



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA



CECA

DJISON SILVESTRE DOS SANTOS

EFICIÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E DO
EXTRATO HEXÂNICO DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) NO
CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI,
1887) (ACARI: IXODIDAE) *IN VIVO*

RIO LARGO – AL
2010

DJISON SILVESTRE DOS SANTOS

**EFICIÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E DO
EXTRATO HEXÂNICO DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) NO
CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI,
1887) (ACARI: IXODIDAE) *IN VIVO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências Agrárias como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

**RIO LARGO - AL
2010**



ATA DE REUNIÃO DE BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 13 (treze) dias do mês de dezembro do ano de 2010, às 08h00min (oito) horas, sob a Presidência do (a) Professor (a) Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria Forti Broglio, em sessão pública na sala do mestrado em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, km 85 da BR 104 Norte, Rio Largo-AL, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**EFICIÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. E DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) NO CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) *IN VIVO*” do (a) aluno (a) **DJISON SILVESTRE DOS SANTOS**, sob matrícula **2007G0119**, requisito obrigatório para conclusão do Curso de Agronomia, assim constituída: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria Forti Broglio, CECA/UFAL (orientador); Prof^ª Dr^ª Roseane Cristina Prêdes Trindade, CECA/UFAL e Mestranda em Agronomia Leilianne Alves de Souza, CECA/UFAL. Iniciados os trabalhos, foi dado a cada examinador um período máximo de 30 (trinta) minutos para a arguição ao candidato. Terminada a defesa do trabalho, procedeu-se o julgamento final, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição: Prof^º. Dr. Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria Forti Broglio, nota 10,00 (dez), Prof^ª Dr^ª Roseane Cristina Prêdes Trindade, nota 10,00 (dez) e Mestranda em Agronomia Leilianne Alves de Souza, nota 10,00 (dez). Apuradas as notas, o candidato foi considerado **APROVADO**, com média geral **10,00 (dez)**. Na oportunidade o candidato foi notificado do prazo de máximo de 30 (trinta) dias, a partir desta data, para entregar a Coordenação do Trabalho de Conclusão de Curso, devidamente protocolada, da versão definitiva do trabalho defendido, em 4 (quatro) vias, impressas e encadernadas e uma cópia digitalizada em CD com as correções sugeridas pela Banca, sem o que está avaliação se tornará sem efeito, passando o aluno a ser considerado reprovado. Nada mais havendo a tratar, os trabalhos foram encerrados para a lavratura da presente ATA, que depois de lida e achada conforme, vai assinada por todos os membros da Banca Examinadora, pelo coordenador (a) do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e pelo coordenador (a) do Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo/AL, 13 de dezembro de 2010.**

1º Examinador _____
Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria Forti Broglio (Orientador)

2º Examinador _____
Prof^ª Dr^ª Roseane Cristina Prêdes Trindade

3º Examinador _____
Mestranda em Agronomia

Coordenador do TCC _____
Prof^ª Dr^ª Roseane Cristina Prêdes Trindade

Coordenador do Curso de Agronomia _____
Prof^ª Dr^ª Leila de Paula Rezende

DEDICO

Esta vitória aos meus pais Maria José Silvestre dos Santos e Mauro Aureliano dos Santos, pelo inestimável amor, incentivo e apoio que desde os primeiros passos ajudaram-me a trilhar o caminho.

*"Com Ele está a sabedoria e a força".
(Jó 12:13).*

AGRADECIMENTOS

A minha imensa gratidão a Deus, que de forma grandiosa tem guiado a minha vida, dando-me, sobretudo força, ânimo e coragem;

Ao meu pai, Mauro Aureliano dos Santos e a minha mãe Maria José Silvestre dos Santos, pela força e apoio incondicional me incentivando sempre na busca de conhecimentos;

A minha noiva, Josilene da Mota um agradecimento especial pelo amor, carinho e compreensão e pelo apoio durante todos os momentos;

À Universidade Federal de Alagoas – UFAL;

A minha orientadora e amiga Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Forti Broglio a qual teve participação direta na realização deste sonho e que é um grande exemplo pra mim. Minha gratidão a você é infinita!

Dr.^a Nivia da Silva Dias pela contribuição e todo conhecimento transmitido, estímulo e compreensão;

A Prof.^a Dr.^a Roseane Cristina Prêdes Trindade por ter aceitado o convite para participar na colaboração deste trabalho;

Aos professores do Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias - CECA que contribuíram para minha formação;

Aos meus colegas do curso de Agronomia e aos amigos. Aos colegas do Laboratório de Entomologia do CECA/UFAL, Diego Olympio, pela amizade e enorme empenho na elaboração deste trabalho, Jakeline Maria dos Santos, Simone Silva da Costa, Alice Maria de Araújo, Vanessa de Melo Rodrigues, Leilianne Alves de Souza, Hully Monáisy Alencar Lima e Erisson Marques da Silva pelo companheirismo durante as atividades.

A todos aqueles que, mesmo não mencionados, de uma forma de ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado a todos por tudo!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema da fase parasitária e não-parasitária do carrapato bovino.....	14
FIGURA 2 - Fruto da gravioleira (<i>Annona muricata</i> L. Annonaceae).....	19
FIGURA 3 - Esquema do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (<i>M. anisopliae</i> x cigarrinha).....	22
FIGURA 4 - Etapas do preparo do extrato vegetal no CECA/UFAL (A e B) e Laboratório de Química/UFAL (C e D). Secagem das estruturas vegetais em estufa a 40-45°C (A); Trituração em moinho de facas (B); Filtragem (C); Rota evaporador (D). Etapas realizadas no período de janeiro de 2009.....	24
FIGURA 5 - Pulverização do animal.....	26
FIGURA 6 - Fêmeas de <i>R. (B). microplus</i> condicionada em placas de Petri. No período de março a junho de 2009 no Laboratório de Entomologia CECA, UFAL.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Escala de notas e porcentagem de eclodibilidade de larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887).....	27
TABELA 2 - Médias ¹ ± (EP) da mortalidade das teleóginas, índice de conversão em ovos, peso dos ovos, porcentagem de eclodibilidade, e eficiência do produto em <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887) após a utilização do extrato alcoólico de <i>A. muricata</i> e do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> . Bioensaio realizado no Laboratório de Entomologia Agrícola do CECA/UFAL no período de janeiro a julho de 2009.....	29

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Principais características do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	13
2.2. Controle do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Obtenção do extrato: coleta das sementes e preparo.....	24
3.2. Obtenção e produção de isolado do fungo entomopatogênico.....	25
3.3. Montagem do bioensaio: avaliação da eficácia do extrato de sementes de graviola e do fungo.....	26
3.4. Avaliações das duas formas de controle (microbiano e com extrato.....	27
3.5. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Mortalidade.....	29
4.2. índice de conversão em ovos.....	30
4.3. Peso dos ovos.....	30
4.4. Eclosão larval.....	31
4.5. Eficiência do produto.....	31
5. CONCLUSÃO.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

RESUMO

SANTOS, D. S. **Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e do extrato hexânico de *Annona muricata* L. (Annonaceae) no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) *in vivo*** Rio Largo: Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Estado de Alagoas UFAL – CECA, 2010. (Trabalho de Conclusão de Curso).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação *in vivo* do entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e do extrato hexânico de *Annona muricata* L. no controle do carrapato-dos-bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Foram utilizados doze animais, da raça Holandesa, pertencentes à Fazenda São Luiz, Viçosa – AL, os quais estavam isentos de tratamento químico para carrapatos. Os animais foram divididos em três grupos compostos cada um deles por quatro bovinos. Realizou-se a aplicação mediante banhos por aspersão, com pulverizador costal manual (20 L), sendo o grupo controle representado por água 4 L destilada e 1,2 L de DMSO e os grupos tratados com 4 kg do fungo Fitossan 4 *M. anisopliae* (10^8 conídios.mL⁻¹), diluídos em 4 L de água destilada e 4,2 L de uma solução a 1% (p/v) do extrato de semente de *A. muricata* diluído em água e DMSO a 1% (p/v), sendo esta quantidade preparada individualmente para cada animal. Após 24 horas foram realizadas as coletas das fêmeas ingurgitadas nos bovinos, de forma aleatória, sendo retiradas 30 fêmeas por animal, maiores que 4 mm em comprimento, totalizando 120 fêmeas por grupo. As fêmeas foram levadas ao Laboratório de Entomologia CECA/UFAL em Rio Largo, AL e pesadas em balança analítica. As coletas de dados foram feitas a partir do terceiro dia da montagem do bioensaio, sendo registrada, a cada três dias até as primeiras eclosões larvais, a mortalidade das fêmeas, índice de conversão em ovos, peso da massa de ovos, percentual de eclosão e percentual de controle. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Ambos os tratamentos testados possibilitaram controle satisfatório do carrapato bovino, em relação às variáveis estudadas, destacando-se que o *M. anisopliae* causou também redução no peso dos ovos postos pelas fêmeas ingurgitadas.

Palavras-chave: Palavras-chave: Carrapato bovino, *Annona muricata*, *M. anisopliae*.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são os mais importantes ectoparasitas em áreas de exploração pecuária, tanto em regiões tropicais quanto subtropicais, e são responsáveis por severas perdas econômicas, principalmente no que concerne à transmissão de patógenos e toxinas, como vetores potenciais. No Brasil, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) representa um grande problema na produção de bovinos em diferentes regiões e, segundo Grisi et al. (2002), os prejuízos causados de forma direta e indireta relacionados a este ectoparasita, foram estimados em 2 bilhões de dólares/ano.

R.(B). microplus tem a capacidade de transmitir para os bovinos, os protozoários, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, assim como as rickettsias *Anaplasma marginale* e *A.centrale*. Os protozoários produzem a doença denominada de babesiose e as rickettsias a anaplasmose. Ao conjunto de ambas, comumente se denomina Tristeza Parasitária, mas elas nem sempre ocorrem juntas (GONZALES 1975; STORER, 1986).

O controle deste ectoparasita é, indiscutivelmente, necessário, e o tratamento sanitário de rebanhos é realizado durante a fase parasitária com carrapaticidas sintéticos. No entanto, a prática do uso destes acaricidas como forma profilática e terapêutica tem acarretado problemas a respeito do desenvolvimento de populações resistentes de carrapatos frente às diversas gerações de acaricidas (SOARES et al., 2001), bem com o aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal, principalmente leite e carne, e a poluição ambiental proveniente do uso indiscriminado de acaricidas no controle (BULLMAN et al., 1996).

A necessidade de métodos mais seguros, menos agressivo ao homem e meio ambiente tem estimulado a busca de novos inseticidas a partir de extratos vegetais. As plantas têm sido uma importante fonte de substâncias com diferentes estruturas químicas e com diversas atividades contra artrópodes (VIVAN, 2005).

Pesquisas com fungos entomopatogênicos como controladores biológicos têm sido realizadas visando auxiliar o estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle de artrópodes (ALVES, 1998, CHANDLER et al., 2000). Os entomopatógenos, que são considerados como importantes fatores na redução da população de pragas, ocorrem naturalmente no ambiente, e podem ser introduzidos ou aplicados (BAHIENSE et al., 2007).

Entre os fungos entomopatogênicos, os mais empregados no controle de pragas são o *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e o *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.; este fato talvez se deva a sua ampla distribuição geográfica, à variedade de hospedeiros e às ocorrências em condições naturais, enzoóticas ou epizoóticas (ALVES, 1998).

Uma das alternativas promissoras e de grande interesse para a pecuária é o controle biológico feito com agentes microbianos (PAIÃO et al., 2001). A atividade patogênica de fungos para *R. (B.) microplus* já foi amplamente investigada em estudos *in vitro*, onde a ação dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para as diversas fases do ciclo de vida do carrapato ficou plenamente caracterizada (CASTRO et al., 1997; MONTEIRO et al., 1998; PAIÃO et al., 2001; MELLO et al., 2006).

A utilização de extratos vegetais no controle do carrapato também tem sido foco de pesquisas em vários países. No Brasil, trabalhos utilizando óleos emulsionáveis de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Myrtaceae), rotenóides extraídos do timbó (*Derris urucu*) (Fabaceae) (VERÍSSIMO, 2004), azadiractina, presente em plantas da família Meliaceae (BORGES et al., 2003; BROGLIO-MICHELETTI et al., 2010) piperinas em Piperaceae (SILVA et al., 2009) e acetogeninas em Annonaceae (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2009a,b), mostraram-se promissores no controle desse parasito.

Os acaricidas originados de plantas tendem a ter baixa toxicidade, desenvolvimento lento de problemas de resistência e instabilidade no meio ambiente já que são substâncias mais biodegradáveis que suas contrapartes sintéticas, cujos princípios ativos se metabolizam rapidamente ante à radiação solar e à umidade microclimática (MORALES e GARCIA, 2000; IANNACONE e LAMAS, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo estudar *in vivo* a mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* bem como o peso dos ovos, eclodibilidade larval e eficiência do controle frente ao uso de extrato vegetal e de fungo entomopatogênico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos da espécie *R.(B.) microplus* pertencem à ordem Acarina, família Ixodidae, sub-família Rhipicephalina apresentam como características morfológicas: gnatossoma com base hexagonal, rostró e palpos curtos, achatados e rugosos, escudo sem ornamentação, presença de olhos, peritremas arredondados ou ovais e os machos apresentam duas características marcantes que são: duplo par de placas adanais e extremidade posterior com apêndice caudal. São parasitos obrigatórios, tendo como hospedeiros preferenciais os bovinos, mas na ausência destes, podem parasitar outros animais tais como eqüinos e cães. Os carrapatos desse gênero fazem todas as ecdises sobre o hospedeiro, sendo classificados como ixodídeos monóxenos (FORTES, 2004).

A família Ixodidae se caracteriza por possuir o corpo dividido em capítulo ou gnatossoma e idiosoma ou corpo propriamente dito, do qual sobressaem os 3 ou 4 pares de patas, e está coberto, total ou parcialmente, por uma placa quitinosa denominada escudo. O capítulo ou gnatossoma é constituído pelo rostró, que é a reunião dos órgãos da porção anterior e por uma base de forma cilíndrica até pentagonal, variando com os gêneros e as espécies (CORDOVÉS, 1997).

O carrapato bovino *R.(B.) microplus* recentemente foi reclassificado através do uso da biologia molecular dentro do gênero *Rhipicephalus* e subgênero *Boophilus* passou a ser chamado de *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), porém pode-se ainda utilizar o nome *B. microplus* (MURRELL e BARKEL, 2003).

O *R. (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) é um das 860 espécies de carrapatos conhecidas mundialmente (WALKER et al., 2000), que obrigatoriamente parasitam e espoliam seus hospedeiros, podendo parasitar animais domésticos, selvagens e até mesmo seres humanos.

Este carrapato é originário da Ásia, notadamente da Índia e da Ilha de Java, entretanto, em função das expedições exploradoras registradas na História, com a movimentação de animais e mercadorias, ocorreu sua introdução nas regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul, com alguns focos no 35° Sul (NUÑES et al., 1982).

CICLO EVOLUTIVO DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *R. (B.) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) é um aracnídeo pertencente à ordem Acarina da classe Arachnida. Esta classe juntamente com a dos Merostomata, compõe o sub-filo Chelicerata do filo Arthropoda. É a única espécie desse gênero identificada no Brasil e o mais importante ectoparasita de rebanhos bovinos (GASPARIN, 2007).

Este ectoparasito apresenta duas fases distintas no seu ciclo de vida. A primeira chamada de fase parasitária que ocorre em um único hospedeiro, e a outra, quando está na pastagem, chamada de fase não-parasitária ou vida livre (Figura 1).

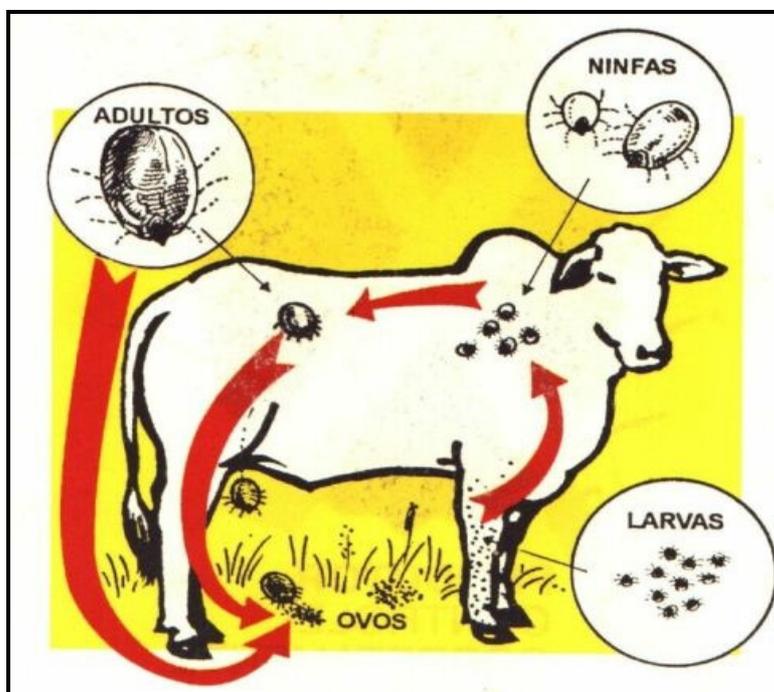


FIGURA 1 - Esquema da fase parasitária e não-parasitária do carrapato bovino

Fonte: <http://www.unitins.br> [acesso em 16/12/201]

A fase não-parasitária compreende os estágios de fêmea adulta (teleógina), ovo e larva infestante. A fêmea adulta ingurgitada ao desprende-se do bovino procura um lugar protegido do sol, após dois ou três dias (período de pré-postura), começa a postura, que pode chegar a 1000 ovos. No período de quatro semanas aproximadamente, dependendo da temperatura e da umidade, eclodem uma larva de cada ovo. Estas, permanecem dois ou três dias onde eclodiram, e depois sobem na vegetação, permanecendo juntas, à espera da passagem dos bovinos, para neles subir e iniciar a fase parasitária (ROCHA, 1998).

A fase parasitária inicia-se quando a larva infestante fixa-se no hospedeiro, geralmente nas regiões do períneo, base da cauda, entrepernas, virilha, úbere, escroto e interior da orelha passando a ser larva parasitária. Aos poucos, vão crescendo (aumentam em peso cerca de 200 vezes), até chegarem a ninfas e machos e fêmeas adultos, quando se acasalam (GONZALES, 1975; CORDOVÉS, 1997; FURLONG, 1998). O ciclo evolutivo inicia com a cópula. A procura do parceiro se realiza pelo odor dos feromônios secretados pela fêmea. Esta fase dura, em média, 18 a 22 dias e não sofre influência da umidade e da temperatura (FARIAS 1995; CORDOVÉS, 1997).

O macho é pequeno, e se coloca sob a fêmea partenógina que está fixada no couro do bovino. Este utiliza o hipóstomo (rosto) e introduz um espermatóforo no orifício genital. A fêmea adulta, uma vez fecundada, se desprende do bovino e cai no pasto, onde inicia a postura. Em condições adversas, como baixa temperatura, a teleógina, embora não faça a postura, não morre, aguardando condições favoráveis para reiniciar o processo. Dessa forma, o período de postura pode se prolongar de vários dias, até meses, dependendo das condições climáticas (GONZÁLES, 1975).

As larvas distinguem-se dos demais estádios do ciclo por possuírem apenas três pares de patas, o que caracteriza a mudança de fase. Na fase de ninfa, permanecem entre o sexto e o décimo dia. Estas, por sua vez, evoluem, formando as metaninfas (fase na qual também não se alimenta), permanecendo nesta fase entre o 10º e 13º dia. Por volta do 15º dia, após a fixação no bovino, sofrem mais uma metamorfose, originando um indivíduo sexuado, ou seja, a neógina (fêmea) ou o neandro (macho) (FARIAS 1995).

DANOS CAUSADOS PELO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os prejuízos causados pelos carrapatos ao hospedeiro podem ser expressos por duas diferentes vias: direta ou indireta. A ação irritante da picada, espoliativa da alimentação e tóxica, é atribuída diretamente ao parasito. Já os prejuízos indiretos são aqueles causados pela transmissão de enfermidades, custos com o controle, envolvendo acaricidas, instalações e mão-de-obra, além daqueles detectados durante o processo de industrialização das peles, cuja qualidade é prejudicada pela ação do carrapato (CORDOVÉS, 1997). Quanto aos prejuízos causados no couro do animal, cerca de 70% no Brasil apresentam-se defeituosos em decorrência da ação, principalmente de carrapatos e bernes (KESSLER, 1998).

Cordovés (1997) relatou que os carrapatos são os ectoparasitas mais importantes para a pecuária bovina atual. Os prejuízos vêm desde a perda de peso, baixa conversão alimentar, perdas na qualidade dos couros, toxicoses, lesões da pele as quais favorecem a presença de miíases, anemia, transmissão de agentes patogênicos, que provocam graves enfermidades. Dificilmente pode-se constatar um ectoparasita mais prejudicial à economia pecuária do que o carrapato bovino, em especial, a espécie monóxena (tem somente um hospedeiro), *R. (B.) microplus*.

Quanto aos prejuízos ocasionados aos animais, cita que uma fêmea de carrapato suga em média 2 a 3 mL de sangue do animal e que se encontram a nível de campo infestações em torno de 300 a 400 carrapatos, nas diversas fases do ciclo, com muita facilidade. Isto significa uma espoliação sanguínea em torno de 1 litro por ciclo. Um bovino que mantivesse 2 carrapatos durante o ano, teria seu ganho de peso, diminuído em 1 kg/ano (GONZALES 1975).

2.2. CONTROLE DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

CONTROLE QUÍMICO

O controle com o uso de acaricidas químicos durante a fase parasitária do carrapato tem sido a medida profilática e terapêutica mais comumente utilizada contra esses ectoparasitos. Esta tentativa de controle apenas na fase parasitária é a principal causa dos insucessos no controle do carrapato bovino uma vez que, a maior parte da população dos carrapatos (95%) está na pastagem, apenas 5% dos mesmos estão nos animais (FURLONG e MARTINS, 2000).

Estratégias de controle podem ser o uso de banhos à base de carrapaticidas convencionais a cada 21 dias ou a aplicação de produtos químicos “pour on” a cada 35 dias. Além disso, a rotação das pastagens por um período mínimo de 30 dias é descrita por FURLONG e MASSARD (1994) como sendo um método eficiente de controle.

Quanto à utilização de produtos químicos comerciais, encontram-se apenas variações em relação à eficácia quando se compara a região na qual o produto foi experimentado. Os produtos químicos utilizados são à base de amidinas, piretróides, organofosforados e lactonas macrocíclicas, sendo esta última muito difundida, nos seus diferentes tipos de moléculas, pelo grande período em que permanece ativa no

organismo (LIMA, 1995; QUEIROLO e PONTES, 1995; ALVES-BRANCO et al., 1999).

A eficácia dos carrapaticidas é limitada, já que os carrapatos são parasitas capazes de desenvolver resistência a produtos químicos e passá-la para gerações seguintes (CALDAS, 2004). Há muito tempo tem-se verificado problema de resistência dos parasitas aos medicamentos químicos. A cada ano que passa, novos medicamentos são lançados no mercado com o intuito de eliminar o mais rápido possível, os ectoparasitos, não buscando, entretanto, o equilíbrio do ambiente (ARENALES, 1998).

PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL

O Brasil foi um grande produtor e exportador de inseticidas botânicos, como piretro, rotenona e nicotina. Entre as décadas de 30 e 40 estes inseticidas foram muito populares e importantes no controle de pragas, contudo começaram a ser substituídos após a descoberta de produtos organossintéticos, como o DDT e o BHC. As variações na eficiência do controle, devido às diferenças na concentração do ingrediente ativo entre plantas e, principalmente, o baixo efeito residual, que apontava à necessidade de várias aplicações em períodos curtos, fez com que os inseticidas vegetais fossem gradativamente substituídos pelos sintéticos (COSTA et al., 2004).

As substâncias químicas extraídas das plantas, normalmente, são classificadas em metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em praticamente todos os organismos. Esses compostos se concentram frequentemente nas sementes e órgãos de armazenamento e são necessários para o desenvolvimento fisiológico, já que têm papel importante no metabolismo celular básico. São usados principalmente como matéria-prima industrial, alimento ou aditivo alimentar e incluem produtos como, óleos vegetais, ácidos graxos e carboidratos (BALANDRIN, 1985).

Os metabólitos secundários são compostos derivados bio-sinteticamente dos metabólitos primários, mas têm distribuição limitada a determinados grupos taxonômicos do reino vegetal. Aparentemente, não têm função no metabolismo primário da planta, mas, frequentemente, têm um papel ecológico: atrativo para polinizadores, adaptação química à pressão ambiental ou servindo como defensores contra microrganismos, insetos e predadores superiores e, até mesmo, contra outras plantas. Os metabólitos secundários são geralmente armazenados pelas plantas em

quantidades menores que os metabólitos primários e tendem a ser sintetizados em células especializadas e em estágios de desenvolvimento distintos, o que muitas vezes dificulta sua extração e purificação.

Dessa forma, muitos metabólitos secundários são considerados como materiais especiais ou substâncias químicas refinadas e são mais valorizados no mercado. São utilizados comercialmente como produtos farmacêuticos (terapêuticos, aromatizantes, flavorizantes) e pesticidas. Alguns exemplos de metabólitos secundários são a nicotina, as piretrinas, a rotenona, cocaína, morfina, óleo de rosas, óleo de eucalipto, etc. Eles geralmente têm estruturas altamente complexas, que determinam sua atividade biológica, sendo sua síntese inviável economicamente. Um bom exemplo é a azadiractina extraída da *Azadirachta indica* cuja estrutura é bastante complexa (BALANDRIN, 1985).

Uma das principais características da aplicação de inseticidas botânicos refere-se a sua rápida degradação pela luz solar, ar, umidade, chuva e enzimas desintoxicantes o que resulta em uma menor probabilidade de desenvolvimento de resistência e reduzido risco para organismos benéficos e não-alvo. Muitos inseticidas botânicos têm baixa a moderada toxicidade aos mamíferos, podem ser fabricados na propriedade rural a baixo custo quando se dispõe de material vegetal e que as substâncias sejam solúveis em água. Contudo, o preço dos produtos botânicos disponíveis no mercado pode ser mais elevado do que os dos inseticidas sintéticos, em geral por serem poucos disponíveis no mercado por causa da carência de fornecedores comerciais ou por problemas associados ao fornecimento estável de matéria-prima (AGUIAR-MENEZES, 2005).

As limitações apresentadas no uso de inseticidas vegetais estão na necessidade de sinergistas para aumentar, assim, a ação inseticida do produto. Os inseticidas botânicos apresentam baixa persistência exigindo, assim, aplicações mais frequentes acarretando em custos mais elevados. A carência de pesquisas bem como a dificuldade de registro representam grande entrave para os inseticidas de origem vegetal (AGUIAR-MENEZES, 2005).

Os derivados botânicos podem causar diversos efeitos sobre os organismos, tais como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases. A extensão dos efeitos e o tempo de ação são dependentes da dosagem utilizada, de maneira que a morte ocorre nas dosagens maiores e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas dosagens menores. A utilização de

doses sub-letais causa redução das populações em longo prazo e necessita de menores quantidades de produtos. As doses letais muitas vezes tornam sua utilização inviável pela grande quantidade necessária (ROEL, 2001).

GRAVIOLA (*Annona muricata* L.)

A graviola *Annona muricata* L.(Annonaceae) (Figura 2) é originária da América Tropical, mais especificamente da América Central e Vales Peruanos, e daí distribuída para todas as regiões tropicais do mundo (MANICA, 1997). Segundo o mesmo autor, a gravioleira é uma árvore de pequeno porte, com altura de 3,5 a 8 m, copa pequena, de ramificação assimétrica e de folhagem compacta. As folhas são inteiras, ovadas, oblongas ou elípticas, coriáceas, duras, de pecíolos curtos, de cor verde-escura-brilhante na página superior e verde-amarelada na página inferior, medindo de 5 a 18 cm de comprimento por 2 a 7 cm de largura, quando adultas.

Nos últimos anos, as anonáceas tem sido muito pesquisadas devido ao isolamento e caracterização de diversas classes de substâncias com atividades químicas e farmacológicas (LEBOEUF et al., 1982), principalmente no que diz respeito às acetogeninas. Elas são derivadas de ácidos graxos e apresentam um número variável de anéis tetraidrofurânicos (THF) ou tetraidropirânicos (THP) ao longo da cadeia hidrocarbônica (ALALI et al., 1999).



FIGURA 2 – Fruto da gravioleira (*Annona muricata* L. Annonaceae)

FONTE: <http://www.lojavidanatural.com.br> [acesso em 16/12/2010]

Essas substâncias naturais bioativas apresentam importantes atividades biológicas tais como: citotóxica, antitumoral, pesticida, vermicida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica (CAVÉ et al., 1993;1997).

Todas as partes da gravioleira são usadas em medicamento natural nos trópicos, inclusive a casca, folhas, raízes, fruto e sementes. São atribuídos propriedades diferentes e usos às partes diferentes da árvore. Geralmente a fruta e o seu suco são utilizados para problemas de verminoses e parasitas, baixar febre, aumentar a produção de leite materno após o parto (período de lactação), e como um adstringente para disenteria. As sementes esmagadas são usadas como um vermífugo e contra parasitas internos e externos. Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado que folha, caule, raiz, talo e extratos de semente da graviola têm função antibacteriana sob numerosos patógenos e que o caule tem propriedades antifúngicas. Foi comprovada também atividade antiparasitária. Muitos componentes bioativos e fitoquímicos da graviola têm sido estudados por cientistas desde 1940 (ALMEIDA, 1993).

ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*

O fungo *M. anisopliae* pertencente à classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae, foi descrito por Metschnikoff em 1879 pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*. É um fungo amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos (Alves, 1998), realizou o primeiro trabalho de controle microbiano utilizando este fungo para o controle de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*,(coleóptera:Scarabaeidae). Posteriormente em 1883 Sorok classifica este fungo como *Metarhizium anisopliae*. A partir de então, a utilização deste patógeno vêm sendo estudada sobre muitas espécies de insetos, com grandes potencialidades para o controle biológico, tendo como hospedeiros mais de 300 espécies de insetos.

Dentre os fungos usados no controle biológico de pragas ou com potencialidade para tanto, indubitavelmente o fungo *M. anisopliae* apresenta-se como um agente microbiano de extrema importância dentro do programa de controle biológico. Sua ação é amplamente conhecida, ocorrendo em diversas regiões, desde ambientes de clima temperado até clima tropical. (GARCIA, 2008)

O *M. anisopliae* tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento e à seleção de linhagens do ambiente, ao isolamento de mutantes com características importantes para o controle biológico, ao estudo dos mecanismos de infecção, ao desenvolvimento de metodologias de biologia molecular e a estudos alternativos para produção, manutenção da viabilidade e formulação de biopesticidas (MELISSA et al., 2001).

O processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros (Figura 3) ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (SCHRANK et al., 1993; ALVES, 1998). O processo de infecção é iniciado pela germinação dos esporos sobre a cutícula do hospedeiro. Na superfície do esporo, ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas (proteases, esterases e N-acetilglicosidasas) que têm efeito na adesão, na aquisição preliminar de nutrientes e que também causam modificações superficiais nas camadas mais externas da cutícula do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1990). O esporo germina e o tubo germinativo se diferencia por dilatação da extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1991). Esse estímulo também é sensível a alterações da superfície, indicando um possível mecanismo pelo qual o patógeno reconhece seu hospedeiro (ST. LEGER et al., 1990).

Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração o qual penetra na epicutícula e procutícula do inseto, nem todos os fungos apresentam (ALVES et al.,1986).

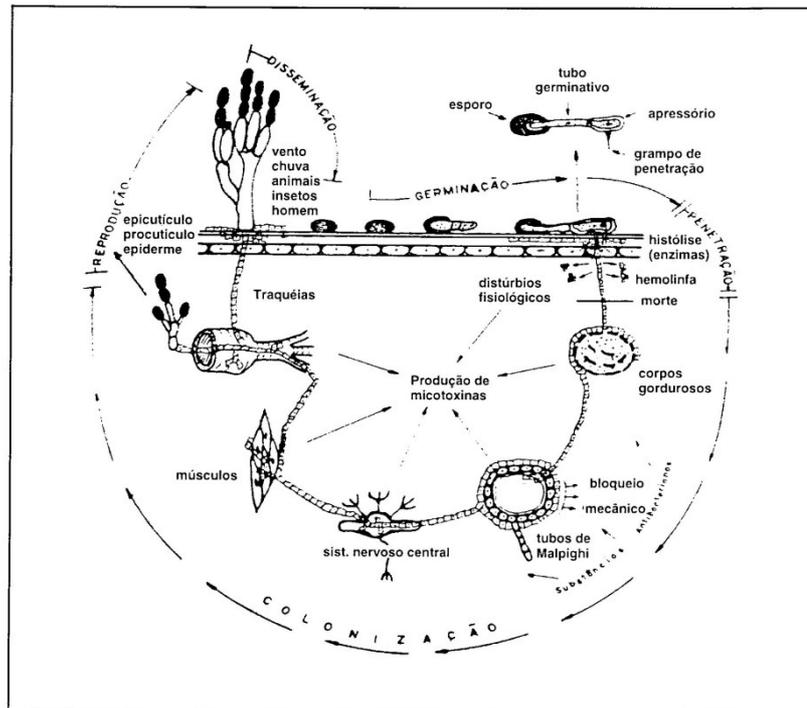


Figura 3 - Esquema do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (*M. anisopliae* x cigarrinha)
Fonte: (ALVES et al.,1986).

Na penetração estão envolvidos dois processos: físico, devido a pressão da hifa que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas e o químico, resultante da elaboração de enzimas (proteases, lípases, quitinases), que facilitam a penetração mecânica. Na área da procutícula ao redor da penetração, aparecem sintomas de histólise (decomposição do tecido por ação de enzimáticas). O aparelho bucal, ânus, regiões intersegmentais e tarsos são, provavelmente, as áreas mais comuns de penetração. A penetração via oral pode ocorrer para alguns fungos como *M. anisopliae* em *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera: Acrididae: Cyrtacanthacridinae), *Nomurae. rileyi* em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Beauveri. bassiana* (Bals.) Vuill. em *Solenopsis* sp. (Hymenoptera: Formicidae) etc. A partir da penetração inicia-se o processo de colonização do hospedeiro pelo fungo. As hifas que penetram sofrem um engrossamento e se ramifica; inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente, na cavidade geral do corpo. A partir deste momento, são formadas pequenas colônias do fungo e outros corpos hifais. Após a morte do inseto, o fungo cresce dentro do cadáver e todos os tecidos internos são penetrados por hifas filamentosas. A morte do inseto ocorre depois de 4 a 5 dias da inoculação ; as hifas começam a emergir pelos espiráculos através das áreas mais fracas(ALVES et al.,1986).

O fungo *M. anisopliae* tem mostrado ser um promissor agente no controle de artrópodes, merecendo destaque o carrapato, que foi amplamente estudado em ensaios de laboratório e comprovada sua eficiência no controle de varias espécies como *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma cajennense* (KAAYA et al., 1996; MONTEIRO et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999; BITTENCOURT, 2000; PAIÃO et al., 2001; GARCIA et al., 2004; LOPES et al., 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na Fazenda São Luiz pertencente ao município de Viçosa – Alagoas (9°22’S, 36°14’W e altitude 210 metros) e no Laboratório de Entomologia do Centro de Ciências (CECA-UFAL), Rodovia BR 104 N, km 85 no município de Rio Largo/AL (9°27’S e 35°27’W, altitude 127 metros) no período de janeiro a julho de 2009, ambos pertencentes à Universidade Federal de Alagoas.

3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO: COLETA DAS SEMENTES E PREPARO

As sementes de graviola foram coletadas em frutos procedentes de cultivos orgânicos, sendo as estruturas vegetais de onde se obteve os frutos encaminhados à confirmação taxonômica no Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA). A qual foi identificada, registrada e uma exsicata foi depositada na coleção do herbário do referido instituto, com o número de registro (MAC34903). As sementes após a secagem em estufa com circulação e renovação de ar (A), foram trituradas em moinhos de facas rotativas(B) e, em seguida, submetidas à extração por percolação a frio, utilizando-se como solvente o hexano(C). O solvente foi evaporado em aparelho de rotavapor sob pressão reduzida(D) (FIGURA 4).



FIGURA 4 - Etapa do preparo do extrato vegetal no CECA/UFAL (A e B) e Laboratório de Química/UFAL (C e D). Secagem das estruturas vegetais em estufa a 40-45°C (A); Trituração em moinho de facas (B); Filtragem (C); Rota evaporador (D). Etapas realizadas no período de Janeiro de 2009.

3.2. OBTENÇÃO E PRODUÇÃO DE ISOLADO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO.

Foi utilizado o isolado Fitossan 4 de *M. anisopliae* obtido do carrapato-dos-bovinos, *R. (B.) microplus* e pertencente a micoteca do Laboratório da Fitossan – Assistência Fitossanitária e Controle Biológico Ltda, onde era conservado em temperatura de 6 ± 2 °C em tubos de vidro com meio de cultura composto por Batata-Dextrose-Ágar mais o antibiótico sulfato de estreptomicina (BDA + A) e óleo Nujol[®]. Por ocasião dos experimentos, o isolado foi repicado e multiplicado em BDA + A, previamente autoclavado a 120 °C por 20 minutos. Este foi repicado para placas de Petri contendo BDA + A e colocado em estufa incubadora BOD a 26 ± 1 °C, fotofase de 12h, permanecendo durante sete dias. Após este período, este foi multiplicado em tubos de ensaio contendo meio de cultura de arroz, previamente autoclavados a 120 °C por 30 minutos, os quais permaneceram em estufa incubadora BOD, nas condições anteriormente referidas pelo período de 14 dias, obtendo-se após esse período o material necessário para os testes. As suspensões foram preparadas a partir dos tubos contendo meio de cultura com os entomopatógenos, adicionando-se 100 mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween 80 a 0,01% (ADE +E). As suspensões foram aferidas mediante quantificação em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico, sendo posteriormente ajustadas para 10^8 conídios. mL⁻¹. A viabilidade do isolado foi avaliada utilizando-se duas placas de Petrii contendo BDA+A. Nas placas foram colocados 0,1 mL da suspensão correspondente a 10^8 conídios mL⁻¹, espalhando-se com alça de Drigaslky. As placas foram incubadas em câmara climatizada tipo BOD a 26 ± 1 °C e 12 h de fotofase por 24 h. As leituras foram efetuadas em microscópio óptico mediante a determinação do percentual de conídios germinados e não germinados, contando-se 100 conídios por placa 24 h após o plaqueamento, totalizando 200 conídios em cada avaliação. A viabilidade dos conídios deverá ser superior a 95%.

3.3. MONTAGEM DO BIOENSAIO: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO EXTRATO DE SEMENTES DE GRAVIOLA E DO FUNGO

Foram utilizadas doze vacas leiteiras de raça Holandesa, da fazenda São Luiz, pertencentes à Universidade Federal de Alagoas (UFAL) isentas de tratamento químico por aproximadamente dois meses, apresentando cada animal carga parasitária similar. Cada grupo foi composto por quatro animais, constituindo-se cada um deles em uma repetição. Após este período realizou-se a pulverização nos animais, sendo o grupo controle tratado com 4 L de água destilada adicionada a 1,2 L de DMSO e os grupos tratados com 4 kg do fungo Fitossan 4 *M. anisopliae* (10^8 conídios.mL⁻¹), diluídos em 4 L de água destilada e 4,2 L de uma solução a 1% (peso/volume) do extrato de semente de *A. muricata* diluído em água e DMSO a 1% (peso/volume), sendo esta quantidade preparada individualmente para cada animal(Figura 5). Após 24 horas foram feitas as coletas das fêmeas ingurgitadas nos bovinos, de forma aleatória, sendo retiradas 30 fêmeas por animal totalizando 120 fêmeas por grupo.



FIGURA 5 - Pulverização do animal.

As fêmeas foram levadas ao Laboratório de Entomologia do CECA/UFAL, sendo colocadas em placas de Petri, cinco fêmeas por placa e em seguida pesadas para avaliação (Figura 6).



FIGURA 6 - Fêmeas de *R. (B). microplus* condicionada em placas de Petri. No período de março a junho de 2009 no Laboratório de Entomologia CECA, UFAL.

3.4. AVALIAÇÕES DAS DUAS FORMAS DE CONTROLE (MICROBIANO E EXTRATO).

O peso médio de fêmeas, o índice de conversão em ovos (peso da massa de ovos/peso do grupo de fêmeas x 100) e o percentual de eclodibilidade que foi obtido pelo método de escala de notas (Tabela 1).

O percentual de controle foi calculado segundo as fórmulas descritas por Davey et al. (2001) e a percentagem de eclodibilidade segundo escala de notas (tabela 1) de Broglio-Micheletti et al. (2009):

$$\text{Eficiência do Produto} = \frac{\text{ER (testemunha)} - \text{ER (tratado)}}{\text{ER (testemunha)}}$$

$$\text{Eficiência Reprodutiva (ER)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas colhidas} \times \text{peso da postura} \times \% \text{ eclosão}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas amostra}}$$

TABELA 1 – Escala de notas e percentagem de eclodibilidade de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).

Escala de notas	Intervalo de porcentagem
0	0
1	1 – 25
2	25 – 50
3	50 – 75
4	75 – 100

3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Todos os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A estatística foi realizada utilizando-se as ferramentas do programa Sisvar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. MORTALIDADE

Constatou-se nos testes realizados *in vivo* que o extrato hexânico de *A. muricata* a 1% matou 25,60% \pm 0,08 das fêmeas ingurgitadas, diferindo do *M. anisopliae* Fitossan 4 (10^8 conídios. mL⁻¹) com 36,66% \pm 0,07, sendo que na testemunha a mortalidade foi de 22,41% \pm 0,07, que diferiu apenas do fungo (Tabela 2).

TABELA 2 – Médias¹ \pm (EP) da mortalidade das teleóginas, índice de conversão em ovos, peso dos ovos, porcentagem de eclodibilidade, e eficiência do produto em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) após a utilização do extrato hexânico de *Annona muricata* L.e do fungo *Metarhizium anisopliae*. Bioensaio realizado no Laboratório de Entomologia do CECA/UFAL.

Tratamento	Mortalidade (%)	IOC (%)	Peso dos ovos (mg)	Eclodibilidade (%)	Eficiência do Produto (%)
Testemunha	22,41 \pm 0,07a	50,91 \pm 1,60a	47,87 \pm 1,93a	83,41 \pm 3,58a	-
<i>M. anisopliae</i> 10 ⁸ conídios. mL ⁻¹	36,66 \pm 0,07b	32,25 \pm 1,99b	33,83 \pm 2,63b	58,33 \pm 4,47b	53,62 \pm 6,23 a
Extrato A. <i>muricata</i> 1%	25,60 \pm 0,08a	33,66 \pm 2,27b	41,75 \pm 2,56ab	68, 29 \pm 4,33b	42,20 \pm 6,14 a
C. V(%)	27,30	24,36	27,94	28,42	61,14

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p < 0,05).

CV – Coeficiente de Variação

IOC | índice de conversão em ovos

Em relação ao controle microbiano, Bahiense et al. (2007) trabalhando com *M. anisopliae* em testes com animais estabulados verificaram que houve um percentual médio de mortalidade de 33% no grupo tratado com suspensão do fungo ESALQ-959, isolado de cigarrinha-das-pastagens, na concentração de $8,0 \times 10^8$ conídios. mL⁻¹ e 0,1% de espalhante adesivo Tween 80 em relação ao grupo controle (água e 0,1% de espalhante adesivo Tween 80). Esses mesmos autores verificaram que no geral, o índice de produção de ovos se apresentou menor no grupo tratado do que no não tratado.

Em contrapartida, quando os testes foram realizados *in vitro*, a mortalidade foi maior como relataram Chungsamarnyart et al., 1990, que verificaram que extratos

alcoólicos de sementes de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) nas concentrações de 2%, 5% e 10% mataram 92,5%, 100% e 100% das teleóginas, respectivamente, 48 horas após a imersão. Dessa mesma forma, BROGLIO-MICHELETTI et al. 2009a,b observaram *in vitro* que o extrato de semente de graviola a 1% e 2%, respectivamente, matou 100% de fêmeas ingurgitadas.

A diferença nos resultados (*in vivo/in vitro*) pode estar relacionada à sensibilidade do entomopatógeno e dos extratos aos fatores climáticos, tais como temperatura, umidade relativa e luminosidade, que podem ter interferido no desempenho dos tratamentos.

4.2. ÍNDICE DE CONVERSÃO EM OVOS

Os resultados do índice de conversão em ovos indicaram que houve interferência do fungo *M. anisopliae* (10^8 conídios. mL⁻¹) e do extrato hexânico de *A. muricata* 1% no desenvolvimento das fêmeas ingurgitadas, causando uma diminuição na oviposição, diferindo da testemunha com grau de significância de $P < 0,05$ (Tabela 2). Com relação à eficácia de conversão, o fungo apresentou valor médio de 32,25% \pm 1,99, o extrato 33,66% \pm 2,27 e a testemunha 50,91% \pm 1,60.

De acordo com Athayde et al. (2006), a ação de diferentes concentrações (10^4 a 10^8 conídios. mL⁻¹) do fungo *M. anisopliae* variedade *acridum* sobre a eficiência reprodutiva média de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* revelou que à medida que se aumentou a concentração de conídios houve diminuição do índice médio de produção dos ovos. Borges et al. (2003), verificaram os efeitos *in vitro* de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e constataram que os extratos, nas concentrações de 0,015% a 0,25%, não mataram as fêmeas adultas, mas inibiram parcial ou totalmente a produção de ovos e a embriogênese.

4.3. PESO DOS OVOS

O peso médio da massa de ovos obtido no grupo tratado com o fungo foi de 33,83 \pm 2,63 mg, diferindo em relação à testemunha, que teve o valor igual a 47,87 \pm 1,93 mg. Já o extrato com o peso médio de 41,75 \pm 2,56 mg, não apresentou diferença significativa em relação à testemunha (Tabela 2). Athayde et al (2006), verificaram que a menor massa de ovos colocada pelas fêmeas do *R. (B.) microplus* foi obtida quando se

utilizou o *M. anisopliae* 10^8 conídios. mL⁻¹, afirmando que à proporção que se aumentava a concentração de conídios houve diminuição no peso dos ovos. BROGLIO-MICHELETTI et al. 2009a,b relataram em observações *in vitro* que o extrato de semente de graviola a 2% e 1%, respectivamente, afetaram a oviposição com produção de 0,03g e 0,04g de ovos, com esses valores sendo semelhantes aos obtidos no ensaio em estábulo. CATTO et al. (2009) trabalhando *in vitro* com diferentes extratos de plantas no controle do carrapato bovino obtiveram que o extrato do lenho da raiz de *Annona dioica* L. (Annonaceae) na concentração de 2,5% diminuiu significativamente a produção de ovos, chegando a próxima de zero, em concentração de 20% .

4.4. ECLOSÃO LARVAL

Pode-se observar que tanto o fungo quanto o extrato hexânico da *A. muricata* a 1% tiveram efeito bastante significativo em relação à eclosão, ocasionando $58,33 \pm 4,47$ % e $68,29 \pm 4,33$, respectivamente, na eclosão das larvas do carrapato *R. (B.) microplus*, diferindo estatisticamente da testemunha que teve $83,41\% \pm 3,58$ de eclosão.

Segundo Melo et al. (2006), houve uma diferença significativa no período médio de eclosão das larvas do carrapato quando utilizaram como tratamento os isolados E9 e 319 de *M. anisopliae* com as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL⁻¹; constatando-se também que quando aplicaram o *M. anisopliae* 10^8 conídios/mL⁻¹, foi maior o período médio de eclosão. Para BROGLIO-MICHELETTI et al. 2009a,b, não houve eclosão larval quando se utilizou o extrato da semente da graviola a 1% e 2% em testes *in vitro*.

4.5. EFICIÊNCIA DO PRODUTO

Em relação à eficiência do produto, pode-se afirmar que o isolado *M. anisopliae* Fitossan 4 (10^8) conídios/mL⁻¹ e o extrato de *A. muricata* apresentaram, respectivamente, $53,63 \pm 6,23$ % e $42,20 \pm 6,14$ % de eficiência no controle do carrapato bovino (Tabela 1).

Basso et al. (2005) controlaram a infestação de carrapatos em pastagens artificialmente infestadas. A aplicação do fungo *M. anisopliae* ($1,8 \times 10^8$ conídios. mL⁻¹) antes ou após a infestação da pastagem com fêmeas ingurgitadas, ou após a eclosão das larvas, teve efeito na ação do patógeno.

Catto et al. (2009) estudaram as eficiências acaricidas de extratos de *Annona dioica* St. Hil (Annonaceae) (lenho da raiz) nas concentrações de 2,5%, 5% e 20%, em bioensaios para controle do carrapato bovino *in vitro* obtendo respectivamente, 91,81%, 95,15% e 98,67% em contrapartida em concentração abaixo de 1% foi pouco eficiente. Os mesmos autores trabalhando com as mesmas concentrações citadas anteriormente, porém, para casca da raiz obtiveram 32,12%, 55,93% e 71,40% de eficiência. Para BROGLIO-MICHELETTI et al. 2009a,b com o extrato das sementes de *A. muricata* L. a 1% e 2%, respectivamente, obteve-se 100% de eficiência de controle em testes de imersão em laboratório.

Este estudo foi uma continuidade de pesquisas anteriores realizadas em *in vitro*, no qual o extrato das sementes de *A. muricata* L e do isolado Fitossan 4 de *M. anisopliae* (10^8 conídios.mL⁻¹) obtido do carrapato-dos-bovinos se mostraram mais eficientes no controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Através de informações fornecidas pelo vaqueiro da propriedade, foi observado que após a aplicação dos produtos houver uma diminuição na população de carrapatos após o período de aplicação, dando-nos a oportunidade de novos trabalhos como a avaliação do efeito residual destes produtos sobre o ambiente.

4. CONCLUSÃO

O extrato hexânico de *A. muricata* 1% e o isolado *M. anisopliae* Fitossan 4 (10^8) conídios/mL⁻¹, são potencialmente úteis para o controle de *R. (B.) microplus* em aplicação em animais estabulados, interferindo no ciclo biológico de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-MENEZES, E.L. **Inseticidas Botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p.58 (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 205), 2005.

ALALI, F.Q.; LIU, X.-X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, p.504-40, 1999.

ALMEIDA, E. R. **Plantas Medicinais Brasileiras, Conhecimentos Populares e Científicos.** São Paulo: Hemus Editora Ltda., 1993, p.343.

ALVES-BRANCO, F. de P. J. PINHEIRO, A. da C., SAPPER, M. de F. M., MERCIER, P., WHITE, C. R. Eficácia comparativa de quatro endectocidas sobre infestações naturais por *Boophilus microplus* em bovinos. **A Hora Veterinária**, ano 19, n.111, set/out., 1999.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos.** São Paulo: Manole, 1986, 407p.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 289 p.

ARENALES, M. C. **Comparando homeopatia veterinária com medicina convencional no controle de ecto e endoparasitas.** São Paulo: [s.n.], 1998. 26p.

ATHAYDE, A, C, R; REIS, R, S; BITTENCOURT, V.R.E.P. **Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*.** Agropecuária Científica no Semi-árido, Patos, v.2, n.1, set – dez 2006.

BACCHI, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I. da C.; PERINOTTO, W. M. de S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação do potencial de controle biológico de *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.4, p.243-245, 2007.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W.H. Natural Plant Chemical: Sources of Industrial and Medicinal Materials. **Science**, v.228, p.1154-60, 1985.

BASSO, L.M. de S.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M.A. de A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M.V.; MOCHI, D.A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.6, p.595-600, jun. 2005.

BITTENCOURT, V.R.E.P. Controle Biológico. In: MELO I. S.; AZEVEDO. J, L. **Controle biológico de carrapatos**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2000, cap. 4, p.145-175.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J. de; PERALVA, S.L.F.S.; REIS, R.C.S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1883) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.2, p.78-82, 1999.

BORGES, L. M. F.; FERRI, P.H.; SILVA, W.J.; SILVA, W.C.; SILVA, J.G. In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17, p.228-231, 2003.

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; DIAS, N.da S.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A. de; LOPES, D.O.P.; SANTOS, J.M. dos. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.46-50, 2010.

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.de; DIAS, N.da S.; GIRÓN-PÉREZ, K.; TRINDADE, R.C.P. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) com extractos vegetales. **Revista Colombiana de Entomología**, v.35, n.2, p.145-149, 2009b.

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.de; DIAS, N.da S.; ARAÚJO, A.M.N.de. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.44-48, 2009a.

BULLMAN, G.M.; MUÑOS CABENAS, M.E.; AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinaria Argentina**, v.8, p.3-15, 1996.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v.19, n.1, p.73-82, 1997.

CALDAS, F. Carrapato: a vez do combate personalizado. **Revista Balde Branco**. Ano XXXIX. Nº474 Abril 2004. 82p.

CATTO, J.B.; BIANCHIN, I.; SAITO, M.L. **Efeito acaricida *in vitro* de extratos de plantas do pantanal no carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, MS, 2009. 26p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 26).

CAVÉ, A.; CORTES, D.; FIGADERE, B.; HOCQUEMILLER, R.; LAPREVOTE, O.; LAURENS, A.; LEBOEUF, M. Recent advances in the acetogenins of Annonaceae. Plenum Press. v.27, p. 167-202, 1993.

CAVÉ, A.; CORTES, D.; FIGADERE, B.; LAURENS, A.; PETTIT, G.R. Progress in the chemistry of organic natural products. **Wien: Springer-Verlag**. v.70, p. 330, 1997.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Science and Technology*, v. 10, n. 4, p. 357-384, 2000.

CHUNGSAMARNYART, N.; JIWAJÍNDA, S.; JANSAWAN, W. Effects of crude extracts on the cattle tick (*Boophilus microplus*) insecticidal action 1. **Kasetsart Journal Natural Science**, v.24, p.28-31, 1990. Supplementary.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária, 1997. 176p.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas - **Acta Biologica Leopoldensia**. v.26, p. 173-185, 2004.

Esquema de fase parasitária e não parasitaria do carrapato bovino. Disponível em: http://www.unitins.br/ates/arquivos/pecu%C3%A1ria/bovinocultura/ecto%20e%20endo%20parasitas/Carrapato%20-%20Ciclo%20de%20Vida_arquivos/ciclobm.jpeg [acesso em 16 de dezembro de 2010]

FARIAS, N.A.R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Rio Grande do Sul: Editora Agropecuária. 1995.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4.ed. São Paulo: Ícone, p.607, 2004.

Fruto da Gravioleira. Disponível em: <http://www.lojavidanatural.com.br/image/cache/data/1/graviola-450x450.jpg> [acessado em 16 de dezembro de 2010]

FURLONG, J. Carrapatos dos bovinos: conheça bem para controlar melhor. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, (Circular Técnica nº 46), p.21, 1998

FURLONG, J., MASSARD, C. de A. Controle do carrapato dos bovinos. In: FURLONG, J. **Manejo sanitário, prevenção e controle de parasitoses e mamite em rebanhos de leite**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p.37-48.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R. de S. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Juiz de Fora: EMBRAPA-Gado de Leite, (Circular Técnica nº 59). p.25, 2000.

GARCIA, M.V. **Aplicação do Fungo *Metarhizium anisopliae* em Pastagem Visando o Controle do Carrapato *Boophilus microplus* em Bovinos**. 2008.23p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)-UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, São Paulo, 2008.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1513-1518, 2004.

GASPARIN, G. et al. Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v38 n.5, p.453-459, 2007.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 104p.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 103p.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

IANNACONE, J.; LAMAS, G. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, Turrialba, v.65, p.92-101, 2002.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* using the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, n.1, p.15-20, 1996.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos.** Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, p.9-33/74-61, 157p, 1998.

LEBOEUF, M. *et al.* The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, p.2783-813, 1982.

LIMA, W. S. Controle de endo e ectoparasitos e relação custo/benefício em novilhas de rebanhos leiteiros de Minas Gerais. **A Hora Veterinária**, ano 15, n.85, mai/jun., 1995.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; P´REZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.1, p.27-31, 2007.

MAGADUM, S.; MONDAL, D.B.; GHOSH, S. Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. **Parasitology Research**, v. 105 , n. 4 , p. 1085-1091, 2009.

MANICA, I. **Taxonomia, morfologia e anatomia.** Anonáceas: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, 1997. p. 20-35.

MELISSA, F.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A. P.; BARATTO, C. M.; KOGLER, V.; SILVA, da M. V.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, V.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Biotecnologia aplicada ao Controle Biológico Biotecnologia. **Ciência & Desenvolvimento**, nº 23 - novembro/dezembro 2001.

MELLO, D.R. de; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOSKIN, 1883, SOBRE O CARRAPATO *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.4, p.157-162, 2006.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A. do C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.2, p.109-112, 1998.

MORALES, S.; GARCÍA, C.M. Metodología para la evaluación del potencial insecticida de especies forestales. *Revista Facultad Nacional Agronomía*, v. 53, p.787-800, 2000.

MULLA, M.S.; SU, T. Activity and biological effects of neem products against arthropod of medical and veterinary importance. **Journal of American Mosquito Control**, v.15, n.1, p.133-152, 1999.

NUÑES, J.L.; MUÑOZ COBENAS, M.E.; MOLTEDO, H.L. **Boophilus microplus, la garrapata comun del Ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19p.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick of the *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n.2, p.245- 251, 2001.

QUEIROLO, M. T., PONTES, J. B. Avaliação de fluazuron no controle estratégico do carrapato *Boophilus microplus*. **A Hora Veterinária**, ano 15, n.88, nov/dez., 1995.

RAMIREZ, F. Projeto de estudo de factibilidade para el control de la garrapata em Costa Rica. Salud Animal - IICA. **Publicação científica** nº 1, 1982.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável - Universidade Católica Dom Bosco. **Revista Internacional de Desenvolvimento**, v.1, p. 43-50, 2001.

SCHRANK, A.; BASSANESI, M. C.; PINTO JR, H.; COSTA, S. V.; BOGO, M. R.; SILVA, M. S. N. (1993) Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metharhizium anisopliae*. *Ciência e Cultura*, v.45, p.200-205, 1993.

SILVA, W.C.; MARTINS, J.R.de S.; SOUZA, H.E.M.de; HEINZEN, H.; CESIO, M.V.; MATO, M.; ALBRECHT, F.; AZEVEDO, J.L. de; BARROS, N.M. de. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.164, 2-4, p.267-274, 2009.

SOARES, V.E.; SILVEIRA, D.M.; NUNES, T.L.S.; OLIVEIRA, G P.; BARBOSA, O.F; COSTA, A.J. da. In vitro analysis of the action of acaricides on *Boophilus microplus* strain take from dairy cattle from the north-east area of Sao Paulo State. **Semina-Ciências Agrárias**, v.22, n.1, p.71-75, 2001.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** 136:1779-1789.

ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. (1991) A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 57:299-310.

STORER, T.I. & USINGER, R.L. **Zoologia Geral**. São Paulo: Nacional, 6ª Edição, 1986. 816p.

VERÍSSIMO, C. J. **Controle biológico e alternativo do carrapato do boi**. São Paulo: APTA/SAA-SP, 2004, 3p.

VIVAN, M. P. **Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativo aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*)**. Florianópolis, 2005. 72p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E.; HORAK, I.G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae)** a guide to the brown ticks of the world. Cambridge, Cambridge University Press, 2000. p.643.