

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**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**

Dissertação de Mestrado

ANELISE WEBSTER DE MOURA VIEIRA

Porto Alegre, Agosto de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**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**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, Agosto de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor RS e no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Curso de mestrado realizado com bolsa da CAPES.

“My strong advice to young researchers is to think in a truly multidisciplinary way and to go to institutes which can support this approach. Addressing a problem from different sides is essential. Good funding is not everything: I would also encourage young scientists to choose institutes where they can get good mentoring and be stimulated and challenged by faculty members who demonstrate true interest in their work. Importantly, treasure the value of central facilities, available to everyone and capable of supporting research beyond what a single laboratory can do. This kind of support raises the level of ambition and productivity of a young starting group more than any seemingly rich ‘start-up package’.”

Marino Zerial

(AKHTAR *et al.*, 2011)

“O otimista é um tolo. O pessimista, um chato. Bom mesmo é ser um realista esperançoso.”

Ariano Suassuna

“Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida.”

Confúcio (551 a.C. - 479 a.C.)

“Continuaremos!”

João Ricardo de Souza Martins

Dedico este trabalho

Ao meu marido, Ugo Araújo, pela amizade, companheirismo, carinho, força, paciência e amor.

À minha mãe, Maria Rita, ao meu irmão Fernando e a minha avó, Myrtem por tudo o que representam para mim. “Somos indissolúveis!”

Aos Mestres na arte da ciência e da vida, Dr. João Ricardo e Dr. José Reck por contagiarem-me com o seu amor pela pesquisa.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho foi possível a partir da interação entre os pesquisadores do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor RS (Dr. João Ricardo Martins e Dr. José Reck) e do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da UFRGS (Dra. Marilene Henning Vainstein e Dr. Augusto Schrank).

Ao meu orientador Dr. Augusto Schrank e à professora Dra. Marilene Vainstein pela oportunidade e confiança no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. João Ricardo Martins, exemplo de profissional e de ser humano. Por ter me acolhido em seu laboratório e ter o dom de me fazer acreditar que tudo tem o seu propósito e seu tempo e que a única coisa que nós podemos fazer é o nosso melhor sempre, que o “resto” vem.

Ao Dr. José Reck, fundamental neste trabalho, pessoa de caráter forte a quem eu admiro muito. Obrigada por todos os ensinamentos, por todos os “puxões de orelha” e por todas as palavras amigas.

Ao Dr. Walter Beys e Dra Lucélia Santi por terem sido meus “tutores” e terem me ensinado tudo o que eu sei sobre Controle biológico e *Metarhizium anisopliae*. Serei sempre muito grata por todos os momentos de discussão e decisões com relação à execução do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Fungos Filamentosos (Lab. 217) que apesar da pequena convivência sempre fizeram com que eu me sentisse parte da equipe. E aos colegas de outros laboratórios, pela convivência, aprendizado durante as disciplinas, pelas conversas de corredor, pelas risadas, pelos desabafos.

Ao Luciano e à Silvia, secretários do PPGBCM, por toda ajuda, paciência e eficiência.

A Dra Livia Kmetzsch revisora da redação científica, por todas as sugestões.

A todos do Instituto de Pesquisa Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) pelo apoio e oportunidade de realizar este projeto e ao Centro de Meteorologia do Rio Grande do Sul (CEMETRS) pela disponibilização dos dados meteorológicos.

A CAPES e ao CNPq pelo financiamento deste trabalho.

Aos membros da família “Laboratório de Parasitologia” do IPVDF. Por me ensinar o que é a ciência propriamente dita, mostrando-me o caminho para que eu pudesse apaixonar-me ainda mais por esta. Sou extremamente privilegiada por fazer parte desta equipe!

Ao Dr. Guilherme Klafke pela agradável convivência e ensinamentos diários.

Ao Dr. Prof. João Carlos Gonzalez, pela convivência e experiência passada.

Aos estagiários Ramon Scheffer e Rafael Vargas e ao senhor Gilmar Fialho que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao amigo Bruno Dall’Agnol, parceiro de todas as horas, pela convivência agradabilíssima, pela extrema competência em tudo o que se dispõe a fazer, pelo apoio, pela grande ajuda, pela força e pela paciência em ouvir meus desabafos.

Aos amigos que mesmo distantes sempre mandaram força e palavras de incentivo.

Ao meu amigo-irmão Marcelo Araújo, pelo apoio e incentivo.

Aos membros das famílias Webster, Moura, Vieira, Araújo e Passos pelo carinho, incentivo e apoio constante. À tia Simone Vieira, amiga sincera; pelo carinho e preocupação. Ao meu irmão, Fernando, pela cumplicidade e amor incondicional. À minha avó, Myrtem, meu maior exemplo de força e fé! Amo vocês!

À minha mãe, Rita Webster, meu orgulho, meu porto seguro, meu maior exemplo de mulher, de força, de coragem, de honestidade, de profissionalismo, e principalmente de SER HUMANO! Por você e para você: SEMPRE!

Ao meu marido, Ugo Araújo. Literalmente, meu anjo! Obrigada por todo amor e companheirismo. Esta vitória não seria alcançada se não estivesse do meu lado! TE AMO!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Características gerais do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
1.1.2 Biologia e importância econômica do carrapato <i>R. microplus</i>	15
1.1.3 Controle de carrapatos e resistência	18
1.2 Controle biológico	23
1.2.1 O fungo biocontrolador <i>Metarhizium anisopliae</i>	25
1.2.2 Processo de infecção	27
1.3 Compatibilidade entre o fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> e acaricidas comerciais	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Caracterização da suscetibilidade a acaricidas	32
3.2 Produção de conídios e suspensões	33
3.3 Testes <i>in vitro</i>	33
3.3.1 Compatibilidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> com acaricidas comerciais	33
3.3.2 Eficácia de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i>	34
3.3.3 Eficácia de <i>Metarhizium anisopliae</i> combinado com acaricidas comerciais sobre <i>Rhipicephalus microplus</i>	34
3.4 Ensaio a campo	34
3.4.1 Local do estudo	34
3.4.2 Bovinos	35
3.4.3 Tratamentos	36
3.5 Análise estatística	37
4. RESULTADOS	39
4.1 Identificação de cepa de <i>Rhipicephalus microplus</i> resistente a acaricidas químicos	39

4.2 Compatibilidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> com acaricidas comerciais	40
4.3 Eficácia de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i>	41
4.4 Ensaio a campo	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	55
7. PERSPECTIVAS	56
8. REFERÊNCIAS	57
9. ANEXOS	67
9.1 Manuscrito: <i>Rhipicephalus microplus</i> acaricide resistant strain: integrated control using <i>Metarhizium anisopliae</i> (an arthropod-pathogenic fungi) under field conditions	67
9.2 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IPVDF	91
9.3 <i>Curriculum vitae</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior
±	Mais ou menos
≈	Aproximadamente
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
°C	Graus Celsius
BPO	Butóxido de piperonila
CAPES	Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEMETRS	Centro de Meteorologia do Rio Grande do Sul
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
GABA	Ácido gama-aminobutírico
G	Grama
H	Hora
Há	Hectare
IE	Índice de eficácia (%)
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
IR	Índice reprodutivo
Kg	Quilograma
L	Litro
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
N	Norte
OF	Organofosforado
OIE	<i>Office International des Epizooties</i> , Organização Mundial de Saúde Animal
OP	<i>Organophosphate</i>
OS	Piretróide Sintético
Psi	“Pounds per square inch”
S	Sul
SP	<i>Synthetic Pyrethroid</i>
TL ₅₀	Tempo Letal para 50% da população
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UR	Umidade relativa
v/v	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Distribuição mundial de <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
Figura 2. Larvas do carrapato <i>R. microplus</i> no ápice de gramínea	16
Figura 3. Distribuição mundial de resistência de carrapatos a acaricidas	19
Figura 4. Fluxograma de desenvolvimento de resistência a acaricidas	22
Figura 5. Processo de infecção do fungo <i>M. anisopliae</i> em seus hospedeiros artrópodes pela pressão mecânica exercida pelo apressório e degradação da cutícula pela secreção de enzimas hidrolíticas	27
Figura 6. Processo de infecção no carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	28
Figura 7. Condições meteorológicas locais (Temperatura, Umidade relativa do ar e Precipitação) durante o período experimental (janeiro a julho de 2012)	35
Figura 8. Ensaios a campo: Pesagem dos animais, infestação experimental e contagem de fêmeas ingurgitadas	36
Figura 9. Tratamento dos bovinos a campo. Preparo da suspensão/solução e banho dos animais	37
Figura 10. Perfil de cepa de campo de <i>R. microplus</i> com características de resistência às principais classes de acaricidas químicos comercializados	40
Figura 11. Mortalidade de fêmeas do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de suspensões do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> .	43
Figura 12. Fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> infectadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> sete dias após o tratamento	43
Figura 13. Número de carrapatos <i>R. microplus</i> nos grupos tratados e controle	45
Figura 14. Porcentagem de eficácia dos tratamentos	46
Tabela 1. Espécies e estágios de carrapatos infectados por <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
Tabela 2. Perfil de suscetibilidade de cepas do carrapato <i>R. microplus</i> a diversas classes de acaricidas em amostras provenientes de campo no período de janeiro a dezembro de 2011	39
Tabela 3. Compatibilidade do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> com acaricidas comerciais	41
Tabela 4. Avaliação de LT ₅₀ do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> tratado com o fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> e acaricidas isoladamente ou em associação.	42

RESUMO

A eficácia do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* para controle de carrapatos foi evidenciada em vários experimentos *in vitro*, entretanto, há poucos relatos de ensaios em condições de campo para demonstrar a real aplicação do controle biológico. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de *M. anisopliae* no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições de laboratório e de campo associado ou não a acaricidas químicos, utilizando bovinos. Inicialmente, foi avaliada a compatibilidade de *M. anisopliae* (cepa E6) em ensaio *in vitro* com cinco produtos comerciais contendo: amitraz, cipermetrina, clorpirifós e duas associações de piretróides sintéticos e organofosforados (PS+OF). Em geral os acaricidas apresentaram pouco efeito na viabilidade do fungo. Quando *M. anisopliae* foi associado ao amitraz e a clorpirifós, ocorreu diminuição na viabilidade em aproximadamente 63% e 67% a 48 e 96 horas após a mistura, respectivamente. A eficácia de *M. anisopliae* (cepa E6) também foi avaliada sobre uma cepa de *R. microplus* multiresistente a acaricidas. Foram realizados experimentos *in vitro* e em condições de campo, utilizando o fungo isoladamente ou em associação com um acaricida comercial de pulverização em bovinos infestados com a cepa Jaguar (de *R. microplus* resistente a carrapaticidas). Para os ensaios a campo, vinte bovinos foram divididos em quatro grupos (n = 5): (i) o grupo tratado com acaricida; (ii) o grupo tratado com o fungo, (iii) o grupo tratado com a associação de fungo + acaricida, e (iv) o grupo controle (não tratado). Os animais foram separados em piquetes com animais naturalmente infestados e também com infestação experimental com a cepa Jaguar. Em cada infestação foram utilizadas 20.000 larvas de *R. microplus*, aplicadas em três semanas a -21, -14 e -7 dias antes do primeiro tratamento e uma semana depois de cada tratamento. Os animais dos grupos tratados foram pulverizados com o fungo na concentração de 10^8 conídios/mL com intervalo de 21 a 28 dias sendo realizados sete tratamentos. Desde o primeiro tratamento até o final do experimento, os três grupos tratados, apresentaram nas contagens, número de carrapatos inferior ao grupo controle ($P < 0,05$). Os grupos tratados com a suspensão de esporos de fungo ou com acaricida isoladamente apresentaram um controle semelhante, com um mínimo de 50% de eficácia e média de 75%. Mais significativo foi o tratamento com associação do fungo com o acaricida que resultou em eficácia de 91,7%, após o primeiro tratamento e acima de 98% após os outros seis tratamentos. Assim, fica aqui demonstrada a real aplicabilidade do uso do fungo *M. anisopliae* (Cepa E6) para controle de *R. microplus* resistentes a acaricida, em especial a sua associação com acaricidas.

Palavras-chave: Controle biológico, fungo acaropatógeno, carrapato, controle associado

ABSTRACT

The of the fungus *Metarhizium anisopliae* to control ticks has been shown in several *in vitro* experiments. However, there have been few reports of assays in field conditions in order to demonstrate the real applicability of the biological control. Thus aim of the present study was to evaluate the efficacy of *M. anisopliae* to control *Rhipicephalus microplus* under laboratory and field conditions. Firstly the compatibility of *M. anisopliae* (strain E6) to acaricides was tested *in vitro* using five commercial acaricides: amitraz, cypermethrin, chlorpyrifos and two associations of synthetic pyrethroid and organophosphate (SP+OP). In general, the acaricides only displayed mild effects on fungus viability. The lower fungal viability was with amitraz and chlorpyrifos, approximately 63% of fungus viability at 48 hours post-mixture and 67% at 96 hours, respectively. Secondly, the efficacy of *M. anisopliae* (strain E6) to control a multiacaricide-resistant strain of *R. microplus* (Jaguar) was evaluated, *in vitro* and under field conditions in tick infested bovines, using the fungus alone or in association with a commercial acaricide by manual spraying. The field experiment was conducted with twenty bovines divided into four groups (n = 5); (i) acaricide-treated group, (ii) fungus-treated group, (iii) fungus+acaricide group, and (iv) control non-treated group. Animals were allocated into highly infested paddocks and were also experimentally infested with 20.000 larvae of *R. microplus* in three weeks -21, -14, and -7 days before the first treatment and one week after each treatment. Animals in the treated groups were sprayed with *M. anisopliae* at a concentration of 10^8 conidia/mL at 21 or 28 days intervals (seven treatments). From the first treatment to the end of the experiment, the treated groups had lower tick infestation ($P < 0.05$). Groups treated with fungus suspension and acaricide alone, presented a similar efficacy, with minimal of 50% and 75% average. Importantly, the association of fungus and acaricide promoted a minimal percent of 91.7% tick-control after the first treatment and over 98% tick-control in the other six treatments. Thus in this work we demonstrate the real applicability of the use of *M. anisopliae* (strain E6) to control acaricide resistant ticks *R. microplus* in particular using the association of fungal spores and acaricides.

Keywords: Biological control, Acari pathogenic fungi, Tick, Associated control

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* (MURRELL & BARKER, 2003) é um ectoparasito hematófago de bovinos, presente nas regiões de clima tropical e subtropical, entre os paralelos 32° N e 32° S, sendo encontrado na América do Sul e Central, sul dos Estados Unidos, México, Ilhas do Caribe, Austrália, costa leste e oeste africana e alguns países da Ásia (GONZALES, 2003, ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006). No Brasil, com exceção de algumas regiões do Rio Grande do Sul e do sertão nordestino é encontrado em quase todos os estados, visto que as condições climáticas do país são favoráveis ao seu desenvolvimento durante a maior parte do ano (HORN & ARTECHE, 1985). (Figura 1).

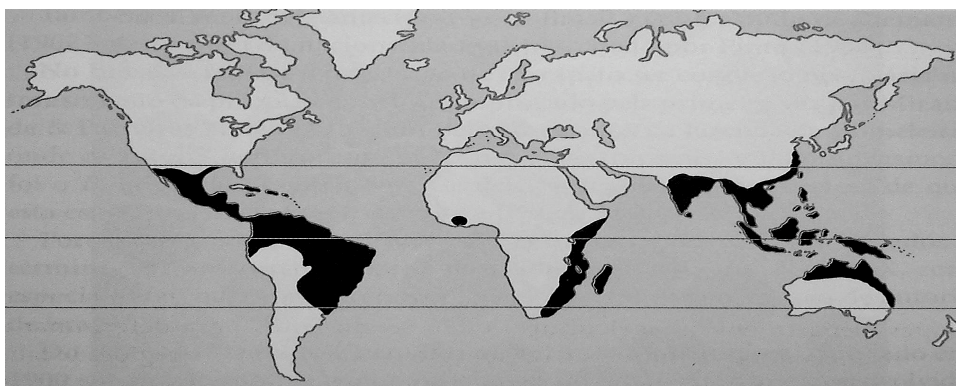


Figura 1. Distribuição mundial de *Rhipicephalus microplus*.

Fonte: FAO, 2004.

A distribuição do *R. microplus* em áreas de clima tropical e subtropical está diretamente relacionada com o trânsito de animais infestados com esse parasito na época das expedições e expansões territoriais (WHARTON, 1974). Segundo GONZALES (1995) *R. microplus* foi introduzido no Brasil através da comercialização de gado parasitado de outros países da América Latina no século XVIII. Os bovinos de raças

européias (*Bos taurus taurus*) são mais suscetíveis a esse parasito do que as raças zebuínas (GONZALES, 2003), provavelmente devido a uma co-evolução entre os zebuínos e o *R. microplus*, uma vez que ambos tiveram origem na Ásia (WHARTON, 1974). Zebuínos e taurinos demonstram serem igualmente suscetíveis durante a primeira infestação por *R. microplus*, no entanto, a diferença na resistência entre as raças está diretamente relacionada na maior resistência adquirida (imune) dos zebuínos (SZABÓ, 2009)

1.1.2 Biologia e importância econômica do carrapato *R. microplus*

R. microplus é um parasito monoxeno, ou seja, exige um único hospedeiro, no qual realiza todas as mudas. O ciclo de vida do *R. microplus* compreende um período parasitário e outro de vida livre. O período parasitário dura, em média, três semanas e inicia quando as larvas infestantes entram em contato com o hospedeiro. Estas detectam a presença do bovino através de um órgão sensorial que possuem no primeiro par de patas (Órgão de Haller), o qual é responsável pela detecção do dióxido de carbono (CO₂) exalado pelo bovino. As larvas possuem geotaxia (SONENSHINE, 1993) e fototaxia. Elas posicionam-se no topo da vegetação e ficam aguardando a passagem do hospedeiro (Figura 2), e no momento do encontro, movem-se ativamente em direção ao corpo do mesmo (GONZALES *et al.*, 1974; GUIMARÃES *et al.*, 2001; PEREIRA e LABRUNA, 2009).



Figura 2. Larvas de *R. microplus* no ápice de gramínea, mostrando o geotropismo negativo.

Fonte: arquivo pessoal (Anelise Webster)

As larvas, uma vez sobre o bovino, distribuem-se por todo o corpo do animal. Entretanto, são mais comumente encontradas em locais onde a pele é mais delgada (virilha, face interna das pernas, inserção caudal, barbela e pavilhão auricular) regiões onde, coincidentemente, o alcance do animal é mais limitado diminuindo assim as chances de serem removidas mecanicamente pelos hospedeiros através de lambeduras (GUIMARÃES *et al.*, 2001; GONZALES *et al.*, 2003; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

Segundo GUGLIELMONE e colaboradores (2006), as larvas se alimentam por seis a oito dias até sofrerem a primeira muda, passando para a fase de ninfas, as quais atingem a idade adulta e sofrem a segunda muda entre sete e nove dias a partir da primeira muda. Os carrapatos atingem a maturidade sexual cinco dias, em média, após a ecdise anterior. Após a cópula, a fêmea fertilizada aumenta consideravelmente sua ingesta sanguínea, ingurgita,

e normalmente após 21 dias da fixação da larva sobre o hospedeiro, desprende-se do mesmo e cai ao solo para realizar a postura dos ovos.

A fêmea procura um local com alta umidade e protegido da luz solar, evitando assim a dessecação de seus ovos. A postura começará após um período de amadurecimento do seu sistema reprodutivo, denominado de período de pré-postura com três dias de duração normalmente, com cada fêmea sendo capaz de gerar cerca de 3.000 ovos (PEREIRA & LABRUNA, 2009). Em condições ambientais favoráveis, (temperatura ótima de aproximadamente 27 °C e umidade relativa maior que 85%) inicia-se então o período de oviposição. A duração deste período está diretamente relacionada às condições climáticas, com a postura durando em média 14 dias. Se as condições ambientais não forem favoráveis, o metabolismo da fêmea é diminuído e a postura dos ovos é retardada (GUIMARÃES *et al.*, 2001; GONZALES *et al.*, 2003; PEREIRA & LABRUNA, 2009). Estima-se que apenas 5% da população dos carrapatos estejam presentes no hospedeiro e 95% no ambiente, em fase não parasitária: larvas, fêmeas adultas e ovos (CORDOVÉS, 1997).

O carrapato *R. microplus* é responsável por diversos danos aos animais que parasita, principalmente pela espoliação de grandes quantidades de sangue, onde cada fêmea é capaz de ingerir de 2-3 mL, fato que acarreta em anemia e uma série de alterações orgânicas, como anorexia, emagrecimento, apatia e em casos mais extremos, pode levar à morte do animal (MARTINS, 2004; JONSSON, 2006; PEREIRA & LABRUNA, 2009). Este parasita pode modificar os parâmetros bioquímicos sanguíneos e digestivos do hospedeiro (CORREIA *et al.*, 1998; GONZÁLES-ACUÑA & GUGLIELMONE, 2005) e também causar alterações na hemostasia durante a infestação de bovinos (RECK *et al.*

2009). Ainda, RECK e colaboradores (2013) demonstraram que a ocorrência de miíases por *Cochliomyia hominivorax* está diretamente relacionada com a presença de *R. microplus*, onde foi constatado que animais com alta contagem semanal de carrapatos tem seis vezes mais chances de apresentarem miíases.

R. microplus é responsável também pela transmissão da babesiose e anaplasiose, enfermidades integrantes do complexo Tristeza Parasitaria Bovina (TPB), através da inoculação dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da bactéria *Anaplasma marginale*, levando a um quadro de anemia severa, palidez das mucosas, icterícia, febre, prostração, abortos e muitas vezes levando o animal a óbito (MARTINS & CORREA, 1995; JONSSON *et al.*, 2008). GRISI *et al.*, (2002) relataram que as perdas econômicas causadas por *R. microplus* podem chegar a cerca de dois bilhões de dólares anuais, valores que resultam da diminuição de ganho de peso, custos com antiparasitários, diminuição da produção de leite, depreciação do couro e lesões contaminadas, predispondo à ocorrência de miíases.

1.1.3 Controle de carrapatos e resistência

O controle de *R. microplus* é realizado quase exclusivamente com a utilização de produtos químicos. Os principais acaricidas utilizados atualmente são os compostos organofosforados, piretróides, amitraz, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron (MARTINS, 2004; KLAFKE, 2009). Entre as drogas descritas anteriormente somente o fluazuron ainda não apresenta relato de resistência. Há uma disseminação global de populações resistentes a organofosforados e piretróides (FAO, 2004); amitraz (KUNZ & KEMP, 1994; BENAVIDES *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2004); lactonas macrocíclicas

(MARTINS & FURLONG, 2001; KLAFKE *et al.*, 2006) e fipronil (CUORE *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008; CASTRO-JANER *et al.*, 2010) (Figura 3).

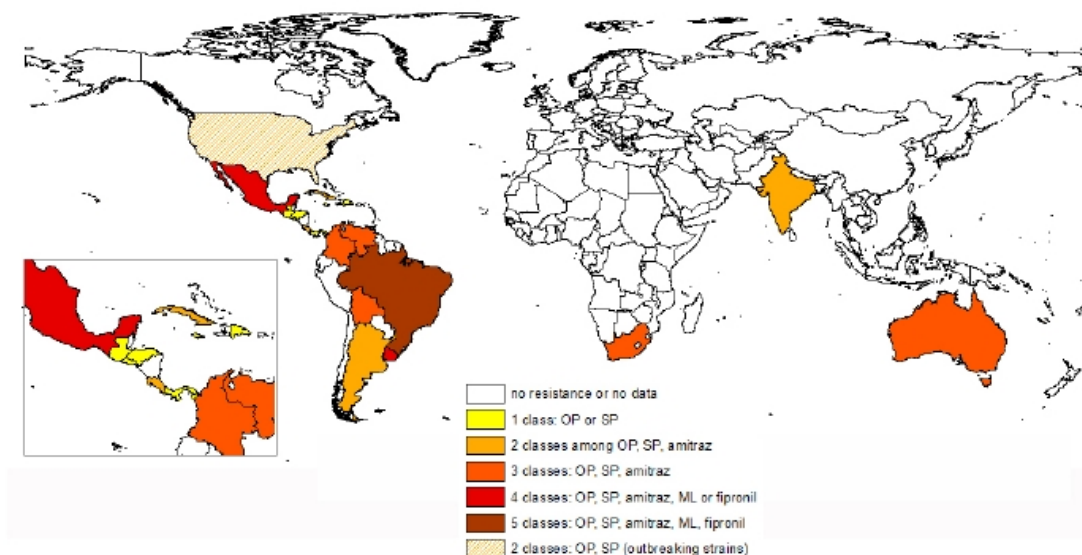


Figure 3: Distribuição mundial da resistência a acaricidas. Resistência acumulada para organofosforado (OF), piretróide sintético (PS), amitraz, lactonas macrocíclicas (LM) e fipronil. As cores indicam o relato de pelo menos um relato de resistência no país. O mapa não é quantitativo. Estabelecido baseado em informações avaliadas em junho de 2012.

Fonte: Tese Leonore Lovis (2012) e FAO (2004)

A maioria dos acaricidas atua sobre o sistema nervoso dos artrópodes: no axônio do neurônio pré-sináptico, sobre os neurotransmissores ou receptores pós-sinápticos (LOVIS, 2012). Os organofosforados (OF) inibem a atividade da acetilcolinesterase ligando-se a esta impedindo que a mesma hidrolise a acetilcolina (TAYLOR, 2001). Quando a acetilcolina não é degradada esta se acumula na fenda sináptica e nos músculos levando à paralisia neuromuscular (SAUNDERS & HARPERS, 1994). Os piretróides atuam no canal de sódio dependente da voltagem resultando numa despolarização prolongada e eventual

paralisia (VIJVERBERG *et al.*, 1982). O modo de ação do amitraz ainda não foi bem definido. Segundo JONSSON e HOPE (2007): Dois sítios de destino têm sido propostos para artrópodes (i) monoamina oxidase e (ii) receptores octopamine. No entanto, nenhuma evidência direta foi estabelecida para a ação do amitraz sobre esses dois sítios- alvo em potencial.

O sítio de ação das Lactonas Macrocíclicas são os canais de cloro dependentes de GABA e glutamato (TAYLOR, 2001). Foi demonstrado pela primeira vez que a LM estimula a libertação de GABA a partir de terminações nervosas e reforça a ligação do GABA ao seu receptor no neurônio pós-sináptico. O aumento do fluxo de Cl⁻ na célula leva a hiperpolarização. Isto conduz à uma paralisia e subsequente morte do artrópode (CAMPBELL & BENZ 1984; SHOOP *et al.*, 1995). O Fipronil bloqueia a transmissão de sinais através da ligação aos canais de cloro dependentes de GABA e glutamato (ZHAO *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, inibe o fluxo de cloro (Cl⁻) na célula nervosa o e que resulta na hiperexcitação do sistema nervoso do artrópode (POSTAL *et al.*, 1995, TAYLOR, 2001). O Fluazuron é um inibidor de quitina, um aminopolisacarideo complexo e componente importante da cutícula do artrópode, este, age sobre a enzima sintetase de quitina. Durante cada ecdise, moléculas de quitina são montadas com proteínas em microfibrilas (COHEN, 1993). Quando os estágios imaturos de artrópodes são expostos a estes compostos não são capazes de completar a ecdise e conseqüentemente morrem durante o processo de muda.

A falta de uma política oficial de controle do carrapato, somada à desinformação da maioria dos pecuaristas, são fatores agravantes para a seleção de populações resistentes aos carrapaticidas. Esta desinformação dos produtores abrange aspectos biológicos do parasito e sua relação com o hospedeiro e com o meio ambiente (LEITE, 1987). A interação entre

métodos químicos e não químicos promove melhores resultados (controle e adiamento da resitência) do que a utilização exclusiva de acaricidas. Dentre os fatores que podem diminuir o aparecimento da resitência estão: a redução do número de tratamentos, o uso de produtos com qualidade comprovada e concentração correta (KLAFKE, 2009).

A seleção e a manutenção de populações de carrapatos resistentes dependem de muitos fatores, os quais podem ser divididos em fatores biológicos e operacionais (RIDDLES & NOLAN, 1986; DENHOLM & ROWLAND, 1992). Fatores biológicos são aqueles relacionados diretamente com o parasito e correspondem a aspectos genéticos, ecológicos, comportamentais e fisiológicos (GUERREIRO *et al.*, 2001). Segundo DENHOLM & ROWLAND (1992) fatores operacionais são aqueles que estão relacionados ao controle do homem como a eleição dos produtos, a frequência de aplicação, a concentração do produto e o método de aplicação. SUTHERST & COMINS (1979) abordam as falhas na diluição dos produtos, na aplicação dos mesmos, na conservação e nos intervalos de aplicação, as quais levam a concentrações não letais dos carrapatos, como sendo os principais fatores facilitadores na seleção de indivíduos resistentes.

De acordo com FREITAS e colaboradores (2005) o uso de diferentes acaricidas com diferentes composições muitas vezes em um curto período de tempo acaba por selecionar populações com maior grau de resistência e resistentes a mais de um princípio ativo. O uso indiscriminado destes produtos pode promover a falha completa no controle de carrapatos dentro de um curto período de tempo (FERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2012). Sabe-se também que a aplicação de um produto químico mais do que seis vezes por ano, pode contribuir para o desenvolvimento de populações resistentes (MENDES *et al.*, 2011).

Por definição, a resistência é a mudança na frequência de genes em uma população, promovida pela seleção artificial, onde indivíduos sobrevivem a doses de fármacos letais à maioria dos indivíduos da mesma espécie em uma dada população (SANGSTER, 2001; FAO, 2004). A utilização de forma inadequada dos acaricidas, como o uso excessivo e indiscriminado associado a dosagens incorretas e nos períodos onde os animais apresentam maior quantidade de parasitos (GEORGE, 2000) são fatores que geram uma pressão seletiva fazendo com que o desenvolvimento da resistência seja um fenômeno inevitável (CONWAY & COMINS, 1979).

Segundo ROUSH (1993), os alelos que conferem a resistência aos acaricidas são raros. Sendo assim, a grande maioria dos indivíduos de uma determinada população de carrapatos é suscetível. Quando o acaricida é administrado, os indivíduos que possuem esses genes sobrevivem e darão origem a uma nova geração que carregará os mesmos consigo. Assim, à medida que novos tratamentos são realizados os indivíduos suscetíveis desaparecem, selecionando desta forma uma população de indivíduos resistentes aquele determinado acaricida (Figura 4) (KUNZ & KEMP, 1994).

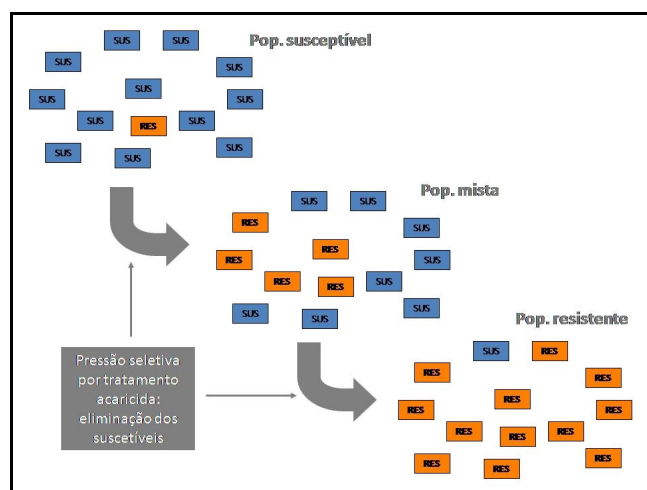


Figura 4. Fluxograma de desenvolvimento de resistência a acaricidas. Resistente (RES), Suscetível (SUS)

Ilustração Guilherme Marcondes Klafke

Existem três mecanismos principais de resistência a acaricidas: (i) diminuição de penetração cuticular da droga, (ii) resistência metabólica e (iii) resistência por insensibilidade de sítio de ação (FFRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004). Ainda não há descrição de resistência de *R. microplus* a acaricidas por meio da diminuição da penetração da cutícula. A resistência metabólica é caracterizada por um aumento na capacidade que os indivíduos têm de destoxificar e/ou eliminar os produtos utilizados nos tratamentos. Esse aumento pode ser resultado da maior expressão de enzimas responsáveis pelo metabolismo da droga ou aumento da especificidade destas enzimas pela droga facilitando sua destoxificação (LI *et al.*, 2007). A resistência por insensibilidade de sítios de ação é caracterizada por uma mutação de um ou mais nucleotídeos na região codificadora de um gene. Esta mutação pode conferir uma mudança de aminoácido, e conseqüentemente, uma alteração tri-dimensional na(s) proteína(s) formadora(s) do receptor. Esta alteração estrutural pode reduzir ou bloquear a capacidade da molécula de se ligar ao sítio de ação, resultando em resistência (SODERLUND & BLOOMQUIST, 1990; KLAFKE, 2009).

1.2 Controle biológico

A constante degradação do meio ambiente e a cobrança cada vez mais intensa da sociedade por metodologias novas e alternativas resultam em um aumento significativo das pesquisas científicas buscando uma redução na agressão do ecossistema causada pelo homem (SAMISH *et al.*, 2008). O controle biológico se baseia em um dos fundamentos básicos das relações ecológicas entre os seres vivos de que cada espécie, seja animal, vegetal ou microbiana, possui inimigos naturais (SANTI *et al.*, 2011). Dessa forma, organismos capazes de inibir o crescimento populacional de outros podem ser utilizados no

controle de populações específicas. Um agente biocontrolador eficiente deve propiciar uma redução significativa dos danos causados por um organismo praga, por morte ou redução de seu crescimento populacional (MELO & AZEVEDO, 1998).

Alternativas aos produtos químicos vêm sendo estudadas devido aos grandes custos gerados aos pecuaristas assim como danos ao meio ambiente e à saúde humana. O controle biológico de pragas 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, 1998; MILNER, 2000; SHAH & PELL, 2003, SHAMISH *et al.*, 2004). Desde o início do século 20, numerosos candidatos para o biocontrole de carrapatos, incluindo patógenos, parasitos e predadores foram identificados (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010). Um estudo relatou que o mercado mundial de biopesticidas está crescendo e durante os próximos anos deve chegar a mais de um bilhão de dólares (FARIA & WRAIGHT, 2007).

A desvantagem encontrada na utilização dos biocontroladores é a necessidade de condições ambientais favoráveis, como temperatura e umidade (VILLANI *et al.*, 1992), além de necessitar de um tempo maior para promover a morte dos hospedeiros após a aplicação em relação ao controle químico (SANTI *et al.*, 2011). Estudos têm sido realizados para melhorar a produção em massa, a estabilidade, a formulação e a aplicação destes organismos (JENKINS, 1998; GRIMM, 2001; BATA, 2003; POLAR *et al.* 2005).

O estudo das características básicas da relação entre o microrganismo e o seu respectivo hospedeiro tem permitido um melhor entendimento do processo de patogenicidade e de suas características específicas. Em relação aos fungos arthropodopatogênicos, alguns trabalhos sugerem que os efeitos em artrópodes não alvo são

mínimos, tornando-os uma alternativa segura para seu uso em programas de manejo integrado de pragas quando comparados com os acaricidas químicos (GOETTEL & HAJEK, 2000; PELL *et al.* 2001).

1.2.1 O fungo biocontrolador *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metschn.) Sorokin é amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente no solo, onde sobrevive por longos períodos (ALVES, 1998). Foi classificado durante muito tempo como Deuteromiceto pertencente à classe Hiphomycetes (TULLOCH, 1976). No entanto, através de análises do rDNA, LIU e colaboradores (2001) classificaram o fungo *M. anisopliae var. majus* como sendo a forma anamorfa de *Cordyceps brittlebankisoides*, sendo assim considerado como um Ascomiceto. Apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos. O desenvolvimento vegetativo desta espécie ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura ideal entre 24 e 30°C e pH ótimo de 6,9 (DRIVER *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.*, 2005). Os requisitos nutricionais do fungo são poucos, podendo utilizar como fonte de carbono amido, glicose, glicerol, maltose, sacarose e quitina (ALVES, 1998).

Atualmente, *M. anisopliae* é um importante agente utilizado no controle biológico de pragas, tendo sua ação bastante estudada e amplamente utilizada (SHAH & PELL, 2003). Sua patogenicidade tem sido demonstrada para carrapatos de diferentes gêneros e espécies sendo descrito como um excelente biocontrolador do carrapato bovino *R. microplus*, demonstrando elevada mortalidade em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies e estágios de carrapatos infectados por *Metarhizium anisopliae*.

Espécie de carrapato	Estágio	Autores
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>Amblyomma variegatum</i>	e Fêmeas ingurgitadas	KAAYA <i>et al.</i> , 1996
<i>Ixodes scapularis</i>	Larvas e Fêmeas ingurgitadas	ZHIOUA <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Fêmeas ingurgitadas	CASTRO <i>et al.</i> , 1997 CORREIA <i>et al.</i> , 1998 FRAZZON <i>et al.</i> , 2000 ONOFRE <i>et al.</i> , 2001 ARRUDA <i>et al.</i> , 2005 POLAR <i>et al.</i> , 2005 LEEMON & JONSOON, 2008 BEYS DA SILVA <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Ovos	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 1994 BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Ovos, Larvas e Fêmeas ingurgitadas	FERNANDES <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Larvas	BAHIENSE <i>et al.</i> , 2006

No Brasil, é utilizado com sucesso, desde 1965 para o controle da cigarrinha-da-cana, (*Mahanarva posticata*). Atualmente é utilizado para diversas outras pragas como a cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta*), a broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), a broca-dos-citros (*Diploschema rotundicollis*), a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), o cupim da cana-de-açúcar (gênero *Heterotermes*) e o cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*) (ALVES, 1998). Surgem cada vez mais produtos formulados a partir dos conídios de *M. anisopliae* para o manejo de pragas em diferentes países inclusive no Brasil (BEYS DA SILVA, 2012).

1.2.2 Processo de infecção

A infecção de artrópodes por *M. anisopliae* envolve uma combinação de dois processos: a pressão mecânica exercida pelo apressório (ST LEGER *et al.*, 1986.) e a degradação da cutícula por enzimas hidrolíticas (Figura 5), tais como lipases (BEYS DA SILVA *et al.*, 2010.), proteases (SANTI *et al.*, 2010) e quitinases (DA SILVA *et al.*, 2005, STAATS *et al.*, 2013). O processo de infecção de *M. anisopliae* sobre hospedeiros artrópodes inicia-se com a deposição do conídio sobre o tegumento do hospedeiro, seguido por germinação, penetração, colonização, exteriorização das estruturas do fungo e produção de esporos (Figura 6) (ST LEGER *et al.*, 1991; ARRUDA *et al.*, 2005; BEYS DA SILVA *et al.*, 2012).

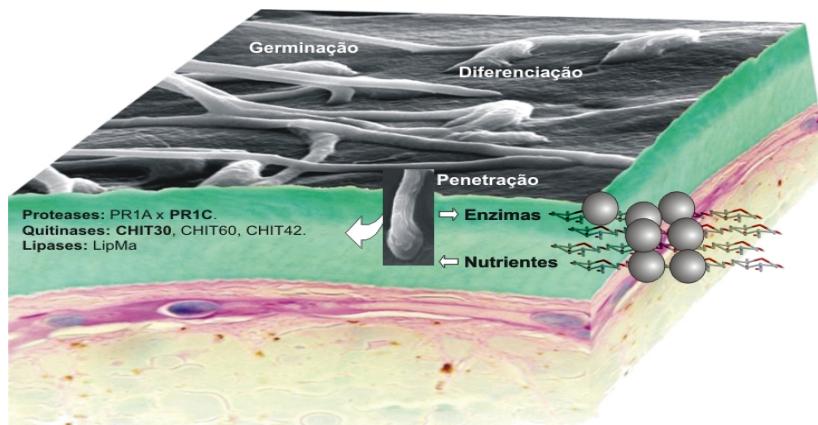


Figura 5: Processo de infecção por *M. anisopliae* através de pressão mecânica exercida pelo apressório e degradação da cutícula pela secreção de enzimas hidrolíticas (Cedida por SCHRANK A.)

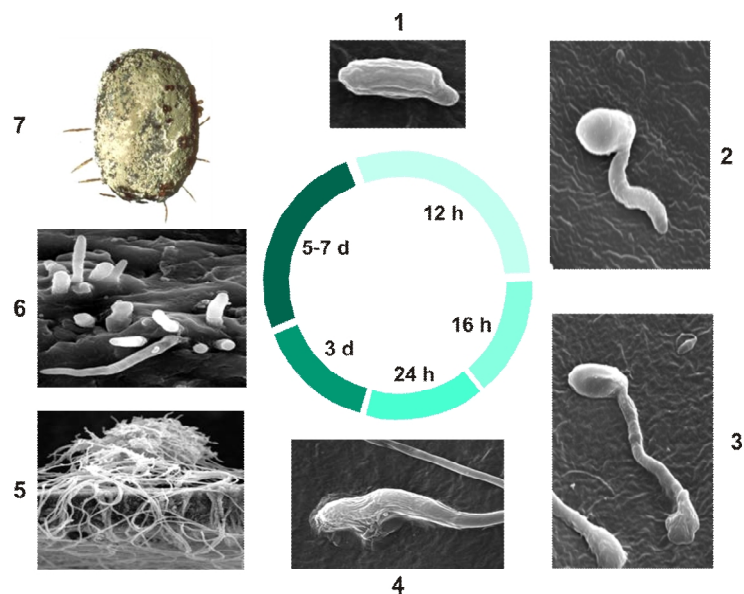


Figura 6: Processo de infecção sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus*. (1) Adesão/ Germinação, (2) Tubo germinativo, (3) Apressório, (4) Penetração, (5) Colonização, (6) Emergência (7) Morte do hospedeiro. SCHRANK, A. & VAINSTEIN (2010) *Toxicon*.

Os sintomas causados pela patogenia de *M. anisopliae* sobre o hospedeiro são perda da sensibilidade, incoordenação dos movimentos e paralisia, levando-o à morte (ALVES, 1998). Após a morte do hospedeiro, as hifas invadem órgãos internos e, com o esgotamento de nutrientes, se estendem para fora do tegumento. Sob condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos de coloração verde oliva que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros indivíduos (LAVERLAM, 1999). A grande variabilidade genética que apresenta esta espécie resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz ultravioleta (ALVES, 1998; ARRUDA *et al.*, 2005).

1.3 Compatibilidade entre o fungo *Metarhizium anisopliae* e acaricidas comerciais

A estratégia mais prática e econômica para a utilização de entomopatógenos é aquela que se baseia na conservação dos mesmos dentro dos agrossistemas. A conservação

pode ser feita através da adoção de técnicas simples, tais como aplicação de agrotóxicos seletivos a esses entomopatógenos (ALVES *et al.*, 1998). Os referidos autores afirmaram que pode ocorrer sinergismo entre produtos químicos e biológicos resultando em aumento da eficácia no tratamento de indivíduos resistentes ou menos suscetíveis aos produtos químicos. No entanto, os produtos químicos podem inibir o crescimento vegetativo e a conidiogênese dos fungos entomopatogênicos e até mesmo levar a ocorrência de mutações genéticas, alterando assim a sua virulência. Quando há compatibilidade os produtos químicos podem ser associados com fungos entomopatogênicos, aumentando a eficiência do controle (MOINO JR & ALVES, 1998).

A reação imune do organismo alvo contra fungos entomopatogênicos é composta de duas fases: uma é a defesa do tegumento, e a outra é o sistema imunológico incluindo as reações de defesa celular e humoral (WAGO, 1995). Os efeitos do estresse dependem de doses subletais de drogas que podem alterar a reação imunitária incluindo hemócitos e defesa humoral (HIROMORI & NISHIGAKI, 2001). Estes autores mostraram a possibilidade de um método eficaz de controle usando a associação de fungos entomopatogênicos e inseticidas sintéticos, indicando que a sinergia pode ser causada pela inibição do sistema de defesa humoral do organismo alvo.

ALVES e colaboradores (1998) descreveram que a detecção de isolados compatíveis com produtos químicos de diferentes grupos é de fundamental importância, pois a infecção sobre o organismo alvo só se estabelecerá se não houver inibição do crescimento vegetativo do agente já que esta é a etapa inicial do processo infectivo. Diversas formulações comerciais foram estudadas com relação à compatibilidade com agentes entomopatogênicos em condições de laboratório e campo e observou-se que não

houve efeito deletério sobre os microorganismos utilizados (BATISTA FILHO *et al.*, 2001).

O uso seletivo de produtos é uma importante estratégia para o manejo integrado de pragas, sendo um sistema de controle que, no contexto do meio ambiente e da dinâmica da população das espécies de pragas, utiliza todas as técnicas e métodos adequados da melhor forma compatível possível para manter populações de pragas abaixo daqueles níveis que causam danos econômicos consideráveis (FAO, 1975). A utilização de agentes biológicos associados a produtos químicos podem aumentar a eficácia do controle de *R. microplus* em função do efeito aditivo ou sinérgico dessa associação, porém há a necessidade de estudos referentes sobre este aspecto (BARCI *et al.*, 2009)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o controle de cepa resistente à acaricida do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* em bovinos infestados em condições de campo.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil de resistência de populações de *R. microplus* a diferentes classes de acaricidas químicos
- Avaliar a viabilidade de *M. anisopliae* com diferentes acaricidas químicos
- Avaliar o efeito da aplicação do fungo *M. anisopliae* associado ou não a acaricida químico em bovinos infestados experimentalmente com isolado resistente a acaricidas (cepa Jaguar) de *R. microplus* a campo

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da suscetibilidade a acaricidas

Foram utilizadas para análise 87 populações de *R. microplus* provenientes de diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul com perfis variados de suscetibilidade aos acaricidas.

As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), utilizando-se o teste de DRUMMOND e colaboradores (1973) frente às principais classes de acaricidas comerciais.

Cada grupo experimental foi constituído de três repetições, contendo cada uma 10 fêmeas ingurgitadas com tamanho e peso homogêneos. Os grupos foram imersos por cinco minutos nas diluições dos produtos comerciais testados, sendo o grupo controle imerso em água destilada. Os carrapatos foram removidos da imersão com o auxílio de um tamis de plástico, secos em papel toalha absorvente, colocados em placas de Petri e mantidos na estufa a 27°C e com umidade relativa (UR) superior a 80%, para posterior avaliação de postura e eclodibilidade. No 15º dia de incubação foi aferido o peso da massa de ovos aparentemente férteis (coloração marrom claro, brilhantes e agrupados) de cada grupo, sendo as mesmas, incubadas para a análise da eclodibilidade (no 30º dia de incubação). A partir destes dados foi avaliado o índice de eficácia de cada produto comercial, através das seguintes fórmulas segundo DRUMMOND e colaboradores (1973):

IR = Índice Reprodutivo

IR = $\frac{\text{Peso da massa de ovos} \times \% \text{ de eclosão} \times 20.000}{\text{Peso das fêmeas ingurgitadas}}$

IE = % de eficácia

IE = $\frac{(\text{I R controle} - \text{I R tratado}) \times 100}{\text{IR controle}}$

3.2 Produção de conídios e suspensões

M. anisopliae var. *anisopliae*, cepa E6, descrita por FRAZZON e colaboradores (2000) como uma cepa com alta patogenicidade para carrapatos, foi mantida em laboratório como descrito previamente (BOGO *et al.*, 1998). A produção de conídios do fungo foi realizada utilizando 100 g de grãos de arroz adicionados a 30 mL de uma solução de peptona a 0,5%. O meio foi esterilizado em sacos de polipropileno por 30 minutos. Em cada saco foram inoculados 10^6 conídios/mL e mantidos a 28 °C por 14 dias (SANTI *et al.*, 2011). Os grãos de arroz foram lavados em solução de Tween 80 (polisorbitano) (0,01%) esterilizada, homogenizada e a concentração foi determinada usando-se uma câmara de Neubauer. As suspensões foram diluídas em água estéril a concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL.

3.3 Testes *in vitro*

3.3.1 Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com acaricidas comerciais

As suspensões (10^8 conídios/mL) foram adicionadas às formulações acaricidas comerciais diluídas conforme o fabricante (v/v). Foram realizados um total de seis grupos, sendo um controle apenas com água destilada e cinco grupos teste, sendo cada um com um acaricida de princípio ativo diferente nas diluições recomendadas pelos fabricantes: um amidínico (amitraz 12,5% - Triatox® – MSD Saúde Animal), um piretróide sintético (PS) (cipermetrina 15% - Cyperpour® 15 - CEVA), um organofosforado (OF) (clorpirifós 48% - Diazinon® - AllVet) e duas associações de piretrióides sintéticos com organofosforados (PS/OF) (cipermetrina 15% + clorpirifós 48% + butóxido de piperonila 5% Cyperpour Plus® – CEVA e cipermetrina 20% + clorpirifós 50% Ciclorfós®- Allvet). As formulações finais foram aliqüotadas em microtubos contendo 1 mL. Foi realizado o plaqueamento das

formulações em oito intervalos de tempo (1, 5, 10, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) após a exposição do fungo ao acaricida. A avaliação do teste foi realizada através da contagem das UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) de cada grupo (LACEY *et al.*, 1994). O teste foi realizado em triplicata de onde foi calculada a média e o erro padrão.

3.3.2 Eficácia de *Metarhizium anisopliae* sobre *Rhipicephalus microplus*

M. anisopliae foi testado em três concentrações diferentes de conídios (10^6 , 10^7 , 10^8 conídios/mL). Todos os grupos de tratamento continham 10 fêmeas ingurgitadas e cada tratamento consistiu de três repetições. Os carrapatos foram imersos nas suspensões de esporos por cinco minutos e após a secagem, as fêmeas foram colocadas em placas de Petri e incubadas a 27 ± 1 °C e 80% de umidade relativa durante 20 dias. A mortalidade dos carrapatos foi verificada diariamente para determinar o tempo letal (TL₅₀).

3.3.3 Eficácia de *Metarhizium anisopliae* combinado com acaricidas comerciais sobre *Rhipicephalus microplus*

A concentração mais elevada de conídios (conídios/mL) foi escolhida para ser combinada com acaricidas comerciais, tal como descrito acima. Todos os grupos tiveram 10 fêmeas ingurgitadas e cada tratamento consistiu de três repetições. Os carrapatos foram tratados e mantidos nas mesmas condições descritas para os ensaios utilizando apenas o fungo.

3.4 Ensaios a campo

3.4.1 Local do estudo

O estudo de campo foi realizado de fevereiro a julho de 2012 no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) (30°03'06"S, 51°18'44"W), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. A temperatura média anual e precipitação são de 20°C e 1428,8 milímetros, respectivamente. As informações climáticas para o período estudado foram obtidas a partir de uma estação meteorológica do Centro de Meteorologia do Rio Grande do Sul (CEMETRS, FEPAGRO) localizada dentro do IPVDF (Figura 7).

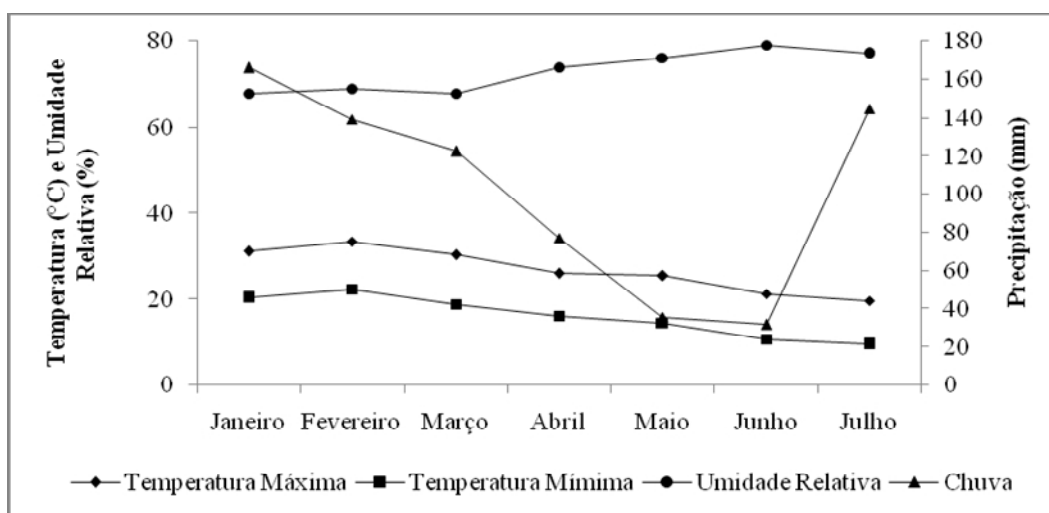


Figura 7: Condições meteorológicas (Temperatura, Umidade relativa do ar e Precipitação) no local do ensaio a campo durante o período experimental (janeiro a julho de 2012). Obtidas a partir de uma estação meteorológica do Centro de Meteorologia do Rio Grande do Sul (CEMETRS, FEPAGRO) localizada dentro do IPVDF

3.4.2 Bovinos

Vinte bovinos da raça Angus (*Bos taurus taurus*) de 12-14 meses de idade, com peso médio de 231 kg ± 58, foram utilizados para os ensaios de campo. Os animais foram mantidos em quatro piquetes (≈1 ha cada) no IPVDF, sendo os mesmos separados com cerca elétrica. Os animais foram infestados com 20.000 larvas de *R. microplus* da cepa Jaguar (item 4.1) durante três semanas (-21, -14 e -7 dia) antes do primeiro tratamento e uma semana depois de cada tratamento. Esta quantidade de larvas foi definida de acordo

com a literatura (RECK *et al.*, 2009) que descreve que apenas 5 a 10% das larvas se desenvolvem tornando-se fêmeas adultas. A infestação foi avaliada pela contagem do número de carrapatos acima de 4,5 mm no lado esquerdo do animal (WHARTON & UTECH, 1970), uma vez por semana, durante todo o período experimental (seis meses) (Figura 8)



Figura 8: Experimento a campo. (A) Pesagem dos animais para divisão nos grupos experimentais. **(B)** Infestação artificial com 20.000 larvas de *R. microplus* a cada 21 dias. **(C)** Contagem semanal de fêmeas ingurgitadas.

Fotos: Ugo Araújo Souza

3.4.3 Tratamentos

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais de cinco bovinos cada. O **grupo 1** foi pulverizado com uma solução acaricida (cipermetrina 0,015% + clorpirifós 0,048% - Ciclorfós - AllVet). O **grupo 2** foi pulverizado com a suspensão aquosa de conídios do fungo (10^8 conídios/mL) em 0,02% de Triton X-100 (éter octilfenólico de decaetilenoglicol). O **grupo 3** foi pulverizado com a suspensão aquosa de conídios de fungos (10^8 conídios/mL) em 0,02 % Triton X-100 adicionado da solução acaricida (cipermetrina 0,015% + clorpirifós 0,048%). O **grupo 4** (grupo controle) não recebeu nenhum tratamento. Cada animal foi pulverizado com oito litros de suspensão / solução utilizando um pulverizador manual, com um bico do tipo cone e a uma pressão com cerca de 150 psi. Todos os grupos receberam tratamento em intervalos de 21 a 28 dias, optamos

por esse período de tempo, pois havia sido relatado por KAAYA *et al.*, (1996) que os conídios de fungos entomopatogênicos mantêm a sua viabilidade na pele dos animais por um período de 2-3 semanas, além de coincidir com o período de parasitismo exercido pelo *R. microplus* (PEREIRA & LABRUNA, 2009). (Figura 9). A eficácia dos tratamentos foi calculada como a porcentagem de redução de carrapatos, quando comparado com o grupo controle (MORIN *et al.*, 1996).



Figura 9: Tratamento a campo. (A, B e C) Preparo da suspensão de esporos e solução do acaricida para o tratamento dos respectivos grupos. (D e E) Banho de aspersão com cada animal recebendo 8 L de suspensão/solução. (F) Animal com o corpo totalmente encharcado após tratamento.

Fotos: Ugo Araújo Souza

3.5 Análise estatística

A compatibilidade do fungo com os acaricidas comerciais foi avaliada pela variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) utilizando o software Prism (3.0). O tempo letal (TL₅₀) para fêmeas ingurgitadas

foi avaliado por uma análise *probit* segundo Robertson e colaboradores (2007) através do software Polo Plus (LeOra Software, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Identificação de cepa de *Rhipicephalus microplus* resistente a acaricidas químicos

Foram testadas 87 amostras de carrapatos no período de janeiro a dezembro de 2011. Os testes foram realizados utilizando-se os principais grupos químicos disponíveis no mercado, três formulações de amitraz, quatro piretróides sintéticos e oito associações entre acaricidas. A variação do número de amostras de carrapatos testadas para cada princípio ativo está diretamente relacionada com a quantidade de parasitos enviados ao laboratório assim como com o histórico dos produtos utilizados nas propriedades. Todos os produtos testados, com exceção de duas associações, apresentaram percentual de eficácia inferior a 85% contra as populações avaliadas, indicando resistência aos princípios ativos utilizados (Tabela 2).

Tabela 2: Eficácia *in vitro* de diversas classes de acaricidas em amostras de carrapatos *R. microplus* provenientes de campo no período de janeiro a dezembro de 2011 – Total: 87 amostras

Produto	Grupo químico	Fórmula	Nº de amostras	% de resistência
A1	Amidínicos	Amitraz 12,5%	11	72,7
A2			50	64
A3			58	14
C1	Piretróides	Cipermetrina 15%	44	95,5
C2			22	95,5
C3			5	80
D1			54	92,6
PO1	Associações acaricidas	Cipermetrina+ clorpirifós+butóxido de piperonila	59	16,95
PO2		Cipermetrina+clorpirifós	28	10,7
PO3		Cipermetrina+ethion	70	40
PO4		Cipermetrina+clorpirifós	73	17,8
PO5		Flumetrina+ coumafós	25	32
PO6		Amitraz+ clorpirifós	14	7,2
PO7		Cipermetrina+clorpirifós	19	0
PO8			5	0

Entre as amostras de carrapatos, em função dos resultados obtidos, foi isolada uma cepa de *R. microplus* (Cepa Jaguar) com características de resistência às principais classes de acaricidas para ser utilizada nos ensaios *in vitro* e em bovinos infestados a campo (Figura 10)

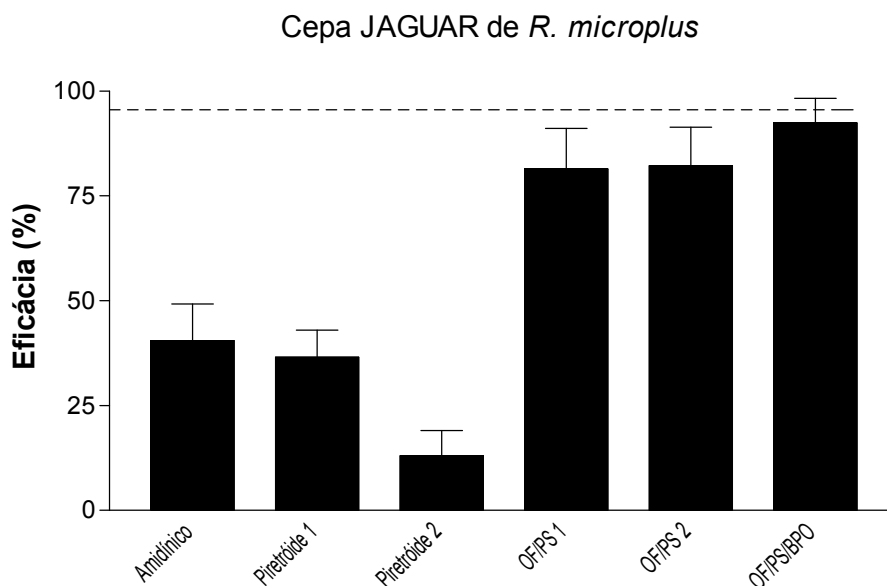


Figura 10: Perfil de cepa de campo de *R. microplus* com características de resistência às principais classes de acaricidas utilizados. Amidínico (amitraz), Piretróide 1 (cipermetrina), Piretróide 2 (deltametrina), OF/PS 1 (clopirifós + cipermetrina), OF/PS 2 (clopirifós + cipermetrina) e OF/PS/BPO 1 (clopirifós + cipermetrina + butóxido de piperonila)

4.2 Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com acaricidas comerciais

A viabilidade do fungo, avaliada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *M. anisopliae* não foi afetada significativamente pela maioria dos acaricidas testados, ou seja, não houve diferença estatística entre os grupos onde o fungo foi exposto aos acaricidas, quando comparada com o grupo controle, que não teve contato

com os mesmos. *M. anisopliae* teve sua menor viabilidade quando exposto aos acaricidas amitraz e clorpirifós com 63% em 48 e 67% em 96 horas de exposição, respectivamente. Quase todos os acaricidas (amitraz, piretróide, organofosforado e uma associação de OF+PS) mostraram alguma redução na viabilidade do fungo em comparação com o controle (sem acaricida) em pelo menos um dos tempos testados no experimento. A associação PS+OF (cipermetrina 0,015% +clorpirifós 0,048%) foi o único acaricida que não induziu qualquer alteração na viabilidade do fungo, de modo que este acaricida foi escolhido para ser utilizada no teste a campo com os bovinos infestados (Tabela 3).

Tabela 3: Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com acaricidas comerciais. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de viabilidade.

Horas de exposição ao acaricida	ACARICIDA / VIABILIDADE					
	Controle	Amitraz	Clorpirifós	Cipermetrina	Cipermetrina + Clorpirifós	Cipermetrina + Clorpirifós + BPO
1	100±8.08 a	97.21±1.92 a	89.22±1.20 a	93.81±2.10 a	94.41±5.69 a	91.62±5.71 a
5	100±8.02 a	96.66±8.16 a	71.94±12.54 b	83.07±14.60 a	96.88±2.67 a	99.33±4.35 a
10	100±3.51 a	90.86±4.96 a	91.25±6.64 a	79.38±7.9b	91.25±7.04 a	70.43±8.18 b
24	100±11.68 a	95,27±5.57 a	75±5.84 b	80.07±6.59 b	99.16±3.10 a	97.13±2.55 a
48	100±12.12 a	63.15±9 b	95.13±3.33 a	70.76±9.66 b	93.37±2.88 a	84.41±3.57 b
72	100±15.63 a	77,13±10 a	89,07±23.99 a	88.87±8.53 a	92.31±7.89 a	84.01±7.90 a
96	100±11 a	90.06±7.65 a	67.87±7.74 a	98.25±2.68 b	95.52±2.76 a	93.18±2.05 a
120	100±59.37 a	76.15±1.83 b	71.07±5.15 b	80.39±7.30 a	94.41±0.55 a	83.78±4.18 a

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). BPO (butóxido de piperonila).

4.3 Eficácia de *Metarhizium anisoplie* sobre *Rhipicephalus microplus*

Para avaliar a eficácia *in vitro* do fungo no controle do carrapato foi observada, através de um estereoscópio, a mortalidade das fêmeas de *R. microplus* da cepa Jaguar durante 20 dias para calcular o valor do Tempo Letal de 50% da população (TL_{50}) para as suspensões fúngicas. As TL_{50} foram de 12,6; 10,3 e 8,7 dias para as concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL, respectivamente (Figuras 10 e 11). O grupo controle e os grupos

tratados apenas com acaricidas não apresentaram mortalidade acima de 50% durante o período analisado (20 dias). No entanto, quando a suspensão de *M. anisopliae* (10^8 conídios/mL) foi associada com acaricidas, houve aumento da mortalidade (Tabela 4). Em alguns casos os valores de mortalidade foram menores que 50% ao final do experimento. Assim, o TL₅₀ não pode ser calculado. Em todos os experimentos, a taxa de sobrevivência dos carrapatos no grupo controle (sem tratamento) foi de 100%.

Tabela 4 Avaliação de TL₅₀ de *Rhipicephalus microplus* tratado com *Metarhizium anisopliae* e acaricidas isoladamente ou em associação.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os números entre parênteses representam

Tratamentos	Solução/Suspensão	TL ₅₀ (IC 95%)	% Mortalidade acumulada
Controle	Água	ND	3,66 (2,78 – 4,54)
Acaricidas	Amitraz	ND	2,33 (2 – 2,66)
	Clorpirifós		3
	Cipermetrina		2,33 (2 – 2,66)
	Cipermetrina+Clorpirifós		3,33 (3 – 3,66)
	Cipermetrina+Clorpirifós+BPO		2,66 (2 – 3,32)
<i>M. anisopliae</i>	10 ⁶	12,6 (11,7 - 13,5)	100
	10 ⁷	10,3 (9,4 – 11,2)	100
	10 ⁸	8,7 (8,4 - 9)	100
<i>M. anisopliae</i> com acaricidas	Amitraz	9,5 (8 – 9)	100
	Clorpirifós	9,25 (7 – 11,5)	100
	Cipermetrina	8,65 (7,85 – 9,45)	100
	Cipermetrina+Clorpirifós	6,56 (6,56 – 6,86)	100
	Cipermetrina+Clorpirifós+BPO*	6,48 (6,18 – 6,78)	100

o erro padrão. A morte dos carrapatos foi verificada todos os dias após o tratamento, por 20 dias. ND - não determinado (mortalidade <50%)

*BPO (Butóxido de piperonila).

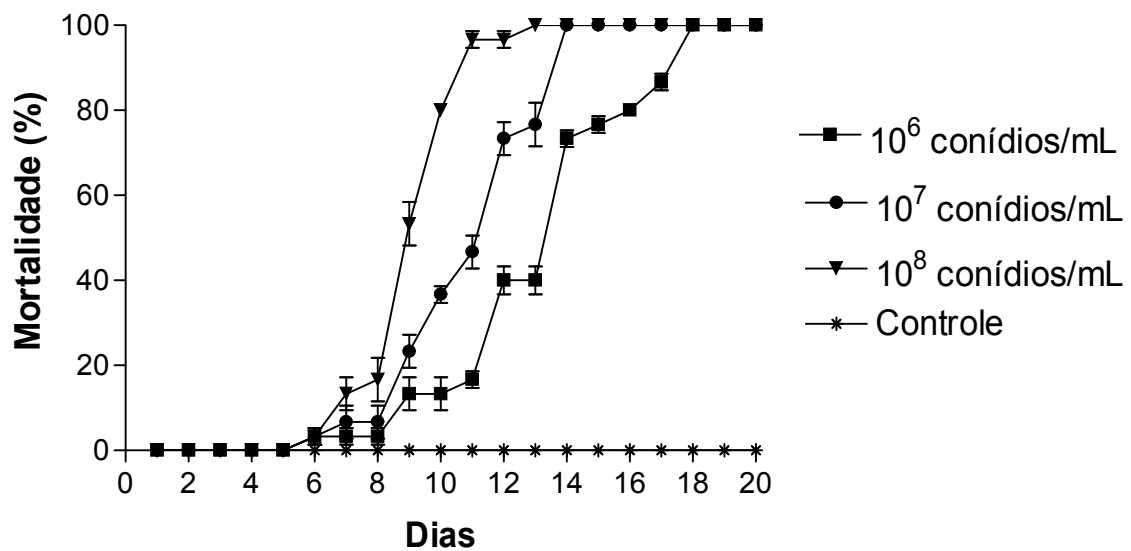


Figura 11: Mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações de suspensões de *Metarhizium anisopliae* (10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL). Cada grupo foi composto por 10 carrapatos em triplicata. As barras representam o erro padrão. A morte dos carrapatos foi verificada todos os dias após o tratamento, por 20 dias.



Figura 12: Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas com *Metarhizium anisopliae* sete dias após tratamento. Observar a completa cobertura da superfície do carrapato com hifas brancas do fungo.

Arquivo pessoal: Anelise Webster

4.4 Ensaio a campo

Todos os grupos tratados: G1 (solução acaricida de cipermetrina 0,015% + clorpirofós 0,048%) G2 (suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL) e G3 (associação de suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL com solução acaricida de cipermetrina 0,015% + clorpirofós 0,048%) mostraram carga de carrapatos significativamente menor ($p \leq 0,05$) quando comparado com o grupo controle, demonstrando assim a eficácia dos tratamentos (Figura 14) durante a maior parte do experimento. Este resultado foi obtido através da contagem das fêmeas ingurgitadas maiores do que 4-5 mm do lado esquerdo dos animais.

Nos dias 42, 49, 119, 126 e 154 de contagem o grupo tratado com acaricida não apresentou diferença significativa com o grupo controle assim como os dias 42, 49, 98, 105, 126 e 140 para o grupo tratado com fungo *M. anisopliae*. O grupo tratado com a associação de suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL com solução acaricida mostrou um número significativamente menor de carrapatos *R. microplus*, em todas as contagens quando comparado com o grupo controle.

Os grupos tratados com a suspensão do fungo ou acaricida isoladamente apresentaram uma eficácia semelhante, com média de 75%. A variação de eficácia foi de 55-86% para o grupo tratado com a suspensão de *M. anisopliae* e de 59-95% com a solução acaricida isoladamente. No entanto, a associação entre o fungo *M. anisopliae* e o acaricida promoveu uma eficácia no controle do carrapato *R. microplus* de 91,7% após o primeiro tratamento (dia 7) e acima de 98% nos outros seis tratamentos (dia 28, 56, 77, 98, 119 e 140) (Figura 13). Os animais foram avaliados semanalmente, durante as contagens dos carrapatos, para verificar a sanidade dos bovinos e detectar qualquer alteração em seus

parâmetros fisiológicos. Não houve nenhuma evidência de qualquer reação adversa nos animais dos grupos tratados.

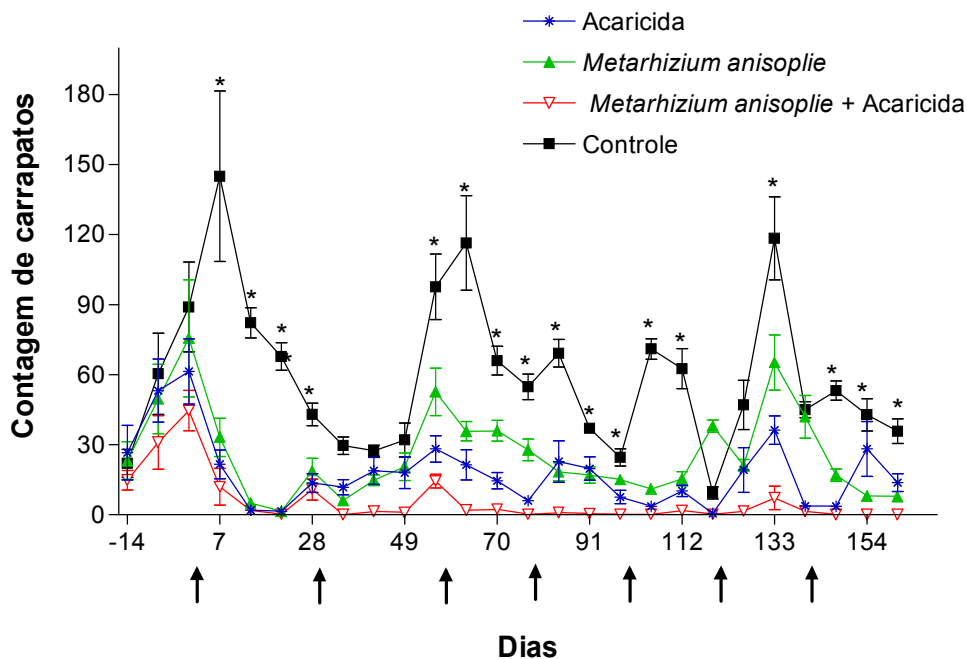


Figura 13: Determinação do número de carrapatos nos grupos de bovinos com os diferentes tratamentos: G1-em azul (solução acaricida de cipermetrina + clorpirofós) G2-em verde (suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL) e G3-em vermelho (associação de suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL com solução acaricida de cipermetrina + clorpirofós) e controle (sem tratamento). A avaliação (contagem do número de carrapatos) foi realizada durante todo experimento (182 dias) uma vez por semana. As setas indicam os dias de tratamento.

* Grupos tratados diferem significativamente ($p \leq 0,05$) do grupo controle.

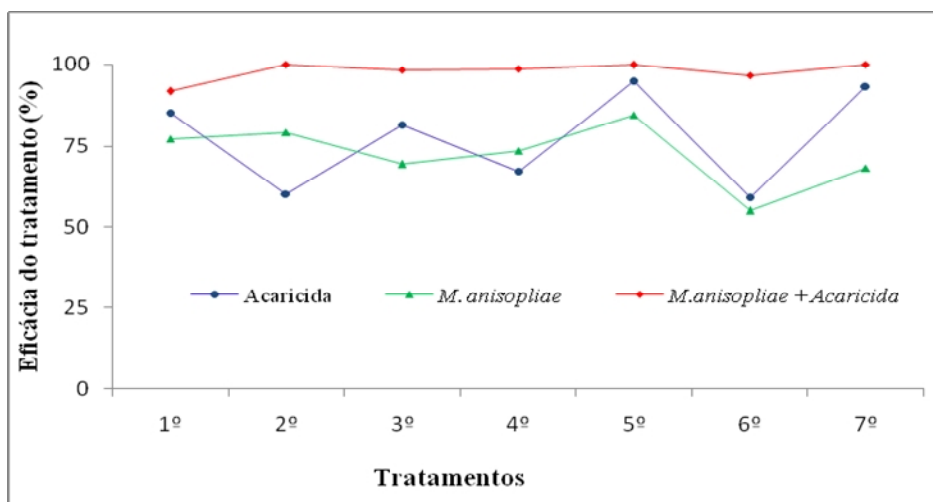


Figura 14: Porcentagem de eficácia dos tratamentos. G1-em azul (solução acaricida de cipermetrina + clorpirofós) G2-em verde (suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL), e G3-em vermelho (associação de suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL com solução acaricida de cipermetrina + clorpirofós). Determinada como a porcentagem de redução de carrapato, quando comparado pela contagem do número de carrapatos nos animais com o grupo de controle, uma semana após o tratamento. Dias dos tratamentos: 0, 28, 56, 77, 98, 119 e 140.

5. DISCUSSÃO

O ectoparasitismo por carrapatos é um problema importante para a pecuária em várias regiões do mundo, em especial em rebanhos bovinos. No Brasil os rebanhos, principalmente das regiões de clima tropical e subtropical (HORN & ARTECHE, 1985) estão sujeitos a infestações pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* causando perdas importantes na produção animal (JONSSON, 2006; PEREIRA & LABRUNA, 2009). A infestação por este carrapato causa diversos prejuízos pela diminuição de ganho de peso, custos com antiparasitários, diminuição da produção de leite, depreciação do couro e lesões contaminadas, predispondo a ocorrência de mifases (MARTINS, 2004).

O controle destes carrapatos é majoritariamente realizado pelo uso de carrapaticidas, em especial compostos organofosforados, piretróides, amitraz, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron (KLAFKE, 2009). Esse controle acarreta, pelo menos, dois efeitos negativos: (i) a contaminação do ambiente e do produto final (carne, leite, etc) e (ii) a seleção de carrapatos resistentes aos acaricidas. Portanto, objetivos importantes é o levantamento de dados sobre essas populações de carrapatos resistentes a acaricidas e o desenvolvimento de métodos mais eficientes de controle (BEYS DA SILVA *et al.*, 2012). Neste particular, o uso do controle biológico utilizando principalmente fungos entomopatogênicos tem mostrado um grande potencial de aplicação.

Neste estudo abordamos dois aspectos do controle biológico de carrapatos, em condições de campo, utilizando como modelo o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e a compatibilidade da utilização conjunta do controle biológico e químico para controlar uma cepa resistente a acaricidas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Um aspecto fundamental que permitiu a realização deste trabalho foi a colaboração entre o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) e o Centro de

Biotecnologia da UFRGS abordando assim tanto experimentos em nível de laboratório quanto experimentos a campo.

Neste estudo foram avaliadas amostras de populações de *R. microplus*, provenientes do Estado do Rio Grande do Sul onde foram utilizados os principais grupos químicos de acaricidas disponíveis no mercado (amitraz, piretróides sintéticos, organofosforados e suas associações), destes, com exceção de duas associações detectou-se percentual característico de resistência (eficácia < 85%) demonstrando assim que a distribuição da resistência de carrapatos a acaricidas está disseminada também pelo território de clima subtropical (FAO, 2004).

Dentre estas amostras foi isolada e mantida em laboratório uma cepa, denominada Cepa “Jaguar”, com alto grau de resistência aos acaricidas *in vitro*. Estudos anteriores já relataram cepas com resistência a diversas classes de acaricidas. KUNZ & KEMP (1994) descreveram uma cepa de carrapato *R. microplus* com característica de resistência à amitraz e piretróide sintético e BENAVIDES e colaboradores (2000) descreveram resistência a amitraz, piretróide sintético e organofosforado. FERNÁNDEZ-SALAS e colaboradores (2012) descreveram uma cepa de *R. microplus* com características de resistência à quatro famílias de produtos químicos: organofosforados, piretróides sintéticos, amitraz e ivermectina.

Em um estudo recente POHL e colaboradores (2012) utilizando o Teste de Pacote de Larvas (TPL) relataram a cepa Jaguar com resistência à uma quarta classe de acaricida: as lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina e moxidectina). De acordo com LANUSSE e colaboradores (1997) as lactonas macrocíclicas surgiram como uma alternativa para o controle do *R. microplus*, no entanto, já foram descritos casos de

resistência à essa classe de acaricidas (MARTINS & FURLONG, 2001; KLAFKE *et al.*, 2006; PEREZ-COGOLLO *et al.*, 2010).

A aplicação de um produto químico mais do que seis vezes por ano, pode contribuir para o desenvolvimento de populações resistentes (MENDES *et al.*, 2011). Com o desenvolvimento da pecuária intensiva, as populações de carrapatos têm sido submetidas à aplicações freqüentes de todas as classes de acaricidas disponíveis no mercado, levando assim à seleção de indivíduos com grau de resistência cada vez mais elevado (ALONSO-DÍAZ *et al.*, 2007). Portanto nosso estudo, bem como em outros na literatura, evidencia populações resistentes que devem ser submetidas a experimentos que permitam um conhecimento mais detalhado que possa auxiliar nos métodos de controle.

Uma das alternativas para o controle de cepas resistentes de carrapatos a acaricidas seria o uso combinado do controle biológico com o químico (ALVES *et al.*, 1998). Desta forma avaliamos a compatibilidade de *Metharhizium anisopliae* (cepa E6) com cinco acaricidas comerciais. SCHUMACHER & POEHLING (2012) utilizando acaricidas em baixas dosagens em duas cepas de *M. anisopliae* (MA-K e MA-7) demonstraram a compatibilidade do fungo com amitraz e piretróide (permetrina). De acordo com BATISTA FILHO e colaboradores (2001) utilizando a cepa SPL 358 de *M. anisopliae* consideraram que o piretróide (deltametrina) não inibiu o crescimento vegetativo, no entanto, inibiu a conidiogênese do fungo. MOHAMED e colaboradores (1987) utilizando a cepa E9 mostraram que o produto químico clorpirifós foi tóxico para o crescimento micelial e para a esporulação, e que o piretróide não inibiu o desenvolvimento do fungo. RODRIGUES e colaboradores (2002) observaram que uma associação de OF (diclorvós) + PS (cipermetrina) não apresentou ação inibidora no desenvolvimento do fungo. Em nosso estudo, determinamos que uma associação de OF + PS (clorpirifós 50% e cipermetrina

20%) não induziu a viabilidade do fungo. Assim, este acaricida foi o escolhido para ser utilizado no ensaio a campo.

Nos experimentos de laboratório com as diferentes concentrações de suspensões aquosas de *M. anisopliae* foi demonstrada que a maior concentração (10^8 conídios/mL) apresentou melhor resultado quando comparada com as concentrações inferiores levando a uma mortalidade de 100% em 13 dias após o tratamento. De acordo com a literatura a mortalidade está diretamente relacionada com a concentração de esporos de *M. anisopliae* utilizadas nos tratamentos (BITTENCOURT, *et al.*, 1994; ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000; MELO *et al.*, 2006 e OJEDA-CHI *et al.*, 2010) FRAZZON e colaboradores (2000) demonstraram mortalidade de 50%, utilizando isolados E6S1, E6S2 e E9 de *M. anisopliae* em *R. microplus* cinco dias após a aplicação de esporos e uma mortalidade de 100% dentro de 2 semanas após o tratamento em condições de laboratório. MONTEIRO *et al.*, (1998) verificaram que uma concentração $7,5 \times 10^8$ conídios/mL de *M. anisopliae* (Cepa E9) foi mais eficaz, com o fungo esporulando em 91% das fêmeas de *R. microplus*, ou seja, uma concentração 7,5 vezes maior do que a utilizada em nosso estudo para obter resultados semelhantes.

ALVES e colaboradores (1998) propuseram que o grau de compatibilidade de produtos biológicos e químicos pode resultar em uma maior eficácia no tratamento de alguns artrópodes menos suscetíveis ou resistentes a produtos químicos. BATISTA FILHO e colaboradores (2001); HIROMORI & NISHIGAKI (2001) sugerem que um aumento da patogenicidade de fungos sobre carrapatos pode ser obtido através da combinação do fungo com baixas doses dos produtos químicos para provocar um estresse no sistema imune do hospedeiro, deprimindo assim sua resposta. BAHIENSE e colaboradores (2006) descreveram que as associações de *M. anisopliae* e piretróide (deltrametrina) mostraram

uma taxa de mortalidade maior do que os tratamentos com fungo ou piretróide isoladamente, sugerindo que a associação de fungos e produtos químicos podem ser utilizados em concentrações menores, para diminuir os custos, otimizar os benefícios, aumentar a segurança e eficácia. Em nosso estudo foi demonstrado que quando a suspensão de 10^8 conídios/mL de *M. anisopliae* (Cepa E6) foi associada com acaricidas (amitraz, cipermetrina, clorpirifós e associações de cipermetrina + clorpirifós e cipermetrina + clorpirifós + BPO) houve aumento na mortalidade de uma cepa de *R. microplus* resistente a acaricidas. Tendo em vista esta constatação em condições de laboratório, havia a necessidade de se comprovar esta proposta em condições de campo.

Em nosso estudo a campo os tratamentos dos animais G1 (solução acaricida de cipermetrina + clorpirifós), G2 (suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL) e G3 (associação de suspensão de esporos de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/mL com solução acaricida) foram realizados no final da tarde, para minimizar os efeitos adversos da luz solar como a radiação de raios UV-A e UV-B, que podem interferir na germinação do fungo e nas fases iniciais de desenvolvimento dos tubos geminativos (BRAGA *et al.*, 2001; FRANCISCO *et al.*, 2008). A escolha foi semelhante à dotada por ALONSO-DIAZ *et al.*, (2007) que aplicou o tratamento com os conídios às 18-19 horas, quando a temperatura oscilou entre 28 a 32°C, na ausência de luz solar. Este procedimento pode ajudar a infecção do fungo no hospedeiro pelo mecanismo de penetração dos conídios através da cutícula (ARRUDA *et al.*, 2005). A realização de experimento a campo possibilita constatar as reais adversidades que o fungo pode encontrar para ser utilizado de fato como biocontrolador para o carrapato *R. microplus*, demonstrando sua viabilidade e eficácia sob efeitos ambientais como sol e chuva, os quais

não são possíveis de serem observados em condições de laboratório além dos efeitos sobre o animal, como temperatura e umidade.

De acordo com a literatura a temperatura ótima e a umidade relativa para a maioria dos isolados de *Metarhizium* spp. está em torno de 25°C e de 55 a 75% respectivamente (OUEDRAOGO *et al.*, 1997; MICHALAKI *et al.*, 2006) . A média de temperatura no campo, durante o período do experimento foi de 20°C, com uma variação entre 33°C (máxima) (Fevereiro de 2012) e de 9°C (mínima) (Julho de 2012) no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em Eldorado do Sul.

Considerou-se que a temperatura não afetou a ação de *M. anisopliae* sobre os carrapatos nas nossas condições de campo, demonstrando que este fator não é um impedimento para a aplicação deste organismo em qualquer lugar do mundo que possua variação de temperatura semelhante à descrita anteriormente. ANGEL-SAHAGUM e colaboradores (2010) tiveram uma variação significativa de temperatura (19-30°C) durante seu experimento a campo para o controle de larvas de *R. microplus* em pastagem utilizando a Cepa MA 14. KAAYA e colaboradores (2011) demonstraram grandes flutuações em seus dados meteorológicos, especialmente na precipitação e umidade relativa do ar com a maior precipitação de janeiro a março e a maior umidade relativa foi de fevereiro a abril, assim como em nosso estudo (Figura. 13). Neste estudo, *M. anisopliae* na formulação aquosa contendo 0,02% de Triton X-100 foi utilizado para controlar *R. microplus* em bovinos. Um dos entraves para o uso do fungo para o controle do carrapato bovino é a possibilidade de efeitos adversos nos animais. Durante todo o período do experimento (182 dias) os animais foram avaliados semanalmente para verificar a sanidade dos mesmos e detectar qualquer alteração em seus parâmetros fisiológicos. Não houve nenhuma evidência de qualquer reação adversa nos animais dos grupos tratados. Todos permaneceram saudáveis durante o

período do experimento assim como nos estudos conduzidos por ALONSO-DIAZ e colaboradores (2007) e KAAYA e colaboradores (2011).

Os resultados obtidos em nosso estudo foram mais significativos do que estudos anteriores onde foi utilizada uma formulação de óleo e conídios de *M. anisopliae* (10^8 conídios/mL), aplicada a cada 3-4 semanas em um período de um ano onde foi observada a redução de 83% nas populações de *R. evertsi evertsi* e *R. (B.) decoloratus* sobre bovinos a campo (KAAYA *et al.*, 2011). Em outro estudo conduzido por ALONSO-DIAZ e colaboradores (2007), utilizando (10^8 conídios/mL) de *M. anisopliae* em formulação aquosa com Tween-80 no controle de *R. (B.) microplus* mostrou uma redução de 45% da população de carrapatos após o segundo tratamento assemelhando-se ao obtido por DE CASTRO e colaboradores (1997) que registraram uma diminuição de 50% na população *R. microplus* tratados com o fungo em teste de estábulo. Estas diferenças podem ser atribuídas tanto as condições ambientais como as diferenças de virulência entre cepas utilizadas.

O fato dos grupos tratados com a suspensão de fungo ou acaricida, isoladamente terem demonstrado a mesma eficácia média, e maior eficácia para o grupo tratado com o fungo após dois dos sete tratamentos, confirmam a relevância deste estudo que mostra uma perspectiva real para adotar este controle em grande escala.

Os dados aqui apresentados mostram que *M. anisopliae* (cepa E6) e acaricidas (amitraz, cipermetrina, clorpirifós e associações de cipermetrina + clorpirifós e cipermetrina + clorpirifós + BPO) agem sinergicamente e de forma mais eficiente para controlar carrapatos. Assim, a possibilidade de combinação de estratégias diferentes e complementares no controle deste ectoparasita, como a utilização de controle químico

convencional por acaricidas e controle biológico com microrganismos, como fungos artropatogênicos, deve ser considerado como recurso para controlar carrapatos com elevado nível de resistência aos acaricidas.

Neste trabalho objetivamos contribuir com experimentos em laboratório e a campo para demonstrar a real possibilidade de utilizar formulações compostas por *Metarhizium anisopliae* (Cepa E6) e acaricidas para o controle de populações do carrapato *Rhipicephalus microplus* resistentes a acaricidas.

Mostramos assim que a formulação de *M. anisopliae* associado à acaricida foi capaz de controlar o carrapato *Rhipicephalus microplus* em bovinos.

6. CONCLUSÕES

M. anisopliae (cepa E6) foi compatível com a maioria dos acaricidas testados, não afetando sua viabilidade.

Uma população de *R. microplus* resistente à acaricidas químicos foi suscetível ao tratamento com esporos do fungo *M. anisopliae*

Quando utilizados em associação, esporos do fungo *M. anisopliae* e carrapaticida o tratamento foi mais eficaz contra o carrapato tanto nos experimentos *in vitro* quanto no ensaio a campo com bovinos infestados em relação aos tratamentos isolados.

Houve eficácia no tratamento a campo com *M. anisopliae* (Cepa E6) associado ou não a acaricida químico (cipermetrina + clorpirifós)

7. PERSPECTIVAS

Estudos futuros são necessários para se obter uma formulação comercial viável do agente biológico com acaricidas.

Avaliar a interação entre fungo e acaricida ao nível de mecanismos.

8. REFERÊNCIAS

- AKHTAR, A.; FUCHS, E.; MITCHISON, T.; SHAW, R. J.; JOHNSTON, D. S. T.; STRASSER, A.; TAYLOR, S.; WALCZAK, C. & ZERIAL, M. A decade of molecular cell biology: achievements and challenges. *Nature Reviews- Molecular Cell Biology*. Volume 12, october. 669, 2011
- ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. Ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2a ed., Piracicaba, 1998.
- ALVES, S. B.; MOINO, J. R. & ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, p. 217-238, 1998.
- ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* structures during the penetration events leading to the infection of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 37: 231-244, 2005.
- BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E. K. K & BITTENCOURT, V. R. E. P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology*, v. 141, p 319–324, 2006.
- BARCI, L. A. G.; WENZEL, I. M.; DE ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C. & DO PRADO, A. P. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 18, supl. 1, p. 63-68, dez. 2009
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. & LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 3, p. 437-447, Sep. 2001.
- BATTA, Y. A. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*, 22: 415-422, 2003.
- BENAVIDES, E.; RODRÍGUEZ, J. L. & ROMERO, A. Isolation and partial characterization of the montecinos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini 1877) multiresistant to different acaricides. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, v. 916, p. 668–671, 2000
- BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; CORRÊA, A. P.; SILVA, L. A.; BRESCIANI, F. R.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. 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.
- BEYS-DA-SILVA W. O., SANTI L., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Biocontrol of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the acaricidal fungus *Metarhizium*

anisopliae. In: Woldemeskel M (editor). Ticks: Disease, Management and Control. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers Inc., 2012; 217–46.

BITTENCOURT, V.R. Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. *Annals of the New York Academy of Science*, 916: 555-558, 2000.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G. & FACCINI JLH. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Revista Ciência Rural*, 29: 351-354, 1999.

BITTENCOURT; V. R. E. P.; MASSARD, C. L & LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural- Série Ciência da Vida*. 16: 32-38, 1994.

BOGO, M. R.; ROTA, C. A.; PINTO, J. R. H.; CAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology*, 37: 221 e 225, 1998.

CAMPBELL, W. C. & BENZ G. W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 7:1-16, 1984.

CASTRO, A. B. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. & DAEMON E. Eficácia in vivo do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Revista Universidade Rural*, 19: 73-82, 1997.

CASTRO-JANER, E., J. R. MARTINS, M. C. MENDES, A. NAMINDOME, G. M. KLAFKE, AND T. T. SCHUMAKER. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Vet. Parasitol.* 173:300-306, 2010.

COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 22:245-261, 1993.

CONWAY, G. R. & COMINS, H. N. *Resistance to pesticides*. 2. In: Lessons in strategy from mathematical models. *Span*, v. 22, n.2 p. 53-55, 1979.

CORDOVÉS, C.O. *Carrapatos: controle e erradicação*, Alegrete, ed. Gralha, p.130, 1999

CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C, MONTEIRO, A. C. & VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 189-191, 1998.

CUORE, U., A. TRELLES, J. SANCHIS, V. GAYO, AND M. A. SOLARI. Primer diagnostico de resistencia al Fipronil en la garrapata comun del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria* 42:35-41, 2007.

- DA SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. *Research in Microbiology*, 156: 382–392, 2005.
- DE CASTRO, A. B. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E., VIEGAS, E. D. C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Rev. Univ. Rural*, Sér. Cienc. da Vida. 19, 73–82, 1997.
- DENHOLM, I. & ROWLAND, M. W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annual Review of Entomology*, v. 37, n. 1, p. 91-112, 1992.
- DRIVER F, MILNER R. J. & TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104: 134-150, 2000.
- DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J. & GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*. Laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, n.66, p.130-133, 1973.
- ESTRADA-PEÑA, A.; GARCÍA, Z. & FRAGOSO, S. H. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Exp. Appl. Acarol*, 38, 307–316, 2006.
- FAO, Food and Agriculture Organisation (Roma, Itália). *In: Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines*. Roma: Food and Agriculture Organisation, Animal Production and Health Division, 53 p, 2004.
- FARIA, M. R, & WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*, 43, 237-256, 2007.
- FERNANDES, E. K, COSTA, G. L, MORAES, A. M. & BITTENCOURT, V. R. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Basic Microbiology*.44: 270-274, 2004.
- FERNÁNDEZ-SALAS A, RODRÍGUEZ-VIVAS R.I. & ALONSO-DÍAZ MA First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multiresistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 183:338–342, 2012.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J. & LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet*, v. 20, p. 163-70, 2004
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Rep. FAO In: *Panel of Experts on Integrated Pest Control*, 5th, Oct. 15–25, 1974. Rome, Italy: FAO-UN, *Meeting Rep.* 1975/M/2. 41 p, 1975

FRAZZON, A. P. G.; VAZ, Jr. I. V. S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 93: 117-125, 2000.

FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C. & VAZ, I. S. J. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.33, p. 109- 17, 2005.

GEORGE, J. E. Present and future technologies for tick control. *Ann. NY Acad. Sci.* v. 916, p. 583-588, 2000.

GOETTEL, M. S & HAJEK, A. E. Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. In: WAJNBERG E, SCOTT JK, QUIMBY PC (Eds) Evaluating indirect ecological effects of biological control. *CAB International, Wallingford*, p. 81-97, 2000.

GONZALES, J. C. In: *O Controle do Carrapato do Boi*. 2.Ed. Porto Alegre, Ed. do autor 79p. 1995.

GONZALES, J. C. In: *O Controle do Carrapato do Boi*. 3.Ed. Passo Fundo, Ed. da Universidade de Passo Fundo, 128 p., 2003.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R. & WAGNER, E. M. O ciclo parasitário de *Boophilus microplus* (Can. 1887) em bovinos estabulados. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 2:25-34, 1974.
GONZALEZ-ACUÑA D. & GUGLIELMONE A. A. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae: Ixodidae) of Chile. *Experimental and Applied Acarology*, 35: 147-163, 2005.

GRIMM, C. Economic feasibility of small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Protection*, 20: 623-630, 2001.

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

GUERRERO, F. D.; DAVEY, R. B. & MILLER, R. J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol*, v. 38, n. 1, p. 44-50, 2001.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R. S. & ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D.MB.; Arzua, M.; Bechara, G.H (Eds). Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: In: *Um guia ilustrado para identificação de espécies*. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo/BR, P.115-138, 2006.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C. & BARROS-BATTESTI, D. M. In: *Ectoparasitos de importância veterinária*, Editora Plêiade, São Paulo, 2001.

- HIROMORI, H. & NISHIGAKI, J. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Appl. Entomol. Zool.*, 36 (2): 231–236, 2001.
- HORN, S. C. & ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Veterinária*, Ano 4. n 23, janeiro/fevereiro. 1985
- JENKINS, N. E. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycospasticides. *Biocontrol News Information*, 19: 21-31, 1998.
- JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.*, 137, 1–10, 2006.
- JONSSON, N. N. & M. HOPE. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 146:193-198, 2007.
- JONSSON, N. N.; BOCK, R. E. & JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology*, 155 1–9, 2008.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N. & OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20, 1996.
- KLAFKE, G. M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M.J. P.; Klafke, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência*. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-106, 2009.
- KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; ALBUQUERQUE, T. A., MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J. & SCHUMAKER, T. T. S. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 142, p. 386-390, 2006.
- KUNZ, S. E. & KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Sci. Technol.*, OIE. v. 13, p. 1249–1286, 1994
- LACEY, L. A., MARTINS, A. & RIBEIRO, C. The pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for adults of the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Eur. J. Entomol.*, 91, 313–319, 1994.
- LAVERLAM S. A. In: <http://www.cali.cetcol.net.com/~laverlam>. 1999. Acesso em: fevereiro de 2013

LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; SÁNCHEZ, S.; SUTRA, J. F.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 91-9, 1997.

LEEMON, D. M.; TURNER, L. B. & JONSSON, N. N. 2008. Pen studies on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Vet. Parasitology*, 156, 248-260.

LEITE, R. C. Problemas de planejamento ao combate do *Boophilus microplus*. In: *Seminário do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 5º, anais. Belo Horizonte, 1987.

LEORA SOFTWARE. in: J.L. Robertson, H.K. Preisler, R.M. Russel (Eds.), *Polo Plus Probit and Logit Analysis, User's Guide*. Berkeley, 36 pp 2003.

LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. & GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), *J. Med. Entomol*, v. 41, n. 2, p. 193–200, 2004.

LI, X; SCHULER, M. A. & BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol*, v. 52, p. 231-253, 2007.

LIU, Z.Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J.; YAO, Y. J. & LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 178-182, 2001.

LOVIS, L. Evaluation of acaricide resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, using a new in vitro test and molecular tools. Tese de doutorado. 2012

MARTINS, J. R & CORRÊA, B. L. Babesiose e anaplasmosse bovina: aspectos destas enfermidades. *Pesq. Agrop. Gaúcha*, Porto Alegre, v.1, n.1, p.51-58, 1995

MARTINS, J. R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec*, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.

MARTINS, J. R. Carrapato bovino: epidemiologia e controle. *Cad. Boas Prát. Prod*, 115-136, 2004.

MARTINS, J. R., FURLONG, J., PRATA, M. C. A., AND DOYLE, R. L. Acaricide resistance in Brazil and the use of mixture as chemical alternative for tick control, VI Seminario Internacional de Parasitologia Animal, Boca del Río, Veracruz, Mexico. 2008.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. In: *Controle Biológico* - volume 1. EMBRAPA: Jaguariúna – SP, 262 p. 1998.

MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; NOGUEIRA, A. H. C.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D. P.; GABRIEL, F. H. L.; UENO, T. E. H.; NAMINDOME, A. & KLAFKE, G. M., Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol*, 178, 383–388, 2011.

MILNER, R. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocon News Inform* 21(2): 47N-50N. 2000.

MOINO, J. R. A. M. & ALVES, S. B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis*. In: *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, v.27, n. 4, p. 611-619. 1998.

MURRELL, A. & BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol*, v. 56, p. 169-172, 2003.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N.M. & AZEVEDO JL. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research*, 62: 1478-1480, 2001.

PELL, J.K.; EILENBERG, J.; HAJK, A. E. & STEINKRAUS DC. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. In: BUTT TM, JACKSON C, MAGAN N (Eds.) *Fungal as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, p. 77-153, 2001.

PEREIRA, M. C. & LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M.C.; Labruna, M.B.; Szabó, M.J.P.; Klafke, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência*. MedVet Livros, São Paulo, p. 15-56, 2009

POHL, P. C.; KLAFKE, G. M.; JÚNIOR, J. R.; MARTINS, J. R.; DA SILVA VAZ, I. JR., MASUDA, A. 2012. ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res*. 111(6):2345-51.

POLAR, P.; KAIRO, M. T, MOORE, D.; PEGRAM, R. & JOHN SA. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160: 151-157, 2005.

POSTAL, J. M., JEANNIN R. P. C. & CONSALVI P.J. Field Efficacy of a Mechanical Pump Spray Formulation Containing 0.25% Fipronil in the Treatment and Control of Flea Infestation and Associated Dermatological Signs in Dogs and Cats. *Veterinary Dermatology* 6:153-158, 1995.

RECK, JR.; BERGER, M.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; DA SILVA, VAZ. J.R, I.; GUIMARÃES, J. A. & TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Research in Veterinary Science*, 86, 56–62, 2009.

RECK, J.; MARKS, F.; SOUZA, U. A.; WEBSTER, A.; RODRIGUES, R. O.; LEITE, R. C.; GONZALES, J. C.; KLAFKE, G. M. & MARTINS, J.R. Tick infestation is a risk factor for myiasis occurrence in cattle. Submetido para *Veterinary Parasitology*, 2013.

RIDDLES, P. W. & NOLAN, J. Prospects for the management of arthropod resistance to pesticides. In: "Parasitology. Quo Vadit?." *VI International Congress of Parasitology. Anais*, Brisbane, Ed. Australian Academy of Science, Canberra p. 679 – 687, 1986.

ROBERTSON, J.L., RUSSELL, R.M., PREISLER, H.K., SAVIN, N.E. Bioassays with Arthropods, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2007.

ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol. Today*, v. 9, n. 5, p. 174-179, 1993.

SAMISH, M.; GINSBERG, H. & GLAZER, I. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: *Bowman, A. S. & Nutall, P.A. (editors) Ticks – Biology, Disease and control. New York, Cambridge University Press. Pp. 447-469, 2008.*

SAMISH, M., GINSBERG, H. & GLAZER, I. Biological control of ticks. *Parasitology*, v. 129, p. 389-413, 2004

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n. 1-3, p. 89-109, 2001.

SANTI, L.; SILVA, L. A. D., BEYS-DA-SILVA, W. O.; CORRÊA, A. P. F., RANGEL, D. E. N.; CARLINI, C. R.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 27:2297–303, 2011.

SANTI, L.; SILVA, W. O., PINTO, A. F., SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biol*, 114(4):312, 2010.

SAUNDERS, D. S. AND C. HARPER. Pesticides. In A. W. Hayes (ed.), Principles and Methods of Toxicology, Third Edition. Raven Press, New York. p. 389-415, 1994.

SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56, 1267-1274, 2010.

SHAH, P. A. & PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotech*, 61: 413–423, 2003.

SCOTT, L. G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls, pp. 39-57. In R. T. Roush and B. E. Tabasnik (eds.), Pesticide resistance in arthropods. Chapman Hall, New York. 1990.

- SODERLUND, D. M. & BLOOMQUIST, J. R. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: TABASHNIK, B.E.; ROUSH, B.E. Pesticide Resistance in Arthropods. *New York: Chapman & Hall, Inc.*, p. 58-96, 1990.
- SONENSHINE, D. E. *Biology of ticks*. 2. Ed. New York: Oxford University Press, 465p, 1993.
- ST LEGER, R. J, COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 85-95, 1986.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol*, 58:415-426, 1991.
- STAATS, C. C.; KMETZSCH, L.; LUBECK, I.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biol*, 117(2):137-44, 2013.
- SUTHERST, R. W. & COMINS, H. N. The management of acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*, in Australia. *Bulletin of Entomological Research*, v. 69, p.519-537, 1979.
- SZABÓ, M. J. P. Imunopatologia da resistência de bovinos ao carrapato *R. (B) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M.J. P.; Klafke, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência*. MedVet Livros, São Paulo, p. 81-106, 2009.
- TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J.* 161:253-268, 2001.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 407-411, 1976.
- VIJVERBERG, H. P., J. M. VAN DER ZALM, AND J. VAN DER BERCKEN. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. *Nature* 295:601-603, 1982.
- VILLANI, M. G., S. R. KRUEGER & NYROP J. P. A case study of the impact of the soil environment on insect/pathogen interactions: scarabs in turfgrass. In *Use of Pathogens in Scarab Pest Management* (T. R. Glare and T. A. Jackson eds.). *Intercept, Hampshire*, p. 111–126, 1992.
- WAGO, H. Host defense reactions of insects. *Jpn. J.Appl. Entomol. Zoo*, 39: 1– 4 In Japanese with English summary. 1995

WHARTON R. H. & UTECH K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestkini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. *J. Aust. Entomol. Soc.*, 9:171-82, 1970.

WHARTON, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R.; WHARTON RH. *Control of arthropods of medical and veterinary importance*. New York, Plenum Publishing, p. 36-52, 1974.

ZHAO, X., J. Z. YEH, V. L. SALGADO, & NARAHASHI T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310:192-201, 2004.

ZHIOUA, E.; BOWING, M.; JONHSON, P. W.; GINSESBERG, H. S. & LEBRUM RA. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*, 83: 815-818, 1997.

9. ANEXOS

9.1 Manuscrito a ser submetido à Revista *Veterinary Parasitology*

***Rhipicephalus microplus* acaricide resistant strain: integrated control using *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions**

Anelise Webster^{1,2}, José Reck², Lucélia Santi¹, Ugo Souza², Bruno Dall'Agnol², Guilherme M. Klafke², Marilene H. Vainstein¹, Walter Beys¹, João Ricardo Martins², Augusto Schrank¹

¹*Centro de Biotecnologia - UFRGS*

²*Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) – FEPAGRO-RS*

Corresponding author: Augusto Schrank. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, lab. 217. Porto Alegre, RS. Brazil. CEP: 91501-970. Phone.: +55 (51) 3308-6079; Fax.: +55 (51) 3308-7309.

E-mail address: aschrank@cbiot.ufrgs.br (A. Schrank)

Abstract

The efficacy of the fungus *Metarhizium anisopliae* to control ticks has been shown in several *in vitro* experiments. However, there have been few studies in field conditions in order to demonstrate the real applicability of the biological control of ticks. The aim of the present study was to evaluate the efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control *Rhipicephalus microplus* under laboratory and field conditions. Initially, the compatibility of *Metarhizium anisopliae* strain E6 with acaricides was evaluated *in vitro* using five different formulations: amitraz, cypermethrin, chlorpyrifos and two acaricide mixtures (chlorpyrifos + cypermethrin and chlorpyrifos + cypermethrin + pyperonilbutoxide). In general, the acaricides treatments determined mild effects on fungus viability. The lower fungal viabilities were obtained after treatment with amitraz (63% after 48 hours) and

chlorpyrifos (67% after 96 hours). The efficacy of *M. anisopliae* to control an acaricide-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* was evaluated *in vitro* and under field conditions in tick infested cattle, using the fungus alone or in association with a commercial acaricide by manual spraying. The field experiment was conducted with twenty bovines divided into four groups (n = 5); (i) acaricide-treated group, (ii) fungus-treated group, (iii) fungus+acaricide group, and (iv) control non-treated group. Animals were allocated into highly infested paddocks and were also experimentally infested with 20,000 larvae with Jaguar strain of *R. microplus* in three sequential weeks 21, -14, and -7 days before the first treatment and one week after each treatment. Animals in the treated groups were sprayed with *M. anisopliae* at a concentration of 10^8 conidia/mL at 21 days intervals (seven treatments). From the first treatment to the end of the experiment, animals in the three treated groups had lower tick infestation ($P < 0.05$). Groups treated with fungus suspension and acaricide alone, presented a similar efficacy, with minimal of 50% and 75% average. Importantly, the association of fungus and acaricide promoted a minimal percent of 91.7% tick-control after the first treatment and over 98% tick-control in the other six treatments. Thus in this work we demonstrate the real applicability of the use of *M. anisopliae* (strain E6) to control acaricide resistant ticks *R. microplus* in particular using the association of fungal spores and acaricides.

Keywords: Biological control, Acaripathogenic fungi, Tick, *M. anisopliae*, *R. microplus*, acaricide resistance.

Introduction

Rhipicephalus microplus is a cattle hematophagous ectoparasite, which is present in tropical and subtropical areas (Estrada-Peña *et al.*, 2006). It causes anaemia, anorexia (Jonsson, 2006), immunosuppression (Inokuma *et al.*, 1993) and other systemic disturbances in their hosts (Reck *et al.*, 2009). This tick is vector of Cattle Tick Fever, an important disease of cattle, caused by *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *B. bigemina* (Jonsson *et al.*, 2008). The economical losses related to tick parasitism are estimated in two billion dollars per year in Brazil, mainly due to skin damage, reduction in milk production, decreased weight gain and acaricide-control costs (Griset *et al.*, 2002).

R. microplus control is performed mainly by chemical acaricides; however there are multiple reports of tick resistant strains (Martins & Furlong, 2001; Alonso-Diaz *et al.*, 2006; Rodriguez-Vivas *et al.*, 2006; Castro-Janer *et al.*, 2010). The indiscriminate use of acaricides, incorrect dose application, and the beginning of treatments only when cattle shows a high tick load contribute to the development of acaricide resistance (Soares *et al.*, 2001). In addition, the public concern with acaricide residues in the environment and the demand for chemical-free food contributes to the search for an alternative method of control for *R. microplus* (Kay & Kemp., 1994; Samish, *et al.*, 2004).

The use of microorganisms for the biological control of arthropods was first proposed in the middle of the 19th century; nevertheless, the full potential and the many advantages of this practice have only recently been applied at a commercial scale. In this scenario, *Metarhizium anisopliae* is the most studied entomopathogenic fungi (Schrank & Vainstein, 2010). The infection of arthropods by *M. anisopliae* involves a combination of two processes: the mechanical pressure exerted by appressoria (St Leger *et al.*, 1986) and

cuticle degradation by hydrolytic enzymes such as lipases (Beys da Silva *et al.*, 2010), proteases (Santi *et al.*, 2010) and chitinases (Da silva *et al.*, 2005, Staats *et al.*, 2013).

M. anisopliae effect on *R. microplus* ticks has been evaluated in several *in vitro* studies (Bittencourt *et al.*, 1992; Frazzon *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2001; Onofre *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2004; Arruda *et al.*, 2005; Polar *et al.*, 2005; Bahiense *et al.*, 2006; Lemmon and Jonsoon, 2008). However, its efficacy in pen trials (Correia *et al.*, 1998; Bahiense *et al.*, 2007; Leemon *et al.*, 2008), and when it was directly applied in pasture (Garcia *et al.*, 2011) have shown not to be efficient.

Some promising studies were made in field conditions (Polar *et al.*, 2005; Alonso-Díaz *et al.*, 2007; Ojeda-Chi *et al.*, 2010) and demonstrated the need for more researches in this scenario. However, the potential of entomopathogenic fungi as tick-control agents is often under-estimated, because they are considered too restricted by the environmental conditions normally present in tick habitats (Fernandes *et al.*, 2012).

Despite the combination of *M. anisopliae* with synthetic acaricides has been suggested as a promising way to control resistant *R. microplus* strains, until now a few satisfactory results of acaricide-fungus compatibility and tick control were obtained (Bahiense *et al.*, 2006, 2008). In the present study, we evaluated the effect of *M. anisopliae* E6 strain alone or associated with commercial acaricides on an acaricide-resistant strain of *R. microplus in vitro* and under field conditions. Our findings demonstrated a significant decrease of *R. microplus* on cattle in the field by *M. anisopliae* sprayed alone or in combination with acaricides.

Materials and methods

Ticks

Rhipicephalus microplus engorged females from Jaguar strain were collected from experimentally infested animals housed in individual pens on slatted floors, maintained at Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul State, Brazil. This tick strain was used because of its resistance against several classes of acaricides, as previously demonstrated by *in vitro* assays using Adult Immersion Test (AIT) and Larval Packet Test (LPT) (Pohl *et al.* 2012). After collection, the females were transferred to the laboratory, washed with water and 2.5% sodium hypochlorite solution and then with sterile distilled water to avoid any contamination with others microorganisms.

Production of conidia and suspensions

M. anisopliae var. *anisopliae* E6 strain, a highly pathogenic isolate for ticks (Frazzon *et al.*, 2000) was maintained as previously described (Bogo *et al.* 1998). Fungus cultivation for conidia production was performed using 100 g of rice grains added to 30 mL of a 0.5% peptone solution. The medium was autoclaved in polypropylene bags for 30 min. In each bag, 10^6 spores were inoculated and then cultivated at 28°C for 14 days (Santi *et al.*, 2011). The rice grains were washed in 0.01% of sterile Tween 80, homogenized and the conidia concentration was determined using a Neubauer hemocytometer. The suspensions were diluted in sterile water (Beys da Silva *et al.*, 2010) at concentrations of 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL.

In vitro assays

Compatibility of *M. anisopliae* with commercial acaricides

M. anisopliae compatibility with acaricides was evaluated using five commercial acaricides: amitraz (0.025%), a cypermethrin (0.015%), chlorpyrifos (0.048%) and two associations of synthetic pyrethroid and organophosphate (SP+OP) (0.015% cypermethrin, 0.048% chlorpyrifos and 0.005% piperonylbutoxide; 0.02% cypermethrin and 0.05% clopyrifos). *M. anisopliae* suspensions (10^8 conidia/mL) supplemented with distinct commercial acaricides were inoculated in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (BDA) medium and maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80% humidity for eight different times (1, 5, 10, 24, 48, 72, 96 e 120 h). All experiments were performed in triplicate. The compatibility of *M. anisopliae* with acaricides was evaluated assessing the conidia viability by colony-forming units (CFU) determination from solutions in the respective times (Lacey *et al.*, 1994).

In vitro efficacy of *M. anisopliae* against *R. microplus*

M. anisopliae was tested in three different conidia concentrations (10^6 , 10^7 , 10^8 conidia/mL). All treatment groups had 10 engorged females and each treatment consisted of three replicates. Ticks were immersed in spore solutions for five minutes and after drying the females were placed in Petri dishes and incubated at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80% relative humidity for 20 days. Tick death was checked daily to determinate the median lethal time (LT₅₀).

In vitro efficacy of *M. anisopliae* combined with commercial acaricides against *R. microplus*

The highest conidia concentration (10^8 conidia/mL) was chosen to be combined with commercial acaricides, as described above. All groups had 10 engorged females and each treatment consisted of three replicates. Ticks were treated and maintained at the same conditions described for the assays using only *M. anisopliae*.

Field trial

Location

The field trial was conducted from February to July 2012 at Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) (30°03'06" S; 51°18'44" W), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul State, Brazil. The mean annual temperature and precipitation are 20°C and 1428.8 mm, respectively. Climate information for the studied period was obtained from a meteorological station of FEPAGRO located inside IPVDF (CEMETRS) (Figure 4).

Animals

Twenty bovines (*Bos taurus taurus*), 12-14 month old, with average weight of 231 kg \pm 58, were used for field assays. Cattle were maintained in four paddocks (\approx 1 ha each) at IPVDF. Paddocks were separated with electric fences. Cattle were sequentially infested with 20,000 larvae of *R. microplus* ticks from Jaguar strain at days -21; -14 and -7 of the first treatment and one week after each treatment. The tick load was evaluated by counting the number of tick females greater than 4.5 mm on left side of the animal (Wharton & Utech, 1970) once a week for the all the experimental period (six months).

Treatments

Animals were divided into four experimental groups of five animals each. Group 1 was sprayed with an acaricide solution (SP+OP); group 2 was sprayed with fungus suspension conidia (10^8 conidia/mL) with 0.02% Triton X 100; group 3 was sprayed with fungal conidia (10^8 conidia/mL) with 0.02% Triton X 100 added with an acaricide solution (SP+OP); and group 4 (control group) did not receive any treatment. Each animal was sprayed with eight liters of suspension/solution using a manual sprayer with a cone-type nozzle and a pressure of approximately 40 lb/in². The efficacy of treatments was determined as the percentage of tick reduction when compared to the control group (Bittencourt *et al.*, 2003). All groups received the treatments at intervals of 21 or 28 days. This interval was chosen because it was reported by Kaaya and co-workers (1996) that entomopathogenic fungi maintain their viability in the skin of animals for a period of 2-3 weeks and to coincide with the period of parasitism exerted by *R. microplus* (Pereira & Labruna, 2009)

Data analysis

The compatibility of fungus and commercial acaricides and the in field trial were assessed by the variance (ANOVA) followed by the Tukey's test with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$) calculated using the Prism software (3.0). The lethal time (LT₅₀) for engorged females was assessed using the Polo Plus software.

Results

Compatibility of *M. anisopliae* with commercial acaricides

The fungus viability, assessed by counting colony forming units (CFU) of *M. anisopliae* was not significantly affected by most of acaricides tested, there was no statistical difference between the groups where the fungus was exposed to acaricides, when compared with the control group. *M. anisopliae* had a lower viability when exposed to amitraz and organophosphate with 63% of the fungus viable at 48 hours of exposure and 67% at 96 hours, respectively. The association SP + OP (cypermethrin + chlorpyrifos) was the only acaricide which did not induce any change in the viability of the fungus, so this acaricide was chosen to be used in the field trial. The others acaricides: amitraz, cypermethrin, chlorpyrifos and the second acaricide mixture (chlorpyrifos + cypermethrin + pyperonilbutoxide) induced some reduction in the fungus viability in comparison with the control (without acaricide) at least one of the times tested in the experiment. (Table 1).

In vitro efficacy of *M. anisopliae* against *R. microplus*

To evaluate the efficacy of the fungus in the control of ticks, was observed the mortality of *R. microplus* females daily using a stereoscope for 20 days. The value of Lethal Time to 50% of the population (LT₅₀) to the fungal suspensions were 12.6, 10.3 and 8.7 days for concentrations of 10⁶, 10⁷ and 10⁸ conidia / mL, respectively (Figure 1). The control group and the groups treated with acaricides showed no mortality above 50% during the study period (20 days). However, when the suspension of *M. anisopliae* (10⁸ conidia/mL) was associated with acaricides, increased the mortality (Table 2). In some cases the mortality values were lower than 50% at the end of the experiment, thus the LT₅₀

cannot be calculated. In all experiments, the survival rate of ticks in the control group (no treatment) was 100%.

Field experiment

All treatment groups, G1 (acaricide solution of cypermethrin + clorpyrifos), G2 (spore suspension of *M. anisopliae* at concentration of 10^8 conidia/mL) and G3 (association of spore suspension of *M. anisopliae* at concentration of 10^8 conidia/mL with acaricidal solution of cypermethrin + clorpyrifos) determined a reduction in tick counts ($p \leq 0.05$) when compared with the control group, demonstrating the effectiveness of the treatments.

The group treated with acaricide (cypermethrin + chlorpyrifos) showed no significant count difference with the control group on days 42, 49, 119, 126 and 154 as well as the group treated with fungus *M. anisopliae* on days 42, 49, 98, 105, 126 and 140. The group treated with the combination of spore suspension of *M. anisopliae* at concentration of 10^8 conidia/mL with acaricide solution (cypermethrin + clorpyrifos) showed significantly fewer *R. microplus* ticks as compared with the control group in all counts. (Figure 2).

The groups treated with the suspension of the fungus or acaricide alone showed similar efficacy ($p \geq 0.05$), with an average of 75%. The range of efficacy was 55-86% in the group treated with a suspension of *M. anisopliae* and 59-95% with the acaricide alone. The association between the fungus *M. anisopliae* and acaricide promoted 91.7% of control of *R. microplus* after the first treatment (day 0) and above 98% in the other six treatments (days 28, 56, 77, 98, 119 and 140) (Figure 3). The animals were evaluated weekly for scores of ticks to check the health of cattle and detect any changes in their

physiological parameters. There was no evidence of any adverse reaction in the animals of the treated groups.

Discussion

R. microplus tick is considered the most important parasite affecting cattle in Latin America and the major ectoparasite affecting livestock in America, Asia and Oceania (Estrada-Peña *et al.*, 2006). This tick causes several losses and is a great economical impact regarding costs with antiparasitics (Jonsson, 2006; Pereira & Labruna, 2009). The control of this tick is mainly accomplished by use of acaricides, particularly organophosphates, pyrethroids, amitraz, macrocyclic lactones, fipronil and fluazuron (Klafke, 2009). This control involves at least two negative effects: (i) chance of environment and animal products (meat, milk, etc) contamination (ii) selection of ticks resistant populations to acaricides. Therefore, an important goal in this area is characterization of tick populations response to acaricides and the development of more efficient control methods (Beys da Silva *et al.*, 2012). In this sense, the potential use of biological control by entomopathogenic fungi has shown a great application potential.

In this study we aimed address the compatibility of biological and chemical control for *R. microplus* acaricide resistant strain.

In a recent study Pohl and co-workers (2012) using the larval packet test reported that Jaguar strain (*R. microplus* strain also used in our experiments) showed resistance to four classes of acaricides: SP, OP, amitraz and macrocyclic lactones. The application of a chemical rather than six times per year can contribute to the development of resistant populations (Mendes *et al.*, 2011). In intensive animal breeding areas, cattle has been submitted to frequent applications of all classes of acaricides available in the market, thus leading to the selection of resistant ticks (Alonso-Díaz *et al.*, 2007).

An alternative for the control of tick acaricide resistant strains would be the combined use of biological and chemical control (Bahense *et al.*, 2006). Thus, we evaluate the compatibility of *Metarhizium anisopliae* (strain E6) with five commercial acaricides: amidinic (0.025% amitraz), a synthetic pyrethroid (0.015% cypermethrin), an organophosphate (0.048% chlorpyrifos) and two associations of synthetic pyrethroids with organophosphates (0.015% cypermethrin, 0.048% chlorpyrifos and 0.005% piperonylbutoxide; 0.02% cypermethrin and 0.05% chlorpyrifos). The minimum percentages of viability of the fungus were observed with amitraz (63% at 48 hours) and chlorpyrifos (67% at 96 hours). Schumacher and Poehling (2012) already demonstrated compatibility of two strains of *M. anisopliae* (MA-K and MA-7) with amitraz and permethrin. Batista Filho and co-workers (2001), using SPL 358 strain of *M. anisopliae*, found that deltamethrin did not inhibit the vegetative growth, however, inhibited the fungal spore production. Mohamed and co-workers (1987), using the strain E9 showed that chlorpyrifos affected mycelial growth and sporulation and that pyrethroids did not inhibit fungal growth. Rodrigues and co-workers (2002) tested an association of OP (dichlorvos) and SP (cypermethrin) and showed no inhibitory effect on the development of the fungus. In our study, we determined that an association of OP and SP (50% chlorpyrifos and 20% cypermethrin) did not induce any change in fungi viability. Thus this acaricide was chosen to be used in the field assay.

In *in vitro* experiments with different concentrations of *M. anisopliae* aqueous suspensions, it has been demonstrated that the highest concentration (10^8 conidia/mL) showed better results when compared to lower concentrations leading to 100% mortality 13 days after treatment. The mortality is directly related to the concentration of *M. anisopliae* spores used in treatments (Bittencourt *et al.*, 1994; Zhioua *et al.*, 1997; Frazzon

et al., 2000; Melo *et al.*, Ojeda-Chi *et al.*, 2010). Frazzon and co-workers (2000) demonstrated 50% of mortality in *R. microplus*, using E6S1, E6S2 and E9 strains of *M. anisopliae* five days after treatment with spores and 100% of mortality within two weeks after the treatment. Monteiro and co-workers (1998) found that a *M. anisopliae* (E9 strain) with concentration of $7.5 \cdot 10^8$ conidia/mL was more efficient with fungus infecting 91% of female *R. microplus*.

Alves and co-workers (1998) proposed that the compatibility of biological and chemical products can result in greater efficacy in the control of some arthropods less susceptible or resistant to chemicals. Some authors (Batista Filho *et al.*, 2001; Hiromori & Nishigaki, 2001) suggest that increased pathogenicity of fungi on ticks can be obtained by combining the fungus with low doses of chemicals to cause a stress on the immune system of the host, thus depressing its response. Bahiense and co-workers (2006) described that association of *M. anisopliae* and deltamethrin showed a higher mortality rate than treatments with acaricide or fungus alone, suggesting that association of fungus and chemicals can ensure that the two components can be used in lower concentrations, to reduce costs, optimize benefits, increasing the safety and efficacy.

We demonstrated in our study that when the suspension of *M. anisopliae* (strain E6) was associated with acaricides (amitraz, pyrethroid, organophosphate and pyrethroid and organophosphate associations) there was an increase in mortality in a strain of *R. microplus* resistant to acaricides. In view of this finding under laboratory conditions, there was the need to prove this proposition under field conditions.

In our study, the treatments in field animals were performed in the late afternoon, to avoid the adverse effects of sunlight and the radiation of UV-A and UV-B, which interfere with the germination of the fungus and the early stages of germinate tubes development

(Braga *et al.*, 2001; Francisco *et al.*, 2008). The choice of day-period time was similar to that chosen by Alonso-Diaz and co-workers (2007) in Mexico, who applied the treatment with conidia at 6-7 pm when the temperature ranged from 28 to 32°C in the absence of sunlight. This may help the host fungus infection in the mechanism of penetration of spores through the cuticle (Arruda *et al.*, 2005).

According to literature, the optimum temperature and relative humidity for the majority of *Metarhizium* spp. is around 25°C and between 55-75%, respectively (Ouedraogo *et al.*, 1997; Michalski *et al.*, 2006). Thus, high temperatures and low humidity could limit the use of *M. anisopliae* in some tropical and arid areas. The average temperature during our field experiment was 20°C. So, since this temperature did not impair the action of *M. anisopliae* on ticks in field conditions, this environmental factor is not an impediment to the application of this organism in wet subtropical and temperate zones, as Southern Brazil. It must take into account when comparing our results to other obtained in tropical and dry regions. Angel-Sahagum and co-workers (2010) in a study realized in Mexico had a significant variation in temperature (19-30°C) during their field experiment to control larvae of *R. microplus* in grazing using MA 14 strain.

One of the obstacles to the use of fungus for the control of cattle tick is the possibility of adverse effects in animals. During the whole period of the experiment (182 days) the animals were evaluated weekly to check their health status and detect changes in their physiological parameters. There was no evidence of any adverse reaction in animals of treated groups, since all remained healthy during the experimental period. It was in accordance with previous studies conducted by Alonso-Diaz and co-workers (2007) and Kaaya and co-workers (2011).

The tick burden was significantly lower ($p \leq 0.05$) in the treated groups: G1 (acaricide solution), G2 (spore suspension of *M. anisopliae*), and G3 (association of spore suspension of *M. anisopliae* with acaricidal solution) when compared with the control group (no treatment). The tick control percentage obtained was superior than those obtained in a similar field trial, in which using an oil formulation of *M. anisopliae* (10^8 conidia/ mL) at each 3-4 weeks over a one-year period it observed an efficacy around 83% for *R. evertsi evertsi* and *R. (B.) decoloratus* (Kaaya *et al.*, 2011). In another study conducted by Alonso-Diaz and co-workers (2007), using 10^8 conidia/mL of *M. anisopliae* formulate in water with Tween-80 showed a reduction of 45% in *R. (B.) microplus* population after the second treatment. These differences could be attributed both to environmental conditions, differences in virulence of strains and the formulations used.

The data presented here show that *M. anisopliae* (strain E6) associated with acaricides (amitraz, pyrethroid, organophosphate and associations of pyrethroid and organophosphate) are more effectively to control ticks. The potential associated use of chemical acaricides and biological agents could stimulate the use and spreading of biological control for animal parasites among practitioners and farmers. Future studies should be conducted in order to verify the possibility of developing a commercial viable biological agent with acaricides.

Acknowledgments

Authors would like to thank to Mr. Gilmar Fialho, Mr. Rafael Vargas and Mr. Ramon Scheffer (IPVDF) for help in animal handling and treatments and to Dr. Flávio Varone (Centro de Meteorologia do Rio Grande do Sul, CEMETRS, FEPAGRO) for meteorological data. This work was financially supported by Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Edital 064/2008 (Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico – CNPq and Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA), Projeto SANIMARS (Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Edital PROBITI 03/12), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Alonso-Díaz MA, García L, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Ángel-Sahagún CA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H. 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 147:336–340

Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R, 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de Medicina Veterinaria* 38: 105e113.

Alves, S.B., Moino Jr., A., Almeida, J.E.M., 1998. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.), *Controle Microbiano de Insetos*. 2nd ed. FEALQ, Piracicaba, pp. 217–238.

Ángel-Sahagún, C.A., Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa J., Pescador-Rubio, A., Skoda, S.R., Cruz-Vázquez, C., Lorenzoni, A.G., Galindo-Velasco, E., Fragoso-Sánchez, H., Foster, J.E. 2010. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Veterinary Parasitology* 170, 278–286.

Arruda, W., Lubeck, I., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 37, 231–244

Bahiense, T.C., Fernandes, E.K., Angelo Ida, C., Perinotto, W.M., & Bittencourt, V.R. 2007. Evaluation of the biological control potential of *Metarhizium anisopliae* to ward *Boophilus microplus* in pen trials. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 16, 243-245.

Bahiense, T.C., Fernandes, E.K.K., & Bittencourt, V.R.E.P. 2006. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Vet. Parasitol.*, 141, 319-324.

Bahiense, T.C., Fernandes, E.K.K., Angelo, I.C., Perinotto, W.M.S Bittencourt, V.R.E.P. 2008. Performance of *Metarhizium anisopliae* and Its Combination with Deltamethrin

against a Pyrethroid-Resistant Strain of *Boophilus microplus* in a Stall Test Ann. N.Y. Acad. Sci., 2008, 1149, 242-245.

Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Lamas, C., 2001. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. Neotrop.Entomol. 30, 437–447.

Beys da Silva, W.O., Santi, L., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2010. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. Fungal Biology 114: 10e15.

Beys-da-Silva WO, Santi L, Vainstein MH, Schrank A. Biocontrol of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the acaricidal fungus *Metarhizium anisopliae*. In: Woldemeskel M (editor). Ticks: Disease, Management and Control. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers Inc., 2012; 217–46.

Beys da Silva, W.O., Santi, L., Corrêa, A.P., Silva, L.A., Bresciani, F.R., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2010. 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

Bittencourt, V. R. E. P., Massard, C. L., Lima, A. F., Viegas, E. C. and Alves, S. B., 1992. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF 1879) SOROKIN 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI 1887). Arq. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, 15, 197–202.

Bittencourt, V.R.E.P., Bahiense, T.C., Fernandes, E.K.K., Souza, E.J., 2003. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1979) Sorokin, 1983 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Rev. Brás. Parasitol. Vet 12, 38–42

Bittencourt, V.R.E.P., Massard, C.L., Lima, A.F., 1994. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. Rev. Univ. Rural Ser. Cienc. Vida. 16, 49– 55

Bogo, M.R., Rota, C.A., Pinto, Jr.H., Ocampos, M., Correa, C.T., Vainstein, M.H., Schrank, A. 1998. A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. Current Microbiology 37: 221e225.

Braga, G.U.L., Flint, S.D., Miller, C.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. J. Invertebr. Pathol. 78, 98–108.

Castro-Janer E, Rifran L, Gonzalez P, Piaggio J, Gil A, Schumaker TTS, 2010. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. Veterinary Parasitology 169: 172e177.

Centro Estadual de Meteorologia do Rio Grande do Sul. In <http://www.cemet.rs.gov.br/>

- Correia, A.C.B., Fiorin, A.C., Monteiro, A.C., & Veríssimo, C.J. 1998. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *J. Invertebr. Pathol.*, 71, 189-191
- Costa, G.L., Sarquis, M.I.M., Moraes, A.M.L., & Bittencourt, V.R.E.P. 2001. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathol.*, 154, 207-209.
- da Silva, M.V., Santi, L., Staats, C.C., Costa, A.M., Colodel, E.M., Driemeier, D., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2005. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology* 156: 382–392.
- De Castro, A.B.A., Bittencourt, V.R.E.P., Daemon, E., Viegas, E.D.C., 1997. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Rev. Univ. Rural, Sér. Cienc. da Vida.* 19, 73–82
- Estrada-Peña, A., García, Z., Frago, S.H., 2006. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 38, 307–316.
- Fernandes E.K.K., Bittencourt V.R.E.P., Roberts, D.W. 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology* 130, 300–305
- Fernandes, E.K., Costa, G.L., Moraes, A.M., & Bittencourt, V.R. 2004. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Basic Microbiol.*, 44, 270-274.
- Francisco, E.A., Rangel, D.E.N., La Scala Jr., N., Barbosa, J.C., Correia, A., do, C.B., 2008. Exposure of *Metarhizium anisopliae* conidia to UV-B radiation reduces its virulence. *J. Anhui Agricult. Univ.* 35, 246–249.
- Frazzon APG, Da Silva VI, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. 2000 *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 94:117–125.
- Garcia, M.V., Monteiro, A.C., Szabó, M.P.J., Mochi, D.A., Simi, L.D., Carvalho, W.M., Tsuruta, S.A., & Barbosa, J.C. 2011. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. *Vet. Parasitol.*, 181, 267– 273.
- Grisi, L., Massard, C.L., Moya Borja, G.E., Pereira, J.B., 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Revista Veterinária* 125, 8–10.
- Hiromori H, Nishigaki J, 2001. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Applied Entomology and Zoology* 36: 231e236.

Horn, S.C; Arteche, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. A Hora Veterinária. Ano 4. n 23, janeiro/fevereiro. 1985

Inokuma, H., Kerlin, R.L., Kemp, D.H., Willadsen, P., 1993. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. Vet. Parasitol. 47, 107–118.

Jonsson, N.N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Vet. Parasitol. 137, 1–10.

Jonsson, N.N., Bock, R.E., Jorgensen, W.K. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. Veterinary Parasitology 155 (2008) 1–9.

Kaaya GP, Mwangi EN, Ouna EA. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomm avariegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. J Invert Pathol 67:15–20.

Kaaya, G. P., Samish, M., Hedimbi, M., Gindin, G., Glazer, I. 2011. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. ExpApplAcarol. 55:273–281

Kay, B.H., Kemp, D.H., 1994. Vaccines against artropods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50, 87–96.

Lacey, L.A., Martins, A., Ribeiro, C., 1994. The pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for adults of the Japanese beetle, *Popilia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). Eur. J. Entomol. 91, 313–319.

Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Alvarez, L., Sánchez, S., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M. 1997. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. J Vet Pharmacol Ther. 91-9.

Leemon, D.M., &Jonsson, N.N. 2008. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. J. Invertebr. Pathol., 97, 40-49.

Leemon, D.M., Turner, L.B., &Jonsson, N.N. 2008. Pen studies on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). Vet. Parasitol. 156, 248-260.

Martins, J.R., Furlong, J., 2001. A vermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. Vet. Rec. 149, 64.

- Melo, D.R., Reis, R.C.S., Bittencourt, V.R.E.P., 2006. Patogenicidade *in vitro* do *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Rev. Bras. Parasitol. 15, 157–162.
- Michalaki, M.P., Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Batta, Y.A., Balotis, G.N., 2006. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin applied alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Du Val larvae: influence of temperature, relative humidity and type of commodity. Crop Prot. 25, 418–425.
- Mohamed, A.K., Pratt, J.P., Nelson, F.R., 1987. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. Mycopathologia 99, 99–105.
- Monteiro, S.G., Bittencourt, V.R.E.P., Daemon, E., Faccini, J.L.H., 1998. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Ciência Rural 28, 461–466.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodriguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology 170, 348–354.
- Onofre, S.B., Miniuk, C.M., Barros, N.M., & Azevedo, J.L. 2001. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. Am. J. Vet. Res., 62, 1478-1480.
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., Lomer, C.J., 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Mycopathologia 137, 37–43.
- Pohl PC, Klafke GM, Júnior JR, Martins JR, da Silva Vaz I Jr, Masuda A. 2012. ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitol Res. 111(6):2345-51.
- Polar, P., Aquino de Muro, M., Kairo, T.K., Moore, D., Pegram, R., John, S., Roach-Benn, C., 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. Vet. Parasitol. 134, 159–167.
- Polar, P., Kairo, M.T., Moore, D., Pegram, R., & John, A. S. 2005. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. Mycopathol., 160, 151-157.
- Reck Jr., Berger, M., Terra, R.M.S., Marks, F.S., da Silva Vaz Jr, I., Guimarães, J.A., Termignoni, C. 2009. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. Research in Veterinary Science 86 (2009) 56–62.
- Rodrigues, J.A.R.; Santos, G.F.; Athayde, A.C.R.; Lima, E.A.L.A. Características comportamentais de *Metarhizium anisopliae* após passagem em meio de cultura mais

acaricida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12. 2002, Rio de Janeiro. Anais. RJ, 2002. 1 CD-ROM.

Rodriguez-Vivas, R.I., Rodriguez-Arevalo, F., Alonso-Díaz, M.A., Fragoso- Sanchez, H., Santamaria, V.M., Rosario-Cruz, R., 2006. Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico, prevalence and potential risk factors. *Prev. Vet. Med.* 75, 280–286.

Samish, M., Ginsberg, H., & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitol.*, 129, S389-S403.

Santi, L., Silva, L.A.D., Beys-da-Silva, W.O., Corrêa, A.P.F., Rangel, D.E.N, Carlini, C.R, Schrank, A., Vainstein, M.H. 2011. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhiziumanisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercusperuvianus*. *World J MicrobiolBiotechnol* 2011;27:2297–303.

Santi, L., Silva, W.O., Pinto, A.F., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2010. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biol.* 114(4):312-9

Schrank A, Vainstein MH, 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56, 1267-1274.

Schumacher, V., Poehling, H.M., 2012. In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal biology* 116.121 e 132.

Soares, V.E., Silveira, D.M., Nunes, T.L.S., Oliveira, G.P., Barbosa, O.F., da Costa, A.J., 2001. In vitro analysis of the action of acaricides on *Boophilusmicroplus* strain take from dairy cattle from the north-east area of Sao Paulo State. *Semina-Ciências Agrárias* 22, 71–75.

St Leger R.J, Charnley, A.K, Cooper, R.M. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 85–95

Staats, C.C., Kmetzsch, L., Lubeck, I., Junges, A., Vainstein, M.H., Schrank, A. 2013 *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercusperuvianus*. 117(2):137-44

Wharton RH, Utech KBW. 1970. The relation between engorgement and dropping of *Boophilusmicroplus* (Canestkini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. *J AustEntomol Soc.* 9:171–82.

Zhioua, E., Browning, M., Johnson, P.W., Ginsberg, H.S., LeBrun, R.A., 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhiziumanisopliae* (deuteromycetes) to *Ixodesscapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol.* 83, 815–818.

Table 1: Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with commercial acaricides. The results of viability are expressed in percent (%).

Hours post exposure	Acaricide/Viability					
	Control	Amitraz	OP	SP	SP+OP	SP+OP+PBO
1	100±8.08 a	97.21±1.92 a	89.22±1.20 a	93.81±2.10 a	94.41±5.69 a	91.62±5.71 a
5	100±8.02 a	96.66±8.16 a	71.94±12.54 b	83.07±14.60 a	96.88±2.67 a	99.33±4.35 a
10	100±3.51 a	90.86±4.96 a	91.25±6.64 a	79.38±7.9b	91.25±7.04 a	70.43±8.18 b
24	100±11.68 a	95.27±5.57 a	75±5.84 b	80.07±6.59 b	99.16±3.10 a	97.13±2.55 a
48	100±12.12 a	63.15±9 b	95.13±3.33 a	70.76±9.66 b	93.37±2.88 a	84.41±3.57 b
72	100±15.63 a	77.13±10 a	89.07±23.99 a	88.87±8.53 a	92.31±7.89 a	84.01±7.90 a
96	100±11 a	90.06±7.65 a	67.87±7.74 a	98.25±2.68 b	95.52±2.76 a	93.18±2.05 a
120	100±59.37 a	76.15±1.83 b	71.07±5.15 b	80.39±7.30 a	94.41±0.55 a	83.78±4.18 a

Means followed by the same letter in the same line do not differ statistically ($p \geq 0,05$).

OP (Organophosphate), SP (Synthetic Pyrethroid), SP + OP (Synthetic Pyrethroid and Organophosphate), SP+OP+PB (Synthetic Pyrethroid, Organophosphate and Piperonyl butoxide).

Table 2: LT_{50} evaluation of *Rhipicephalus microplus* treated with *Metarhizium anisopliae* or with an association of *M. anisopliae* and acaricides.

Treatments	Solution/Suspension	LT_{50} (days)	% Acumulated Mortality
Control	Water	ND	3.66 (2.78 – 4.54)
Acaricide	Amitraz		2.33 (2 – 2.66)
	Organophosphate		3
	Synthetic Pyrethroid	ND	2.33 (2 – 2.66)
	SP+OP		3.33 (3 – 3.66)
	SP+OP+PBO		2.66 (2 – 3.32)
<i>M. anisopliae</i>	10^6	12.6 (11.7 – 13.5)	100
	10^7	10.3 (9.4 – 11.2)	100
	10^8	8.7 (8.4 - 9)	100
<i>M. anisopliae</i> with acaricides	Amitraz	9.5 (8 – 9)	100
	Organophosphate	9.25 (7 – 11.5)	100
	Synthetic Pyrethroid	8.65 (7.85 – 9.45)	100
	SP+OP	6.56 (6.56 – 6.86)	100
	SP+OP+PBO	6.48 (6.18 – 6.78)	100

The experiments were performed in triplicates and the numbers between parentheses represent the standard error. Ticks death was checked every day after treatment, per 20 days. ND – not determinate (mortality <50%)

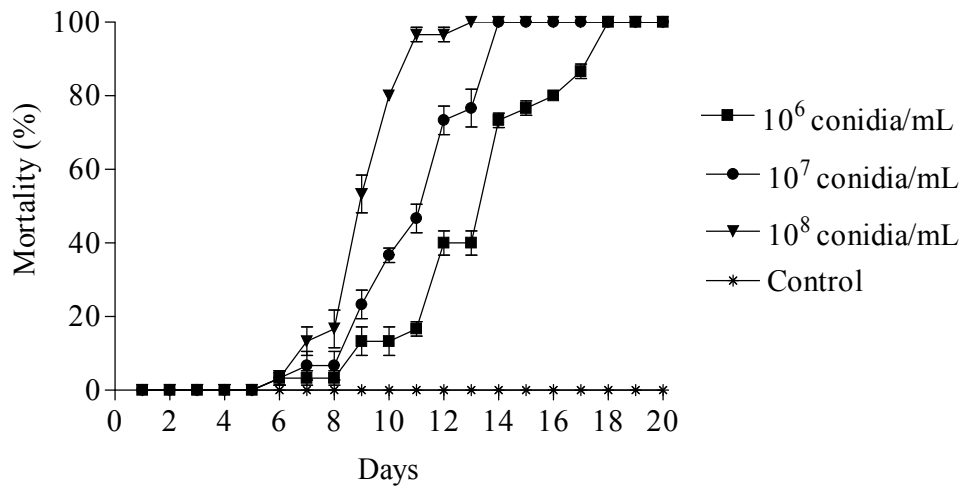


Figure 1: Mortality of *Rhipicephalus microplus* females treated with different concentrations of aqueous conidial suspensions of *Metarhizium anisopliae* (10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL). Each group represented 10 females. The experiments were done in triplicate. Bars represent standard error. Ticks death was checked every day after treatment, per 20 days

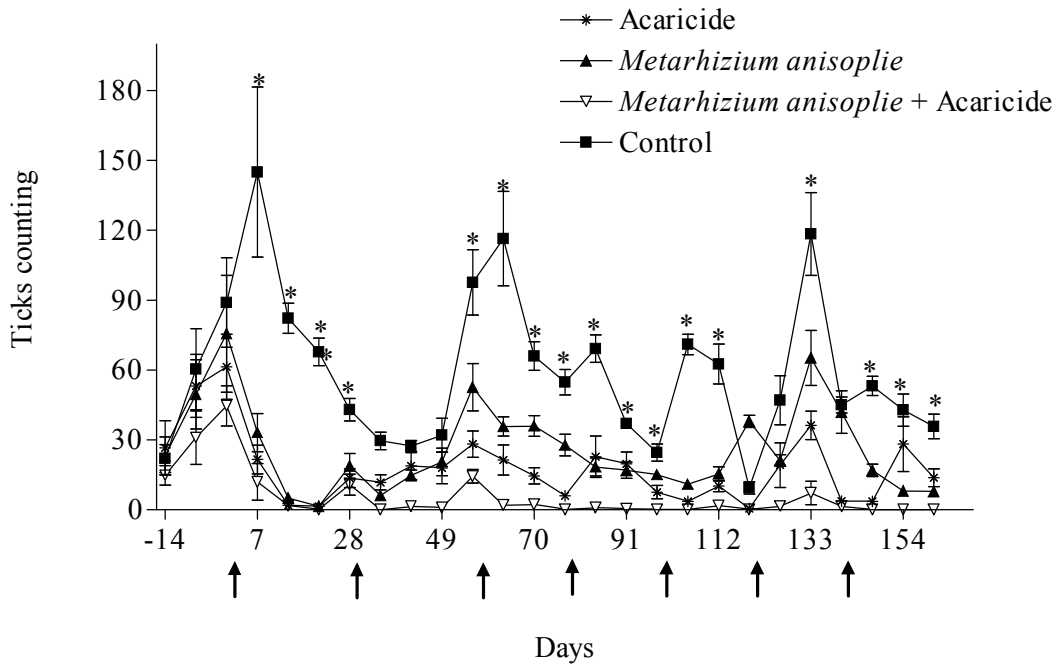


Figure 2: Determination of the number of ticks in cattle groups with different treatments: G1 (acaricide solution of cypermethrin + clorpiriphos), G2 (spore suspension of *M. anisopliae* at concentration of 10^8 conidia/mL) and G3 (association of spore suspension of *M. anisopliae* at concentration of 10^8 conidia/mL with acaricide solution of cypermethrin + clorpiriphos) and control (no treatment). Evaluation (counting the number of ticks) was done throughout the experiment (182 days) once a week. Arrows indicate the days of treatment. * Treated groups are significantly different ($p \leq 0.05$) from the control group.

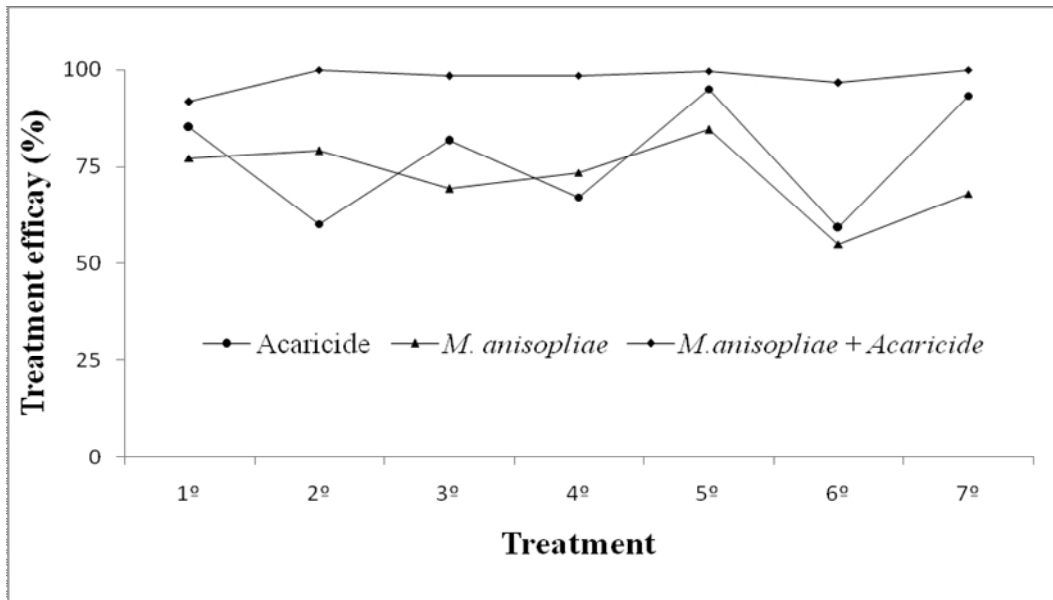


Figure 3. Percent of treatments efficacy. G1 (acaricide solution of cypermethrin + clorpiriphos), G2 (spore suspension of *M. anisopliae* at concentration of 10^8 conidia/mL) and G3 (association of spore suspension of *M. anisopliae* at concentration of 10^8 conidia/mL with acaricide solution of cypermethrin + clorpiriphos) and control (no treatment). That was estimated as the percentage of tick reduction when compared to the control group by counting the number of ticks in the animals one week after the treatment.

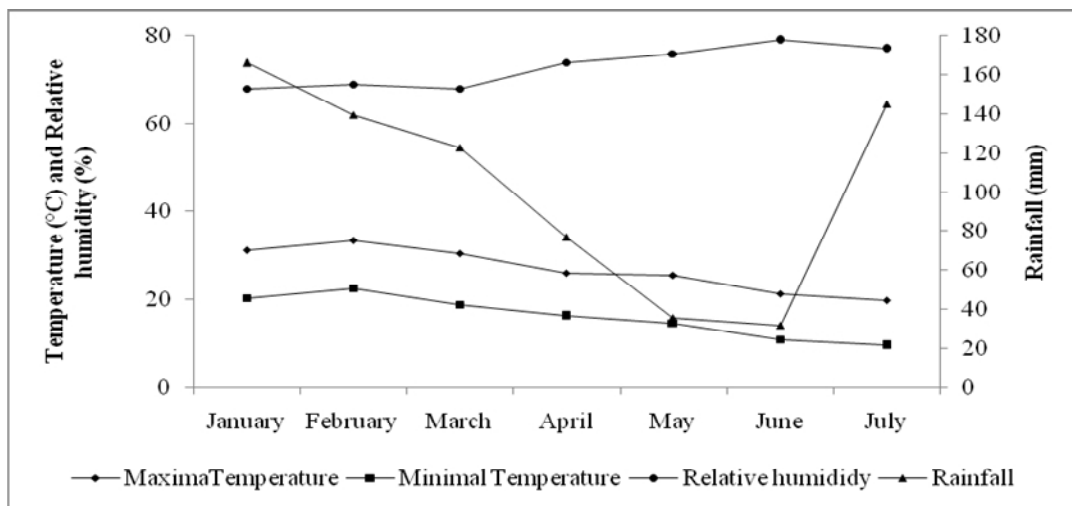


Figure 4: Weather conditions (temperature, relative humidity and rainfall) during the experimental period (January to July 2012).

9.2 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IPVDF

Ofício n.º 01/12 – CEUA/IPVDF

Eldorado do Sul, 10 de janeiro de 2012.

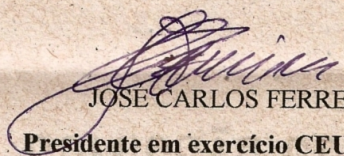
Senhor Pesquisador:

Com relação ao Projeto de Pesquisa – SUSCETIBILIDADE DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* AO FUNGO *Metarhizium anisopliae*: ENSAIOS IN VITRO E A CAMPO E ASSOCIAÇÃO A ACARICIDAS QUÍMICOS; projeto de mestrado de Anelise Webster de Moura Vieira, orientador Dr. Augusto Schrank (UFRGS) e co-orientador Dr. João Ricardo Martins (IPVDF); protocolado para análise e parecer sob o n.º 11/2011, cabe referir o seguinte:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – IPVDF reuniu-se extraordinariamente em 7 de dezembro de 2011, no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e subsequentemente emitiu **PARECER FAVORÁVEL** à pesquisa a ser desenvolvida.

É o parecer.

Atenciosamente,


JOSE CARLOS FERREIRA
Presidente em exercício CEUA - IPVDF.

9.3 CURRICULUM VITAE

Dados pessoais

Nome Anelise Webster de Moura Vieira

Nascimento 11/01/1986 - Porto Alegre/RS - Brasil

CPF 059.787.704-17

Formação acadêmica/titulação

2011- Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: 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

Orientador: Augusto Schrank

Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005-2009 Graduação em Medicina Veterinária.

Centro de Estudos Superiores de Maceió, CESMAC, Maceio, Brasil

Título: Uso de Neem (*Azadirachta indica*), Melão de São Caetano (*Mormodica charantia*) e semente de abóbora (*Curcubita moschata*) no controle de helmintosgastrintestinais de ovinos naturalmente infectados.

Orientador: Silvio Romero de Oliveira Abreu

Formação complementar

2012–2012 Curso de curta duração em Cuidados e manejo de animais de experimentação.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

2012-2012 Curso de curta duração em ALIMENTOS. O que você gostaria de saber a ciência. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2010-2010 Curso de curta duração em Carrapatos - Biologia, Epidemiologia e Controle. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, Brasil

2010-2010 Diagnóstico e Controle de Brucelose e Tuberculose. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, Brasil

2010-2010 Curso de curta duração em Biossegurança no IPVDF: Fundamentos e Aplicações. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, Brasil

2009-2009 Curso de curta duração em Dermatologia em Cães e Gatos. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2009-2009 Curso de curta duração em Ciclo de Palestras de Medicina Veterinária. Centro de Estudos Superiores de Maceió, CESMAC, Brasil

2008-2008 Curso de curta duração em Emergências em Clínica de Pequenos Animais. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceió, Brasil

2007-2007 Curso de curta duração em Comportamento Animal. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceió, Brasil

2007-2007 Curso de curta duração em Ultrassonografia em Pequenos animais. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

2007-2007 Curso de curta duração em Neurologia Veterinária. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceió, Brasil

2006-2006 Curso de curta duração em Dermatologia Veterinária. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceió, Brasil

2006-2006 Curso de curta duração em Medicina de Felinos. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceió, Brasil

2006-2006 Curso de curta duração em Dermatologia. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Alagoas, CRMV/AL, Brasil

2006-2006 Curso de curta duração em Cardiologia Veterinária. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceió, Brasil

2006-2006 Curso de curta duração em Nutrição Clínica em Pequenos Animais. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceio, Brasil

2005-2005 Curso de curta duração em Emergência em Clínica de Pequenos Animais. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Alagoas, CRMV/AL, Brasil

2005-2005 Curso de curta duração em Avaliação Andrológica de Mamíferos Domésticos. Centro de Estudos Superiores de Maceió, CESMAC, Maceió, Brasil

2005-2005 Curso de curta duração em Emergências Veterinárias. Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - AL, ANCLIVEPA-AL, Maceió, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - FEPAGRO

Vínculo institucional

2009-2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor-IPVDF

Vínculo institucional

2009-2009 Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Centro de Estudos Superiores de Maceió - CESMAC

Vínculo institucional

2006-2008 Vínculo: Livre, Enquadramento funcional: Estágio extra-curricular , Carga horária: 20, Regime: Parcial. Secretaria Municipal de Saúde de Maceió - SMS

Vínculo institucional

2006-2006 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Vacinador , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MARTINS, J. R., ANTUNES, D. F., Rovaina Loureano Doyle, SOUZA, U.A, WEBSTER, A, CRUZ, N. L. N.

Avaliação de formulações de doramectina injetável no controle de miíase natural por *Cochliomyia hominivorax* em bovinos submetidos à castração. A HoraVeterinária., v.189, p.7-10 - , 2012.

2. MARTINS, J. R., MARTINS, J. R., Reck Jr., J., DOYLE, R. L., VIEIRA, A. W. M., VIEIRA, A. W. M.

Amblyomma aureolatum (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus w iedii*) in Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso). v.19, p.189 - 191, 2010.

3. CRUZ, N. L. N., VIEIRA, A. W. M., PORTO, W. J. N., SOUTOMAIOR, M. P., ABREU, S.R.O

Infecção por *Babesia canis* em cães provenientes do município de Marechal Deodoro - AL. Revista Semente. , v.4, p.167 - 173, 2009.

4. AUTO, M. C., LOPES, A. C. P. A., VIEIRA, A. W. M., CRUZ, N. L. N., ROCHA, T. J. M., PORTO, W. J. N., SOUTOMAIOR, M. P.

Demodicose Canina: Aspectos clínicos e parasitológicos. Revista Semente. , v.3, p.115 - 118, 2008.

5. AUTO, M. C., ROCHA, T. J. M., VIEIRA, A. W. M., LOPES, A. C. P. A., CRUZ, N. L. N., PORTO, W. J. N., SOUTOMAIOR, M. P.

Fauna ectoparasitária de cães naturalmente infestados provenientes do Município de Marechal Deodoro- AL. Revista Semente. , v.3, p.147 - 149, 2008.

6. LOPES, A. C. P. A., VIEIRA, A. W. M., CRUZ, N. L. N., AUTO, M. C., ROCHA, T. J. M., SOUTOMAIOR, M. P., PORTO, W. J. N.

Frequência de *Dirofilaria immitis* em cães infectados no município de Marechal Deodoro, Alagoas. Revista Semente. , v.3, p.71 - 73, 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- 1.WEBSTER, A, RECK, J., SANTI, L., VAINSTEIN, M. H., BEYS, W. O. S, MARTINS, J. R., SCHRANK, A.

CONTROLE DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* COM O FUNGO *Metarhizium anisopliae* EM CONDIÇÕES DE CAMPO In: IV Simpósio Brasileiro de Acarologia,2013, Bento Gonçalves.Anais IV Simpósio Brasileiro de Acarologia. , 2013.

- 2.KLAFKE, G., BAMBERG, V., WEBSTER, A, DALLAGNOL, B., SOUZA, U.A, SCHEFFER, R., RECK, J., MARTINS, J. R.

MULTIRRESISTÊNCIA ACARICIDA EM POPULAÇÕES DE *Rhipicephalus microplus* DO RIO GRANDE DO SUL In: IV Simpósio Brasileiro de Acarologia, 2013, BentoGonçalves. Anais IV Simpósio Brasileiro de Acarologia. , 2013.

- 3.DALLAGNOL, B., DAU, S.L, WEBSTER, A, ALVES, A., VIEIRA, V., RODRIGUES, R., MARTINS, J. R., KLAFKE, G., RECK, J.

SOROPREVALÊNCIA DE *Theileria equi* EM EQUINOS DO MUNICÍPIO DE PASSO FUNDO, RS In: IV Simpósio Brasileiro de Acarologia, 2013, Bento Gonçalves. Anais IV Simpósio Brasileiro de Acarologia. , 2013.

- 4.MARTINS, J. R., WEBSTER, A, SOUZA, U.A, RECK JR, J

Aspectos do ciclo em laboratório de *Ornithodoros brasiliensis* alimentados em *Rattus norvegicus* e *Gallus gallus* In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia. Veterinária, 2012, São Luis - MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.188

5. MARTINS, J. R., WEBSTER, A, SOUZA, U.A, SCHEFFER, R., TRAESEL, M., KOEKE, I., KLAFKE, G., GONZALES, J.C, RECK JR, J

Avaliação *in vitro* da sensibilidade a acaricidas de populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Rio Grande do Sul In: XVII Congresso Brasileiro deParasitologia Veterinária, 2012, São Luis - MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.154

- 6.WEBSTER, A, SOUZA, U.A, SCHEFFER, R., GONZALES, J.C, RECK, J., MARTINS, J. R.

Comportamento de acaricida a base de cipermetrina e clorpirifós in vitro e in vivo contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XVII Congresso

Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luis - MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012.

7. SOUZA, U.A, WEBSTER, A, CENCI, A., CERVA, C., DASSO, M., MARTINS, J. R., RECK, J.

Frequência de nematódeos intestinais e *Eimeria* spp. em bovinos leiteiros do noroeste colonial do Rio Grande do Sul In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luis-MA. Anais XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.95

8. DALLAGNOL, B., WEBSTER, A, SOUZA, U.A, MARTINS, J. R., RECK, J.

Infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em carneiro mantido em campo livre de bovinos In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luis - MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.191

9. RECK JR, J, MARKS, F., WEBSTER, A, SOUZA, U.A, RODRIGUES, R., CERQUEIRA, R., GONZALES, J.C, MARTINS, J. R.

Infestação por carrapatos *Rhipicephalus microplus* como fator de risco para ocorrência de miíases em bovinos. In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luis - MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.155

10. MARTINS, J. R., WEBSTER, A, SOUZA, U.A, SCHEFFER, R., TRAESEL, M., Rovaina Loureano Doyle, KOEKE, I., PONTES, J., KLAFKE, G., GONZALES, J.C, Reck Jr.

Monitoramento da sensibilidade ao Fipronil em populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do Rio Grande do Sul In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luis - MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.155

11. SOUZA, U.A, WEBSTER, A, CENCI, A., CERVA, C., DASSO, M., MARTINS, J. R., RECK, J.

Pesquisa de trematódeos em fezes de bovinos leiteiros em duas regiões fisiogeográficas do Rio Grande do Sul In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luis-MA. Anais XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.99

12. WEBSTER, A, SOUZA, U.A, DALLAGNOL, B., AGUILAR, L., GONZALES, J.C, Reck Jr., MARTINS, J. R.

Primeiro registro de *Amblyomma triste* parasitando bovinos no Brasil In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luis - MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2012. p.191

13.MARTINS, J. R., ANTUNES, D. F., DOYLE, R. L., VIEIRA, A. W. M., SOUZA, U.A

Avaliação da eficácia de uma formulação de brincos inseticidas contendo abamectina e butóxido de piperonila no controle da mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2010. p.33

14.MARTINS, J. R., Reck Jr., J., PARIZI, L.F, DOYLE, R. L., VIEIRA, A. W. M., SOUZA, U.A, MASUDA, A., TERMIGNONI, C.

Dinâmica das infestações pelo carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* em um grupo de bovinos tratados com avermectina injetável no Rio Grande do Sul In: XVI. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2010.

15.CRUZ, N. L. N., VIEIRA, A. W. M., ABREU, S.R.O, PORTO, W. J. N.

Frequência de Leishmaniose em cães provenientes de Marechal Deodoro - Alagoas In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2010.

16.MARTINS, J. R., DOYLE, R. L., VIEIRA, A. W. M., SOUZA, U.A, GONZALES, J.C

In vitro diagnosis of tick susceptibility to acaricides In: XIII International Congress of Acarology, 2010, Recife. Abstract Book - XIII International Congress of Acarology, 2010. , 2010. p.144

17.CRUZ, N. L. N., VIEIRA, A. W. M., ABREU, S.R.O, PORTO, W. J. N.

Infecção por *Babesia* spp., *Leishmania* spp. e *Anaplasma platys* em cães provenientes do Município de Marechal Deodoro - Alagoas In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2010.

18.MARTINS, J. R., DOYLE, R. L., VIEIRA, A. W. M., SOUZA, U.A, GONZALES, J.C

Resultados de testes carrapaticidas "*in vitro*" frente ao carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* em amostras colhidas em diferentes localidades no Rio Grande do Sul In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. , 2010.