

Associação de *Metarhizium anisopliae sensu lato* e cipermetrina para controle de *Rhipicephalus microplus**

Jéssica Fiorotti de Paulo¹, Julie Rhanna Tavares Ferreira², Allan Felipe Marciano³, Maria Clemente de Freitas¹, Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues³, Mariana Guedes Camargo⁴, Isabele da Costa Angelo⁵, Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt⁶ e Patrícia Silva Gôlo⁶⁺

ABSTRACT. de Paulo J.F., Ferreira J.R.T., Marciano A.F., de Freitas, M.C. Coutinho-Rodrigues C.J.B., Camargo M.G., Angelo I.daC. Bittencourt V.R.E.P., Gôlo P.S. [Association between *Metarhizium anisopliae sensu lato* and cypermethrin to control *Rhipicephalus microplus*.] Associação de *Metarhizium anisopliae sensu lato* e cipermetrina para o controle de *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.3):85-90, 2016. Departamento de Parasitologia Animal, Anexo 1, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, BR 465 Km 47, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: patriciagolo@gmail.com

Rhipicephalus microplus is responsible for large economic losses in Brazilian livestock. In order to control this arthropod, the indiscriminate use of chemical products may be widely used, leading to damages to the environment, animals and humans, besides contributing to the appearance of resistant tick populations. The use of chemicals associated with biological entomopathogens drives an alternative to increase the effectiveness of tick control and reduce the damage caused by the inappropriate use of chemicals. Accordingly, the aim of the present study was to evaluate the efficiency of *Metarhizium anisopliae* and cypermethrin association on immature stages of *R. microplus* ticks. The groups were exposed by immersing the egg mass and larvae in 1 ml of fungal aqueous suspension, cypermethrin solution, cypermethrin associated to the fungal suspension and Tween 80 0.1% (v/v) (control). The biological parameters evaluated were: larval hatching percentage and larval mortality percentage. It was observed that both the fungus in a low concentration (10^6 conidia mL⁻¹) or cypermethrin in a low concentration (25 ppm) were not able to change the biological parameters in comparison to the control group. Despite this, when associated the fungus at 10^6 conidia mL⁻¹ with cypermethrin in a low concentration, together they were able to reduce larval hatching percentage and increase mortality in comparison to the single use of fungus or cypermethrin. Accordingly, it is concluded that the association of *M. anisopliae* with cypermethrin is a promising alternative to control of immature stages of *R. microplus*.

KEY WORDS. Arthropod, entomopathogens, chemical products.

*Recebido em 21 de julho de 2016.

Aceito para publicação em 17 de novembro de 2016.

¹ Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mails: jeskvni@gmail.com; mariamedvetufrjr@hotmail.com

² Curso de Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: julierhannatavares@gmail.com

³ Médico-veterinário, MSc. PPGMV, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mails: allan-fmarc@gmail.com; caio-jr@hotmail.com

⁴ Médico-veterinário, DSc. IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: marigcamargo@gmail.com

⁵ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, IV, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: isabeleangelo@yahoo.com.br

⁶ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Parasitologia Animal, Anexo 1, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Campus Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mails: vaniabit@ufrjr.br; + Autora para correspondência, E-mail: patriciagolo@gmail.com

RESUMO. *Rhipicephalus microplus* é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária brasileira. Com o intuito de controlar esse artrópode, o uso indiscriminado de produtos químicos é amplamente empregado, acarretando em prejuízos ao meio ambiente, aos animais e humanos, além de contribuir para o aparecimento de cepas de carrapatos resistentes. Assim, o emprego de produtos químicos associados a entomopatógenos surge como uma alternativa para aumentar a eficácia do controle de carrapato e reduzir os danos causados pelo uso inapropriado de produtos químicos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi de avaliar a eficiência da associação de *Metarhizium anisopliae* e cipermetrina sobre estágios imaturos de *R. microplus*. O tratamento dos grupos foi realizado através da imersão de ovos e larvas em 1mL de suspensão aquosa do fungo, solução de cipermetrina, suspensão fúngica associada à cipermetrina e um grupo controle. Os parâmetros biológicos avaliados foram o percentual de eclosão e o percentual de mortalidade das larvas. Observou-se que o fungo quando utilizado sozinho em menor concentração (10^6 conídios mL⁻¹) ou a cipermetrina também em menor concentração (25 ppm) não foram capazes de alterar os parâmetros biológicos quando comparados ao grupo controle. No entanto, a associação do fungo a 10^6 conídios mL⁻¹ com cipermetrina em menor concentração, foi capaz de reduzir o percentual de eclosão pela metade e causar o dobro de mortalidade quando comparado ao uso do fungo e cipermetrina isoladamente. Desta forma, conclui-se que a associação de *M. anisopliae* com cipermetrina é eficaz no controle de estágios imaturos de *R. microplus*.

PALAVRAS-CHAVE. Artrópode, entomopatógeno, produtos químicos.

INTRODUÇÃO

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*, é atualmente considerado um dos principais agentes de parasitismo e causador de prejuízos à pecuária brasileira. Este artrópode também é responsável por significativas perdas econômicas em rebanhos de áreas tropicais e subtropicais, sendo um importante transmissor de patógenos e ainda, ocasiona gastos na aquisição de produtos químicos para seu controle, gerando um prejuízo de 3,24 bilhões de dólares por ano (Grisi et al. 2014, Zhang et al. 2009).

Para o controle do carrapato, o uso de produtos químicos é amplamente utilizado. No entanto, o uso inconsciente tem contribuído para o aparecimento de cepas de carrapatos resistentes, além

de levar ao acúmulo de resíduos em produtos de origem animal e à contaminação ambiental (Patarroyo 2002). Neste contexto, muitas pesquisas realizadas têm desenvolvido um controle alternativo desse carrapato, almejando desta forma a diminuição dos efeitos maléficos de produtos químicos aos animais e ao meio ambiente. Dentre os métodos mais utilizados no controle alternativo, os fungos entomopatogênicos como o *Metarhizium anisopliae* se destacam, devido à capacidade de penetração via cutícula e resultados significativos no controle de diversos artrópodes (Samish & Rehacek 1999, Fang et al. 2011).

Para aumentar a eficácia de produtos químicos, assim como a dos entomopatógenos, alguns estudos têm-se baseado em avaliar compatibilidade entre os mesmos. Em alguns casos, produtos químicos podem ser compatíveis e serem utilizados com o fungo entomopatogênico, o que aumenta a sua eficiência (Moino & Alves 1998).

De acordo com Lourenção et al. (1993), para o controle de pragas na agricultura, os fungos podem ser usados de forma isolada ou em associação com outros métodos, como os inseticidas químicos (Wenzel et al. 2004) ou inseticidas naturais de origem vegetal (Marques et al. 2004). No entanto, poucos estudos foram realizados para se determinar a compatibilidade entre fungos patogênicos para carrapatos e carrapaticidas químicos e sua eficiência no combate a *R. microplus*. (Bahense & Bittencourt 2004), apesar dos benefícios do controle associado.

A combinação de *M. anisopliae* com produtos químicos tem sido considerada promissora em carrapatos resistentes (Webster et al. 2015). No entanto, poucos estudos têm demonstrado resultados satisfatórios em testes à campo ou até mesmo in vitro. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do efeito de *M. anisopliae* sozinho ou associado à cipermetrina sobre ovos e larvas de *R. microplus* em condições de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas coletadas do piso das baias de animais artificialmente infestados e mantidos estabulados (aprovado pelo CEUA/IV/UFRRJ, n. 23083.009241/2011-16), no município de Seropédica, Rio de Janeiro. As fêmeas ingurgitadas foram lavadas em água corrente e imersas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% para que houvesse a higienização da cutícula. Posteriormente, as fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri e mantidas em câmaras climatizadas, sob temperatura de $27 \pm 1^\circ$

C e umidade relativa $\geq 80\%$, para realização de postura para obtenção de ovos e larvas.

Teste de sensibilidade de *Rhipicephalus microplus* a carrapaticidas

Foi realizado o teste de sensibilidade do carrapato bovino a diversos carrapaticidas para se avaliar a susceptibilidade da população estudada. As fêmeas ingurgitadas foram enviadas para a EMPRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Manutenção da colônia de *Metarhizium anisopliae sensu lato*

O isolado CG 148 de *M. anisopliae* s.l. foi mantido sob condições controladas de temperatura e umidade (meio batata-dextrose-ágar, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\geq 80\%$ de umidade relativa). CG 148 foi isolado de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) em Goiânia - GO em 1982 e foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.

Preparo da suspensão fúngica

O preparo da suspensão fúngica de *M. anisopliae* s.l. foi feito através de um raspado de conídios da superfície do meio de cultura e suspensos em água destilada estéril e Tween 80 0,1%. Seguindo a metodologia de Alves (1998), foi feita uma quantificação dos conídios através de uma câmara de Neubauer, ajustando a concentração em 10^8 conídios mL^{-1} para 20 mL de suspensão e então foram feitas as diluições seriadas a 10^7 conídios mL^{-1} e 10^6 conídios mL^{-1} .

Preparo das soluções de cipermetrina

As soluções foram preparadas usando um produto comercial composto do piretróide cipermetrina e seguindo as recomendações do fabricante para a concentração de 150 ppm. Duas soluções (50 ppm e 25 ppm) foram preparadas a partir da diluição da dose recomendada pelo fabricante.

Preparo das suspensões fúngicas associadas à cipermetrina

No preparo das suspensões, a cipermetrina foi diluída nas duas concentrações (50 ppm e 25 ppm) e após a diluição, os conídios foram raspados da superfície do meio de cultura e suspensos na solução de cipermetrina. Desta forma, obteve-se as seguintes concentrações: fungo na concentração de 10^7 conídios mL^{-1} associado a cipermetrina 50 ppm e 25 ppm, assim como o fungo na concentração de 10^6 conídios mL^{-1} associado a cipermetrina 50 ppm e 25 ppm.

Ensaio biológico com ovos

A massa de ovos obtidos até o décimo dia de postura foi separada em alíquotas de 50 mg e acondicionadas em tubos de ensaio devidamente vedados com algodão hidrófilo. Para realização do tratamento dos ovos, a massa de ovos foi imersa em um ml de suspensão fúngica

por três minutos. Os grupos controle foram imersos em água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,1% (v/v) por 3 minutos. Após o tratamento, os tubos foram acondicionados em câmaras climatizadas (UR $\geq 80\%$ e T $27 \pm 1^\circ\text{C}$). Como parâmetro de avaliação, foi observado diariamente o percentual de eclosão das larvas.

Ensaio biológico com larvas

Tubos de ensaio contendo 50 mg de ovos de *R. microplus* foram mantidos em câmara climatizada até a completa eclosão das larvas. O tratamento ocorreu no 15º dia após o início da eclosão das larvas e a metodologia utilizada para a exposição das larvas foi a mesma descrita para o ensaio biológico com ovos. A estimativa do percentual de mortalidade das larvas foi observada a cada cinco dias após a realização do tratamento das mesmas.

Análise estatística

Os dados seguiram o teste de normalidade de Shapiro-wilk e foram classificados como dados não paramétricos (percentuais de eclosão e de mortalidade das larvas), desta forma, foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as ordenações médias, com nível de significância de 5% (Sampaio 2002).

RESULTADOS

Viabilidade fúngica

Através da análise de viabilidade fúngica, foi possível observar que o fungo estava viável quando utilizado sozinho ou quando associado à cipermetrina, tendo demonstrado um percentual de germinação superior a 99% após 24 horas em ambos os casos.

Ensaio Biológico

Ovos. Os resultados referentes ao bioensaio com ovos estão representados na tabela 1. O percentual de eclosão das larvas no tratamento com *M. anisopliae* s.l. a 10^6 conídios mL^{-1} foi inferior quando comparado ao grupo controle, assim como o tratamento efetuado apenas com o fungo a 10^7 conídios mL^{-1} . O percentual de eclosão larval dos tratamentos do fungo a 10^6 e 10^7 conídios mL^{-1} também foi inferior quando comparados aos grupos tratados apenas com cipermetrina a 25 e 50 ppm. O percentual no grupo tratado com a associação de *M. anisopliae* s.l. 10^6 conídios mL^{-1} com cipermetrina a 25 ppm foi inferior ao percentual do grupo tratado apenas com cipermetrina a 25 ppm. O tratamento com cipermetrina a 25 ppm e a 50 ppm foram estatisticamente iguais quando comparados entre si. No entanto, a associação do fungo a 10^6 conídios mL^{-1} com cipermetrina a 50 ppm foi estatisticamente igual quando comparada ao grupo controle. O grupo da associação do fungo a 10^7 conídios mL^{-1}

Tabela 1. Valores do percentual de eclosão das larvas a partir do tratamento de ovos de *Rhipicephalus microplus* com o fungo *Metarhizium anisopliae* nas concentrações 10⁶ e 10⁷ conídios mL⁻¹, cipermetrina a 25 e 50ppm, além de um grupo controle, utilizados isoladamente ou associados. Os experimentos foram conduzidos a temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa ≥ 80%.

Tratamentos	Percentual de Eclosão
CTR Aquoso	97,5 ± 2,07 ^a
Ma 10 ⁶	69,3 ± 15,1 ^{bc}
Ma 10 ⁷	29,5 ± 19,5 ^c
Cip 50	94,6 ± 4,1 ^a
Cip 25	98,5 ± 1,3 ^a
Ma 10 ⁶ + Cip 25	20,0 ± 21,68 ^{bd}
Ma 10 ⁶ + Cip 50	93,5 ± 6,16 ^{ad}
Ma 10 ⁷ + Cip 25	61,25 ± 21,67 ^{bc}
Ma 10 ⁷ + Cip 50	77,5 ± 23,75 ^{bd}

(*) Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si (p ≥ 0.05).

Tabela 2. Valores do percentual de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* com o fungo *Metarhizium anisopliae* nas concentrações 10⁶ e 10⁷ conídios mL⁻¹, cipermetrina a 25 e 50 ppm, além de um grupo controle, utilizados isoladamente ou associados. Os experimentos foram conduzidos a temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa ≥ 80%.

Tratamentos	Percentual de Mortalidade		
	Dia 5	Dia 10	Dia 15
CTR Aquoso	0,0 ± 0,00 ^a	0,3 ± 0,48 ^a	0,4 ± 0,51 ^a
Ma 10 ⁶	1,5 ± 1,9 ^{ab}	18,5 ± 11,55 ^{ac}	34,28 ± 11,33 ^{ac}
Ma 10 ⁷	5,8 ± 5,18 ^{bd}	86,4 ± 17,56 ^{be}	97,7,0 ± 2,98 ^{bf}
Cip 50	39,1, ± 27,1 ^{bd}	80,0 ± 7,74 ^{bc}	84,0 ± 6,99 ^{cd}
Cip 25	8,3 ± 7,18 ^c	24,0 ± 8,3 ^{ac}	25,5 ± 12,86 ^{ad}
Ma 10 ⁶ + Cip 25	22,0 ± 21,23 ^{cd}	88,5 ± 6,25 ^{be}	88,5 ± 6,25 ^{ce}
Ma 10 ⁶ + Cip 50	33,00 ± 14,94 ^{ce}	97,8 ± 1,93 ^{ed}	97,8 ± 1,93 ^{bf}
Ma 10 ⁷ + Cip 25	32,00 ± 19,32 ^{ce}	97,4 ± 2,06 ^{ed}	97,4 ± 2,06 ^{ef}
Ma 10 ⁷ + Cip 50	61,0 ± 12,86 ^e	100,00 ± 0,00 ^d	100,00 ± 0,00 ^b

(*) Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si (p ≥ 0.05).

com cipermetrina a 25 ppm e do fungo a 10⁷ conídios mL⁻¹ com cipermetrina a 50 ppm não diferiram estatisticamente entre si e ainda foram estatisticamente iguais quando comparados ao grupo tratado apenas com o fungo a 10⁶ conídios mL⁻¹.

Larvas. Os resultados referentes ao bioensaio com larvas estão representados na tabela 2. No bioensaio com larvas, o percentual de mortalidade do grupo tratado apenas com o fungo na concentração de 10⁶ conídios mL⁻¹ foi estatisticamente similar ao grupo controle. No tratamento com o fungo a 10⁷ conídios mL⁻¹, o percentual de mortalidade foi superior quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com o fungo a 10⁶ conídios mL⁻¹. O percentual de mortalidade do tratamento do fungo a 10⁶ conídios mL⁻¹ foi estatisticamente igual quando comparado ao grupo tratado apenas com cipermetrina a 25 ppm, no entanto, o grupo

tratado com cipermetrina a 25 ppm obteve um percentual inferior quando comparado ao grupo tratado apenas com o fungo a 10⁷ conídios mL⁻¹. O grupo tratado apenas com cipermetrina a 50 ppm obteve um percentual de mortalidade estatisticamente igual quando comparado ao grupo tratado com cipermetrina a 25 ppm, ao fungo a 10⁶ conídios mL⁻¹ e à associação do fungo a 10⁶ conídios mL⁻¹ com cipermetrina a 25ppm. O grupo da associação do fungo a 10⁶ conídios mL⁻¹ com cipermetrina a 50ppm, o grupo da associação do fungo a 10⁷ conídios mL⁻¹ com cipermetrina a 25ppm e do fungo a 10⁷ conídios mL⁻¹ com cipermetrina a 50ppm não diferiram estatisticamente entre si e ainda foram estatisticamente iguais quando comparados ao grupo tratado apenas com o fungo a 10⁷ conídios mL⁻¹. Desta forma, a associação entre o fungo *M. anisopliae* na concentração de 10⁶ conídios mL⁻¹ com cipermetrina a 25ppm, foi capaz de aumentar a eficiência sobre larvas de *R. microplus* quando o fungo e a cipermetrina nas mesmas concentrações foram utilizados isoladamente.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos foram os estudos divulgados envolvendo *Metarhizium anisopliae* s.l. como bioagente para controle de ectoparasitas (Kaya et al. 2011, Perinotto et al. 2012, Camargo et al. 2016). Embora tenha sua ação comprovada, ainda não há um protocolo considerado eficiente e sustentável para os sistemas de produção. De maneira geral, a eficácia de um fungo por vezes pode ser comprometida por diferentes fatores como ausência de nutrientes, baixa umidade, radiação ultravioleta, temperatura, pH, entre outros (Lovett & St Ledger 2015). Por este motivo, estudos que envolvam a formulação (Camargo et al. 2012) ou o sinergismo com produtos químicos (Bahense et al. 2008) podem ampliar a eficiência do controle biológico.

Neste contexto, amplas são as pesquisas realizadas para produzir ou mesmo associar moléculas químicas entre si como tentativa de aumentar a eficácia do controle de *R. microplus*. Piretróides sintéticos como a cipermetrina ainda figuram como um dos compostos mais utilizados, tendo alguns estudos envolvendo sua resistência registrada ao redor do mundo (Sharma et al. 2012, Rodriguez-Vivas et al. 2013, Singh et al. 2014).

Para uma associação eficiente, todavia, os compostos químicos devem apresentar mínimos ou de preferência nenhum efeito deletério ao desenvolvimento fúngico. Alguns autores demonstraram que a deltametrina e o clorpirifós podem atuar atrasan-

do a germinação do fungo ou até mesmo inviabilizando o mesmo (Mohamed et al. 1987, Batista Filho et al. 2001). O presente estudo que avaliou de forma individual e associada a ação de subdosagens de *M. anisopliae* s.l. e cipermetrina não observou influência na germinação do isolado fúngico após adição do produto químico. Webster et al. (2015) também demonstraram em condições laboratoriais que a associação entre fungo e cipermetrina + clorpirifós não influenciou na viabilidade fúngica e nem no tempo de germinação.

Em testes de compatibilidade *in vitro*, resultados como os obtidos por Bahiense et al. (2006) reportaram um aumento de até 70% da eficiência da deltametrina para larvas de *R. microplus* quando associada à suspensão de *M. anisopliae* na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹. No presente estudo foi possível demonstrar que a concentração do fungo a 10^6 conídios mL⁻¹ já foi capaz de causar um efeito aditivo para o mesmo estágio evolutivo quando este foi associado a subdosagens de cipermetrina, gerando uma mortalidade larval de aproximadamente 88%. O fungo na menor concentração quando associado à menor concentração de cipermetrina utilizada foi capaz de aumentar em cerca de 60% a mortalidade de larvas, quando comparados com a utilização isolada dos compostos, demonstrando assim a eficácia da associação no controle de estágios imaturos de *R. microplus*.

A resposta imune (humoral e celular) é estimulada a partir do contato direto do hospedeiro com produtos tóxicos ou mesmo agentes biológicos. A baixa toxicidade advinda do uso de subdosagens de cipermetrina pode ter retardado a morte do hospedeiro, desencadeando uma resposta imunológica imunossupressiva capaz de facilitar a ação de agentes infecciosos como *Metarhizium anisopliae*. Tais achados corroboram com a literatura que relata que o uso da combinação de fungos com produtos químicos em baixas concentrações pode favorecer o aumento da virulência do fungo (Hiromori & Nishigaki 2001). No entanto, pouco ainda se conhece sobre este efeito associativo. Mais estudos são necessários para avaliar como a resposta imune celular e também a humoral auxiliam na eficácia de agentes biológicos utilizados no controle de artrópodes.

A resistência aos carrapaticidas químicos pode ter relação direta com a eficácia das associações. Para fungos entomopatogênicos, estudos já foram reportados em literatura relatando existir diferença de susceptibilidade entre as populações distintas de carrapatos (Perinotto et al. 2012). A sensibilidade da população utilizada foi previamente confirmada

através de testes *in vitro* realizados pela EMBRAPA, registrando eficácia de 100% do produto sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Na sequência, os ensaios realizados neste experimento demonstraram que os ovos e as larvas advindas desta mesma população também podem ser considerados sensíveis à cipermetrina, visto que a dosagem indicada pelo fabricante era de 150 ppm e a subdosagem de 50 ppm foi capaz de causar redução na eclodibilidade de ovos (em torno de 94%) e alta mortalidade de larvas (cerca de 80%) quando testada em isolado. Porém, quando associado a *M. anisopliae*, após dez dias de tratamento, a eficácia aumentou cerca de 2,6 vezes em comparação à da menor concentração de cipermetrina. Para estudos que avaliaram associações em populações resistentes, foram necessárias maiores dosagens de produto químico e de fungo para a observação de efeitos sinérgicos (Bahiense et al. 2006, Webster et al. 2015). Por este motivo, acredita-se que para o estudo do uso de associações seja necessário que se conheça anteriormente a susceptibilidade da população através da realização de testes *in vitro*, para posteriormente determinar qual a concentração ideal de produto químico e de *M. anisopliae* a ser utilizada.

Estes resultados são promissores para o controle de carrapatos, tendo em vista a grande aplicabilidade do uso conjugado de compostos químicos e biológicos. Futuros estudos devem ser realizados com outras fases de vida do carrapato com o objetivo de avaliar melhor a associação de acaricidas químicos e fungos proporcionando o desenvolvimento de uma estratégia de controle mais viável para carrapatos.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos com o presente estudo, é possível concluir que a associação de *M. anisopliae* s.l. na concentração de 10^6 conídios mL⁻¹ com cipermetrina a 25 ppm foi eficaz no controle de estágios imaturos de *R. microplus*. Desta forma, este tipo de associação pode ser promissor como alternativa no controle deste artrópode.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERÊNCIAS

- Alves S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- Bahiense T.C. & Bittencourt V.R.E.P. Laboratory evaluation of the

- compatibility and the synergism between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and deltamethrin to resistant strains of *Boophilus microplus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1026: 319-322, 2004.
- 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* ticks. *Vet. Parasitol.*, 141: 319-324, 2006.
- Bahiense T.C., Fernandes E.K.K., Angelo I.C., Perinotto W.M.S. & Bittencourt V.R.E.P. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1149: 242-245, 2008.
- Batista Filho, A., Almeida J.E.M. & Lamas, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotrop. Entomol.*, 30: 437-447, 2001.
- Camargo M. G., Golo P. S., Angelo I. C., Perinotto W. M. S., Sá F. A., Quinelato S. & Bittencourt V. R. E. P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Vet. Parasitol.*, 188: 140-147, 2012.
- Camargo M. G., Nogueira M. R. S., Marciano A. F., Perinotto W. M. S., Coutinho-Rodrigues C. J. B., Scott F. B., Angelo I. C., Prata, M.C.A. & Bittencourt, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Vet. Parasitol.*, 223: 38-42, 2016.
- Fang W., Veja-Rodriguez J., Glosch A. K., Kang A. & St Leger, R. J. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science*, 331: 1074-1077, 2011.
- Grisi L., Leite R. C., Martins J. R. S., Barros A. T. M., Andreotti R., Cançado P. H. D., Léon A. A. P., Pereira J. B. & Villela H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, 23: 150-156, 2014.
- Hirromori H. & Nishigaki J. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Appl. Entomol. Zool.*, 36: 231-236, 2001.
- Kaaya G. P., Samish M., Hedimbi M., Gindin G. & Glazer I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Exp. Appl. Acarol.*, 55: 273-281, 2011.
- Lourenção A. L., Komatsu S. & Alves, S. B. Controle de *Sitophilus zeamais* em milho com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e Pirimifos Metil. *Ecossistema*, 18: 69-74, 1993.
- Lovett B. & St. Leger R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. *Curr. Genet.*, 61: 253-261, 2015.
- Marques R. P., Monteiro A. C. & Pereira G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciênc. Rur.*, 34: 1675-1680, 2004.
- Mohamed A. K., Pratt J. P. & Nelson F. R. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathologia*, 99: 99-105, 1987.
- Moino Jr. A. M., Alves S. B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis*. *An. Soc. Entomol. Bras.*, 27: 611-619, 1998.
- Patarroyo M. E., Vargas M. I., Prates A. A. & Dias Mendes M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunop.*, 88: 163-172, 2002.
- Perinotto W. M. S., Angelo I. C., Golo P. S., Quinelato S. B., Camargo M. G., Sa F. A. & Bittencourt V. R. E. P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Exp. Parasitol.*, 130: 257-260, 2012.
- Rodriguez-Vivas R. I., Li A. Y., Ojeda-Chi M. M., Trinidad-Martinez I., Rosado-Aguilar, J. A., Miller R. J. & Pérez de León A. A. In vitro and in vivo evaluation of cypermethrin, amitraz, and piperonyl butoxide mixtures for the control of resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.*, 197: 288-296, 2013.
- Samish M. & Rehacek J. Pathogens and Predators of ticks and their potential in biological control. *Ann. Rev. Entomol.*, 44: 159-182, 1999.
- Sampaio I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ- Editora, 2002. 265p.
- Sharma A. K., Kumar R., Kumar S., Nagar N., Singh N. K., Rawat S. S., Dhakad M.L., Rawat A. K. S., Ray D. D. & Ghosh S. Deltamethrin and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India. *Vet. Parasitol.*, 188: 337-345, 2012.
- Singh N. K., Manjurul Haquea J., Singh H., Rath S. S. & Ghosh S. A comparative study on cypermethrin resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Hyalomma anatolicum* from Punjab (India). *Ticks Tick Borne Dis.*, 5: 90-94, 2014.
- Webster A., Reck J., Santi L., Souza U. A., Dall'Agnol B., Klafke G. M., Beys-da-Silva W. O., Martins J. R. & Schrank A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet. Parasitol.*, 207: 302-308, 2015.
- Wenzel I. M., Batista Filho A., Almeida A. M. B. & Mineiro J. L. C. Compatibilidade de *Lecanicillium lecanii* (Hyphomycetes), em condições de laboratório e estufa, aos agrotóxicos utilizados na cultura do crisântemo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 75: 157-166, 2004.
- Zhang B., Bai Z., Hoefel D., Tnag L., Wang X., Li B., Li Z. & Zhuang G. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Sci. Total Environ.*, 407: 1915-1922, 2009.