

Metarhizium anisopliae como agente de biocontrole do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Metarhizium anisopliae as a biocontrol agent of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*



Nayara Maria de Oliveira

Bióloga, graduanda do curso de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). e-mail: nayara@unipam.edu.br

Marília Luiza dos Reis Sousa

Graduanda do curso de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). e-mail: marilialrs@unipam.edu.br

Thays Stella Barcelos Dias

Agrônoma graduada pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Cleiton Burnier Oliveira

Agrônomo do Laboratório Farroupilha – Lallemand, Patos de Minas/MG

Ronnie Carlos Pereira

Agrônomo do Laboratório Farroupilha – Lallemand Patos de Minas/MG.
e-mail: ronniecp@unipam.edu.br

Alice Pratas Glycério de Freitas

Mestre em Administração de Empresas pelo Centro Universitário Salesiano de São Paulo. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade de São Paulo. Docente do curso de Medicina Veterinária UNIPAM. e-mail: alicepratas@unipam.edu.br

RESUMO: O presente trabalho objetivou avaliar o efeito *in vitro* de isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, coletadas aleatoriamente do corpo de bovinos naturalmente infestados da cidade de Patos de Minas. O bioensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Após a infecção foram observados os seguintes parâmetros biológicos: peso inicial das fêmeas ingurgitadas, período pré-postura, período de postura, peso da massa de ovos, período de incubação, peso residual das teleóginas. Não foi observada diferença estatística significativa no peso inicial e no peso final das fêmeas, no tempo de oviposição e sobrevivência. Quanto aos resultados de peso da massa total de ovos, o isolado I apresentou maior média (0,48±0,04a), seguido dos isolados III (0,46±0,05ab) e II (0,36±0,08bc), os quais apresentaram diferenças significativas quando comparados com o controle. Conclui-se que os isolados

de *M. anisopliae* nas condições de 27° C e 45% de umidade relativa do ar não reduziram o tempo de oviposição, a sobrevivência das teleóginas de *Boophilus microplus* e o peso da massa de ovos índice de produção de ovos.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico. Fungos. Entomopatógenos. Artrópodes.

ABSTRACT: The present work aimed to evaluate fungi *in vitro* effect of isolates of the fungi *Metarhizium anisopliae* on engorged females of *Boophilus microplus* collected at random from the body of naturally infested cattle of the city of Patos de Minas. The bioassay was performed in a completely randomized design with five replicates. After the infection, were analyzed the following biological parameters: initial weight of engorged females, pre-posture period, posture period, egg mass, incubation period, residual weight of the telegynge. No significant statistical difference was observed in the initial weight and the final weight of the females, in the time of oviposition and survival. Regarding the weight results of the total egg mass, isolates I had the highest mean ($0.48 \pm 0.04a$), followed by isolates III ($0.46 \pm 0.05ab$) and II ($0.36 \pm 0.08bc$), that showed significant differences when compared to the control. It was concluded that the isolates of *M. anisopliae* at conditions of 27° C and 45% of relative humidity did not reduce the time of oviposition, the survival of *Boophilus microplus* telegynes, the weight of egg mass index egg production.

KEYWORDS: Control biological. Entomopathogenic fungi. Arthropods.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado um dos ectoparasitos de maior importância econômica na pecuária bovina brasileira. O rebanho bovino comercial do Brasil é o maior do mundo e determinante para a economia do país. O estado de Minas Gerais é um polo de produção leiteira no Brasil e sofre as consequências da alta prevalência desse ectoparasito (ABIEC, 2016).

O carrapato é o principal agente causador de infestações por artrópodes em bovinos e é responsável por sérios prejuízos econômicos na pecuária bovina, como redução na produção de leite, carne e couro, perda de peso e estresse, além de maiores gastos com medicamentos e animais que vão a óbito quando não são tratados corretamente (KISS *et al.*, 2012).

No Brasil destacam-se dois gêneros de grande importância: o protozoário *Babesia*, espécies *Babesia bovis* e *B. bigemina*, e a rickettsia, da espécie *Anaplasma marginale*, responsáveis pelo complexo denominado “tristeza parasitária bovina” (TPB), que revela ser um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento da pecuária bovina nacional (GARCIA, 2008).

Atualmente, o controle do carrapato é baseado principalmente no emprego de acaricidas químicos aplicados com o objetivo de extinguir as fases parasitárias que infestam os animais (FRANCO, 2000). Contudo, ao longo dos anos, muitos carrapatos foram capazes de sobreviver à maioria dos produtos químicos utilizados para o seu controle, fenômeno denominado de resistência.

A aplicação dos produtos de forma incorreta, com dosagens inferiores às

recomendadas pelo fabricante, talvez seja uma das situações mais relevantes para o aparecimento de resistência em populações de carrapatos (FAO, 2004).

Alternativas aos produtos químicos são pesquisadas, devido aos grandes custos gerados aos pecuaristas, bem como danos ao meio ambiente e à saúde humana. O controle biológico de pragas baseados no uso de fungos entomopatogênicos tem sido uma alternativa promissora, pois além de utilizar mecanismos naturais de combate, apresenta grandes vantagens quanto ao impacto ambiental, aos custos, à especificidade e ao não desenvolvimento de resistência (ALVES, 1998b, SHAH; PELL, 2003, SAMISH *et al.*, 2004).

O controle biológico possui diversas vantagens quando comparado ao controle clássico utilizando produtos químicos. O baixo impacto ambiental gerado, o baixo risco em seu manuseio, os custos reduzidos e principalmente uma maior especificidade em relação ao agente-alvo são exemplos dessas vantagens. Dentre os métodos estudados está a utilização de fungos entomopatogênicos, o que parece ser uma alternativa eficiente e segura. Entre fungos entomopatogênicos avaliados para controle de carrapatos, encontra-se *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* como os mais patogênicos, causando mortalidade para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000).

As pesquisas utilizando microrganismos para o controle do carrapato ainda se encontram em caráter inicial, e vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo de infecções experimentais por fungos e constatado resultados satisfatórios, em diferentes espécies de carrapatos com diferentes isolados fúngicos, principalmente em testes em condições laboratoriais (BITTENCOURT *et al.*, 1997, COSTA *et al.*, 2002, REIS *et al.*, 2004).

O *Metarhizium anisopliae* tem sido bastante utilizado no controle biológico de insetos e pragas da agricultura e no controle de artrópodes, nos últimos tempos. As pesquisas que avaliam o potencial biocontrolador de vetores de doenças animais são frequentes, merecendo destaque o carrapato, que foi amplamente estudado em ensaios de laboratórios. A eficácia do fungo no controle de várias espécies como *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi comprovada, tornando-se um potencial alternativo ao controle químico e demonstrando elevada mortalidade em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas (KAAYA *et al.*, 1996; MONTEIRO *et al.*, 1998; BITTENCOURT *et al.*, 1999; PAIÃO *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2007).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* de isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em condições de laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), sob o protocolo nº

33/17. O estudo foi realizado nos Laboratório de Genética e Biotecnologia e no Laboratório de Parasitologia Animal do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Cada unidade experimental foi composta por um grupo de dez teleóginas acondicionadas em uma placa de Petri de vidro estéril com 90 milímetros de diâmetro.

Os isolados de *M. anisopliae* utilizados no experimento foram cedidos por um Laboratório da cidade de Patos de Minas, MG. Os fungos foram produzidos em placas de Petri em meio de cultura BDA acidificado (pH 4,0) em estufa de crescimento com temperatura de 25° C por um período de 10 dias. Após esse período, foi preparada uma suspensão de conídios para a utilização do experimento.

Para a realização do bioensaio, foram coletadas 200 fêmeas ingurgitadas (teleóginas) aleatoriamente do corpo de bovinos naturalmente infestados, no período vespertino, e acondicionadas em um recipiente limpo, lacrado, com orifícios para entrada de ar e papel umedecido com água forrando o fundo do recipiente.

Em seguida, as teleóginas foram armazenadas na parte inferior da geladeira por 24 horas, para que a temperatura baixa retardasse o processo de oviposição até o dia seguinte, quando foi realizado o primeiro bioensaio.

Antes de receber os tratamentos, as teleóginas foram lavadas em água corrente, em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos para assepsia da cutícula, lavadas em água destilada estéril e secas em papel toalha. Em seguida, as fêmeas foram separadas em grupos de dez, pesadas em uma balança analítica.

A metodologia utilizada para o tratamento das fêmeas ingurgitadas foi a mesma utilizada por Camargo *et al.* (2012). Os tratamentos foram compostos por três isolados de *M. anisopliae* (isolado I, isolado II e isolado III) e um por grupo controle.

Os grupos de teleóginas de cada tratamento foram colocadas em um tecido de tela Voal e imersas por três minutos na suspensão previamente preparada com cada isolado na concentração de 1×10^8 conídios/mL e Tween 80 a 0,1% (agente tensoativo não iônico e emulsionante, estabilizante) (Figura 1-II e II). O grupo controle foi imerso em solução de água destilada estéril e Tween 80 (0,1%).

Decorrido esse período, as fêmeas foram colocadas sobre papel-toalha e fixadas em placa de Petri estéril sobre fita adesiva dupla face. Para facilitar a coleta das posturas, as fêmeas foram fixadas em decúbito dorsal (Figura 1-III e IV).

Após identificação, as placas com as teleóginas foram colocadas em estufa tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) mantidas à temperatura de $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias. O bioensaio foi diariamente observado e a massa de ovos de cada unidade experimental foi coletadas por um período de 15 dias e transferidas para tubos de falcon vedados com algodão hidrófilo umedecidos em óleo de cozinha, para evitar a possível saída de larvas eclodidas no período de incubação e período de eclosão (Figura 1-V e VI). Estes foram mantidos em posição vertical na estufa por 31 dias nas condições de temperatura de $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ para o acompanhamento dos parâmetros relativos a esta fase evolutiva.

Após o término do período de 15 dias de postura, foram registradas a mortalidade das teleóginas, o peso da massa de ovos e o peso residual de cada unidade experimental. Em seguida, as teleóginas foram transferidas para outras placas de Petri esteril, para se observar diariamente o crescimento fúngico e suas respectivas características macro e microscópicas com o auxílio de um microscópio eletrônico.

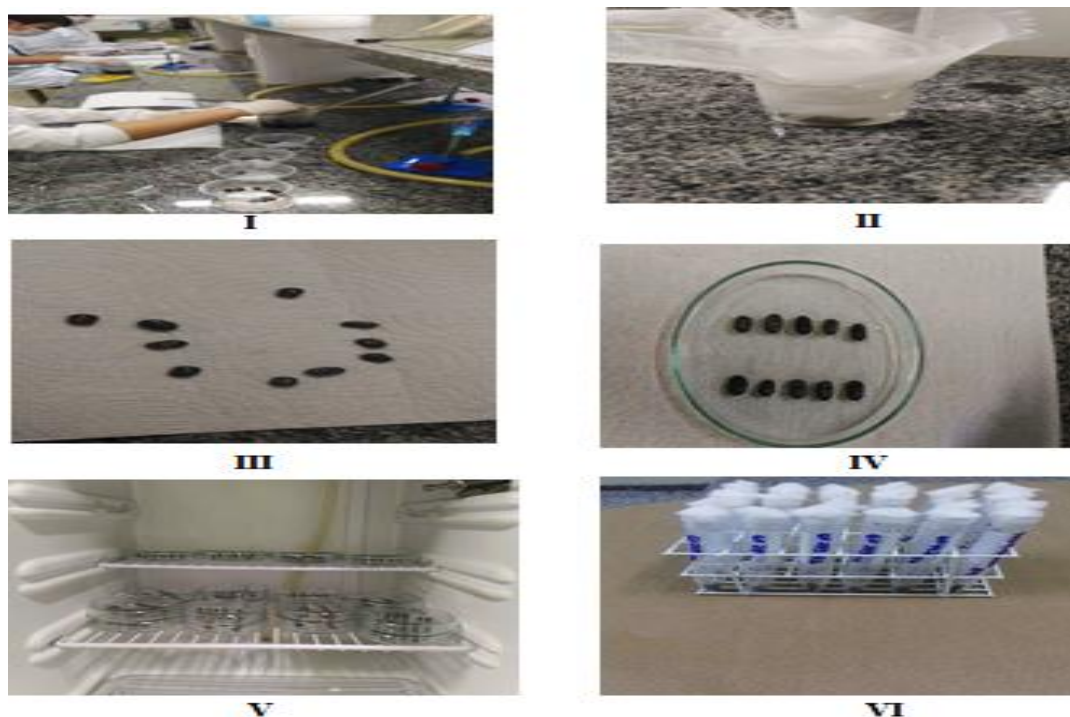


Figura 1: Montagem do Bioensaio dos tratamentos dos isolados de *Metarhizium anisopliae* e do tratamento controle. I- imersão das fêmeas na suspensão dos tratamentos com os isolados na concentração de 1×10^8 conídios/ml e Tween 80 (0,1%). II- imersão do tratamento controle em solução de água destilada esteril e Tween 80 (0,1%). III- Fêmeas em processo de secagem depois da imersão. IV- fixação das fêmeas em fita adesiva dupla face. V- placas em estufa tipo BOD mantidas a temperatura de 27° C. VI- Tubos de Falcon com as massas de ovos coletadas diariamente vedados com algodão em óleo de cozinha. Patos de Minas-MG, 2017.

Em cada placa de Petri, foi colocado um pequeno pedaço de algodão umedecido com água esteril para proporcionar condições de esporulação dos fungos. Para avaliação dos efeitos do *Metarhizium anisopliae* sobre as teleóginas, foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: peso inicial das fêmeas ingurgitadas, período pré-postura, período de postura, peso da massa de ovos, período de incubação, peso residual das teleóginas (determinado três dias após o término da postura).

A partir dos dados coletados foram avaliados os índices de produção de ovos (IPO), e o índice nutricional (IN) segundo a metodologia de Bennett (1974):

$$\text{IPO} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (g)} \times 100}{\text{Peso inicial das teleóginas antes de iniciar a postura (g)}}$$

$$\text{IN} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (g)} - \text{peso residual das fêmeas} \times 100}{\text{peso inicial das teleóginas antes de iniciar a postura (g)}}$$

Para a análise dos resultados, foram utilizadas planilhas tabuladas no programa Windows Excel® 2016. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ao nível de 5% de significância ($\leq p 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oviposição das teleóginas iniciou-se no quarto dia após o início do bioensaio e permaneceu até o décimo quinto dia. O tempo médio de sobrevivência delas foi de 12,4 dias. Não foi verificada diferença estatística entre os grupos quanto ao tempo de oviposição e sobrevivência (Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão do tempo de oviposição, tempo de sobrevivência (dias), peso inicial das fêmeas (g), peso residual das fêmeas (g), peso da massa total de ovos (g), índice de produção de ovos (IPO). Patos de Minas, MG, 2017.

Tratamentos	Tempo Oviposição (d)	Tempo Sobrevivência (d)	Peso Inicial Fêmeas (g)	Peso Final Fêmeas (g)	Peso Massa total de ovos (g)	IPO
Controle	9,36 \pm 0,88a	12,4 \pm 1,21a	2,02 \pm 0,07	0,36 \pm 0,08	0,34 \pm 0,05c	16,87 \pm 3,08a
Isolado I	9,08 \pm 0,99a	12,2 \pm 0,94a	2,15 \pm 0,26	0,45 \pm 0,09	0,48 \pm 0, 04a	22,56 \pm 3,32a
Isolado II	8,08 \pm 1,05a	12,1 \pm 0,67a	1,79 \pm 0,16	0,31 \pm 0,04	0,36 \pm 0,08bc	20,07 \pm 5,09a
Isolado III	8,18 \pm 0,85a	12,4 \pm 0,80a	2,02 \pm 0,16	0,38 \pm 0,05	0,46 \pm 0,05ab	22,65 \pm 1,63a

Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. (d) = dias

(g) = gramas

IPO= Índice de Produção de Ovos

Os dados corroboram com os de Bittencourt (1999), quando utilizou o *M. anisopliae* sobre *B. microplus* e não verificou diferença significativa para o período de postura entre os tratamentos. Bittencourt *et al.* (1994b), em seus estudos, obser-

varam que a duração do período de postura está relacionada com a morte das fêmeas pela ação do fungo *M. anisopliae*, e que os tratamentos aplicados em suas pesquisas não foram capazes de antecipar a morte das fêmeas e também o tempo de postura.

Bennett (1974) observou que, sob a mesma temperatura, fêmeas maiores e mais pesadas encerram a sua postura em um maior intervalo de tempo, porque possuem maior quantidade de nutrientes para converter em massa de ovos, e por isso, só terminam a postura depois das fêmeas menores.

Não foi observada diferença significativa no peso inicial e final das fêmeas, indicando uniformidade entre os grupos. Santos e Fulong (2002), em seus estudos, observaram que o peso da fêmea ingurgitada tem uma relação direta com o sucesso de sua fase de vida parasitária.

De acordo com Fulong (2002), o aumento da competição intraespecífica pode fazer com que haja uma diminuição no peso das fêmeas ingurgitadas. Consequentemente haverá também um menor grau de eficiência no processo de conversão do alimento ingerido em massa de ovos, e o potencial de oviposição de uma fêmea ingurgitada está diretamente relacionado à sua capacidade em alimentar.

A umidade relativa do ar durante o período de desenvolvimento do bioensaio foi de 45%, o que é considerada baixa para o desenvolvimento do fungo. Melo *et al.* (2006), Bittencourt *et al.* (2003) e Bahiense *et al.* (2007) relataram que os carrapatos deverão ser mantidos em estufa tipo B.O.D, com a umidade relativa do ar acima de 70% para realizarem postura. Acredita-se que este seja o principal fator da ineficácia dos isolados no período de sobrevivência das fêmeas: tempo de postura e índice de produção de ovos no presente estudo conforme (tabela 2).

Para os resultados de tempo de sobrevivência do carrapato, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Foram observados 100% mortalidade das teleóginas no décimo oitavo dia de bioensaio. Bittencourt (1992) observou que as fêmeas de carrapatos *Hyalomma scupense* e *Dermacentor marginatus*, morriam antes ou logo após o término da postura, fato também observado no presente trabalho em algumas repetições do presente bioensaio avaliado.

Segundo Veríssimo (1991), na fase de vida livre, a fêmea ingurgitada apresenta primeiro um período de pré-postura de três dias e morre após a postura. Entende-se, portanto, que as fêmeas morrem rapidamente após a oviposição. As teleóginas sobrevivem *in vitro* por 36 horas após a oviposição.

Castro *et al.* (1997), em teste de estábulo (lugar coberto utilizado para abrigar o gado) com *M. anisopliae* e bovinos infestados com *B. microplus*, observaram uma escala crescente de suscetibilidade envolvendo adultos, larvas e ninfas do carrapato. As elevadas mortalidades observadas a partir do dia 24 demonstraram haver atuação nas infestações subsequentes ao tratamento, demonstrando assim um poder residual deste bioacaricida.

Foi observado o aumento da massa de ovos das teleóginas tratadas com os isolados de *Metarhizium* Isolado I e Isolado III (Figura 2 – Figura 3). Esse fato parece não estar relacionado com o peso inicial das teleóginas nem com tempo de sobre-

vivência, uma vez que todos os tratamentos foram estatisticamente iguais para estas variáveis. Este resultado difere dos trabalhos realizados por Bittencourt *et al.* (2003) Melo *et al.* (2006); Athayde *et al.* (2006), que mostram que a aplicação de *Metarhizium* reduz o peso da massa de ovos.

Figura 2: Massa de ovos do tratamento do Isolado I



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3: Massa de ovos do tratamento do Isolado III



Fonte: Elaborado pelo autor

Quanto aos resultados de peso da massa total de ovos, o isolado I apresentou maior média ($0,48 \pm 0,04a$), seguidos dos isolados III ($0,46 \pm 0,05ab$) e II ($0,36 \pm 0,08bc$). Ambos apresentaram diferenças significativas quando comparados com o controle conforme a (Tabela 2). O número de ovos depositados por fêmeas ingurgitadas, inoculadas na concentração de 1×10^8 conídios/mL, foi reduzido à medida que ocorria a mortalidade das teleóginas.

Athayde *et al.* (2006), em teste de patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var *acridum* em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, observaram que o peso médio nos grupos tratados diminuiu à proporção que se aumentava a concentração de conídios utilizada em relação aos grupos controle. Na concentração de 10^8 , o grupo tratado no presente trabalho apresentou a menor massa de ovos que foi de 97,40 mg, resultados que se assemelharam com os de Correia *et al.* (1998), que conseguiram uma redução de 52% da massa de ovos com *M. anisopliae* sobre *B. microplus*. O mesmo se repetiu nos trabalhos de Bittencourt *et al.* (1999), em teste de campo, com o mesmo fungo, sobre carrapatos de bovinos.

Não foi possível afirmar que o fato de o peso da massa de ovos ter aumentado a partir da aplicação dos isolados esteja associado à baixa umidade relativa durante o desenvolvimento do ensaio.

Estudos sobre o controle biológico de carrapatos do gênero *Boophilus* spp. com *M. anisopliae* demonstraram excelente atividade patogênica em condições ambientais com temperaturas entre 25° C e 28° C e umidade relativa entre 60% e 70% (KAAYA; HASSAN, 2000), ou temperatura média de 28° C e umidade relativa em torno de 85% (FRAZZON *et al.*, 2000). Os resultados obtidos e os encontrados pelos referidos autores indicam que o fungo é capaz de exercer a atividade patogênica sobre o carrapato em diferentes condições de temperatura e umidade. Quanto ao

controle biológico, este é um importante fator a ser considerado, pois um bom agente de controle deverá atuar em diferentes condições ambientais. Contudo, seria necessário repetir o ensaio do presente trabalho em condições ambientais de umidade relativa em torno de 85%, conforme vários estudos, uma vez que a umidade relativa da estufa foi apenas de 45%.

Para os resultados de Índice de Produção de Ovos (IPO) observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados conforme (Tabela 2). Bahienese *et al.* (2007) observaram em sua pesquisa uma redução no índice de produção de ovos no segundo dia após tratamento *M. anisopliae*.

Segundo Bittencourt *et al.* (1992), essas diferenças podem ser explicadas devido à alta sensibilidade deste entomopatógeno aos fatores climáticos, tais como umidade relativa e temperatura, afetando não só a virulência como também epizootias. Quando se trata de métodos de controle biológico, menores percentuais de controle são esperados, quando comparados aos métodos convencionais com produtos químicos. Deve-se ressaltar que essa diferença é compensada, pois o processo de controle biológico tem como objetivo manter a praga em níveis aceitáveis, além de preservar ao máximo o ambiente, com consequente preservação dos inimigos naturais dessa praga.

A aplicação de acaricidas biológicos para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* apresenta grandes desafios. Quando se trata de métodos de controle biológico, menores percentuais de controle são esperados, quando comparados aos métodos convencionais com produtos químicos. Deve-se ressaltar que essa diferença é compensada, pois o processo de controle biológico tem como objetivo manter a praga em níveis aceitáveis, além de preservar ao máximo o ambiente, com consequente preservação dos inimigos naturais dessa praga (BAHIENESE *et al.*, 2007).

As pesquisas utilizando microrganismos para o controle do carrapato ainda se estão em caráter inicial, e vários pesquisadores têm-se destinado ao estudo de infecções experimentais por fungos, verificando resultados satisfatórios em diferentes espécies de carrapatos com diferentes isolados fúngicos, principalmente em testes em condições laboratoriais (BITTENCOURT *et al.*, 1997, COSTA *et al.*, 2002, REIS *et al.*, 2004).

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que os isolados nas condições de 27° C e 45% UR não reduziram o tempo de oviposição, a sobrevivência das teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nem o peso da massa de ovos e o índice de produção de ovos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. "Produtos fitossanitários e entomopatógenos", in: Alves, S.B. (ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2nd ed. Piracicaba: FEALQ, p. 217-238, 1998a.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. "Produção de fungos entomopatogênicos", in: ALVES, S.B. (ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 853-857, 1998b.
- ALVES, S.B. *et al.* "Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina", in: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (ed.). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafio*. Piracicaba: FEALQ, cap. 8, p. 215-238, 2008.
- ARRUDA, W. *et al.* Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 37(2005): 231-244.
- ATHAYDE, A. C.R.; LIMA, E. A.L.A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. *Agropecuária Científica no Semiárido*, Patos, v. 2, n. 1, set./dez, 2006.
- BAHIENSE, T.C. *et al.* Evaluation of the biological control potential of *Metarhizium anisopliae* to ward *Boophilus microplus* in pen trials. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 16 (2007): 243-245.
- BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, 16 (1974): 52-61.
- BEYS DA SILVA, W. O. *et al.* The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. *Fungal Biol*, 114(11-12): 911-6, 2010.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. *Ação do fungo Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Itaguaí, 1992. 105p. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1992.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. *et al.* Avaliação da eficácia in vitro do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 6(1): 49-52, 1997.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus*, em condições experimentais. *Ciência Rural*, 29(2): 351-354, 1999.

- BITTENCOURT, V.R.E.P. "Controle Biológico", in: MELO, I. S.; AZEVEDO, J, L. *Controle biológico de carrapatos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000, p. 145-175.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. *et al.* Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12(1): 38-42, 2003.
- CAMARGO M.G. *et al.* Effect of oil-based formulations of entomopathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.*, 188 (2012): 140-147.
- CASTRO, A. B. A. *et al.* Eficácia *in vivo* do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Revista Universidade Rural: Série Ciências da vida*, 19(1-2): 73-82, 1997.
- COSTA, G.L. *et al.* Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* From *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brasil. *Mycopathologia*, 154(4): 207-209, 2002.
- FAO, 2004. Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. *Module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention*, p. 25-77.
- FRANCO, M. Vem aí a vacina contra o carrapato. *DBO Rural*, 19(235): 114-116, 2000.
- FRAZZON, A. P.G. *et al.* *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94 (2000): 117-25.
- 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*, 34(5): 1513- 1518, 2004.
- KAAYA G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma avariegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(3): 15-20, 1996.
- KISS, T; CADAR D.; SPÎNU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. *Vet Parasitol*, 187(2012): 357-366.
- LOPES, R. B. *et al.* Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16(1): 27-31, 2007.

MELO, D. R.D; REIS, R. C.S.; BITTENCOURT, V.R. E.P. Patogenicidade in vitro do fungo *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 15(4): 157-16, 2006.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A. 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*, 29(2): 109-112, 1998.

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*, 27(2): 245-251, 2001.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(6): 788-791, 2004.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. *Parasitology*, 129 (2004): 389-413.

SANTOS, A. P.; FURLONG, J. Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. *Cienc. Rural*, 32(6):1033-1038, 2002.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(2010): 1267-1274.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(2003): 413-423.

VERÍSSIMO, C. J. *Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato Boophilus microplus*. 1991. 170 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991.

VIEIRA. *Efeito do Fungo Metarhizium anisopliae em Associação ou não a Acaricida sobre cepa do carrapato Rhipicephalus microplus resistente a Acaricidas: ensaios em laboratório e a campo*. 2013. 97f. Dissertação de Mestrado em Ciências, Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.