar diferentes cepas de *Beauveria* spp. nas concentrações de 10^5 , 10^7 e 10^9 conídios mL^{-1} em relação ao grupo controle ($1,70 \pm 0,02$). De forma similar, Nogueira *et al.* (2020), observaram redução significativa ao avaliar o produto Metarril® SC Organic (a base de *Metarhizium anisopliae*, formulado em óleo vegetal) na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} , em que a massa de ovos foi reduzida para $0,1262 \pm 0,026$ em relação ao controle ($0,1689 \pm 0,015$).

A redução do percentual de eclosão dos ovos das fêmeas ingurgitadas tratadas na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} (8,33%)¹ foi superior aos achados por Angelo *et al.* (2012), que avaliaram a ação de *Isaria fumosorosea*, *I. farinosa* e *P. lilacinum* na maior concentração testada (10^8), com resultados respectivamente de $83,6 \pm 31,3$, $95,4 \pm 5,9$ e $83,1 \pm 29,6$.

Pode-se notar que os percentuais de eficiência do bioativo não aumentou proporcionalmente ao aumento das concentrações de conídios. Visto que, na concentração 10^7 conídios mL^{-1} a eficiência do produto ($48,00 \pm 15,86$) foi superior às demais concentrações (10^6 , 10^8 e 10^9 conídios mL^{-1}).

Em estudo semelhante, Angelo *et al.* (2012) avaliaram a ação de três fungos entomopatogênicos em diferentes concentrações (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1}) sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino, e observaram variações no percentual de controle de *R. microplus* entre 2,61% e 25,15% para *I. farinosa*, 33,05% a 59,19% para *I. fumosorosea*, e de 0 a 13,50% para *P. lilacinum*. As diferenças na eficácia do fungo *P. lilacinum* observadas por Angelo *et al.* (2012) e no nosso estudo podem estar relacionadas tanto à suscetibilidade da população de carrapato quanto à cepa fúngica empregada. Diferenças também foram observadas utilizando outros isolados fúngicos (*M. anisopliae* 959 e *B. bassiana* Bb 986) em populações distintas de carrapato como nos estudos realizados por Perinotto *et al.* (2012).

Na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} , a eficiência do bioativo ($98,99 \pm 0,60$) alcançou índices semelhantes às formulações fúngicas preparadas com adjuvantes como óleos vegetais e mineral, conforme reportado por Kaaya e Hassan (2000), Camargo *et al.* (2012) e Barbieri *et al.* (2023), com eficiências de 80%, 93,69% e 99% respectivamente. Esses resultados demonstram que pode-se alcançar índices superiores de controle do carrapato utilizando maiores concentrações de conídios ou priorizando o uso de formulações oleosas afim de melhorar a aderência dos conídios a cutícula do carrapato. Uma vez que a cutícula dos carrapatos possui propriedades hidrofóbicas, devido à secreção de substâncias lipoproteicas pela camada externa (Sonenshine, 1991).

No bioensaio com ovos, o bioativo *P. lilacinum* BIC 0119 reduziu significativamente ($p < 0,05$) a eclodibilidade dos ovos ($12,88 \pm 6,48$ - redução de 80,69%) de *R. microplus*, quando os ovos foram tratados com o bioativo na concentração de 10^{10} conídios mL^{-1} . Esses resultados sugerem o potencial do bioativo no controle da fase não parasitária do *R. microplus*. Os dados diferem dos observados por Angelo *et al.* (2012), que não observaram efeito de *Isaria farinosa* e *P. lilacinum* sobre os ovos de *R. microplus* nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1} . Por outro lado, Nogueira *et al.* (2020) observaram redução de 61% na eclodibilidade ao utilizarem produto à base de *M. anisopliae* (Metarril® SC Organic) na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} .

Analisando o efeito do *P. lilacinum* BIC 0119 sob as larvas não alimentadas de *R. microplus*, notou-se que a mortalidade significativa das larvas em todas as concentrações avaliadas após 20 dias do tratamento, pode ser explicada pelo fato da camada de ceras ou lipídios da epicutícula do *R. microplus* ser formada apenas após a ecdise da ninfa e, em maior quantidade adulto, assim, o estágio larval é o mais suscetível à ação de fungos entomopatogênicos (Hackman; Filshie, 1982).

Os resultados de mortalidade larval observados no presente estudo foram similares aos da literatura. No estudo conduzido por Bahiense *et al.* (2006), foi verificado 96,9% de mortalidade larval após 10 dias do tratamento com *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . Camargo *et al.* (2012), compararam formulações aquosas e à base de óleo de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . A mortalidade média das larvas tratadas com formulações oleosas de *M. anisopliae* foi próxima de 100% no quinto dia após o tratamento, enquanto a suspensão aquosa do fungo causou apenas 2,0% de mortalidade. Os

tratamentos com *B. bassiana* começaram a causar uma mortalidade larval significativa no décimo dia com as formulações oleosas alcançando quase 100% de mortalidade aos 20 dias, em contraste com os 27,4% observados com a suspensão aquosa.

Nossos resultados divergem dos obtidos por Angelo *et al.* (2012), onde o *P. lilacinum* sob formulação aquosa, começou a apresentar efeito contra as larvas somente no 15º dia após o tratamento, com 13,0% de mortalidade na maior concentração de conídios testada (10^8 conídios mL⁻¹), 67,5% de mortalidade no 20º dia. No entanto, nossos achados corroboram os de Fernández-Salas *et al.* (2019), que avaliaram o efeito acaricida de *P. lilacinum* contra larvas de duas populações de *R. microplus* (multirresistente e suscetível a acaricidas químicos), observando uma altas taxas de mortalidade de 92,3% e 94,9% respectivamente, para cada população.

Nos bioensaios conduzidos em condições seminaturais, no qual buscou-se simular o ambiente típico de pastagem, utilizando *Brachiaria brizantha*, uma forrageira amplamente utilizada na alimentação de bovinos em todo o Brasil e bem adaptada a diferentes ambientes, mesmo na ausência de irrigação artificial, notou-se que as reduções de teleóginas (60%) e de larvas (76,01%), com uma única aplicação do bioativo foram superiores aos achados de Bittencourt *et al.* (2003), que em estudo também sob condições seminaturais (canteiros de *Brachiaria decumbens*), obtiveram um percentual de controle de até 53,78% de larvas de *R. microplus*, na terceira aplicação com a suspensão fúngica de *M. anisopliae* na concentração de concentração de 10^9 conídios mL⁻¹. Porém trabalho realizado por Marciano *et al.* (2020) com *Metarhizium* spp. em emulsões de óleo mineral e vegetal demonstrou eficácia de 100%. Nesse sentido, experimentos utilizando *P. lilacinum* BIC 0119 em emulsão oleosa devem ser realizados para aprimorar o controle da fase não parasitária do *R. microplus*.

Neste bioensaio, nas fêmeas ingurgitadas inviáveis do grupo tratado (3/5), o fungo *P. lilacinum* BIC 011 foi isolado, bem como no solo dos vasos controle, o que demonstra a capacidade de disseminação do bioativo. Nas condições avaliadas, o bioativo demonstrou capacidade de persistência no solo durante todo o período experimental (41 dias), semelhante aos achados de Marciano *et al.* (2020), que avaliaram formulações oleosas do fungo *M. anisopliae* em testes em condições seminaturais, e observou uma persistência do fungo de 60 dias no solo. Esse resultado é relevante para sua aplicação em campo, pois o conhecimento da persistência do fungo no solo, aliado ao ciclo de vida do *R. microplus*, permite

determinar a frequência de aplicações do tratamento nos animais, contribuindo para o desenvolvimento de protocolos de controle mais eficazes.

No teste *in vivo*, a redução gradual do número de carrapatos ao longo das semanas, mesmo após uma única aplicação do bioativo *P. lilacinum* BIC 0119, associada à maior eficácia observada a partir do 23º dia pós-tratamento, podem estar relacionadas à dinâmica populacional de *R. microplus* e à fisiopatogenia do fungo entomopatogênico (Ment *et al.*, 2010; Nicaretta *et al.*, 2021).

Estudos realizados por Pedrini, Crespo e Juárez (2007), Ment *et al.* (2010) e Santi *et al.* (2010) demonstraram que compostos presentes na cutícula e epicutícula de artrópodes podem favorecer a germinação de conídios de fungos entomopatogênicos. Assim, pode-se inferir que, após a aplicação do bioativo, ocorreu a colonização dos carrapatos expostos, e que após o desprendimento das fêmeas ingurgitadas, o solo pode ter sido colonizado o que promoveu a redução da população larval no ambiente, visto que nos estudos *in vitro* foi o estágio evolutivo mais susceptível.

Essa informação pode ser evidenciada no ensaio seminatural do presente estudo, onde o bioativo *P. lilacinum* BIC 0119 demonstrou capacidade de disseminação entre os solos dos vasos dos grupos tratados e controle, além de promover uma redução significativa no número de fêmeas ingurgitadas viáveis e, consequentemente, no número de larvas.

Outro fator que pode justificar a maior eficácia observada após o 23º dia, considerando o ciclo parasitário do *R. microplus*, é a possível colonização da pele dos bovinos pelo fungo entomopatogênico. De acordo com Polar *et al.* (2008), fatores relacionados ao patógeno, ao carrapato-alvo e ao microambiente cutâneo do hospedeiro, como temperatura da pele, pH, secreções, microbiota cutânea e umidade proporcionada pelos pelos, podem influenciar diretamente a patogenicidade do fungo aplicado. Estudos conduzidos por Nicolaidis *et al.* (1970), Mitchell (2002), Ment *et al.* (2010) e Vanderwolf, Kyle e Davy (2023) indicam que as glândulas da pele de mamíferos secretam sebo, uma substância oleosa que pode facilitar o desenvolvimento de alguns fungos patogênicos. Dessa forma, larvas emergentes no solo poderiam ser colonizadas ao entrarem em contato com o corpo do hospedeiro, levando à sua morte, uma vez que os estágios imaturos dos carrapatos são mais suscetíveis à ação dos fungos entomopatogênicos (Hackman; Filshie, 1982), como observado nos estudos *in vitro* do presente estudo. No entanto, seria interessante

realizar experimentos adicionais para confirmar a persistência/efeito residual do bioativo na pele dos bovinos.

Resultados semelhantes a eficácia do *P. lilacinum* BIC 0119 no ensaio in vivo (55,02%), foram descritos por Bahiense *et al.* (2007), que avaliaram o potencial de controle biológico de *M. anisopliae* sobre *R. microplus* em testes de estábulo, registrando uma mortalidade média de 33% e um aumento significativo da mortalidade a partir do 24º dia pós-tratamento. Já em testes de estábulo, Camargo *et al.* (2014), avaliaram uma formulação comercial a base de *M. anisopliae* acrescida de 10% de óleo mineral no controle do *R. microplus* sobre os bovinos e observaram uma eficácia média de 47,74% ao longo de 23 dias com apenas uma única aplicação do produto.

Os dados obtidos neste estudo evidenciam o potencial de *P. lilacinum* BIC 0119 como agente de controle biológico do *R. microplus*. A redução nos parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas, a diminuição da eclosão dos ovos e a alta mortalidade das larvas nos testes in vitro, associadas à redução do número de fêmeas ingurgitadas viáveis e das larvas em condições seminaturais, além da diminuição no número de carrapatos observada nos testes in vivo, indicam que a utilização deste bioativo pode ser uma estratégia eficaz para mitigar a infestação em rebanhos. Ademais, a persistência do fungo no solo, sugere que tratamentos periódicos poderiam contribuir para o controle contínuo dos carrapatos em áreas infestadas, reduzindo a necessidade de acaricidas químicos e seus impactos ambientais. Por fim, este estudo reforça a importância de pesquisas adicionais voltadas ao aprimoramento das formulações de *P. lilacinum* BIC 0119, visando potencializar seu efeito acaricida e garantir sua viabilidade em estratégias integradas de controle de *R. microplus*, visto que a consolidação de programas de controle biológico, requer a avaliação da interação entre fungo, carrapato e o hospedeiro em condições realistas, nas quais esses elementos coexistem e influenciam uns aos outros, além dos fatores ambientais (Camargo *et al.*, 2016).

7. CONCLUSÕES

Baseados nos testes realizados, pode-se concluir que:

- O bioativo à base de *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 na concentração 10^{10} conídios mL⁻¹ interfere nos parâmetros reprodutivos e biológicos das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, reduzindo a eclosão dos ovos e apresentando alta mortalidade larval em bioensaios realizados *in vitro*;
- *P. lilacinum* BIC 0119 persiste no solo e demonstra capacidade de dispersão;
- O bioativo demonstra potencial como um agente promissor para o controle biológico de *R. microplus*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 3, n. 2, p. 302–303, jun. 1987.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.
- ALVES, R.T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. 1 edição. Embrapa Cerrados, Planaltina (DF) 2010.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V; KOLLER, W. W. **Carrapatos na Cadeia Produtiva de Bovinos**. 1. ed. Brasília, EMBRAPA, 2019. Cap. 10., p. 137-147.
- ANGELO, I. C. *et al.* Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3–4, p. 317–322, 20 set. 2010.
- ANGELO, I. C. *et al.* Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1473–1480, out. 2012.
- ANGELO, I. DA C. *et al.* Formulações oleosas contendo fungos artropodopatogênicos para o controle de *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. Supl.1, p. 18–24, 14 dez. 2015.
- ANGEL-SAHAGÚN, C. A. *et al.* Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus=Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 278–286, 24 jun. 2010.
- BAHIENSE, T. C. *et al.* Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 243–245, dez. 2007.
- 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. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3–4, p. 319–324, 5 nov. 2006.
- BANU, J. G.; IYER, R.; GUNASEKARAN, M. Mass multiplication and formulation of a nematophagous fungus, *Paecilomyces lilacinus* . **International Journal of Nematology** , v. 16, n. 2, p. 145–152, 2006.
- BARBIERI, A. *et al.* Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 14, n. 3, p. 102147, maio 2023.

BARBOZA DE ALMEIDA, I. *et al.* New field technique to evaluate the action of the fungus *Metarhizium anisopliae* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Biological Control**, v. 171, p. 104934, 1 ago. 2022.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52–61, jul. 1974.

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 and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1334–1342, jul. 2018.

BERTI FILHO, E.; MACEDO, L.P.M. **Fundamentos de controle biológico de insetos-praga**. Natal: IFRN Editora, 108 p. 2011.

BEYS-DA-SILVA, W. O. *et al.* Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, p. 107812, 1 jan. 2020.

BITTENCOURT, V.R.E.P. *et al.* Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p.38-42, 2003.

BRAGA, G. U. *et al.* Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 2, p. 140–146, fev. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 maio 1997. Seção 1, p. 13576.

BROVINI, C. N., FURLONG, J., CHAGAS, A. D. S. Influência dos fatores climáticos na biologia e no comportamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* a campo. **Bioscience Journal**, v. 19, p. 71-76, 2003.

CALVANO, M. P. C. A. *et al.* Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. **Experimental & Applied Acarology**, v. 79, n. 3–4, p. 459–471, dez. 2019.

CAMARGO, M. G. *et al.* Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 140–147, 13 ago. 2012.

CAMARGO, M. G. *et al.* Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 271–276, 15 set. 2014.

- CAMARGO, M. G. *et al.* *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38–42, 15 jun. 2016.
- CAMPOS, R. A. *et al.* Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 9, n. 3, p. 1421–1430, 2010.
- CHAGAS, A. C. DE S.; FURLONG, J.; NASCIMENTO, C. B. Predation of *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) tick engorged female by the ant *Pachycondyla striata* (SMITH, 1858) (Hymenoptera: Formicidae) in pastures. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, p. 77–78, 2002.
- CHANDLER, D. *et al.* Fungal Biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 357–384, ago. 2000.
- D'ALESSANDRO, W. B.; HUMBER, R. A.; LUZ, C. Occurrence of pathogenic fungi to *Amblyomma cajennense* in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 156–159, 13 ago. 2012.
- DAVIDSON, E. W. History of Insect Pathology. In: VEGA, F. E.; KAYA, H. K. (Eds.). **Insect Pathology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2012. Cap. 2, p. 13–28.
- DRUMMOND, R. O. *et al.* *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, fev. 1973.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. p. 859, v.1.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO - FAOSTAT. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data>> Acesso em: 10 jun. 2024.
- FARIA, M. R. DE; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 1 dez. 2007.
- FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M. *et al.* Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. **Journal of Insect Science (Online)**, v. 10, p. 186, 2010.
- FERNÁNDEZ-SALAS, A.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; ALONSO-MORALES, R. A. Effect of entomopathogenic native fungi from paddock soils against *Rhipicephalus microplus* larvae with different toxicological behaviors to acaricides. **Experimental Parasitology**, v. 204, p. 107729, 1 set. 2019.
- FIOROTTI DE PAULO, J. F. *et al.* *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1847–1856, jun. 2018.

FURLONG, J., PRATA, M. C. A. **Carrapatos: problemas e soluções**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 65 p., 2005.

GARCIA, M. V. *et al.* Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na Cadeia Produtiva de Bovinos**. 1. ed. Brasília, EMBRAPA, 2019. Cap. 1., p. 17-27.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Eds.). **Trichoderma & Gliocladium (Volume 1)**. London: Taylor & Francis, 1998. Cap. 1, p. 3-34.

GINSBERG, H. S. *et al.* Potential Nontarget Effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) Used for Biological Control of Ticks (Acari: Ixodidae). **Environmental Entomology**, v. 31, n. 6, p. 1191–1196, 2002.

GOFFRÉ, D.; FOLGARAIT, P. J. *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 107–115, 1 set. 2015.

GONZALES, J. C. *et al.* Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 107–119, jul. 1993.

GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150–156, jun. 2014.

GUGLIELMONE, A. A. *et al.* Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1. Ed. São Paulo. 2006. Cap. 7. p.115-124.

HACKMAN, R. H.; FILSHIE, B. K. In: The Tick Cuticle. OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. **Current Themes in Tropical Science: Physiology of Ticks**. 1. Ed. Oxford: Pergamon, 1982. p. 508.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, n. 1, p. 293–322, jan. 1994.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricides against the brown wheat mite. **Journal Economic Entomology**, v. 48, p. 157-161, 1955.

HIGA, L. O. S. *et al.* Controle do Carrapato-do-boi por meio de acaricidas. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na Cadeia Produtiva de Bovinos**. 1. ed. Brasília, EMBRAPA, 2019. Cap. 10., p. 137-147.

HIGA, L. DE O. S. *et al.* Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian

properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 163–171, 7 jun. 2016.

HITCHCOCK, L. F. Studies on the parasitic stages of the cattle tick. *Boophilus microplus* (Canestrini)(Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, p. 145-155, 1955.

HOLDSWORTH, P. A. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 29–43, 28 fev. 2006.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>> Acesso em: 10 jun. 2024.

JONSSON, N. N.; PIPER, E. K.; CONSTANTINOIU, C. C. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 11, p. 553–559, nov. 2014.

KAAYA, G. P. *et al.* Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. **Experimental & Applied Acarology**, v. 55, n. 3, p. 273–281, nov. 2011.

KAAYA, G. P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental & Applied Acarology**, v. 24, n. 12, p. 913–926, 2000.

KEPENEKCI, İ. *et al.* Pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Purpureocillium lilacinum* TR1 against the Black Cherry Aphid, *Myzus cerasi* Fabricus (Hemiptera: Aphididae). **Munis Entomology and Zoology**, v. 10, n. 1, p. 53–60, 1 jan. 2015.

KHAN, M.; TANAKA, K. *Purpureocillium lilacinum* for plant growth promotion and biocontrol against root-knot nematodes infecting eggplant. **PLOS ONE**, v. 18, n. 3, p. e0283550, 24 mar. 2023.

LABRUNA, M. B; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1. Ed. São Paulo. 2006. Cap. 7. p.115-124.

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, nov. 2015.

LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 573–585, jun. 2016.

LUANGSA-ARD, J. *et al.* *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*: *Purpureocillium*, a new fungal genus for *P. lilacinus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 321, n. 2, p. 141–149, ago. 2011.

MA, M. *et al.* Biological Parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Fed on Rabbits, Sheep, and Cattle. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 54, n. 3, p. 301–305, jun. 2016.

MARCIANO, A. F. *et al.* *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) oil-in-water emulsions drastically reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 34, n. 4, p. 488–492, dez. 2020.

MARCIANO, A. F. *et al.* Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2 mar. 2021.

MASCARIN, G. M. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46–53, jul. 2019.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. **Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos**. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa, MG: Epamig, 2010. p. 169–195.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 177, nov. 2016.

MENDES, M. C. *et al.* Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3–4, p. 383–388, 10 jun. 2011.

MENDES, M. C.; PEREIRA, J. R.; PRADO, A. P. Sensitivity Of *Boophilus Microplus* (Acari: Ixodidae) To Pyrethroids And Organophosphate In Farms In The Vale Do Paraíba Region, São Paulo, BRAZIL. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 81–85, jul. 2007.

MENT, D. *et al.* *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 2, p. 132–139, fev. 2010.

MESQUITA, E. *et al.* Utilization of *Metarhizium* as an insect biocontrol agent and a plant bioinoculant with special reference to Brazil. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 4, 21 dez. 2023.

MIRANDA-MIRANDA, E. *et al.* Megaselia scalaris reared on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* laboratory cultures. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 3, p. 344–347, set. 2010.

MITCHELL, T. G. Fungal Pathogens of Humans. Em: WILEY (Ed.). **Encyclopedia of Life Sciences**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2016. p. 1–19.

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). **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3, p. 355–358, 24 jun. 2010.

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**. p. 46–68. In: Controle de carrapatos nas pastagens. eds. VERISSIMO, J.C. Nova Odessa, São Paulo.

National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. *Rhipicephalus microplus* (NCBI-ID: 6941). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6941>>.

National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. *Purpureocillium lilacinum* (NCBI-ID: 33203). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=33203>>.

NICARETTA, J. E. *et al.* *Rhipicephalus microplus* seasonal dynamic in a Cerrado biome, Brazil: An update data considering the global warming. **Veterinary Parasitology**, v. 296, p. 109506, ago. 2021.

NICOLAIDES, N.; FU, H. C.; ANSARI, M. N. Diester waxes in surface lipids of animal skin. **Lipids**, v. 5, n. 3, p. 299–307, mar. 1970.

NOGUEIRA, M. R. DOS S. *et al.* *In vitro* efficacy of two commercial products of *Metarhizium anisopliae* s.l. for controlling the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. e000220, 26 jun. 2020.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (2002). Controle Biológico: Terminologia. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Eds.), **Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores**. São Paulo: Manole. 1-16.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Fourth Special Issue of CBP dedicated to “The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology”. v. 146, n. 1, p. 124–137, 1 jul. 2007.

PEREIRA, M. C. *et al.* ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência**. 1. Ed. São Paulo. MedVet Livros. 2008.

- PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M. B. In: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. PEREIRA, M. C. *et al.* ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência***. 1. Ed. São Paulo. MedVet Livros. 2008. Cap 3. p. 15-53.
- PEREZ-MARTINEZ, M. B. *et al.* Worldwide comparison between the potential distribution of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under climate change scenarios. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 37, n. 4, p. 745–753, dez. 2023.
- PERINOTTO, W. M. S. *et al.* Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 257–260, mar. 2012.
- PINTO, Z. V; LUCON, Mantovanello. C. M; BETTIOL, W. Controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Trichoderma*. p. 275. In: *Trichoderma: uso na agricultura*. DF: **EMBRAPA**, p. 536, 2019.
- POLAR, P. *et al.* Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. **Experimental & Applied Acarology**, v. 46, n. 1–4, p. 119–148, dez. 2008.
- RIDDELL, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia** 42:265–270.
- RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1570–1572, out. 2013.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 3–29, 2018.
- SAMISH, M. *et al.* Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3–4, p. 258–266, 15 dez. 2014.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. 389–403, 2004.
- SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies in Mycology**, v. 6, p. 1-119, 1974.
- SANTI, L. *et al.* *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology**, v. 114, n. 4, p. 312–319, abr. 2010.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, Highlights in Toxinology: Biodiversity in Toxins - Tools for Biological Research and Drug Development. v. 56, n. 7, p. 1267–1274, 15 dez. 2010.

SOUSA, A. B. B. DE *et al.* First Description of Acaricide Resistance in Populations of *Rhipicephalus microplus* Tick from the Lower Amazon, Brazil. **Animals**, v. 12, n. 21, p. 2931, jan. 2022.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. Old Dominion University, Norfolk, Virginia. Oxford University Press, v. 1, 1991, p. 447.

ST LEGER, R. J.; WANG, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 901–907, jan. 2010.

THOM, C. Cultural studies of species of *Penicillium*. U.S.D.A. Bureau of Animal. **Industry Bulletin**. 118, 1-107, 1910.

VANDERWOLF, K.; KYLE, C.; DAVY, C. A review of sebum in mammals in relation to skin diseases, skin function, and the skin microbiome. **PeerJ**, v. 11, p. e16680, 2023.

VALSONI, L. M. *et al.* Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluazuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e025220, 12 fev. 2021.

VEGA, F. E. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149–159, 1 nov. 2009.

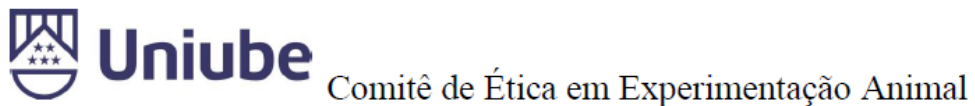
VILAS BOAS, A.M. *et al.* Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 39, p. 123-128, 1996.

VILELA, V. L. R. *et al.* Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 4, p. 101413, jul. 2020.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879–920, out. 2007.

ANEXOS

Anexo A – Declaração de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Ofício CEEA-013/2024

Uberaba, 28 de janeiro de 2025

Ilma. Profa.

JOELY FERREIRA FIGUEIREDO BITTAR

Assunto: Encaminha processo nº 013/2024, sobre o protocolo de pesquisa "**Avaliação do potencial de controle biológico do fungo *Purpureocillium lilacinum* BIC 0119 sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus* em teste de campo**".

Prezado (a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido a avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 30/08/2024, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Joely F. Bittar".

Prof. Joely F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE