

Determinação da CL90 e TL90 do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

Determination of LC 90 and LT 90 of IBCB66 *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) isolate for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) control

Leila A. G. Barci^{1*}; José Eduardo M. de Almeida²; Adriana H. de Campos Nogueira³; Angelo P. do Prado⁴

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal – CPDSA

²Instituto Biológico, Centro Experimental do Instituto Biológico – CEIB

³Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA

⁴Departamento de Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Recebido em 2 de Outubro de 2008

Aceito em 9 de Setembro de 2009

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade e a virulência do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* para larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O isolado IBCB66 foi utilizado como padrão, com a finalidade de determinar a CL50 (Concentração Letal), CL90, TL50 (Tempo Letal) e TL90. O isolado IBCB66 foi testado em seis concentrações diferentes (5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 e 10^9) para determinar a porcentagem de mortalidade. A mortalidade total de larvas foi observada 18 dias após o início do teste no grupo tratado com 5×10^9 conídios.mL⁻¹. A análise de Probit dos dados consignados apontou a CL50 e CL90 concentrações de 3×10^7 e 5×10^8 conídios.mL⁻¹ e para TL50 e TL90, foram 10 e 16 dias, respectivamente.

Palavras-chave: Bovinos, Controle Biológico, Fungo entomopatogênico, Carrapato.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the pathogenicity and the virulence of the IBCB66 isolate of *Beauveria bassiana* on infected larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The IBCB66 fungus strain was used as standard isolates of *B. bassiana* against *R. (B.) microplus* larvae. The larval bioassay tests using the IBCB66 isolate were carried out to determine the (Lethal Concentration) LC50, LC90, (Lethal Time) LT50 and LT90. The IBCB66 fungus strain was tested at six different concentrations (5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 and 10^9 conidia.mL⁻¹) to determine the percentage of larval mortality. In addition, a Probit analysis was also performed. Total larval mortality was observed eighteen days after the beginning of the test in the group treated with 5×10^9 conidia.mL⁻¹. The LC50 and LC90 were 3×10^7 and 5×10^8 respectively and the LT50 and LT90 were 10 and 16 days.

Keywords: Cattle, Biological Control, Entomopathogenic fungus, Tick.

Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi introduzido nos países tropicais e subtropicais por meio das importações de bovinos na época da colonização (WHARTON, 1974). As condições climáticas de nosso país, amplamente favoráveis ao desenvolvimento do parasita, permitiram que populações de carrapatos se estabelecessem em praticamente todo o território nacional.

Os prejuízos causados anualmente à bovinocultura nacional estão relacionados ao grande potencial de veiculação de micro-organismos patogênicos, mortalidade e desenvolvimento letárgico de animais, principalmente os de raças europeias, queda nos sistemas produtivos de leite, carne e couro e, conseqüentemente, baixa agregação de valor aos produtos e altos gastos com insumos veterinários (PENNA, 1990).

Atualmente, essa situação vem se agravando com o desenvolvimento da resistência desses artrópodos aos diferentes grupos químicos nas diversas regiões do país (MENDES, 2005). Como conseqüência, o número de pesquisas realizadas em busca de métodos alternativos para o controle de carrapato tem crescido

*Autor para correspondência: Leila Aparecida Gardiman Barci
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal – CPDSA,
Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1.252,
CEP 04.014-002, São Paulo - SP, Brasil
e-mail: barci@biologico.sp.gov.br

sobremaneira. Os trabalhos publicados estão focados na busca de opções que possam ser implementadas individualmente ou contribuir na composição de sistemas de controle integrado, a fim de minimizar os problemas ocasionados por esses ectoparasitas (BARCI, 1997).

Presentemente, a maioria das pesquisas produzidas, com o objetivo de empregar agentes microbianos no controle de carrapatos, concentra-se na utilização de fungos entomopatogênicos (SAMISH et al., 2004)

Os fungos apresentam vários fatores altamente vantajosos que os tornam uma excelente opção para o controle de ectoparasitas. São patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos e ácaros, promovendo epizootias naturais; infectam diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas, ninfas e adultos, característica desejável e particularmente observada nos diferentes grupos de artrópodos. Algumas estirpes são muito virulentas e a maioria é altamente especializada. Os principais tipos de formas de dispersão – os conídios e esporos – possuem alta capacidade de disseminação horizontal, podendo ser propagados por locais muito distantes. Além disso, estão amplamente distribuídos no ambiente e são facilmente isolados de amostras de solos, insetos e ácaros infectados (ALVES, 1998). Por causa da ampla utilização na área agrícola, encontram-se presentes nas principais coleções de fungos entomopatogênicos do Brasil (Instituto Biológico, ESALQ, EMBRAPA). A coleção do Instituto Biológico conta com grande número de isolados, os quais são amplamente utilizados no combate a pragas agrícolas (ALVES, 1998).

Nesse grupo de micro-organismos, as espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são apontadas pela literatura como as mais promissoras para utilização como agentes microbianos (SAMISH, et al., 2004).

Tendo em vista a necessidade de estudos referentes à utilização do controle biológico em infestações por carrapatos em bovinos, o presente trabalho teve como objetivo verificar, in vitro, a virulência do isolado IBCB66 do fungo *Beauveria bassiana*, inoculado sob a forma de suspensão conidial sobre larvas não alimentadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. E ainda, calcular as concentrações letais 50 e 90 (CL50, CL90) e observar o tempo de ação dessa estirpe, utilizando os parâmetros auferidos como padrões em experimentos de seleção de isolados do fungo para o controle de carrapatos de bovinos.

Material e Métodos

Os testes experimentais foram conduzidos no Instituto Biológico/APTA nos laboratórios de Parasitologia Animal (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal), em São Paulo, Controle Biológico de Pragas (Centro Experimental do Instituto Biológico), em Campinas, e no Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Leste Paulista (Monte Alegre do Sul) – APTA Regional.

Os carrapatos utilizados no presente trabalho procederam de animais mestiços, de produção leiteira, nascidos e criados em Monte Alegre do Sul e infestados experimentalmente com amostra da região. O município localiza-se no Estado de São Paulo, a

22° 43' S e 46° 37' O, 740 m de altitude, apresentando solo da classe podzólico vermelho amarelo.

Fêmeas ingurgitadas foram coletadas diretamente do animal, levadas ao laboratório, onde foram separadas e identificadas quanto ao gênero e espécie, segundo chave de Aragão e Fonseca (1961), lavadas com água destilada, secas em papel macio e mantidas sob 26,5 °C de temperatura e 80% de umidade relativa.

Os ovos e as larvas deles eclodidas foram acondicionados em frascos de penicilina sob as mesmas condições controladas. Nos bioensaios, foram utilizadas larvas infestantes com idade entre 15 e 18 dias.

A escolha do isolado de *B. bassiana* IBCB66, como padrão, foi realizada com base na virulência do entomopatógeno, constatada em bioensaios desenvolvidos em laboratório e na eficácia do isolado, quando utilizado no controle microbiano de ácaros e/ou insetos em condições de campo (BATISTA-FILHO, 2004).

Essa amostra encontra-se depositada no Banco de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do Laboratório de Controle Biológico/Centro Experimental do Instituto Biológico, localizado em Campinas - SP, mantida em freezer a -12 °C, na forma de conídios puros.

O cultivo do isolado do fungo foi obtido por meio do plaqueamento em meio de ágar batata dextrose (ABD). Antes de receber o inóculo, o meio foi autoclavado a 120 °C durante 30 minutos. Após proceder a inoculação, o material foi mantido em sala com temperatura e umidade controladas (26/29 °C e 80% UR e fotofase de 12 horas), onde permaneceu por aproximadamente 15 dias, quando apresentou coloração branca ou ligeiramente amarelada (esporulação). Após atingir a esporulação, o material foi retirado da sala de crescimento e acondicionado a -13 °C.

As suspensões de conídios foram preparadas a partir dos fungos retirados do meio ABD (suspensão mãe), o qual foi raspado com auxílio de uma alça de metal e diluído em água destilada e espalhante adesivo Tween 80°.

A partir da suspensão-mãe, foram preparadas as seguintes concentrações de conídios do fungo.mL⁻¹: 5 × 10⁶, 10⁷, 5 × 10⁷, 10⁸, 5 × 10⁸ e 10⁹. A quantificação dos conídios foi feita por meio de contagem direta ao microscópio com auxílio de câmara de Neubauer (ALVES; MORAES, 1998).

Para o desenvolvimento do experimento foi utilizada a metodologia descrita por Barci e Nogueira (2006), que permite a observação diária de indivíduos de um mesmo tratamento, pelo menos por 20 dias, sem que haja alteração significativa nos percentuais de mortalidade do grupo controle.

Antes de iniciar o bioensaio, frascos de penicilina contendo aproximadamente 10.000 larvas foram abertos e as larvas ativas, potencialmente infestantes, subiram e ficaram agrupadas na borda do frasco. Com auxílio de um pincel de cerdas macias, as larvas foram coletadas, colocadas em placa de Petri contendo disco de papel de filtro, imersas em 3 mL da suspensão a ser testada e cobertas novamente com disco de papel de filtro formando um bloco único no modelo de sanduíche.

Após 10 minutos em contato com a suspensão, o sanduíche foi retirado da placa de Petri e colocado sobre uma “almofada” feita de folhas de papel de filtro recortadas em tamanho de papel A4. Os discos de papel de filtro contendo as larvas banhadas pela suspensão de fungo foram separados e as larvas em movimento

foram aspiradas para dentro de uma pipeta, tipo Pasteur, fechada com tecido de organza (malha de 50 µm) na extremidade mais larga. A aspiração foi realizada com auxílio de Bomba de Vácuo utilizando-se pressão de 1 Lb.Pol⁻². Após a aspiração as pipetas foram seladas na extremidade oposta à tela, separadas por tratamento e mantidas durante todo o bioensaio em câmara climatizada a 27 °C e 80% de UR em recipiente perfurado.

O grupo testemunha recebeu como tratamento água destilada com espalhante adesivo Tween 80[®].

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constando de 5 repetições por tratamento, sendo utilizadas 20 larvas em cada repetição, perfazendo total de 100 indivíduos por tratamento.

Para determinação dos parâmetros relativos à concentração letal 50 e 90 (CL50 e CL90) e do tempo letal 50 e 90 (TL50 e TL90), adotados como valores de referência, foram realizadas avaliações diárias do 1º dia pós-infecção até o dia em que foi constatada mortalidade total de um dos tratamentos.

Foram determinados valores relativos à mortalidade acumulada e corrigida, calculada de acordo com a Equação 1 sugerida por Abbott (1925).

$$\% \text{ mortalidade corrigida} = \frac{\text{números de vivos controle} - \text{número vivos tratado}}{\text{números de vivos controle}} \times 100 \quad (1)$$

Os resultados obtidos foram analisados levando-se em conta as diferentes concentrações de conídios.mL⁻¹ do isolado IBCB66 de *B. bassiana* testadas (variável independente), e a porcentagem de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* obtidas nos diferentes tratamentos (variável dependente). Os dados foram transformados em raiz quadrada de (x + 0,5), submetidos à análise de variância (ANOVA) e, *a posteriori*, ao teste de Tukey para comparação de médias, a 5% de significância global.

Para determinar a concentração letal 90 (CL90) e o tempo letal 90 (TL90), os dados obtidos foram submetidos à análise de Probitos POLO PC Software (LEORA SOFTWARE, 1987).

Resultados

A mortalidade total das larvas de todas as parcelas do mesmo tratamento ocorreu no grupo tratado com suspensão de 10⁹ conídios.mL⁻¹ no décimo oitavo dia após a infecção (DAI).

Os resultados obtidos nos seis tratamentos com as diferentes concentrações (5 × 10⁶ a 10⁹ conídios.mL⁻¹) revelaram percentuais de mortalidade entre 19,6 e 100%.

A análise estatística dos dados indicou que houve diferença significativa entre os percentuais de mortalidade obtidos nos grupos tratados com as concentrações 5 × 10⁶, 1 × 10⁷, tanto entre si como em relação às demais suspensões do bioensaio. Os percentuais de mortalidade obtidos nos tratamentos, a partir da concentração 5 × 10⁷, apresentaram valores não significativos, quando comparados dois a dois, entre uma concentração e a subsequente. Dessa forma, os percentuais de mortalidade de larvas tratadas com suspensões contendo 5 × 10⁷ e 1 × 10⁸ apresentaram diferenças significativas em relação aos demais, porém não diferiram entre si; o mesmo fato pode ser constatado entre os tratamentos

1 × 10⁸ e 5 × 10⁸ e observado entre as suspensões 5 × 10⁸ e 1 × 10⁹ conídios.mL⁻¹ (Tabela 1).

Ao se comparar o valor dos limites unilaterais de F, apontados pela tabela adaptada a partir de resultados de Pearson (GOMES, 1988), ao nível de significância de 5% de probabilidade (aproximadamente 2,2) com o obtido (101,53), foi constatado que os resultados consignados são altamente significativos.

Todos os tratamentos realizados diferiram do grupo-controle que apresentou porcentagem de mortalidade muito baixa (3%).

Os valores referentes à mortalidade total foram muito próximos àqueles calculados para a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

Por meio da análise de Probitos foram estabelecidos como valores referentes à CL50 e CL90, respectivamente, as concentrações 3 × 10⁷ e 5 × 10⁸. Utilizando-se o mesmo método para obtenção do TL50 e TL90, foram determinados os seguintes dias: 10 e 16 DAI (Tabelas 2 e 3).

Os percentuais de mortalidade obtidos no grupo tratado com suspensão de 5 × 10⁸ conídios.mL⁻¹ do isolado IBCB66 de *B. bassiana*, entre o período de 10 a 18 DAI, foram comparados entre si, conforme registros expressos na Tabela 4.

Os percentuais de mortalidade acumulada no período variaram entre 39 e 82%, e a mortalidade corrigida apresentou índices entre 38,4 e 81,4%.

A análise de variância indicou que não houve diferença entre os percentuais de mortalidade ocorridos nos dias 10 e 11 DAI.

Os índices de mortalidade consignados no 12º DAI divergiram daqueles apontados nos dois dias anteriores, porém não apresentaram diferença significativa dos obtidos nos três dias consecutivamente posteriores.

Os registros de mortalidade para o período entre o 12º e 18º DAI sugeriram que não há discordância estatística entre os percentuais de mortalidade obtidos nos blocos que englobam os dias 12, 13 e 14. A mesma observação vale para os dias 13, 14 e 15; 14, 15 e 16; 15, 16 e 17 e, finalmente, 16, 17 e 18.

O coeficiente de variação do bioensaio – 3,41 – foi considerado muito baixo e o valor de F (57,75) altamente significativo, quando comparado ao estabelecido por Pearson (GOMES, 1988), para nível de significância de 5% (2,2).

Tabela 1. Mortalidade acumulada de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Beauveria bassiana* isolado IBCB66, 18 dias após infecção, em condições de laboratório (Temperatura 26,5 °C e Umidade Relativa 80%).

Concentração (conídios.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)		Média e erro padrão
	Acumulada	Corrigida	
Testemunha	3	–	0,6 ± 0,8944 ^a
5 × 10 ⁶	22	19,6	4,4 ± 1,5166 ^b
1 × 10 ⁷	40	38,1	8,0 ± 2,4495 ^c
5 × 10 ⁷	59	57,7	11,8 ± 0,8366 ^d
1 × 10 ⁸	71	70,1	14,2 ± 1,4832 ^{de}
5 × 10 ⁸	82	81,4	16,4 ± 1,1402 ^{ef}
1 × 10 ⁹	100	100	20,0 ± 0,0000 ^f

Dados originais seguidos do erro padrão da média; Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (erro global α = 0.05); Teste ANOVA de um fator; CV = 8,66; F = 101,56; Dados transformados em Raiz quadrada de (x + 0,5) para fins de análise estatística.

Tabela 2. Valores referentes às concentrações letais 50 e 90 do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana*, para o controle in vitro de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, determinados pela análise de Próbites.

Parâmetro	CL90	CL50
Limites fiduciais (95%)	3,016892E + 08 < CL90 < 7,001103E + 08	2,098922E + 07 < CL50 < 3,721379E + 07
Valor de a	-1,243	-1,243
Valor de r ²	0,8630	0,8630
Valor de G	0,0223	0,0223
Valor de b	0,837	0,837
Intervalos de confiança de b	0,764393 < b < 0,909666	0,764393 < b < 0,909666
Qui-quadrado	22,3911	22,3911
Grau de liberdade	28	28
Concentração Eficaz	4,379724E + 08 (4,4 × 10 ⁸)	2,834667E + 07 (2,8 × 10 ⁷)

Tabela 3. Valores referentes aos tempos letais 50 e 90 do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* para o controle de larvas in vitro de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, determinados pela análise de Próbites.

Parâmetro	TL90	TL50
Limites fiduciais (95%)	15,17789 < TL90 < 16,11585	10,26573 < TL50 < 10,9868295
Valor de a	2,933	2,933
Valor de r ²	0,9171	0,9171
Valor de G	0,0050	0,0050
Valor de b	0,216	0,216
Intervalos de confiança de b	0,2072504 < b < 0,2241534	0,2072504 < b < 0,2241534
Qui-quadrado	62,2136	62,2136
Grau de liberdade	88	88
Tempo Eficaz (Dias)	15,621 (16 dias)	10,566958 (10 dias)

Tabela 4. Mortalidade acumulada e corrigida de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas in vitro com suspensão de 5 × 10⁸ conídios do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* no período de 10 a 18 DAI (dias após infecção).

DAI	Mortalidade		Média e erro padrão
	Acumulada	Corrigida	
10	39	38,4	7,8 ± 1,9235 ^a
11	46	45,5	9,2 ± 2,0494 ^a
12	60	59,6	12,0 ± 2,6457 ^b
13	65	64,6	13,0 ± 2,5495 ^{bc}
14	67	66,7	13,4 ± 2,1909 ^{bcd}
15	71	70,4	14,2 ± 2,5884 ^{cde}
16	75	74,2	15,0 ± 1,4142 ^{def}
17	80	79,4	16,0 ± 1,4142 ^{ef}
18	82	81,4	16,4 ± 1,1402 ^f

Dados originais seguidos do erro padrão da média; Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (erro global $\alpha = 0,05$); CV = 3,41; Teste ANOVA de um fator; D.M.S. 5% = 0,54754 -; D.M.S. 1% = 0,66469.

Os dados de mortalidade acumulada e corrigida, foram muito próximos, quando comparados dois a dois para o mesmo dia de tratamento.

Discussão

Os resultados obtidos permitiram verificar que, nas concentrações entre 5 × 10⁶ a 10⁹ conídios.mL⁻¹, o isolado IBCB66 de *B. bassiana* apresenta potencial patogênico para controlar larvas de *R. (B.) microplus* em condições de laboratório. Entretanto, apenas concentrações iguais ou superiores a 5 × 10⁸ conídios.mL⁻¹, que promoveram 83% de mortalidade de larvas, mostraram eficácia necessária para possível utilização a campo.

Larvas de *R. (B.) microplus* tratadas com suspensões do entomopatógeno apresentaram percentuais de mortalidade inversamente proporcional à concentração de conídios.mL⁻¹, dados concordantes com aqueles apontados por Paião et al. (2001) e Fernandes et al. (2006).

Consultando registros da literatura nacional, foi possível verificar que muitos isolados de *B. bassiana* utilizados em experimentações conduzidas com larvas e outros instares de carrapatos de importância médico-veterinária apresentam índices que não diferem muito dos verificados neste trabalho.

Em relação à CL50, os dados obtidos neste trabalho – 2,8 × 10⁷ – são próximos àqueles mencionados por Bittencourt et al. (1999) – 1,8 × 10⁶ – que avaliou a patogenicidade in vitro do isolado Bb747 sobre larvas do carrapato *A. nitens* em

experimentações conduzidas com suspensões que variaram entre 10^5 a 10^8 conídios.mL⁻¹.

Monteiro et al. (2001), ao testar os isolados CG17, EP01 e 986 de *B. bassiana* sobre larvas de *Anocentor nitens*, determinaram as respectivas CL50 ($1,8 \times 10^7$, $1,6 \times 10^6$ e $2,5 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹), quando trabalharam com quatro concentrações que variaram entre 10^5 e 10^8 conídios.mL⁻¹.

Analisando os dados referentes à CL90 do isolado IBCB66, pode-se observar que esses valores estão muito próximos daqueles apontados por Bittencourt et al. (1997) que, em ensaios com fêmeas tratadas com suspensões de dois isolados de *Beauveria bassiana*, determinaram como CL90 a concentração de $1,15 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ para o isolado 747 e $5,95 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ para o 986.

Examinando o tempo letal obtido na presente pesquisa, baseando-se na análise estatística dos dados estabelecidos pelo teste de Tukey a 5% de significância, pode-se inferir que o TL50 do isolado IBCB66 para controlar larvas de *R. (B.) microplus* in vitro com suspensões de 5×10^8 conídios.mL⁻¹, foi de 11 ou 12 dias e o TL90 de 16, 17 ou 18 dias.

Ainda com relação aos tempos letais 50 e 90, não há como estabelecer comparações entre os dados aqui consignados com os apontados na literatura, pois a maior parte dos registros é resultante de delineamentos experimentais onde o dia de avaliação do bioensaio foi previamente estabelecido e não houve observação diária da mortalidade acumulada.

Fernandes et al. (2003) e Fernandes et al. (2006), em ensaios conduzidos com larvas de *R. (B.) microplus* tratadas com diferentes isolados de *B. bassiana*, efetuaram as avaliações dos bioensaios no décimo dia após o tratamento. Paíão et al. (2001) detectaram os índices de mortalidade de larvas de *R. (B.) microplus* tratadas com três isolados de *B. bassiana* no 20º DAI

Monteiro et al. (1998), ao estudar a ação de isolados de *B. bassiana* sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus*, realizaram as observações 10 dias após o tratamento. O mesmo procedimento foi empregado por Souza et al. (1999) e Bittencourt et al. (1999), ao avaliarem, respectivamente, o efeito de *B. bassiana* para larvas de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*.

Reis et al. (2001) demonstraram a ação in vitro de isolados de *B. bassiana* em ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* por intermédio de observações realizadas 15 dias após o tratamento de larvas ou depois da ecdise de adultos.

Em relação ao tempo necessário para que o isolado IBCB66 promova controle efetivo de larvas de *R. (B.) microplus* (16 a 18 dias em condições ótimas), é pertinente considerar a biologia do carrapato. Dependendo das condições climáticas, as larvas se tornam infestantes por um período de até vinte dias após a eclosão, e o tempo de vida livre dessa fase gira em torno de 28 a 51 dias, podendo ficar até seis meses sem se alimentar. O ciclo evolutivo bastante longo permite a exposição dessa fase por tempo suficiente para que haja, em condições de campo, grande chance de colonização desse estágio de desenvolvimento (ROCHA, 2009).

De qualquer forma, os tempos necessários para o estabelecimento de controles efetivos são bem diferentes daqueles observados em tratamentos com produtos químicos.

É preciso ter em mente que, no controle de ectoparasitas, a estratégia de utilização de entomopatógenos difere daquela estabelecida para inseticidas químicos. O controle químico promove

a redução rápida e temporária dos prejuízos econômicos causados por infestações por artrópodos. Os produtos microbianos reduzem as populações das pragas mais lentamente, sendo os resultados mais duradouros que os proporcionados pelos agrotóxicos.

Conclusões

O isolado IBCB66 do fungo *Beauveria bassiana* foi eficaz para o controle in vitro de larvas de *R. (B.) microplus*.

A concentração letal 50 (CL50) do isolado IBCB66 de *B. bassiana* para o controle in vitro do carrapato *R. (B.) microplus* foi de 3×10^7 conídios.mL⁻¹.

O tempo letal 50 (TL50) do isolado IBCB66 de *B. bassiana*, com o propósito de controlar in vitro larvas do carrapato *R. (B.) microplus*, foi de 10 dias, podendo ser as avaliações realizadas no 10º ou 11º DAI.

A CL90 do isolado IBCB66 de *B. bassiana* para o controle in vitro de larvas do carrapato *R. (B.) microplus* foi de 5×10^8 conídios.mL⁻¹.

O tempo letal 90 (TL90) do isolado IBCB66 de *B. bassiana* com o propósito de se controlar in vitro larvas do carrapato *R. (B.) microplus* foi de 16 dias, podendo ser as avaliações realizadas 16, 17 ou 18 DAI.

Referências

- ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 15, p. 265-267, 1925.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961. (VIII, Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira).
- BARCI, L. A. G. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae) no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n. 1, p. 95-101, 1997.
- BARCI, L. A. G.; NOGUEIRA, A. H. C. Método para avaliação de mortalidade de larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) submetidas a tratamentos com produtos carrapaticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 105-109, 2006.
- BATISTA-FILHO, A. Comunicação pessoal. 2004.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. et al. Avaliação da eficácia in vitro de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 49-52, 1997.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. et al. Ação dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 sobre larvas do carrapato *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitologia ALDia**, v. 23, n. 3/4, p. 82-86, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-07201999000300003&script=sci_arttext>. Acesso em: Agosto 2008.

- FERNANDES, E. K. et al. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 393-398, 2003.
- FERNANDES, E. K. et al. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v. 98, n. 4, p. 324-332, 2006.
- GOMES, F. P. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária**. Piracicaba: POTAFÓS, 1988. 160 p.
- LEORA SOFTWARE. **A user's guide to probit or logit analysis**. Berkeley, CA: LeOra Software, 1987.
- MENDES, M. C. **Resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) aos piretróides e organofosforados e o tratamento carrapaticida em pequenas fazendas**. Campinas, 2005. 122p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- MONTEIRO, S. G. et al. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 113-116, 1998.
- MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E. Avaliação *in vitro* da patogenicidade dos isolados CG17, EP01 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin sobre larvas do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 8, n. 3., p. 144-146, 2001.
- PAIÃO, J. C. V.; MONTEIRO, A. C.; KRONKA, S. N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 245-251, 2001.
- PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 4, p. 3-65, 1990.
- REIS, R. C. S. et al. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 544-547, 2001.
- ROCHA, C. M. B. M. **Importância do carrapato *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 (Acarina, Ixodidae) no processo produtivo do leite**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_35.pdf>. Acesso em: Abril 2009.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 389-403, 2004. (Suplemento).
- SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Evaluation of *in vitro* effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 127-131, 1999.
- WHARTON, R. H. The current status and prospects for the control of Ixodid ticks with especial emphasis on *Boophilus microplus*. **Bulletin de L'Office International des Epizooties**, v. 81, n. 1/2, p. 65-85, 1974.