

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**  
**Instituto Biológico**  
**Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no**  
**Agronegócio**

***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação da resistência a organofosforados e piretroides e controle biológico empregando fungos entomopatogênicos**

**Marcelo da Luz Santos**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo - SP

2021

Marcelo da Luz Santos

***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação da resistência a organofosforados e piretroides e controle biológico empregando fungos entomopatogênicos**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora  
Professora Doutora Márcia Cristina Mendes

São Paulo

2021

Eu **Marcelo da Luz Santos**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Santos, Marcelo da Luz.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação da resistência a organofosforados e piretroides e controle biológico empregando fungos entomopatogênicos. / Marcelo da Luz Santos. - São Paulo, 2021.

88 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021D.MS001

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Márcia Cristina Mendes.

Versão do título para o inglês: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: evaluation of resistance to organophosphates and pyrethroids and biological control using entomopathogenic fungi.

1. Diazinon 2. Cipermetrina 3. *M. Anisopliae* 4. KDR I. Santos, Marcelo da Luz II. Mendes, Márcia Cristina III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

*IB/Bibl./2021/001*

---

## Folha de aprovação

Nome: Marcelo da Luz Santos

Título: *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*: avaliação da resistência a organofosforados e piretroides e controle biológico empregando fungos entomopatogênicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 24/05/2021

### Banca Examinadora

Assinatura:

\* Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Cristina Mendes

\*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

\*Prof. Dr. Weber Vilas Boas Soares

\*Instituição: Instituto Zootecnia, Nova Odessa

Assinatura:

\*Prof. Dr. José Eduardo Marcondes Almeida

\*Instituição: Instituto Biológico, Campinas

## AGRADECIMENTOS

À Professora **Dra. Márcia Cristina Mendes** no qual sou imensamente grato pela orientação, pelos votos de confiança na minha capacidade, pelos ensinamentos que levarei para a vida, pela paciência, por todo auxílio durante o desenvolvimento desta dissertação.

O meu muito obrigado também vai para os professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, pelos ensinamentos.

À **Dra. Luciana Gatto Brito** e **Dr. Fabio Barbieri** (Embrapa) pelo apoio e pela presença assídua, principalmente no que tange as dúvidas e pelo auxílio na condução dos experimentos.

Ao **Dr. Weber Vilas Boas Soares** e **Dr. Luiz Carlos Roma Junior** (Instituto de Zootecnia) pelo desejo insesante em contribuir com meu experimento, sou imensamente grato pela acolhida, sugestões, ensinamentos e principalmente pela paciência por isso meu muito obrigado.

Aos colegas colaboradores **Raphael H. Bendassolli**, **MSc Thatiane M. Mitsunaga** e **Caroline M. Gonçalves** (Instituto de Zootecnia) pela boa vontade, ensinamentos e esforços com meu experimento, agradeço imensamente.

Ao **MSc José Roberto Pereira** (APTA) por contribuir e priorizar esforços para fazer meu experimento acontecer, pelos inúmeros ensinamentos ao longo desse tempo, pelo zelo frequente, por isso meu muito obrigado.

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Parasitologia Veterinária (Instituto Biológico): **Fernanda Calvo Duarte**, **Leonardo Costa Fiorini**, **Paulo Henrique Selbmann Sampaio**, **Isabella Barboza de Almeida**, **Lucas Mello Mourán**, **Karina Araújo dos Anjos**, **Shirley Batista da Silva Araújo** que colaboraram proativamente no meu projeto desde o início, por isso meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio – FUNDEPAG**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de mestrado (cota do Programa de Pós-Graduação).

Ao apoio da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelos recursos do Projeto (proc. 2017/50334-3), coordenado pela **Dra. Ana Eugênia**, que garantiram a realização deste trabalho.

Em especial minhas amigas **MSc Poliana Teixeira da Fonseca**, **Maria Iara** e **Margarete Gomes** e outros amigos que me incentivaram, e que sempre estiveram quando eu mais precisei.

Gostaria muito de agradecer a duas pessoas que desde o início de toda minha existência cuidou, amou, sonhou e principalmente educou com maestria. A minha mãe **Zenilda Petronilia da Luz Santos** e meu pai **Aurino Lopes Santos**.

Aos meus irmãos **Raquel da Luz Santos, Mauricio da Luz Santos, Marcos da Luz Santos, Henrique Santos, Harisson Henrique** (sobrinho), **Valéria Brandão** e **Anderson Silva**. Meu muito obrigado sempre.

Ao **Daniel Victor Campos de Jesus**, pelo suporte, incentivo, companherismo em momentos bons e ruins, sou grato pela sua existência na minha vida.

À **Lucinete Santana Ferreira, Marcos Pires Fonseca, Gleysson Jesus** e não podendo faltar o **Lucas Ferreira** que com seu brilho interior trouxe esperança em muitos momentos difíceis, do fundo do coração agradeço pelos muitos conselhos, pelo acolhimento no seio familiar a todos os demais familiares meu muito obrigado sempre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SANTOS, Marcelo da Luz. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: avaliação da resistência a organofosforados e piretroides e controle biológico empregando fungos entomopatogênicos* 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2021.

## RESUMO

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos parasitos que causam impactos para a criação de gado em países tropicais e subtropicais, incluindo Brasil, com prejuízos da ordem de 3,24 bilhões de dólares ao ano. São amplamente diagnosticadas ocorrências de populações resistentes às classes de acaricidas e suas associações em todo Brasil. Para tanto foi realizado o bioensaio usando o teste de pacote de larvas (TPL) impregnados em diferentes concentrações com cipermetrina e diazinon, para caracterizar a resistência fenotípica (NR: nível de resistência), molecular (mutação no Dominio III - S6 T2134A) e o metabolismo enzimático ao diazinon e cipermetrina em algumas populações de *R. microplus* coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Das quarenta propriedades analisadas, dezoito delas apresentaram fatores de resistência a cipermetrina com nível de resistência (NR), NR I (53%) e NR II (47%). A mutação do domínio III T2134A foi encontrada pela primeira vez no Brasil em sete propriedades. Em 6 delas foram encontradas larvas heterozigotas e em 4 foram encontradas larvas homozigotas resistentes. As atividades enzimáticas  $\alpha$ -esterase e  $\beta$ -esterase testadas com larvas vivas e mortas da concentração 409,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cipermetrina não mostraram diferenças significativa ( $p>0.05$ ). Para o princípio ativo diazinon noventa por cento das propriedades expressaram resistência sendo que os NR encontrados foram de 6% para o nível I, 30% nível II e 64% para o nível III. As atividades enzimáticas na maior concentração (3,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) apresentaram diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos de larvas vivas e mortas. Para o biocontrole do carrapato no campo foram feitas suspensões do fungo *M. anisopliae* (IBCB 425) na concentração  $5 \times 10^{13}$  em associação com óleo mineral e pulverizado nas áreas tratadas e, água e óleo mineral na área controle contendo sete animais em cada área, nas cidades de Pindamonhangaba (PRP) e Americana (IZ) ambas no Estado de São Paulo. As avaliações da eficácia dos tratamentos do biocontrole foram feitos quinzenalmente com contagens de infestação nos animais dos grupos tratado e controle. Os resultados das contagens de teleóginas nos bovinos mostraram que o tratamento com o *M. anisopliae* foi eficiente, considerando a infestação superior no grupo controle para ambos locais avaliados. A média anual de eficácia foi de 36% para PRP e 48% para o IZ. A aplicação do fungo *M. anisopliae* (IBCB 425) no pasto, ação extremamente significativa sobre 95% da população *R. microplus*, pode ser uma estratégia efetiva no combate deste ectoparasita, e que novos estudos poderão aprimorar o tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diazinon, Cipermetrina, *M. anisopliae*, KDR

SANTOS, Marcelo da Luz. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: evaluation of resistance to organophosphates and pyrethroids and biological control using entomopathogenic fungi 2021. 88

f. Dissertation (Master in Health, Food and Environmental Security in agribusiness) - Instituto Biológico, São Paulo Agribusiness Technology Agency, São Paulo State Department of Agriculture and Supply, São Paulo, 2021.

## ABSTRACT

Cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* represents one of the most prominent livestock pests in tropical and subtropical regions, with an estimated financial cost of 3,24 billion dollars per year. Tick populations resistant to the chemical classes of acaricides most widely used are a common finding all around Brazil. To characterize the phenotypic resistance of some *R. microplus* populations from different regions of the Sao Paulo State 3 aspects of this resistance was performed: RF (resistance factor), occurrence of the T2134A in the S6 loop of the domain III of the *R. microplus* voltage-gated sodium channel and the enzymatic metabolism of diazinon and cypermethrin. Eighteen out of the 40 tested farms revealed the presence of *R. microplus* populations with 2 different RF levels of RF I (53%) and RF II (47%). The T2134A SNP was found in *R. microplus* populations from seven different rural properties tested and represents the first description of this mutation in Brazil, with homozygote resistant larvae found in 4 of these farms and heterozygote in 6 of them. The enzymatic activity of  $\alpha$ -esterase and  $\beta$ -esterase tested from live and dead larvae in the 409,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  cypermethrin concentration showed no statistically significant difference ( $p < 0,05$ ). 36 out of the 40 farms samples presented *R. microplus* populations resistant to diazinon. Two of them possessed resistant *R. microplus* populations with RF level I, eleven with RF level II and twenty-three with RF level III. The  $\alpha$ -esterase and  $\beta$ -esterase enzymatic activity of the highest diazinon concentration tested (3,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) presented statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) between samples of larvae found dead or alive after the test. The biological control trial employing *M. anisopliae* (ICBC 425) was performed with field application of a suspension containing  $5 \times 10^{13}/\text{mL}$  conidia associated with mineral oil by spraying this suspension over treated areas. Control areas were sprayed with a suspension of water and mineral oil only. Seven adult bovines were present in each area of the experimental fields; both fields were determined in each municipality of Pindamonhangaba (PRP) and Americana (IZ) of the Sao Paulo State, Brazil. The evaluations of the effectiveness of the biocontrol treatments were made every two weeks with infestation counts in the animals of the treated and control groups. The results from counting teleogynes on the cattle showed that the treatment with *M. anisopliae* was efficient, such that infestation remained greater in the control group in both locations evaluated. The annual mean efficacy was 36% for PRP and 48% for IZ. Application of the fungus *M. anisopliae* (ICBC 425) to the pastures gave rise to statistically significant action on 95% of the *R. microplus* population and may constitute an effective strategy for combating this ectoparasite. Further studies will enable refinement of this treatment.

**KEYWORDS:** Diazinon, Cypermethrin, *M. Anisopliae*, KDR



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i> .....	28
Figura 2 - Distribuição mundial da resistencia dos carrapatos aos acaricidas.....	32
Figura 3 - Processo de seleção química da população de carrapatos, aumento da frequência de indivíduos resistentes, até a falha de eficácia.....	36
Figura 4 - Regiões de coleta de amostras de <i>Rhipicephalus microplus</i> no Estado de São Paulo, Brasil.....	45
Figura 5 - Piquete onde foi mantido os animais e pulverizado com fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> <b>A</b> ; Contagem da infestação no lado esquerdo dos bovinos no tronco <b>B</b> e <b>C</b> . Americana – SP .....	49
Figura 6 - Aplicação do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> no pasto para controle de larvas de <i>R. microplus</i> <b>A</b> e <b>B</b> . Americana – SP .....	50
Figura 7 - Piquete onde foi mantido os animais e pulverizado com fungos <i>Metarhizium anisopliae</i> <b>A</b> e <b>B</b> ; Contagem da infestação no lado esquerdo dos bovinos no tronco <b>C</b> , <b>D</b> e <b>E</b> . Pindamonhangaba – SP .....	51
Figura 8 - Aplicação do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> no pasto para controle de larvas de <i>R. microplus</i> <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> . Pindamonhangaba – SP .....	51
Figura 9 - Amplificação por PCR de 13 amostras de larvas provenientes da propriedade P19. A foto mostra o resultado das amostras 7 a 13 amplificadas pelo par de primers específico para o alelo sensível (Primer 227I mais o primer 221S correspondente ao alelo sensível) ou resistente (Primer 227I mais o primer 221R correspondente ao alelo resistente).....	56
Figura 10 - Avaliação das atividades enzimáticas de $\alpha$ -esterase e $\beta$ -esterase em larvas de <i>R. microplus</i> (populações de P5 ao P40) expostas a cipermetrina.....	57
Figura 11 - Avaliação das atividades enzimáticas de $\alpha$ -esterase e $\beta$ -esterase em larvas de <i>R. microplus</i> (populações de P5 ao P40) expostas ao diazinon.....	59
Figura 12 - Contagem de teleóginas do <i>Rhipicephalus microplus</i> nos bovinos em pasto tratado com fungo <i>M. anisopliae</i> e no bovinos no pasto controle no Pólo Regional de Pindamonhangaba PRP...	61
Figura 13 - Contagem de teleóginas do <i>Rhipicephalus microplus</i> nos bovinos em pasto tratado com fungo <i>M. anisopliae</i> e nos bovinos em pasto controle no Instituto de Zootecnia IZ.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de bovinos por categoria, Estado de São Paulo, 2014-2019.....	25
Tabela 2 - Número de bovinos para abate, Estado de São Paulo, 2014-2019.....	26
Tabela 3 - Produção de leite, Estado de São Paulo,2014-2019.....	26
Tabela 4 - Distribuição geográfica da resistência do <i>Rhipicephalus microplus</i> no Brasil aos acaricidas organofosforados, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, Fluazuron, Piretroides+Organofosforados, Amidinas+Organofosforados, e Fipronil.....	34
Tabela 5 - Número de indivíduos de <i>Rhipicephalus microplus</i> coletados em municípios do Estado de São Paulo para testes fenotípicos .....	44
Tabela 6 - Caracterização do fenótipo da resistência e suscetibilidade à Cipermetrina em população de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> do Estado de São Paulo. CL <sub>50</sub> em mg/mL.....	55
Tabela 7 - Determinar as frequências da mutação do domínio III T2134A.....	56
Tabela 8 - Caracterização do fenótipo da resistência e suscetibilidade ao Diazinon em população de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> do Estado de São Paulo. CL <sub>50</sub> em mg/mL.....	58
Tabela 9 - Eficácia do tratamento com fungo <i>M anisopliae</i> no pasto para o controle do <i>R microplus</i> de acordo com a sazonalidade e dados de média de temperatura e umidade do Pólo Regional de Pindamonhangaba PRP.....	60
Tabela 10 - Eficácia do tratamento com fungo <i>M anisopliae</i> no pasto para o controle do <i>R microplus</i> de acordo com a sazonalidade e dados de temperatura e umidade do Instituto de Zootecnia IZ.....	60

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

ABCBio - Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

ACh - Acetilcolina

AchE - Acetilcolinesterase

APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

ARS/USDA - Agriculture Research Service/United States Department of Agriculture

CCEs – Carboxilesterases

ChE – Colinesterase

CL<sub>50</sub> - Concentração letal em cinquenta por cento

CYP450 - Citocromo P450s

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FR – Fator de Resistência

GSTs - Glutathione transferases

IB – Instituto Biológico

IBGE – Instituto Brasileiro de geografia e estatística

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IEA – Instituto de Economia Agrícola

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

OF – Organofosforado

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIB - Produto Interno Bruto

PROBIO - Programa de Inovação e Transferência em Controle Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

*R. microplus - Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

PS - Piretroides Sintéticos

TIA - Teste de Imersão de Adultos

TIL - Teste de Imersão de larvas

TLP - Teste do Pacote de Larvas (Larval Packet Test - LPT)

TPL - Teste do Pacote de Larvas

UGTs - UDP glucorniltransferases

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

$\geq$  - Maior ou igual a

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{L}$  - Microlitro

cm – Centímetros

$\text{cm}^2$  – Centímetros quadrados

h – Horas

Kg – Kilos

m - Metros

mg - Miligramas

min - Minutos

mL - Mililitro

mM – Milimetro

mol. L – Concentração molar

R\$ - Reais

Ph – Peróxido de hidrogênio

$\text{MgCl}_2$  – Cloreto de Magnésio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – Sulfato de amônio

g.L-1 – Grama por litro

SDS - Dodecil sulfato de sódio

ha – Hectar

log – Logarítmico

$\leq$  - Menor ou igual a

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
2.1 Aspectos econômicos da cadeia de carne e leite de bovinos no Brasil .....	23
2.2 Participação do Estado de São Paulo na cadeia produtiva de carne e leite de bovinos .....	25
2.3 Biologia e Taxonomia do <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	27
2.4 Prejuízos e controle do <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	29
2.5 Distribuição global da resistência do <i>Rhipicephalus microplus</i> aos acaricidas. ....	30
2.6 Resistência do <i>Rhipicephalus microplus</i> aos acaricidas no Brasil.....	33
2.7 Resistência do <i>Rhipicephalus microplus</i> aos organofosforados (OF) e Piretroides (SP) no Estado de São Paulo .....	35
2.8 Modo de ação dos piretroides (SP) e organofosforados (OF) e mecanismo de resistência do <i>Rhipicephalus microplus</i> . ....	37
2.9 Bioensaios fenotípicos de diagnóstico da resistência a acaricidas em populações do <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	37
2.10 Inovação Inovação e tecnologia empregadas no biocontrole de pragas de importância econômica .....	38
2.11 Controle biológico usando fungos entomopatogênicos <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> no controle do <i>Rhipicephalus microplus</i>	40
<b>3. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>42</b>
3.1 Objetivos específicos.....	42

<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Local de realização .....	43
4.2 Coleta e seleção de fêmeas ingurgitadas para testes fenotípicos da resistência em <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	43
4.3 Teste de Pacote de Larvas (TPL) .....	45
4.4 Extração e amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da resistência ao Piretroide.....	46
4.5 Testes bioquímicos para avaliação das esterases na resistência ao organofosforados.....	47
4.5.1 Determinação da concentração de proteínas totais e atividade enzimática com espectrofotometria.....	47
4.6 Aplicação de fungos entomopatogênicos no pasto para o controle de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . .....	48
4.7 Análises Estatísticas da resistência aos acaricidas organofosforados e piretroides e do controle biológico com artropodopatogênico .....	52
<b>5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADO.....</b>	<b>53</b>
5.1 Avaliação da resistência, mutação do domínio III T2134A a cipermetrina e as atividades enzimáticas à cipermetrina e ao diazinon.....	53
5.2 Desempenho da aplicação de <i>Metarhizium anisopliae</i> (isolado IBCB 425) na pastagem para controle de <i>R. microplus</i> no Pólo Regional de Pindamonhangaba (PRP)e Instituto de Zootecnia (IZ).....	58
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
6.1 RESISTÊNCIA .....	61
6.2 FUNGOS.....	63
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>



<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>
---	-----------

## 1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitos de grande interesse para a saúde pública e para a sanidade animal justamente por parasitarem diversos animais e podem atuar como vetores de (bactérias, protozoários e vírus), também podem causar muitas injúrias diretas a seus hospedeiros por meio da hematofagia. A ordem Ixodida compreende três famílias: Argasidae e Ixodidae, com vasta distribuição geográfica em todos os continentes (GUGLIELMONE *et al.*, 2010; GUGLIELMONE & NAVA, 2014), e Nuttalliellidae, restrita à Região Afrotropical (MANS *et al.*, 2011).

O *Rhipicephalus microplus*, é o ixodídeo de relevância pelo grande impacto sanitário e econômico para a criação de gado em todo o mundo, mais especialmente em países com clima tropical e subtropical, incluindo o Brasil, com altos níveis de umidade. Além de acarretar perda de peso, danos ao couro e diminuição na produção de leite dos bovinos, também é um importante vetor dos protozoários *Babesia* spp e *Anaplasma marginale* causadores de babesiose e anaplasmosose, respectivamente (GRISI *et al.*, 2002; GUEDES JÚNIOR *et al.*, 2008; KLAFKE *et al.*, 2016).

O IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística divulgou os resultados definitivos do último Censo Agropecuário, que teve como base o ano de 2017, o Brasil contava com 1,176 milhão de estabelecimentos produtores de leite. A maior parte dos produtores 93% deles produziam até 200 litros diários em contrapartida os maiores produtores que produziam acima de 200 litros diários representam apenas 7% do total no cenário nacional segundo Anuário do Leite (EMBRAPA, 2017; 2020).

O Brasil ocupa uma posição importante na classificação de grandes produtores mundiais de carne bovina e de leite. No ano de 2020, chegou a ter mundialmente o maior rebanho bovino (214,7 milhões de cabeças), foi o principal exportador de carne bovina (IBGE, 2020). O Estado de São Paulo reúne um percentual relevante de bovinos para corte e produção de leite, com cerca de 10,4 milhões de animais (IEA- APTA, 2019).

Em regiões como o Sudeste e Centro Oeste do Brasil, que são de clima tropical, é possível encontrar elevados níveis do carrapato bovino durante todo o ano (FURLONG & PRATA, 2007). Nesse contexto, os prejuízos indiretos, relativos ao controle do *Rhipicephalus microplus* (carrapato-do-boi) por meio de carrapaticidas, são estimados em

3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI *et al.*, 2014).

O uso de produtos carrapaticidas, mesmo em condições corretas de aplicação, acarreta, por parte dos carrapatos, a seleção de indivíduos naturalmente resistentes aos mesmos assim que o desenvolvimento de mecanismos de resistência à esses produtos (HIGA *et al.*, 2019). Dados revelaram que populações de carrapatos resistentes aos acaricidas estão disseminadas em toda parte do globo (FAO, 2004). Uma revisão, conduzida por Higa *et al.* (2016), sobre a resistência do *Rhipicephalus microplus* demonstraram que em diversas regiões, como o Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, foram amplamente diagnosticadas ocorrências de populações resistentes a até oito classes de acaricidas e suas associações.

Entretanto para efetuar um monitoramento racional da resistência é necessária a detecção precoce deste fenômeno (MENDES *et al.*, 2001). Vários autores afirmam a importância da identificação rápida da resistência visando o monitoramento e a contenção de parasitas resistentes além da diminuição de custos (KLAFKE, 2012; HIGA *et al.*, 2016).

A utilização de técnicas fenotípicas de avaliação *in vitro* da suscetibilidade de carrapatos às bases pesticidas são ainda o método mais eficiente no diagnóstico da resistência, porém provas diagnósticas moleculares e bioquímicas precisam ser desenvolvidas e utilizadas para a identificação de populações do carrapato dos bovinos resistentes às principais moléculas utilizadas em seu controle (BRITO *et al.*, 2015; VERISSIMO *et al.*, 2015).

Outras desvantagens do uso contínuo e indiscriminado dos acaricidas, além da resistência, é a poluição ambiental, a toxicidade natural, o acúmulo de resíduos nos produtos provenientes de animais medicados, como carne, leite e seus derivados e o couro (HIGA, *et al.*, 2016; BASTOS *et al.*, 2011; MELLO; SILVEIRA, 2012). Novos desafios se apresentam à bovinocultura brasileira, como as exigências de bem-estar animal e os fatores relacionados à sustentabilidade ambiental (ABIEC, 2016; GOMES *et al.*, 2017).

Há necessidade de novas alternativas para um controle efetivo no intuito de diminuir os impactos socioeconômicos que o parasitismo vem causando a agropecuária no País. O uso de fungos entomopatogênico para controlar em campo as espécies de larvas que em questão apresentam significativamente resistência a acaricidas químicos podem contribuir para controle biológico e a preservação sustentável do meio ambiente

(ARAÚJO, 2017).

O mecanismo de ação desses fungos usa os carrapatos como hospedeiros pela adesão de conídeos à cutícula (MORAES *et al.*, 2003). Após a adesão, os conídeos formam tubos germinativos e hifas penetrando através das cutículas e, em seguida, se ramificam atingindo a hemocele (HAJEK & ST. LEGER 1994), colonizando o hospedeiro e produzindo toxinas (KIRKLAND *et al.*, 2004; PAL *et al.*, 2007), as quais, associadas ao crescimento do micélio, levam o hospedeiro à morte (GARCIA *et al.*, 2005).

Neste mesmo seguimento foram evidenciadas penetrações de blastosporos por isolados fúngicos através de aberturas naturais (boca e ânus) de cepas de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, pois apresentaram capacidade virulenta e rápido desenvolvimento em sua cutícula (FERNANDES *et al.*, 2018).

Estudos revelaram que *M. anisopliae* é eficiente no controle do carrapato, ampliando as expectativas para o uso em campo (ARAÚJO, 2017). E, segundo Camargo *et al.* (2016) acredita-se que a associação entre o óleo mineral e um produto a base de *M. Anisopliae* pode ser efetiva no controle deste carrapato.

Segundo Jones (2017) *Metarhizium* spp por serem bons produtores de conídeo, são também virulentos para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Sendo assim, objetivou-se verificar a resistência do carrapato dos bovinos aos acaricidas diazinon e cipermetrina no Estado de São Paulo e estabelecer um sistema de controle biológico de larvas do *R. microplus* à campo com o fungo *Metarhizium anisopliae*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Aspectos econômicos da cadeia de leite de bovinos no Brasil**

Análises e estatísticas fornecidas pelo Anuário do Leite (EMBRAPA, 2020) ajudaram a explicar o cenário após fortes impactos negativos na produção de grãos que refletiram no aumento dos preços do milho e do farelo de soja onde o custo de produção leiteira ficou alto. O preço do leite ao produtor e os custos de produção necessitam de maior atenção frente uma gestão de risco (EMBRAPA, 2020).

Resultados apontados pela Embrapa Gado de Leite, baseados nas pesquisas estatísticas da produção de leite divulgadas pelo IBGE (2019), apontaram o Brasil como o quarto maior exportador de leite. Porém as exportações caíram 17,4% de outubro para novembro de 2020, somando 2,9 mil toneladas de produtos lácteos segundo o Boletim Do Leite (CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - ESALQ/USP,2020).

Entretanto, ainda assim, o perfil de importador de produtos lácteos em novembro/20 tivera altas de 3,2% frente ao mês anterior e de expressivos 105% em relação a novembro/19, segundo dados da Secex no cenário doméstico de oferta de leite limitada e de demanda aquecida também influenciou as compras externas em novembro Boletim Do Leite (CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - ESALQ/USP,2020).

No balanço geral do ano de 2020 nos meses de janeiro a novembro o volume importado de lácteos subiu 15% frente ao mesmo período do ano anterior, somando 151,7 mil toneladas, contra 132,1 mil toneladas em 2019. As exportações de láctios e derivados também alavancaram em 2020, registrando elevação de 32% em comparação ao mesmo período do ano anterior, totalizando 29,8 mil toneladas, contra 22,5 mil toneladas embarcadas em 2019. Boletim Do Leite (CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - ESALQ/USP,2020).

As pesquisas realizadas pela Embrapa Gado de Leite, baseadas nos indicadores econômicos da pesquisa trimestral de leite do IBGE (2018) no ultimo censo, apontam um

crescimento da produção de leite desigual em todo território nacional: a produção de leite brasileira foi de 33,8 bilhões de litros em 2018 sendo 11,5% oriundos da região Sul, 11,4% da Sudeste, 4,1% da Centro-Oeste, 4,3% da Nordeste e 2,2% da região Norte (EMBRAPA, 2020).

Dada importância da bovinocultura leiteira como uma das mais importantes e tradicionais atividades econômicas em nosso país, vale destacar que os ganhos de produtividade advêm de métodos empregados em tecnologias que melhorem a eficiência de produção, dentre eles destaca-se o melhoramento genético, a alimentação e a saúde animal (endo e ectoparasitismo) (EMBRAPA, 2018).

Os acaricidas de uso veterinário são amplamente utilizados na agropecuária leiteira, evitam perdas na produção devido as enfermidades parasitárias e ectoparasitárias, entretanto a qualidade do leite pode ser afetada com o resíduo desses produtos químicos (MELLO; SILVEIRA, 2012). Além da exposição de trabalhadores em situação de vulnerabilidade no manejo dos animais, bem como os riscos de contaminação para consumidores de leite (SILVA *et al.*, 2012). Segundo Bedi *et al.* (2015) constataram a presença de resíduos piretróides e organofosforados em amostras de leite bovino, o que pode estar relacionado à aplicação inadequada e sem acompanhamento técnico.

A contaminação do pasto, dos cereais durante as pulverizações de produtos químicos a fim de conter pragas em lavouras podem ser responsáveis por grande parte das contaminações dos produtos de origem animal quando há ingestão de alimentos contaminados pelos animais de produção (GONZÁLEZ-RODRIGUES, 2005; BASTOS *et al.*, 2011; MELLO; SILVEIRA, 2012). Em estudo realizado por Silva *et al.* (2014), analisaram resíduos de agrotóxicos em 30 amostras de leite cru, em cinco amostras foi detectado 16,67% de organofosforado (OF) todas todas abaixo limites máximos de resíduos (LMR). Analisou-se 98 amostras destinada para alimentação animal, onde foi constatado organofosforado (OF) em 28 amostras sendo 28,57% e carbamatos (CB) em 18 sendo 18,37% e ambos os compostos em uma amostra sendo 1,02%. As ocorrências de resíduos de agrotóxicos em leite e na alimentação animal alerta para uma contaminação cruzada e ausência de manejo dos animais, uma vez que a presença dos compostos no leite também podem ser oriundos do intervalo que o produto foi aplicado no animal e a retirada do leite para consumo (falta do descarte deste leite).

Nesse sentido, se faz necessário o uso correto de medicamentos de uso veterinário, controle de qualidade de alimentos ofertados para animais e monitoramento de resíduos

de medicamentos veterinários no leite, no intuito de mitigar riscos para o consumidor, fornecendo à população produtos seguros que não apresentem risco à saúde (NUNES *et al.*, 2017).

## 2.2 Participações do Estado de São Paulo na cadeia produtiva de carne e leite de bovinos

Segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA, 2019), órgão vinculado à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, o número de bovinos de corte decresceu 3,57%, com um total de 6,19 milhões de cabeças. Com relação aos números de bovinos de leite, ocorreu uma diminuição de 2,73%, com o total de 1,08 milhão de cabeças previsto no levantamento de junho de 2019. Nos últimos cinco anos, o rebanho leiteiro tem sofrido oscilações, mas as previsões para este mercado apostam e acreditam em um crescimento.

**Tabela 1.** Número de bovinos por categoria, Estado de São Paulo, 2014-2019

Ano	Corte		Leite		Misto		Total	
	N. de animais	Δ%	N. de animais	Δ%	N. de animais	Δ%	N. de animais	Δ%
2014	5.793.862		1.348.393		3.782.205		10.924.460	
2015	5.786.893	-0,12	1.267.184	-6,02	3.166.969	-16,27	10.221.046	-6,44
2016	6.066.660	4,83	1.240.237	-2,13	3.289.406	3,87	10.596.303	3,67
2017	6.263.370	3,24	1.193.674	-3,75	3.032.509	-7,81	10.489.553	-1,00
2018	6.426.682	2,61	1.114.445	-6,64	2.843.218	-6,24	10.384.345	-1,00
2019	6.196.982	-3,57	1.083.966	-2,73	3.049.825	7,27	10.330.773	-0,52

Fonte: Instituto de Economia Agrícola (IEA) e Coordenadoria do Desenvolvimento Rural Sustentável (CDRS). SÉRIE INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA. São Paulo. Junho 2019.

De acordo ainda com o Instituto de Economia Agrícola (2019), no caso do rebanho bovino paulista voltado à produção de carne, estima-se que 3,69 milhões de cabeças deverão ser enviadas para a agroindústria em 2019; este número é 0,25% inferior ao verificado em 2018. Com o rebanho bovino no Estado de São Paulo na casa das 10 milhões de cabeças, o número de animais que pode ser enviado para o abate não tem apresentado grandes variações nos últimos anos o que demonstra um leve crescimento da oferta e demanda na balaça comercial.

**Tabela 2.** Número de bovinos para abate, Estado de São Paulo, 2014-2019

Ano	Quantidade <sup>1</sup>	Peso total <sup>2</sup> (@)	Peso total (t)	Δ%
2014	3.623.961	57.983.385	851.718	
2015	3.581.541	60.886.264	894.358	5,01
2016	3.742.426	63.621.249	934.533	4,49
2017	3.718.351	63.211.977	948.179	1,46
2018	3.707.960	63.035.320	945.530	-0,31
2019	3.698.723	62.878.288	943.174	-0,25

<sup>1</sup>Calculada multiplicando a soma do número de bovinos para corte e misto por 0,4072(uma aproximação da taxa de abate).

<sup>2</sup> Calculado multiplicando a quantidade de bovinos para abate pelo peso médio de abate.

Fonte: Instituto de Economia Agrícola (IEA) e Coordenadoria do Desenvolvimento Rural Sustentável (CDRS). SÉRIE INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA. São Paulo. Junho 2019.

A produção leiteira estimada para 2019 foi de aproximadamente 1,78 bilhão de litros, este registro de aumento de 5,36% foi comparado com o ano anterior. Observa-se nos últimos cinco anos uma forte oscilação na produção de leite, contudo nos dois últimos anos houve um aumento na produção de leite no Estado de São Paulo, o que pode significar aumento gradual na produtividade de leite por vaca ordenhada.

Tais crescimentos têm influência de vários fatores: melhores pastagens, tanto em relação à nutrição quanto ao ectoparasitismo, resultam em animais mais produtivos; insumos disponíveis a preços adequados, justamente para assegurar a sanidade e bem-estar dos animais; finalmente, boas condições climáticas e condições de estabilidade econômica que agregados determinam o bom desempenho da produção esperada (IEA, 2019).

**Tabela 3.** Produção de leite, Estado de São Paulo, 2014-2019

Ano	Total		Δ%
	1.000 litros		
2014	1.764.129		
2015	1.534.819		-13,00
2016	1.581.893		3,07
2017	1.519.564		-3,94
2018	1.691.675		11,33
2019	1.782.311		5,36

Fonte: Instituto de Economia Agrícola (IEA) e Coordenadoria do Desenvolvimento Rural Sustentável (CDRS). SÉRIE INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA



### 2.3 Carrapato *Rhipicephalus microplus*

Acredita-se que o *Rhipicephalus microplus* tem sua origem no continente Asiático, mais precisamente na Índia. Em função das grandes expedições exploradoras registradas na história, com a movimentação de animais e mercadorias, ocorreu a sua expansão e introdução na maioria das regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África (NUÑES *et. al.*, 1982 *apud* ANDREOTTI, 2002).

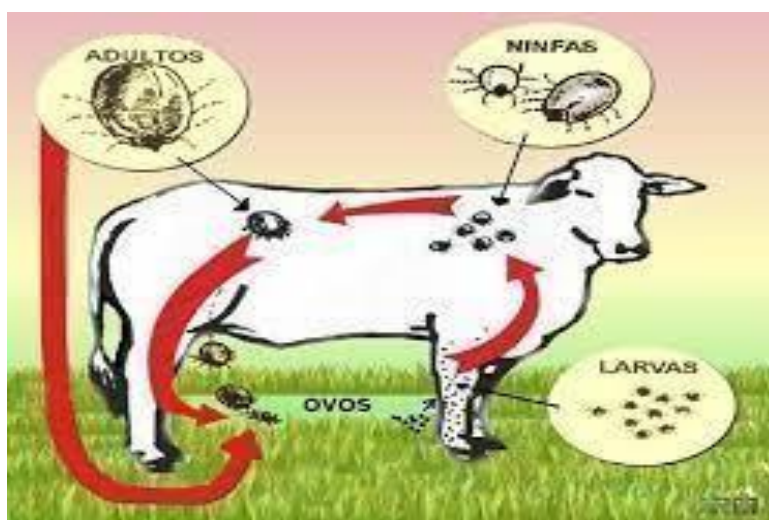
Conhecido popularmente como carrapato-do-boi, o *Rhipicephalus microplus* é um parasito monoxeno, isto é, depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida, preferencialmente os bovinos, porém outras espécies podem comportar-se como hospedeiros (ARTHUR, 1960). São hematófagos, possuem um processo de alimentação mais longo quando comparados a outras espécies, podendo ingerir até 500ml de sangue (TATCHELL *et. al.*, 1972 *apud* ANDREOTTI, 2002) ;(SAUER *et al.*, 2000 *apud* ANDREOTTI, 2002).

Como outras espécies do gênero *Rhipicephalus*, se caracteriza por possuir peças bucais relativamente curtas e pela secreção de quantidades de cemento, material proteináico que auxilia na fixação do carrapato responsável pela aglutinação do parasito ao seu hospedeiro (FRANCISCHETTI *et al.*, 2002). O ciclo de vida deste carrapato ocorre em duas fases especificamente: fase parasitária e fase de vida livre.

O ciclo inicia-se com a fase de vida livre, quando a teleógina, fêmea, após a cópula, ingurgitada de sangue do hospedeiro, desprende-se naturalmente do mesmo e, uma vez no solo, inicia a postura após três dias, com período de postura em torno de 15 dias. De acordo com Sonenshime (1993) *apud* Andreotti (2002), o peso total dos ovos, após o término da postura, equivale a 52% do peso vivo da teleógina, fêmea adulta de carrapato cheia de sangue. Até o 7º dia após a eclosão, a larva está pronta para subir nas pastagens por geotropismo negativo, localizar o hospedeiro pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, pelo estímulo visual e pelo gradiente de concentração de CO<sub>2</sub> e alcançar o hospedeiro a fim de se alimentar.

As larvas infestantes, ao entrar em contato com seu hospedeiro, fixam-se em regiões que favoreçam o seu desenvolvimento, tais como: úbere, perianal, entrepernas. Por conta de alta vascularização e menor espessura, essas regiões são preferenciais para fixação, bem como pela dificuldade de desfixação através de lambidas dos bovinos (WAGLAND, 1978 *apud* ANDREOTTI, 2002).

O período larval é suscetível a baixas temperaturas, no entanto, em presença de alta umidade relativa podem sobreviver até 8 meses (HITCHCOCK, 1955 *apud* ANDREOTTI, 2002). Em condições apropriadas, a fase de vida livre dura em torno de 32 dias (GONZALEZ, 1995 *apud* ANDREOTTI, 2002), durante os quais a larva do carrapato não se alimenta e sobrevive exclusivamente de seus estoques nutricionais (FARIAS 1995 *apud* ANDREOTTI, 2002).



**Figura 1.** Ciclo de vida do carrapato *R. microplus*.

Fonte: Embrapa, 2006

Durante os primeiros dias da infestação no animal, as fêmeas ingerem cerca de 3,8 ml de sangue, no entanto, com aceleração do ingurgitamento após a cópula e tal como mencionado anteriormente, nas horas que precedem a descida do hospedeiro ao solo para postura (12 a 24 horas), esta ingestão atinge valores em torno de 300 – 500 ml (LONDT & ARTHUR, 1975; TATCHELL *et al*, 1972, *apud* ANDREOTTI, 2002).

Vale lembrar que o carrapato *R. microplus* é o principal vetor de dois parasitos, a rickettsia *Anaplasma* sp e o protozoário *Babesia* spp, causadores da "tristeza parasitária bovina" doença que impacta fortemente o sistema de produção (FARIAS, 1995 *apud* ANDREOTTI, 2002).

## **2.4 Prejuízos e controle do *Rhipicephalus microplus***

Como já foi dito, a infestação por carrapatos, tem forte impacto sobre a saúde dos animais e sobre os custos da criação de gado em todo o mundo. Esse impacto é ainda maior naquelas regiões em que, pelos altos níveis de umidade, como ocorre no Brasil, há uma forte presença desses parasitos. (GUGLIELMONE *et al.*, 2010; VERISSIMO, 2015; GUGLIELMONE & NAVA, 2014).

Além das injúrias diretas causadas pela infestação como a perda de peso, os danos ao couro e a diminuição na produção de leite, também mencionado, o *R. microplus* é um importante vetor do protozoário *Babesia* spp e *Anaplasma marginale*, causadores de babesiose e anaplasmoses, respectivamente, por meio da hematofagia, os danos econômicos se agravam para os produtores devido à alta morbidade e mortalidade (GRISI *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2006; GUEDES JÚNIOR *et al.*, 2008).

Apesar de o Brasil ocupar uma posição importante na classificação mundial de grandes produtores e exportadores de carne bovina, e de estimar-se que os prejuízos causados pelo carrapato-do-boi são da ordem de 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI *et al.*, 2014), atualmente não existe um programa governamental para o controle do carrapato dos bovinos. Inúmeras são as causas do insucesso do tratamento adequado dos animais infestados, a saber: falta de dados técnicos e epidemiológicos sobre o uso de acaricidas em cada propriedade, erros na diluição dos produtos acaricidas, desconhecimento da tríade parasito-hospedeiro-ambiente, desconhecimento da biologia e ecologia do *R. microplus* (GARCIA *et al.*, 2016; HIGA *et al.*, 2019).

Outro agravante decorrente do insucesso do tratamento é o acelerado surgimento de cepas resistentes a diversas classes químicas. A eficiência do controle químico é prejudicada por um aumento na frequência de alelos de resistência mutantes, em resposta a pressão de seleção por aumento na frequência de aplicações o que afeta o controle no

campo, falta de planejamento e fomento da informação científica para o produtor na qual ele conhece que o acaricida com o passar do tempo perde sua eficácia, porém desconhece os mecanismos de como isso ocorre (LEITE, *et al.*, 1995; FURLONG *et al.*, 2007; ROBBERTSE *et al.*, 2016; HIGA *et al.*, 2019).

## **2.5 Resistência do *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas.**

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura FAO (2004) inúmeras populações de ectoparasitos se tornaram resistentes aos acaricidas e estão disseminadas em toda parte do globo onde estes são utilizados. A FAO (2012) indica a resistência como uma alteração no comportamento das pragas que ajude a esquivar-se dos efeitos nocivos dos acaricidas. À vista disto, essas pragas escapam à exposição e sobrevivem, acabam progredindo uma cepa resistente.

A resistência é deduzida por um processo metabólico onde as pragas tidas como resistentes são capazes de desintoxicar mais rapidamente do que as pragas suscetíveis. Alguns complexos de enzimas envolvidos neste processo de biotransformação e excreção dos inseticidas em espécies resistentes, podendo destruir muitas moléculas diferentes (FAO, 2012).

A resistência aos inseticidas é um complexo de respostas envolvendo insensibilidade ao local alvo, metabolismo, desintoxicação e excreção de xenobióticos; redução de penetração do inseticida como resultado da síntese cuticular; e finalmente, esquiva comportamental pelo artrópode (HEMINGWAY *et al.*, 2004; ROSARIO-CRUZ, 2009; POHL *et al.*, 2011; GUERRERO; LOVIS; MARTINS, 2012; FEYEREISEN; DERMAUW; VAN LEEUWEN, 2015).

Múltiplos passos adaptativos foram observados em diferentes artrópodes e incluem mutações pontuais na acetilcolinesterase (TEMEYER; DAVEY; CHEN, 2004; MILLER; DAVEY; GEORGE, 2005) e canais de sódio dependente de voltagem (Kdr) (DU *et al.*, 2017; VUDRIKO *et al.*, 2018), e amplificação e regulação positiva de enzimas de desintoxicação, transportadores e canais. Interação complexa entre os mecanismos acima, e envolvendo múltiplas mutações em genes e alelos. (POHL *et al.*, 2011;

TEMEYER; OLAFSON; PRUETT, 2012; JYOTI *et al.*, 2016; KOH-TAN *et al.*, 2016; VUDRIKO *et al.*, 2018).

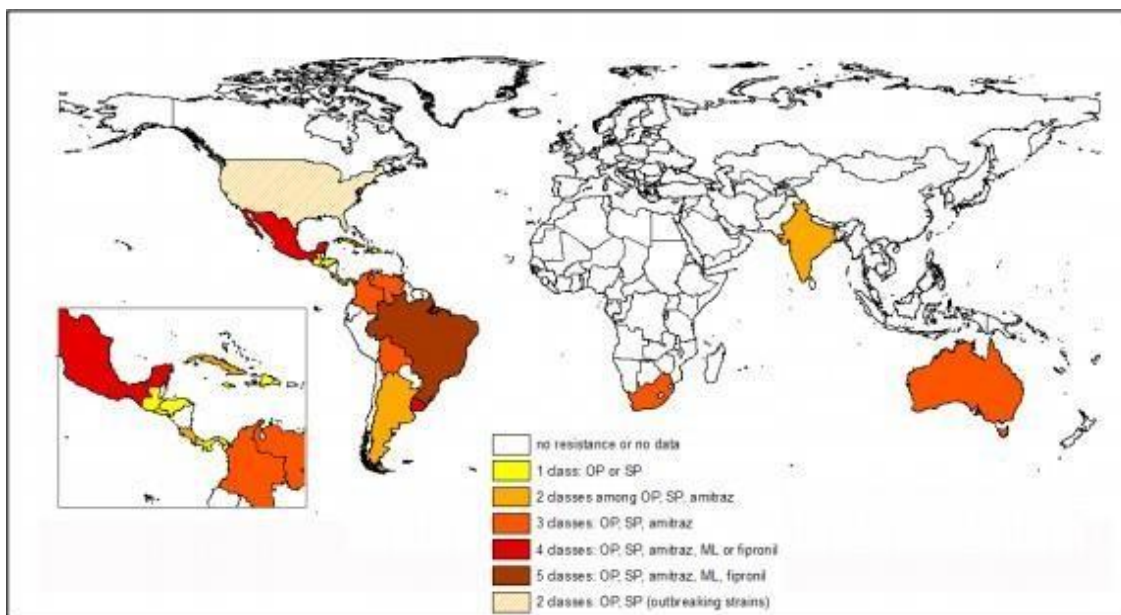
Sabe-se que quatro famílias de enzimas estão associadas ao metabolismo de inseticidas e implicadas em conferir resistência a uma ou mais classes de inseticidas: carboxilesterases (CCEs), glutatona transferase (GSTs), UDP glucuroniltransferases (UGTs) e citocromo P450s (CYP450) (HEMINGWAY *et al.*, 2004; BAFFI *et al.*, 2008; ROSARIO-CRUZ, 2009; FEYEREISEN; DERMAUW; VAN LEEUWEN, 2015; COSSÍO-BAYUGAR *et al.*, 2018).

Os organofosforados (OF) constituem um grande grupo de produtos químicos utilizados nos últimos 60 anos para controle de pragas que afetam a produção agropecuária (BARBOZA, *et al.*, 2018). A quantidade de uso de OF está diminuindo, mas a sua importância provavelmente vai continuar por décadas, devido à sua eficiência em controlar pragas em várias culturas além de seu baixo custo (GÜNGÖRDÜ *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016).

Um cenário preocupante para o controle deste o *R. microplus* em países em desenvolvimento econômico, em zonas tropicais e sub-tropicais, devido à farta resistência a dois ou mais compostos químicos (PARIZI *et al.*, 2009; GRISI *et al.*, 2014). Veja-se, por exemplo:

- Argentina - América do Sul: Formamidinas e Piretróides Sintéticos (LOVES *et al.*, 2013).
- África do Sul - África: Piretróides Sintéticos e Fenilpirazóis (LOVES *et al.*, 2013).
- Austrália - Oceania: Organofosfatos e Piretróides Sintéticos (LOVES *et al.*, 2013).
- Equador - América do Sul: Formamidinas, Lactonas Macrocíclicas e Piretróides Sintéticos (PS) (RODRÍGUEZ-HIDALGO *et al.*, 2017).
- Sri Lanka - Ásia: Diclorodifeniltricloroetano (DDT), Carbamatos e Organofosfatos (OF) (BANDARA; KARUNARATNE, 2017).
- Índia- Ásia: Piretróides Sintéticos e Organofosfatos (NAGAR *et al.*, 2018); (GODARA *et al.*, 2019).

- Colombia - America do Sul: Piretroides Sintéticos (VILLAR *et al.*, 2019).
- México - America do Norte: Piretroides e Amidinas (HIGA *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Distribuição mundial da resistência dos carrapatos aos acaricidas Organofosforados (OP), os Piretroides Sintéticos (SP), Amitraz, Fipronil, Lactona Macroiclica.

Fonte: Lovis, 2012

Como já se mencionou, a efetividade do processo de monitoramento da resistência necessita que este se faça o mais precocemente possível a fim de conter a proliferação de espécies resistentes e, conseqüentemente, a diminuição de custos (MENDES *et al.*, 2001; KLAFKE, 2012; HIGA *et al.*, 2016).

## 2.6 Resistência do *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas no Brasil

O controle químico do *R. microplus* por décadas tem sido caracterizado como a forma mais eficaz e econômica. Todavia, o uso progressivo e indiscriminado dos acaricidas evoluiu para surgimento de cepas resistentes à boa parte dos compostos disponíveis no mercado (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2007; ALBUQUERQUE, *et al.*, 2010; HIGA, *et al.*, 2016).

De acordo com Oliveira *et al.* (1986), os primeiros produtos químicos empregados para controle do carrapato *R. microplus* no Brasil foram os compostos arsenicais e em 1950 já se detectaram casos de resistência. Posteriormente, Freire (1953) reportou os primeiros casos de resistência aos compostos arsenicais e, em 1956, relatou também resistência aos produtos organoclorados.

Quanto aos acaricidas a base de organofosforado a primeira notificação de resistência no Brasil ocorreu em 1963 na cidade de Santa Ambrosina, estado do Rio Grande do Sul, também sendo o primeiro caso de resistência do *R. microplus* a esse composto na América do Sul (WHARTON & ROULSTON, 1975).

Os problemas de resistência continuaram a ser relatados com grande frequência no Rio Grande do Sul (GONZALES & SILVA, 1972; GONZALES *et al.*, 1973) e no Estado de Minas Gerais (PATARROYO & COSTA, 1980). Também foi notificada a existência de cepas resistentes no estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA *et al.*, 1986).

Leite (1988) sugeriu através de seu estudo epidemiológico da resistência do *R. microplus* aos piretroides em propriedades no Rio de Janeiro. Todavia a primeira notificação e constatação de cepas resistentes partiu do estudo de Laranja *et al.* (1989) no Rio Grande do Sul.

A resistência múltipla ocorre quando os carrapatos desenvolvem resistência a dois ou mais compostos, expressando múltiplos mecanismos de resistência. Múltiplas resistências a diferentes classes de acaricidas tornam-se cada vez mais prevalentes no Brasil (KLAFKER *et al.*, 2016) como mostra a tabelas 4.

**Tabela 4.** Distribuição geográfica da resistência do *R. microplus* no Brasil aos acaricidas organofosforados, piretroides, amidinas e lactonas macrocíclicas, Fluazuron, Piretroides + Organofosforados, Amidinas + Organofosforados e Fipronil.

Classes	Sul	Sudeste	Centro-Oeste	Nordeste	Norte
<b>Organofosforados</b>					
	Reck <i>et al.</i> 2014 (RS)	Mendes <i>et al.</i> 2011 (SP)	Gomes <i>et al.</i> 2011 (MT)	Raynal <i>et al.</i> 2013 (BA)	-
	-	Domingues <i>et al.</i> 2012 (MG)	-	-	-
<b>Piretroides</b>					
	Reck <i>et al.</i> 2014; Machado <i>et al.</i> , 2014 (RS)	Mendes <i>et al.</i> 2011 (SP)	Mendes <i>et al.</i> , 2013 (MT)	Raynal <i>et al.</i> , 2013 (BA)	Brito <i>et al.</i> , 2011 (RO)
	Veiga <i>et al.</i> , 2012 (SC)	Flausino <i>et al.</i> , 1995 (RJ)	-	Silva <i>et al.</i> , 2005 (PB)	-
	Souza <i>et al.</i> , 2003 (PR)	Domingues <i>et al.</i> , 2012 (MG)	-	-	-
<b>Aminidina</b>					
	Machado <i>et al.</i> , 2014; Reck <i>et al.</i> 2014 (RS)	Pereira, 2006 (SP)	Gomes <i>et al.</i> 2011 (MT)	Campos Junior & Oliveira, 2005 (BA)	Brito <i>et al.</i> , 2011 (RO)
	Veiga <i>et al.</i> , 2012 (SC)	Furlong, 1999 (MG)	-	Coelho <i>et al.</i> , 2013 (RN)	-
	Souza <i>et al.</i> , 2003 (PR)	-	-	-	-
<b>Lactonas Macrocíclicas</b>					
	Reck <i>et al.</i> 2014 (RS)	Klafke <i>et al.</i> , 2006 (SP)	-	-	-
	-	Lopes <i>et al.</i> , 2014 (MG)	-	-	-
<b>Fluazuron</b>					
	Reck <i>et al.</i> , 2014 (RS)	-	-	-	-
<b>Piretroides + Organofosforados</b>					
	Machado <i>et al.</i> , 2014 (RS)	Mendes <i>et al.</i> 2011 (SP)	Andreotti <i>et al.</i> , 2011 (MT)	Raynal <i>et al.</i> 2013 (BA)	Brito <i>et al.</i> , 2011 (RO)
	Souza <i>et al.</i> , 2003 (PR)	-	-	Santana <i>et al.</i> , 2013 (PE)	-
<b>Amidinas+ Organofosforados</b>					
	Machado <i>et al.</i> 2014 (RS)	-	-	-	-
<b>Fipronil</b>					



Reck *et al.*, 2014  
(RS)Castro-Janer *et al.*,  
2010 (SP)Castro- Janer  
*et al.*, 2010  
(MT)

-

-

---

Rio Grande do Sul (RS); Paraná (PR); Santa Catarina (SC); São Paulo (SP); Rio de Janeiro (RJ); Minas Gerais (MG); Mato Grosso (MT); Bahia (BA); Paraíba (PB); Rio Grande do Norte (RN); Rondônia (RO), Pernambuco (PE).

A evolução progressiva da resistência à múltiplos acaricidas afetam a produtividade da agropecuária bovina no Brasil, de modo que os indivíduos resistentes sobrevivem a concentrações de compostos que normalmente seriam letais para a espécie de *R. microplus* e frustram os esforços de controle químico adotados pelos produtores (GUERREIRO, *et al.*, 2014; STAFFORD; WILLIAMS; MOLAEI, 2017).

### **2.7 Resistências do *Rhipicephalus microplus* aos organofosforados e Piretroides no Estado de São Paulo**

O levantamento da resistência em populações de carrapatos de propriedades interior do Estado de São Paulo, conduzido por Mendes *et al.* (2011) revela uma ocorrência de resistencia ao organofosforado clorpirifós da ordem de 65,25%.

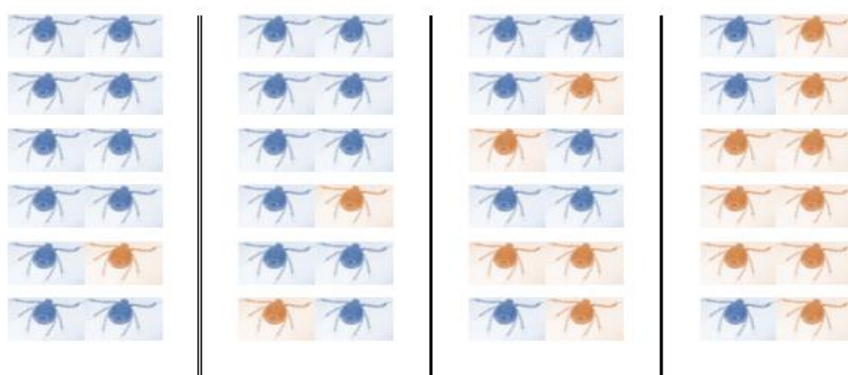
O perfil de sensibilidade *in vitro* dos produtos comerciais a base de OF existentes no mercado atualmente apresentam resultados positivos de porcentagem de mortalidade quando em formulações que combinam mais de um acaricida (UENO *et al.*, 2012; HIGA *et al.*, 2016). As altas frequências de resistência à compostos OF observadas em cepas de campo de *R. microplus* em propriedades do Estado de São Paulo provavelmente pode significar que há falhas no modo de tratamento (MARTINS *et al.*, 2008; LOVIS *et al.*, 2012).

Com relação ao piretroide, seu uso tornou-se indispensável para o aumento da produtividade na agricultura e na agro-pecuária devido à sua ação no controle dos vetores de doenças sendo utilizado no combate a ectoparasitoses, incluindo as provocadas por carraças, pulgas e piolhos em animais (BURNS *et al.*, 2013).

De um modo geral, o desenvolvimento da resistência dos insetos aos piretroides depende da quantidade e da frequência da aplicação do inseticida, para além das características inerentes às espécies expostas. Esses produtos têm uma meia-vida curta no ambiente, uma baixa toxicidade terrestre sobre os vertebrados e não se biomagnificam como as classes químicas mais antigas, como os organoclorados (SCHLEIER & PETERSON, 2011).

Em uma revisão da resistência realizada por Higa *et al.* (2016) foram encontradas no Estado de São Paulo espécies de *R. microplus* resistentes aos piretroides de base única, mostrando baixa eficácia. Resultado diferentemente observado quando as espécies amostradas foram expostas a combinações de formulações de organofosforados + piretroides (PEREIRA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2011; UENO *et al.*, 2012).

Populações de campo de *R. microplus* em São Paulo demonstraram níveis muito altos de resistência à cipermetrina, com fatores variando de 8,0 a 309,3 demonstrando contínuo desenvolvimento da resistência aos piretroides nas regiões onde foi analisada (LOVIS *et al.*, 2012). Nesse mesmo estudo, os autores evidenciaram nas espécies amostradas, a ocorrência de mutações L64I no Dominio II (associado às mutações *kdr* e super-*kdr*) que conferem insensibilidade ao local alvo, e sugerem que o aumento da atividade da esterase poderia provavelmente complementar a insensibilidade observada do local alvo, sem, no entanto, descartar a existência de outros mecanismos de desintoxicação de xenobióticos.



**Figura 3.** Processo de seleção química da população de carrapatos, aumento da frequência de indivíduos resistentes, até a falha de eficácia.

## **2.8 Modos de ação dos piretroides e organofosforados e mecanismo de resistência do *Rhipicephalus microplus***

As principais classes químicas utilizadas para controle de pragas pertencem a categoria dos neurotóxicos, uma vez que o principal alvo dos pesticidas é o sistema nervoso. Todos os organofosforados são derivados de um dos ácidos de fósforo e, como classe, geralmente são os mais tóxicos de todos os pesticidas.

Funciona inibindo as enzimas importantes do sistema nervoso, principalmente a *colinesterase* (ChE). A enzima é fosforilada quando se liga à porção fosforosa do inseticida, uma ligação que é irreversível. Essa inibição resulta no acúmulo de acetilcolina (ACh) nas junções ou sinapses neurônio/neurônio e neurônio/músculo (neuromuscular), causando espasmos rápidos nos músculos voluntários e, finalmente, paralisia (WARE & WHITACRE, 2004; BLOOMQUIST, 2009; MRDAKOVIĆ *et al.*, 2016).

Os piretroides, considerados venenos axônicos, afetam o sistema nervoso periférico e central do inseto. Eles inicialmente estimulam as células nervosas a produzir descargas repetitivas e eventualmente causam paralisia. Tais efeitos são causados por sua ação no canal de sódio, um pequeno orifício através do qual os íons de sódio podem entrar no axônio para causar excitação (WARE & WHITACRE, 2004; BLOOMQUIST, 2009; BURNS *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2013).

## **2.9 Bioensaios fenotípicos de diagnóstico da resistência a acaricidas em populações do *Rhipicephalus microplus***

De acordo com a FAO (2004), a escolha de um teste laboratorial adequado para avaliar a resistência a determinado acaricida em populações do *R. microplus* deve atender alguns requisitos importantes, tais como: alta sensibilidade na identificação da resistência desde seu surgimento; abranger uma gama de grupos químicos que estão em uso, incluindo também os novos princípios ativos; ser de execução simples e de baixo custo fornecendo ao mesmo tempo um resultado rápido e confiável. Nesse sentido, sugere alguns protocolos para a identificação de cepas de carrapatos resistentes, para facilitar o monitoramento global dessa resistência, e orienta que se adotem métodos diagnósticos

padronizados, como testes de avaliação *in vitro* para a identificação fenotípica da resistência com larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (FAO, 2004).

O Teste do Pacote de Larvas – TPL (Larval Packet Test - LPT) é indicado para investigação da resistência em cepas de campo do *R. microplus*, especialmente para acaricidas organofosforados e piretróides sintéticos (KEMP *et al.*, 1999). Nesse teste preferencial, as larvas são expostas a papéis filtros impregnados com acaricida e a mortalidade das larvas é quantificada após 24 horas de exposição aos princípios ativos (FAO, 2004).

O Teste de Imersão de Adultos (TIA) é um bioensaio que manuseia fêmeas ingurgitadas de carrapatos descrito por Drummond *et al.* (1973) é utilizado para estabelecer a eficiência de novos acaricidas contra várias espécies de carrapatos. Este bioensaio foi adequado a partir de testes de resistência executados em diferentes laboratórios padronizando os protocolos e disponibilizando para que seja utilizado amplamente. O Teste de Imersão de Larvas (TIL) foi elaborado por Shaw (1966), estudos comparativos sugeriram que os resultados do TIL podem ser comparados com os resultados do Teste de Pacote de Larvas (TPL) já que há uma boa concordância entre os resultados dos bioensaios (FAO, 2004).

## **2.10 Inovação e tecnologia empregadas no biocontrole de pragas de importância econômica.**

Novos desafios se apresentam à bovinocultura brasileira, como as exigências de bem-estar animal e os fatores relacionados à sustentabilidade ambiental (ABIEC, 2016; GOMES *et al.*, 2017). Nessa necessidade e ordem de idéias enquadra-se o biocontrole ou o controle biológico.

Segundo Garcia (2002), o controle biológico trata da utilização dos inimigos naturais, como microorganismos com potencial patogênico, predadores ou parasitoides, para regular ou controlar populações de insetos-praga. O uso do controle biológico proporciona inúmeros benefícios evidentes em relação ao uso de agentes químicos, uma vez que não polui o ambiente, tem baixo risco de contaminação e não causa desequilíbrios ecológicos possuindo assim o melhor custo benefício para o produtor, além de agregação de valor do produto (GONÇALVES, 1996).

De acordo com Parra *et al.* (2002) a utilização do controle biológico é bem antiga, data do século III a.C., quando os chineses utilizavam espécies de formigas predadoras para manejo e controle dos insetos da Ordem Coleoptera (besouros). Na Califórnia (EUA), em 1888, ocorreu com sucesso a utilização do Controle Biológico para controlar a cochonilha branca-da-laranjeira, *Unaspis citri* Comstock, 1883 (Hemiptera: Diaspididae) com a joaninha predadora *Rodolia cardinalis* Mulsant, 1850 (Coleoptera: Coccinellidae) (MEDEIROS, 1997).

De acordo com a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio, 2018) o mercado brasileiro de biodefensivos atingiu um faturamento de R\$ 528 milhões em 2018 valor de mercado de uso de produtos biológicos para todas as culturas (soja, cana, café, hortaliças e frutas). Estima-se que os biológicos ainda tenham um espaço ínfimo no universo dos produtos fitossanitários comercializados no Brasil, país que demanda um quinto dos agroquímicos consumidos no mundo. Representa apenas entre 1% e 2% do segmento de defensivos vendidos no Brasil. Porém, tem crescido a taxas de 10% a 15% ao ano. Segundo os dados da ABCBio (2018), de 2010 a 2016, a proporção de produtos biológicos registrados no Ministério da Agricultura para uso na agricultura brasileira saltou de 7% para 60% em relação aos produtos químicos.

O Programa de Inovação e Transferência em Controle Biológico (PROBIO), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, por meio de uma referência em controle biológico no Brasil, o Instituto Biológico, desenvolve sistemas de produção de bioinseticidas à base de fungos, bactérias e nematoides para cana, soja, milho, algodão e outras culturas, e atende 56 biofábricas para a produção de agentes de controle em diversos estados brasileiros e no exterior – além de prestar uma série de outros serviços na área (IB-APTA, 2017).

O controle biológico se distingue em três tipos e são classificados em natural, clássico e aplicado:

- I. O controle biológico natural é o método que procura preservar a população de inimigos naturais pelo manejo ambiental. Este tipo de controle é recomendado para qualquer tipo de cultura, pois é causadora da morte natural de grande número de insetos-pragas, impactando no equilíbrio do ecossistema (BERTI-FILHO; MACEDO, 2011).

- II. O controle biológico clássico é o método de liberação de parasitoides ou predadores, após sua produção em laboratório, pretendendo um manejo rápido da população de pragas. É mais aceito pelos produtores, devido sua ação imediata ou acelerada, semelhante ao uso de químicos convencionais. No passado, quando somente existia o controle biológico Clássico, devido às técnicas de criação de insetos serem incipientes, algumas das desvantagens apontadas eram a sua ação lenta e o fato de somente servir para culturas perenes ou semiperenes (BERTI-FILHO; MACEDO, 2011).
- III. O controle biológico aplicado, por sua vez, consiste na criação em grande escala de biocontroladores em laboratório, que em seguida são introduzidos no ambiente com a finalidade de adequar o equilíbrio, diminuindo a população indesejada até que cause menos danos para a produção (BERTI-FILHO; MACEDO, 2011). Assim, para controlar as populações de artrópodes aplica-se o uso de organismos macroscópicos e microscópicos como por exemplo os fungos, bactérias e vírus. São os chamados entomopatogênicos, ou seja, aqueles que vão causar alguma afecção somente para os artrópodes indesejados, com o propósito de controlar os insetos-pragas de importancia economica (GALLO, 2002).

### **2.11 Controle biológico usando fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle do *Rhipicephalus microplus***

Existem dois fungos patogênicos para artrópodes frequentemente estudados no Brasil: *Beauveria* ssp e *Metarhizium* ssp, sendo as espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana*, patogênicas tanto para insetos quanto para ácaros e carrapatos (CHANDLER *et al.*, 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; SUN, *et al.*, 2013).

Numerosos trabalhos demonstraram que existe uma variabilidade genotípica entre os isolados de *M. anisopliae*, e sugeriram que esta espécie era possivelmente um agregado de espécies (BIDOCHKA *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2010). Estudo filogenético feito por Bischoff *et al.* (2009) determinou que o isolado *M. anisopliae* compreende um

complexo de sete espécies: *M. majus*, *M. guizhouense*, *M. brunneum*, *M. pingshaense*, *M. robertsii*, *M. anisopliae* e *M. Lepidiotae*.

Além disso, são relatadas em outros estudos não somente uma variação genotípica, mas variações morfológicas e fisiológicas (LOMER *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2010). Acredita-se que, decorrente de todas essas variações mencionadas, há predominantemente diferentes níveis de virulência em estudos dos isolados de *M. anisopliae* para muitas espécies de artrópodes, inclusive carrapatos (ALVES, 1998; FERNANDES *et al.*, 2004; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; QUINELATO *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação desses fungos ocorre pela adesão de conídios à cutícula dos hospedeiros (MORAES *et al.*, 2003; VEGA & KAYA, 2012). Os esporos precisam aderir à superfície do hospedeiro, a penetração é alcançada tanto pela secreção de enzimas quanto pelo desenvolvimento de estruturas especializadas (apressório) que exercem pressão mecânica (WANG & ST. LEGER, 2007). Após a adesão, os conídios formam tubos germinativos e hifas penetrando através das cutículas e, em seguida, se ramificam atingindo a hemocele (HAJEK & ST. LEGER, 1994), colonizando o hospedeiro e produzindo toxinas (KIRKLAND *et al.*, 2004; PAL *et al.*, 2007), as quais, associadas ao crescimento do micélio, levam o hospedeiro à morte (GARCIA *et al.*, 2005).

Neste mesmo seguimento foram evidenciadas penetrações de blastosporos por isolados fúngicos através de aberturas naturais de cepas de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em carrapatos da espécie, *R. microplus*, pois apresentaram capacidade virulenta e rápido desenvolvimento em sua cutícula (FERNANDES *et al.*, 2018).

Estudos revelaram que *M. anisopliae* parece se apresentar eficiente no controle do carrapato, ampliando as expectativas para o uso em campo (ARAÚJO, 2017). Por outro lado, a utilização destes entomopatogênicos possuem outros fatores associados as desvantagens como a susceptibilidade a diversos fatores ambientais, como umidade, calor e radiação ultravioleta, que diminuem consideravelmente sua eficácia contra os hospedeiros (RANGEL *et al.*, 2004; HUANG; FENG, 2009; MENT *et al.*, 2010).

Segundo Camargo *et al.* (2016) e Perinotto *et al.* (2012) acredita-se que a associação entre o óleo mineral e um produto a base de *M. anisopliae* e *B. bassiana* pode ser efetiva no controle deste carrapato. Também foram feitos experimentos e notou-se

que os *Metarhizium* spp e *B. bassiana*, por serem bons produtores de conídio são também virulentos para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* (SUN, *et al.*, 2013; JONES, 2017).

Diante do agravamento do uso de produtos químicos convencional e a resistência do *R. microplus* à múltiplos acaricidas, o uso de microorganismos, neste caso, em especial o fungo *Metarhizium* spp surge com uma possível alternativa para mitigar problemas relacionados a resistência, perda de produção e sem dúvidas diminuição excessiva de produtos químicos que deixam resíduos.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a resistência do carrapato dos bovinos aos acaricidas diazinon e cipermetrina oriundas de fazendas localizadas em algumas regiões do Estado de São Paulo e estabelecer um sistema de controle biológico do *Rhipicephalus microplus* com o fungo *Metharizium anisopliae* à campo.

#### 3.1 Objetivos específicos

- I. Realizar testes fenotípicos de resistência ao organofosforado diazinon e ao piretroide cipermetrina em carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* por meio do teste de Pacote de Larvas (TPL)
- II. Verificar a ocorrência da mutação do canal de sódio T2134A no segmento S6 do domínio III, em populações de *Rhipicephalus microplus*
- III. Avaliar a atividade enzimática das esterases envolvidas no processo de detoxicação de acaricida por meio de testes bioquímicos com espectrofotometria e com inibidores de organofosforados.
- IV. Aplicar um sistema de biocontrole de *Rhipicephalus microplus* no pasto usando a cepa de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425).



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Locais de realização

O trabalho foi conduzido nas dependências do Laboratório de Parasitologia Animal e do Laboratório de Bacteriologia Geral ambos do Centro de Pesquisa de Sanidade Animal do Instituto Biológico, São Paulo, SP (latitude: 23° 32' 51" S; longitude: 46° 38' 10" W e altitude: 760m), nos anos de 2019 e 2010.

Os testes experimentais de controle biológico no pasto foram executados no Pólo Regional Vale do Paraíba em Pindamonhangaba (PRP), SP (latitude: 22° 55' 26" S; longitude: 45° 27' 42" W; altitude: 557m) de outubro de 2019 a setembro de 2020; e no Centro de Pesquisa em Bovinos de Leite (Instituto de Zootecnia) em Americana (IZ), SP (latitude: 22° 44' 21"; longitude: 47° 19' 53" W e altitude: 545m) de outubro de 2019 a outubro de 2020.

O uso de animais nos experimentos foi avaliado pelo comitê de ética em experimentação animal, protocolo número 314-2021. As cepas e espécies de fungos utilizados não são patogênicas para humanos e animais.

### 4.2 Coleta e seleção de fêmeas ingurgitadas para testes fenotípicos da resistência em *Rhipicephalus microplus*

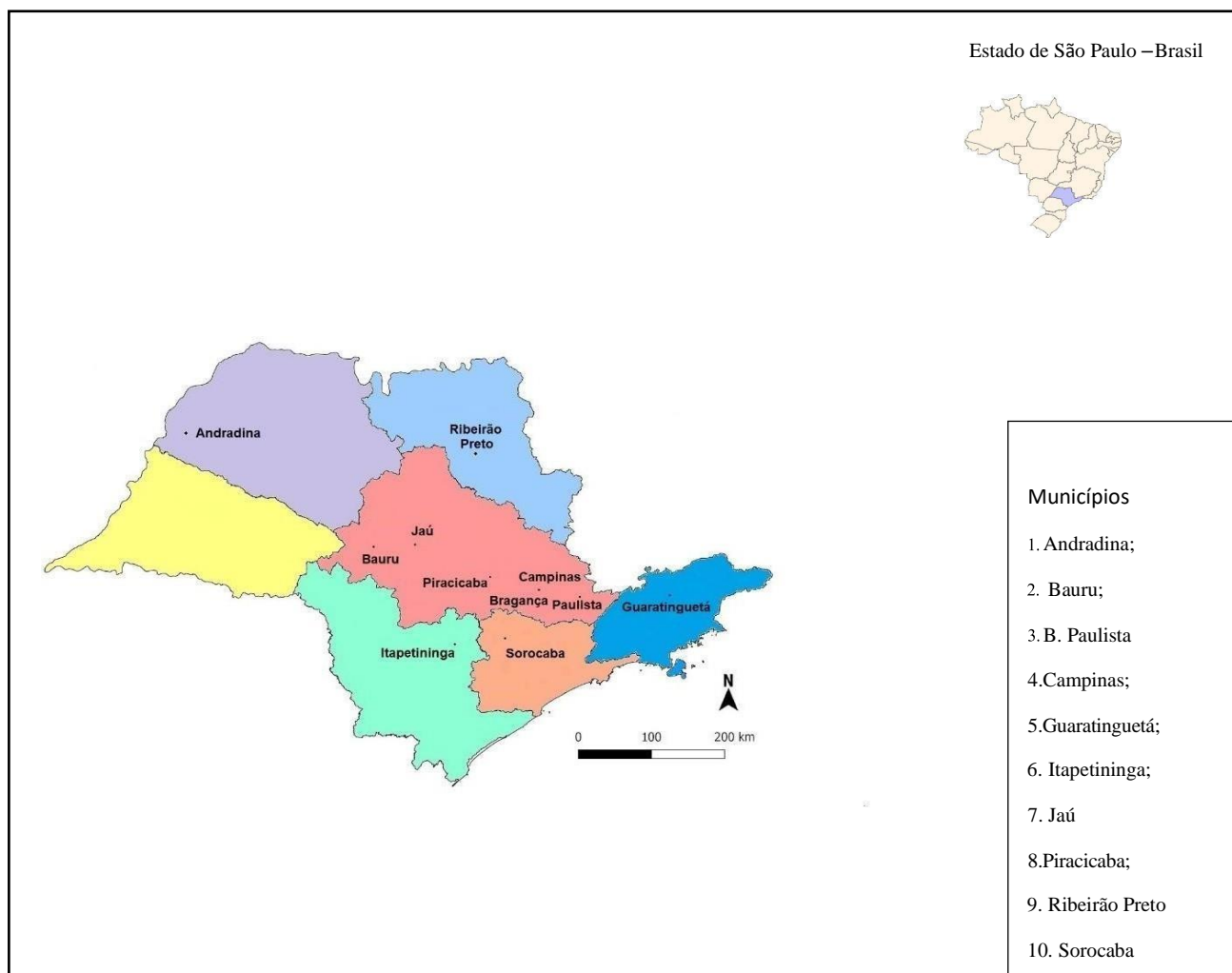
Não foi necessário um esclarecimento ético, pois esses experimentos incluíam exclusivamente larvas de carrapatos *R. microplus*. Além disso, nenhuma alimentação de sangue foi usada, não representava qualquer risco potencial de infecção para humanos e animais domésticos e, portanto, nenhum consentimento ético foi emitido aqui. Todavia foi aberto um processo junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para registro das atividades inerentes a utilização da biodiversidade brasileira em pesquisas com o protocolo n. 71009.

Foram coletadas teleóginas diretamente dos animais infestados e transferidas para frascos plásticos com furos para facilitar a entrada de oxigênio. Essas coletas ocorreram em fazendas situadas em municípios onde há atividade agropecuária de

criação de bovinos, distribuídos em diferentes regiões do Estado de São Paulo como mostra a Tabela 5 e Figura 4.

**Tabela 5.** Número de indivíduos de *Rhipicephalus microplus* coletados em municípios do Estado de São Paulo para testes fenotípicos

Cidade	Localização	Região	Número de Teleóquina
Águas de São Pedro	22° 35' 58" S 47° 52' 34" W	Piracicaba	50
Guaratinguetá	22° 48' 59" S 45° 11' 33" W	Guaratinguetá	70
Cunha	23° 5' 3" S 44° 57' 40" W	Guaratinguetá	10
Potim	22° 50' 34" S 45° 15' 05" W	Guaratinguetá	10
Lorena	22° 43' 51" S 45° 07' 29" W	Guaratinguetá	10
Atibaia	23° 07' 01" S 46° 33' 01" W	Bragança Paulista	30
Socorro	22°35'29" S 46°31'44" W	Bragança Paulista	20
Piracaia	23°03'14" S 46°21'29" W	Bragança Paulista	20
Joanópolis	22°55'49" S 46°16'32" W	Bragança Paulista	20
Bragança Paulista	22°57'07" S 46°32'31" W	Bragança Paulista	20
Nazaré Paulista	23° 10' 42" S 46° 23' 51" W	Bragança Paulista	20
Monte mor	22°56'48" S 47°18'57" W	Campinas	20
Castilho	20°52'20" S 51°29'15" W	Andradina	10
Murutinga do Sul	20°59'36" S 51°16'39" W	Andradina	60
Andradina	20° 53' 46" S 51° 22' 46" W	Andradina	30
Sarapuí	20° 53' 46" S 51° 22' 46" W	Itapetininga	10
Itapetininga	23° 35' 30" S 48° 03' 11" W	Itapetininga	20
São Miguel Arcanjo	23° 52' 42" S 47° 59' 50" W	Itapetininga	10
Piedade	23° 42' 43" S 47° 25' 40" W	Sorocaba	10
Batatais	20° 53' 28" S 47° 35' 06" W	Ribeirão Preto	10
Bauru	22° 18' 53" S 49° 03' 38" W	Bauru	10
Brotas	22° 17' 03" S 48° 07' 36" W	Jaú	10



**Figura 4.** Regiões de coleta de amostras de *Rhipicephalus microplus* no Estado de São Paulo, Brasil.

Fonte: SANTOS, M. L., 2021

### 4.3 Testes de Pacote de Larvas (TPL)

Esse bioensaio para o diagnóstico da resistência de *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas está baseado na técnica de Stone & Haydock (1962).

Os testes foram realizados com populações de carrapatos com os princípios ativos cipermetrina, com padrão analítico  $\geq 90,0\%$  de pureza, e diazinon, com padrão analítico 99,0% de pureza (Sigma ChemicalCo. St. Louis, MO, USA), para caracterizar a resistência fenotípica aos grupos químicos piretroides e organofosforados respectivamente.

Papéis filtro Whatman nº1 (7,5 x 8,5 cm) foram impregnados no Laboratório da Emprapa Amazônia Oriental Belém, PA Brasil. (1° 27' 18" Sul, 48° 30' 9" W) com os princípios ativos diazinon (concentrações: 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.2; 1.6; 2.4; 3.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e cipermetrina (concentrações: 1.6; 6.4; 25.6; 102.4; 409.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ambos com

padrão analítico  $\geq 90,0\%$  de pureza (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), e para o controle os papéis filtro foram impregnados somente com o solvente acetona.

Os testes foram realizados em triplicata. Nos dias do teste, os papéis filtro foram retirados da geladeira, dobrados ao meio e selados em ambos os lados com cliques de metal para formar os pacotes. Aproximadamente cem larvas de carrapatos foram transferidas para cada pacote usando um pincel. Os pacotes foram selados com um terceiro clipe no topo, e incubados em estufa B.O. D a 28°C e 80% de umidade relativa.

Após 24h, a mortalidade larval foi determinada pela contagem do número total de indivíduos mortos e vivos. Larvas que estavam paralisadas ou movendo apenas seus apêndices, sem a capacidade de andar, eram considerados mortos.

Os dados de mortalidade do teste de pacote de larvas foram analisados usando o modelo “probits” POLO-PC software (LeOra Software, 1987) e a classificação do nível de resistência (NR) foi calculada de acordo com Mendes *et al.* (2007).

#### **4.4 Extração e amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da resistência ao Piretroide**

A presença ou não da mutação T2134A do domínio III foi realizada com larvas eclodidas de fêmeas coletadas nas fazendas, as larvas sobreviventes às concentrações dos compostos nos testes fenotípicos denominadas P10, P11, P14, P15, P16, P19, P20, P27, P36 e P37 foram utilizadas de acordo com o protocolo de Guerrero *et al.* (2001). O DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit de extração Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit - Zymo Research - D4069 seguindo orientações do fabricante.

A amplificação de alelos mutantes e sensíveis foi realizada pelo método desenvolvido por Guerrero *et al.* (2001) que consiste de duas reações para a amplificação dos alelos sensível e resistente com as respectivas sequências 5' – TTATCTTCGGCTCCTTCA – 3' (221S) e 5' – TTATCTTCGGCTCCTTCT – 3' (221R). A fita oposta em ambas as reações foi sintetizada com o oligonucleotídeo comum a ambos os alelos de sequência 5' – TTGTTTCATTGAAATTGTCGA – 3' (227I). Além disso, foi adicionado uma reação de controle positivo de PCR em todas as amostras e um controle negativo (substituindo DNA por água ultrapura).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25,0  $\mu$ L contendo 2,5  $\mu$ L de DNA molde e 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo. Adicionou-

se em seguida 12,5  $\mu\text{L}$  do kit de amplificação TaqDNA Polymerase 2x Master Mix RED™ (Ampliqon®, Odense, Dinamarca) na concentração de 4 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 0,8 mM de trifosfatos desoxinucleotídicos para uma diluição à concentração final de reação a 2mM de  $\text{MgCl}_2$  e trifosfatos desoxinucleotídicos a 0,4 mM (dNTP). O volume restante para se atingir 25  $\mu\text{L}$  foi completado com água ultrapura.

As reações foram realizadas a 96°C por 2 min, seguidas por 42 ciclos de PCR (94°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min) e, em seguida, uma extensão final a 72°C por 7 min. Os amplicons obtidos na PCR foram visualizados em géis de agarose a 3% corados com solução uniSafe Dye Nucleic Acid Nucleic Stain™ (20.000x) (Uniscience Corporation® Miami Lakes, FL 33015 USA), com corrida de uma hora e noventa de voltagem e 100 Pb .

#### **4.5 Testes bioquímicos para avaliação das esterases na resistência ao organofosforados e piretroide.**

##### **4.5.1 Determinação da concentração de proteínas totais e atividade enzimática com espectrofotometria**

A atividade enzimática foi realizada com um pool de cinco larvas sobreviventes e de cinco mortas retiradas do papel impregnado da maior concentração para ambos os produtos. Em relação ao diazinon esse teste foi realizado em quinze propriedades NR III, já para cipermetrina foi feito em três propriedades NR I e seis NR II.

As dosagens enzimáticas foram realizadas segundo o Método do Micro Biureto (Itzhaki & Gill, 1964). Para a determinação da concentração de proteínas totais dois reagentes foram utilizados: sulfato de cobre 6 mmol.L<sup>-1</sup> (Reagente 1) e NaOH 1,15 mol.L<sup>-1</sup> (Reagente 2). Cada amostra foi homogeneizada em duas repetições, utilizando-se 500  $\mu\text{L}$  de cada reagente, 995 $\mu\text{L}$  de água destilada e 5  $\mu\text{L}$  da amostra. O padrão usado foi albumina sérica bovina na concentração de 50 g.L<sup>-1</sup>. As medidas de absorvância a 570 nm foram realizadas em espectrofotômetro modelo femto 600 plus e os resultados expressos em g.L<sup>-1</sup> (Gornall et al., 1949).

As atividades enzimáticas das esterases foram determinadas através da adição dos substratos  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil. Em cada tubo foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do homogenato (tanto para a  $\alpha$  quanto para a  $\beta$ -esterase), em 250  $\mu\text{L}$  de solução de acetato de  $\alpha/\beta$ - 25 naftil dissolvidos em 24,75 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2. A reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de

solução de Fast Blue B (0,045 g de Fast Blue B) em 4,5 mL de água destilada adicionada a uma solução de 15 ml de SDS 5%. Novamente a reação foi incubada a temperatura ambiente, por mais 5 minutos para depois, proceder à adição de 200  $\mu$ L de  $\alpha/\beta$ -naftil acetato/fosfato de sódio e mais 50  $\mu$ L de Fast blue. As leituras de absorvância foram feitas em 570 nm.

Análise de variância foi realizada para determinar diferenças nas atividades enzimáticas entre larvas vivas e mortas para cada principio ativo, utilizando o teste de Tukey na comparação das médias considerando o nível de significância de 5%.

#### **4.6 Aplicações de fungos entomopatogênicos no pasto para o controle de larvas de *Rhipicephalus microplus***

Os experimentos foram realizados em dois municípios do Estado de São Paulo, Americana- SP (latitude: 22° 44' 21"; "longitude: 47° 19' 53" W e altitude: 545m) e Pindamonhangaba- SP (latitude: 22° 55' 26" S; "longitude: 45° 27' 42" W e altitude: 557m). O fungo utilizado foi o *Metarhizium anisopliae* (isolado IBCB 425) na concentração de 5 x 10<sup>13</sup> por ha, cedido pelo Instituto Biológico.

O experimento foi realizado com grupo de bezerros homogêneos (raças semelhantes e pareados) com idade inicial de seis (6) meses e permaneceram até dezoito (18) meses sem tratamento carrapaticida há pelo menos 30 dias. Para a formação dos grupos dos animais tratado e controle, no dia zero, de acordo com a média geométrica de três contagens de fêmeas com tamanho entre 4,5 mm e 8,0 mm, do lado esquerdo do animal nos dias -2, -1 e zero, os bezerros foram selecionados por ordem decrescente de infestação e randomizadas em dois grupos com sete animais cada um.

Os bezerros foram mantidos em piquetes formados por *Brachiaria decumbens* e suplementados no período de seca com feno, silagem de sorgo e ração farelada com 20% de proteína bruta.

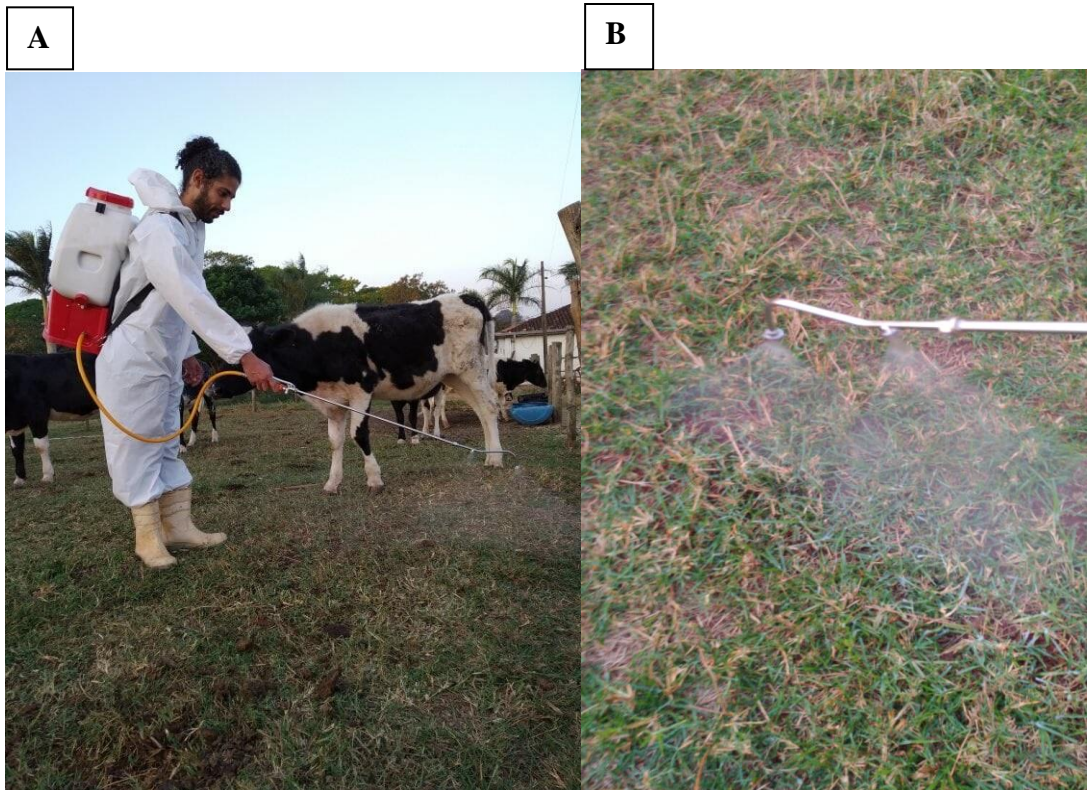
No Centro de Pesquisa de Bovino de Leite (Instituto de Zootecnia) os grupos dos bezerros pertenciam às raças girolando, gir e holandês. Para o tratamento do pasto foram pesados 13 g do fungo *M anisopliae* sendo diluídos em 40 litros de calda (95% de água e 5% de óleo mineral) aplicados em piquete de 640m<sup>2</sup> (na área controle foi aplicado 40 litros de calda contendo 95% de água e 5% de óleo mineral). Para a homogeneização da calda foi usado aproximadamente 300g de um emulsificante alimentício à base de mono e

diglicerídios de ácidos graxos (Emustab, Selecta). A aplicação foi feita com pulverizador costal automático com bico leque para garantir asperção de maneira uniforme.



**Figura 5.** Piquete onde foi mantido os animais e pulverizado com fungos *Metarhizium anisopliae* **A**; Contagem da infestação no lado esquerdo dos bovinos no tronco **B** e **C**. Americana – SP.

Fonte: SANTOS, M. L., 2021



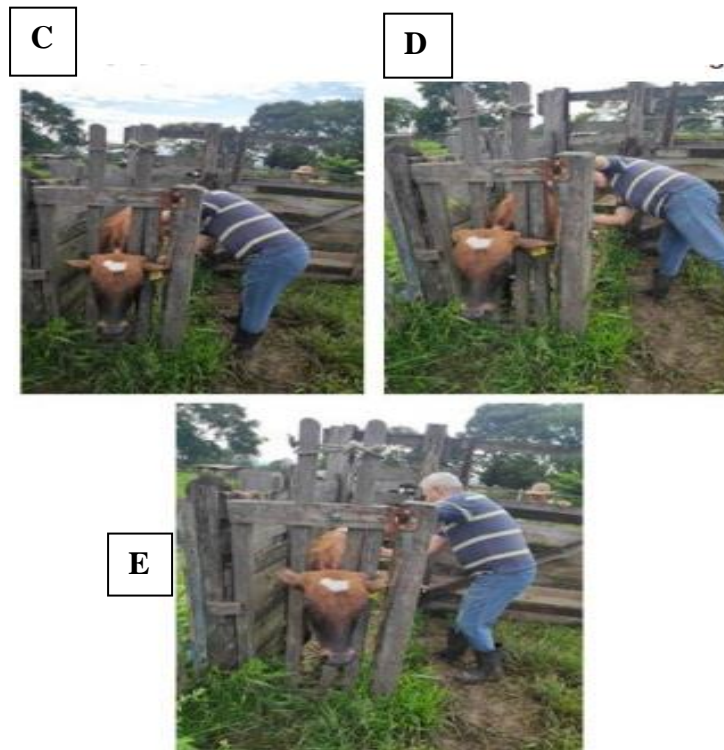
**Figura 6.** Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* no pasto para controle de larvas de *R. microplus* **A** e **B.** Americana – SP.

Fonte: SANTOS, M. L., 2021

Na fazenda do Polo regional do Desenvolvimento Tecnológicos dos Agronegócios do Vale do Paraíba o experimento foi usado bezerros da raça girolando mantidos em dois piquetes totalizando 1 hectare. Para o tratamento do pasto foram pesados 200g do fungo *M anisopliae* sendo diluídos em 100 a 150 litros de água (95% de água e 5% de óleo mineral). A homogeneização foi feita como descrito acima e a aplicação foi feita com o implemento agrícola de barra.







**Figura 7.** Piquete onde foi mantido os animais e pulverizado com fungos *Metarhizium anisopliae* A e B; Contagem da infestação no lado esquerdo dos bovinos no tronco C, D e E. Pindamonhangaba – SP.

PEREIRA, J. R., 2021



**Figura 8.** Aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* no pasto para controle de larvas de *R. microplus* A, B e C. Pindamonhangaba – SP.

Para os dois locais do experimento a aplicação foi realizada a cada mês a partir das 17h e a avaliação foi realizada quinzenalmente pela contagem no animal de todas as teleóginas entre 4,5mm e 8,0mm de comprimento, presentes no lado esquerdo de cada bovino dos dois grupos (Wharthon *et al.*, 1970). As contagens foram realizadas pela mesma pessoa.

#### **4.7 Análises Estatísticas da resistência aos acaricidas organofosforados e piretroides e do controle biológico com artropodopatogênico**

Para calcular resitência, os dados das larvas (vivas e mortas) usadas no teste de pacote de larvas, foram analisados usando o modelo “probits” POLO-PC software (LeOra Software, 1987). Teste estatístico para determinar frequência dos alelos da mutação do domínio III T2134A.

Análise de variância foi realizada para determinar possíveis diferenças significativas entre os fatores de resistência, atividades enzimáticas e foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, teste de Tukey para a comparação das médias considerando o nível de significância.

Para avaliar a eficiência dos tratamentos foi avaliada segundo o método de acordo com Abbott, (1925), avaliação padronizada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de Controle} = \left( 1 - \frac{n(T)}{n(\text{Co})} \right) * 100$$

Sendo:

n = Número de teleóginas acima de 4,5mm

T = Grupo Tratado

Co = Grupo Controle

Foram efetuadas transformações logarítmicas,  $\log(X + 1)$ , para a análise estatística dos dados. Nos testes de campo foi analisada a variância entre as médias para todas as contagens de teleóginas, comparando grupos tratados e controle depois dos tratamentos,

para comparação das médias foi usado o teste de Tukey.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da resistência, mutação do domínio III T2134A a cipermetrin e as atividades enzimáticas à cipermetrina e ao diazinon

Os princípios ativos usados em cada propriedade e os dados de resistência dos produtos cipermetrina e diazinon estão apresentados nas Tabela 6 e Tabela 8. O uso da associação piretróide e orgnofosforados foi citado por 52,5% dos proprietários e 20% relataram o uso de piretróides não associados. Os demais grupos químicos foram mencionados com as seguintes frequências: 15% formamidina, 12,5% fluazuron, 10% lactonas maclociclicas, 7,5% homeopatia, 5% organofosforados não associados, 2,5% fenilpirazóis e 17,5% não mencionaram produto algum.

A Tabela 6 apresenta resultados do teste com a cipermetrina sendo que o cálculo do fator de resistência foi efetuado usando a  $CL_{50}$  da fazenda P2 ( $CL_{50}$ :1,08) considerada como susceptível por apresentar a menor  $CL_{50}$ . O nível de resistência (NR) foi calculado seguindo os valores do fator de resistência (Tabela 6). Resistente Nível I = FR 2,5 -5,4; Resistente Nível II = FR 5,5 – 50 e Resistência Nível III = FR > 50 para os piretroides.

Das quarenta propriedades analisadas, dezoito delas apresentaram fatores de resistência que variou entre 1,58 – 28,8 e NR nível I (53%) e nível II (47%). Das dezoito amostras resistentes, apenas cinco delas, não relataram o uso da cipermetrina (isolada ou associada com outro princípio) no tratamento dos animais contra o *R. microplus*.

A mutação do domínio III T2134A das dez amostras de *R. microplus* analisadas foi identificada em sete propriedades. Em 6 delas foram encontradas larvas heterozigotas e em 4 foram encontradas larvas homozigotas resistentes. A amostra P10 com FR de 10,3 apresentou 87,5% das larvas com resistência heterozigota. Já a amostra P19 com FR de 28,2 mostrou larvas com resistência homozigota para a mutação III T2134A (Tabela 7).

Os gráficos das atividades enzimáticas  $\alpha$ -esterase e  $\beta$ -esterase testadas com larvas vivas e mortas da concentração 409,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cipermetrina das amostras P10, P11, P14, P15, P16, P19, P20, P27, P36 e P37, não mostraram diferenças significativa considerando os dois grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 10).

Nos resultados dos testes do *R. microplus* com o princípio ativo diazinon (Tabela 8) observa-se que noventa por cento das propriedades exibiram resistência usando como

padrão de susceptibilidade a amostra P3 (CL50: 0,03). O nível de resistência (NR) foi calculado seguindo os valores do fator de resistência (Tabela 9). Resistente Nível I = FR 1,5 – 4,4; Resistente Nível II = FR 4,4 – 50 e Resistente Nível III = FR >50 para organofosforado. As porcentagens de NR encontradas foram de 6% para o nível I, 30% nível II e 64% para o nível III.

Verifica-se que as propriedades com NR II e III apresentaram as respectivas porcentagens (46,6% e 69,5%) de uso do organofosforado associado a outro princípio ativo no tratamento dos bovinos. Os resultados das atividades enzimáticas das amostras testadas (P5, P6, P14, P15, P17, P20, P24, P26, P29, P31, P33, P34, P37 P39 e P40) demonstram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de larvas vivas e mortas (Figura 11).

**Tabela 6 .** Caracterização do fenótipo da resistência e suscetibilidade a cipermetrina em população de larvas de *Rhipicephalus microplus* do Estado de São Paulo.

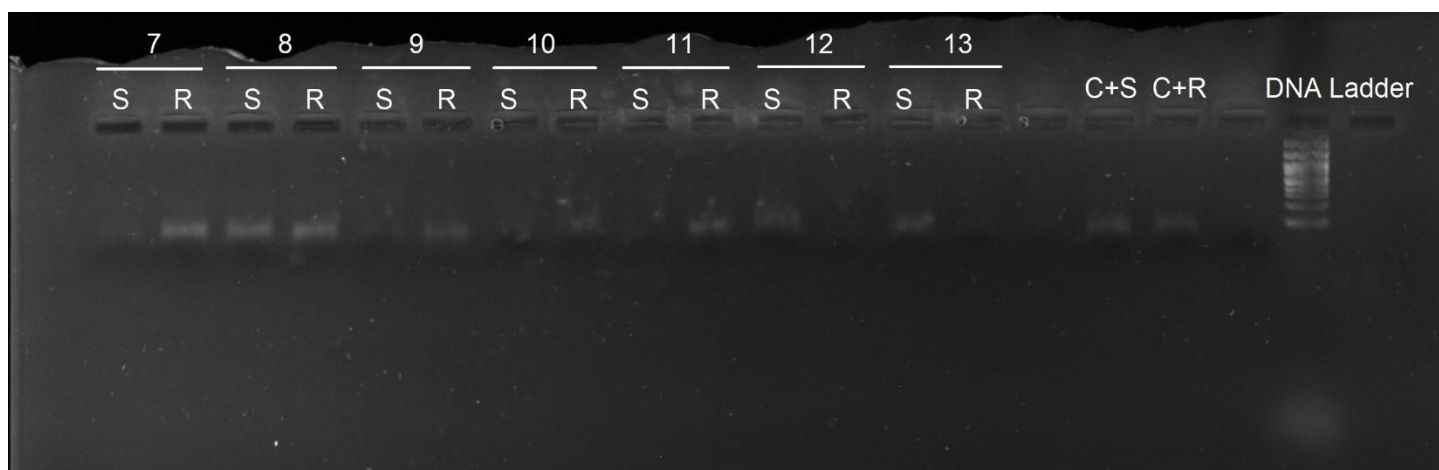
Municípios	Princípio ativo	Nº	LC <sub>50</sub> (95%CI)	SLOPE ± SE	FR	NR	
P1	São Pedro	Não informado	1388	-	0,35±0,181	-	-
P2	São Pedro	Fluazuron + abamectina	2858	1,08(0,252 – 1,626)	2,8±0,272	-	-
P3	São Pedro	Não faz tratamento	2818	1,71(1,344 – 2,075)	2,89±0,211	1,58	I
P4	São Pedro	Não informado	1652	-	0,33±0,277	-	-
P5	Montemor	Cipermetrina,Amitraz,Corpirifós,Fenthion,Diclorvós	1595	-	13,88±754198	-	-
P6	Bragança Paulista	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Diflubezuron	2271	-	14,89±719317,20	-	-
P7	São Pedro	Não informado	2046	-	16,42±2328112,0	-	-
P8	Nazaré Paulista	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Diflubezuron; Doramectina	2676	-	0,77±0,048	-	-
P9	Bragança Paulista	Não informado	2077	-	13,011±435920,7	-	-
P10	Atibaia	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; amitraz	2795	11,2(7,151 – 16,716)	0,91±0,036	10,3	II
P11	Atibaia	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; deltametrina	2499	7,40(6,249 – 8,701)	2,37±0,092	6,85	II
P12	Nazaré Paulista	Diflubenzuron; Doramectina	2487	-	14,38±728156,21	-	-
P13	Socorro	Amitraz; Cipermetrina+clorpirifós+citronela	2469	-	14,49±1056479,4	-	-
P14	Guaratinguetá	Cipermetrina; Fluazuron	2050	5,29(4,395 - 6,238)	3,23±0,188	4,89	I
P15	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Amitraz;	1921	3,67(3,357 - 3,977)	3,28±0,202	3,39	I
P16	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Fluazuron; Flumetrina	2168	5,01(4,482 - 5,601)	2,47±0,103	4,63	I
P17	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela	807	-	1,62±0,134	-	-
P18	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Amitraz	796	-	0,67±0,059	-	-
P19	Guaratinguetá	Flumetrina; Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Amitraz	2825	30,5(21,572 - 43,713)	1,03±0,034	28,8	II
P20	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; amitraz	2817	8,65(7,056 - 10,517)	3,22±0,126	8,0	II
P21	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Fipronil	2249	2,92(2,117 - 3,967)	4,35±0,209	2,7	I
P22	Andradina	Cipermetrina, Clorpirifós	2275	-	14,64±734318,79	-	-
P23	Murutinga do Sul	Cipermetrina+ Clorpirifós; Citronela	744	-	12,12±1630862,9	-	-
P24	Castilho	Cipermetrina, Clorpirifós	540	2,85(2,410 - 3,402)	2,89±0,326	2,63	I
P25	Murutinga do Sul	Cipermetrina+Clorpirifós; Diclorvós+ Cipermetrina+	626	-	13,73±1703346,0	-	-
P26	Murutinga do Sul	Cipermetrina+clorpirifós+citronela	1674	3,16(2,630 - 3,840)	4,36±0,233	2,92	I
P27	Murutinga do Sul	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Deltametrina; Ivermectina	1844	6,42(4,835 - 8,592)	2,59±0,118	5,94	II
P28	Murutinga do Sul	Cipermetrina+clorpirifós+citronela;	874	-	14,39±2024732,6	-	-
P29	Murutinga do Sul	Não informado	890	-	27,83±4031209,4	-	-
P30	Guaratinguetá	Cipermetrina, Fenthion, Clorpirifós	2694	-	15,28±1410592,6	-	-
P31	Guaratinguetá	Cipermetrina+Clorpirifós; Citronela	2432	12,2(8,229 - 18,287)	4,132±0,192	11,2	II
P32	Brotas	Não informado	625	-	0,00±979671,806	-	-
P33	Brotas	Não informado	760	-	1,310±0,088	-	-
P34	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; amitraz;	2470	-	14,66±460881,79	-	-
P35	Itapetininga	Homeopatia	2433	3,05(2,509 - 3,656)	3,08±0,147	2,82	I
P36	Itapetininga	Homeopatia	1163	15,9(6,220 - 36,233)	0,68±0,048	14,7	II
P37	Sarapui	Homeopatia	1178	8,94(1,575 - 28,620)	1,22±0,060	8,27	II
P38	Piedade	Cipermetrina	1671	2,48( 0,877 - 4,333)	2,09±0,125	2,29	I
P39	Ribeirão Preto	Não infirmado	1494	-	0,90±0,048	-	-
P40	Capivari	Não informado	1441	4,93(0,779 - 11,932)	1,26±0,067	4,56	I

N= número de indivíduos; LC<sub>50</sub>(95%CI) = Concentração que mata 50% com intervalo de confiança; FR= Fator de resistência; NR: nível de resistência

**Tabela 7.** Frequência da mutação domínio III T2134A em amostras de *R. microplus* provenientes de algumas regiões no Estado de São Paulo - Brasil

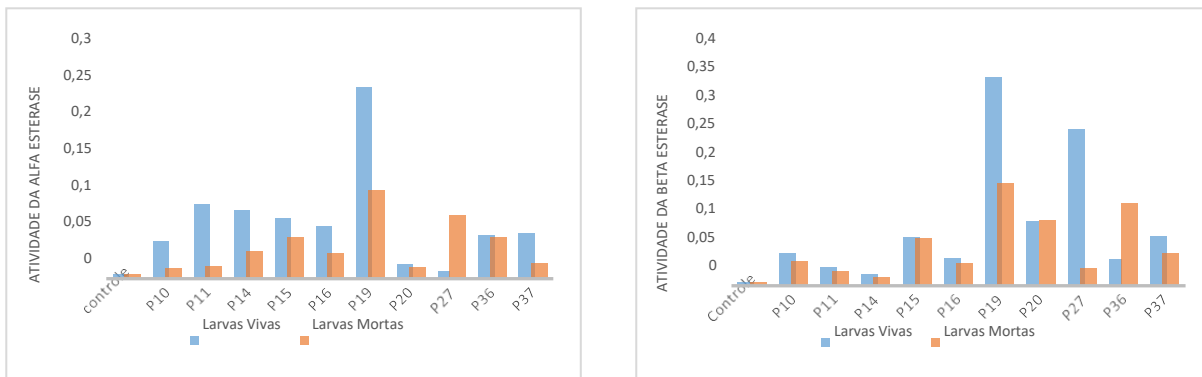
Amostras	FR	Genótipos			
		SS		RS	RR
		n	% freq.	% freq.	% freq.
P10	10,3	16	0	87,5	12,5
P11	6,85	11	54,5	27,3	18,2
P14	4,89	16	93,75	6,25	0
P15	3,39	16	93,75	6,25	0
P16	4,63	16	93,75	0	6,25
P19	28,2	13	23,1	15,4	61,5
P20	8,00	16	100	0	0
P27	5,94	16	93,75	6,25	0
P36	14,7	16	100	0	0
P37	8,27	16	100	0	0

FR: fator de resistência; RS: Resistente heterozigota; RR: Resistente homozigota; SS: sensível; n: número de larvas; % freq.: Porcentagem da Frequência.



**Figura 9.** Amplificação por PCR de 13 amostras de larvas provenientes da propriedade P19. A foto mostra o resultado das amostras 7 a 13 amplificadas pelo par de primers específico para o alelo sensível (Primer 227I mais o primer 221S correspondente ao alelo sensível) ou resistente (Primer 227I mais o primer 221R correspondente ao alelo resistente).

Fonte: SANTOS, M. L., 2021



**Figura 10.** Avaliação das atividades enzimáticas de  $\alpha$ -esterase e  $\beta$ -esterase em larvas de *R. microplus* (populações de P5 ao P40) expostas a cipermetrina. Controle= Larvas que não foram expostas a cipermetrina.

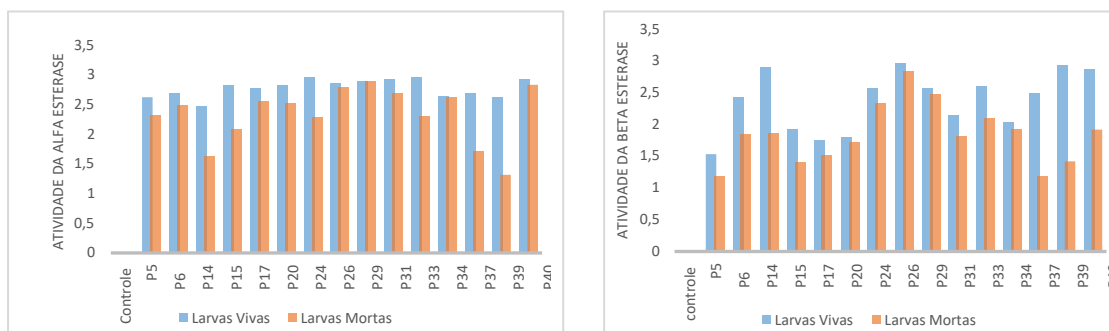
Fonte: SANTOS, M. L., 2021

**Tabela 8.** Caracterização do fenótipo da resistência e suscetibilidade ao diazinon em população de larvas de *Rhipicephalus microplus* do Estado de São Paulo.

	Municípios	Princípio ativo	Nº	LC <sub>50</sub> (95%CI)	SLOPE ± SE	FR	NR
P1	São Pedro	Não informado	3815	0,08(0,023 - 0,154)	0,722±0,041	2,66	I
P2	São Pedro	Fluazuron + abamectina	5601	0,12(0,008 - 0,297)	0,348±0,030	4	I
P3	São Pedro	Não faz tratamento	4797	0,03(0,006 - 0,080)	0,654±0,037	-	-
P4	São Pedro	Não informado	3195	0,45(0,328 - 0,605)	1,081±0,043	15	II
P5	Montemor	Cipermetrina, Amitraz, Clorpirifós+Fenthion,+Diclorvós	3260	4,39(2,788 - 8,975)	0,912±0,052	146	III
P6	Bragança Paulista	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Diflubezuron	5568	5,01(2,548 - 18,321)	0,652±0,036	167	III
P7	São Pedro	Não informado	5348	0,69(0,506 - 0,975)	1,693±0,041	23	II
P8	Nazaré Paulista	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Diflubezuron;	5913	1,97(1,289 - 3,873)	1,092±0,037	65	III
		Doramectina					
P9	Bragança Paulista	Não informado	5107	1,14(0,685 - 2,500)	1,022±0,035	38	II
P10	Atibaia	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; amitraz	5619	1,35(0,989 - 2,053)	1,154±0,038	45	II
P11	Atibaia	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; deltametrina	5605	1,16(0,932 - 1,498)	1,467±0,041	38	II
P12	Nazaré Paulista	Diflubenzuron; Doramectina	4939	2,63(1,899 - 4,201)	1,058±0,043	87	III
P13	Socorro	Amitraz; Cipermetrina+clorpirifós+citronela	4945	0,75(0,643 - 0,895)	1,228±0,039	25	II
P14	Guaratinguetá	Cipermetrina; Fluazuron	5072	29,7(11,762 - 209,769)	0,973±0,067	990	III
P15	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Amitraz;	6285	15,0(10,444 - 24,610)	1,111±0,063	500	III
P16	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Fluazuron;	5175	1,95(1,505 - 2,759)	0,954±0,039	65	III
		Flumetrina					
P17	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela	1449	2,29(1,615 - 3,825)	1,431±0,089	76	III
P18	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Amitraz	1701	-	1,217±0,086	-	-
P19	Guaratinguetá	Flumetrina; Cipermetrina+clorpirifós+citronela;	4969	1,94(1,611 - 2,441)	1,554±0,051	64	III
		Amitraz					
P20	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; amitraz	5016	4,19(3,705 - 5,064)	4,156±0,287	139	III
P21	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Fipronil	4084	1,75(1,600 - 1,939)	2,196±0,080	58	III
P22	Andradina	Cipermetrina, Clorpirifós	4581	1,88(1,574 - 2,339)	1,556±0,056	62	III
P23	Murutinga do Sul	Cipermetrina+ Clorpirifós; Citronela	1430	1,90(1,174 - 4,953)	1,447±0,094	63	III
P24	Castilho	Cipermetrina, Clorpirifós	1394	2,83(2,653 - 3,080)	5,693±0,506	94	III
P25	Murutinga do Sul	Cipermetrina+Clorpirifós; Diclorvós+ Cipermetrina+	1151	0,97(0,484 - 3,188)	0,572±0,069	32	II
P26	Murutinga do Sul	Cipermetrina+clorpirifós+citronela	3788	2,35(2,004 - 2,880)	1,653±0,069	78	III
P27	Murutinga do Sul	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; Deltametrina;	3366	1,55(1,044 - 2,785)	1,232±0,048	27	II
		Ivermectina					
P28	Murutinga do Sul	Cipermetrina+clorpirifós+citronela;	1392	0,92(0,695 - 1,254)	2,334±0,110	30	II
P29	Murutinga do Sul	Não informado	1796	2,96(2,325 - 6,015)	5,218±0,383	98	III
P30	Guaratinguetá	Cipermetrina, Fenthion + Clorpirifós	4924	-	57,413±12888,07	-	-
P31	Guaratinguetá	Cipermetrina+Clorpirifós; Citronela	4405	2,27(1,870 - 2,927)	1,550±0,060	75	III
P32	Brotas	Não informado	1486	-	1,643±0,079	-	-
P33	Brotas	Não informado	1700	2,83(2,132 - 4,618)	1,968±0,134	94	III
P34	Guaratinguetá	Cipermetrina+clorpirifós+citronela; amitraz;	5327	2,71(2,472 - 3,045)	3,511±0,135	90	III
P35	Itapetininga	Homeopatia	4132	2,83(2,458 - 3,433)	3,083±0,135	94	III
P36	Itapetininga	Homeopatia	1141	1,32(0,887 - 2,240)	0,966±0,069	44	II
P37	Sarapuí	Homeopatia	1211	5,39(2,367 - 137,231)	1,232±0,109	179	III
P38	Piedade	Cipermetrina	1722	0,86(0,507 - 1,414)	1,865±0,082	28	II
P39	Ribeirão Preto	Não informado	1253	3,43(2,599 - 6,335)	3,088±0,274	114	III
P40	Capivari	Não informado	1232	6,47(4,245 - 12,376)	1,080±0,099	215	III

N= número de indivíduos; LC<sub>50</sub>(95%CI) = Concentração que mata 50% com intervalo de confiança; FR= Fator de resistência; NR: nível de resistência





**Figura 11.** Avaliação das atividades enzimáticas de  $\alpha$ -esterase e  $\beta$ -esterase em larvas de *R. microplus* (populações de P5 ao P40) expostas ao diazinon. Controle= Larvas que não foram expostas ao organofosforado.

Fonte: SANTOS, M. L., 2021

## 5.2 Desempenho da aplicação de *Metarhizium anisopliae* (isolado IBCB 425) na pastagem para controle de *R. microplus* no Pólo Regional de Pindamonhangaba (PRP) e Instituto de Zootecnia (IZ).

A primeira contagem em ambos locais do experimento foi realizada no mesmo dia da primeira aplicação, esta contagem, portanto, não reflete os efeitos da ação do fungo. De um modo geral, fica evidente que há diferença nas contagens entre controle e tratado na maioria dos meses de acordo com as Figuras 12 e 13.

As médias das eficácias do tratamento com o fungo *M. anisopliae* obtidas no experimento realizado em PRP mostram que houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os animais tratados e controle exceto no outono. Para o ensaio feito no IZ houve diferença significativa, nas médias de eficácia, nas estações do outono e inverno ( $p < 0,01$ ).

Em relação aos dados climáticos e a eficiência nos dois experimentos (PRP e IZ), verifica-se nestes resultados que não houve correlação entre os dados de temperatura e umidade na eficácia dos tratamentos (Tabelas 9 e 10).

**Tabela 9.** Eficácia do tratamento com fungo *M anisopliae* no pasto para o controle de *R microplus* de acordo com a sazonalidade e dados de média de temperatura e umidade do PRP

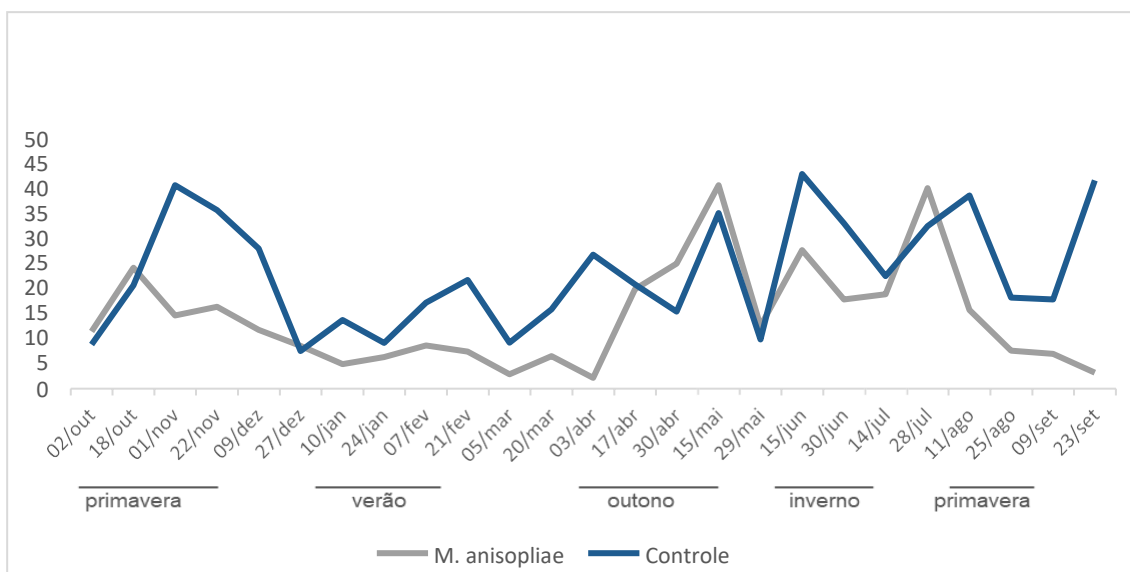
		Primavera	Verão	Outono	Inverno	Média anual
Média teleógena	Controle	16,71	10,27	15,63	19,90	15,82
	tratado	10,00	4,84	13,24	12,84	10,13
	Eficácia	<b>40,17</b>	<b>52,88</b>	<b>15,28</b>	<b>35,49</b>	<b>35,96</b>
	P<0,01	0,01	0,01	NS	0,01	0,01
Temperatura	Mínima	17,1	12,9	7,4	7,9	-
	Máxima	30,2	24,4	22,3	24,3	-
Umidade	Mínima	45,7	56,8	44,1	39,7	-
	Máxima	96,9	99,8	96,9	97,2	-

Dados de temperatura e umidade obtidos pelo Portal Agrometeorológico e Hidrológico do Estado de São Paulo (<http://www.ciiagro.org.br/>)

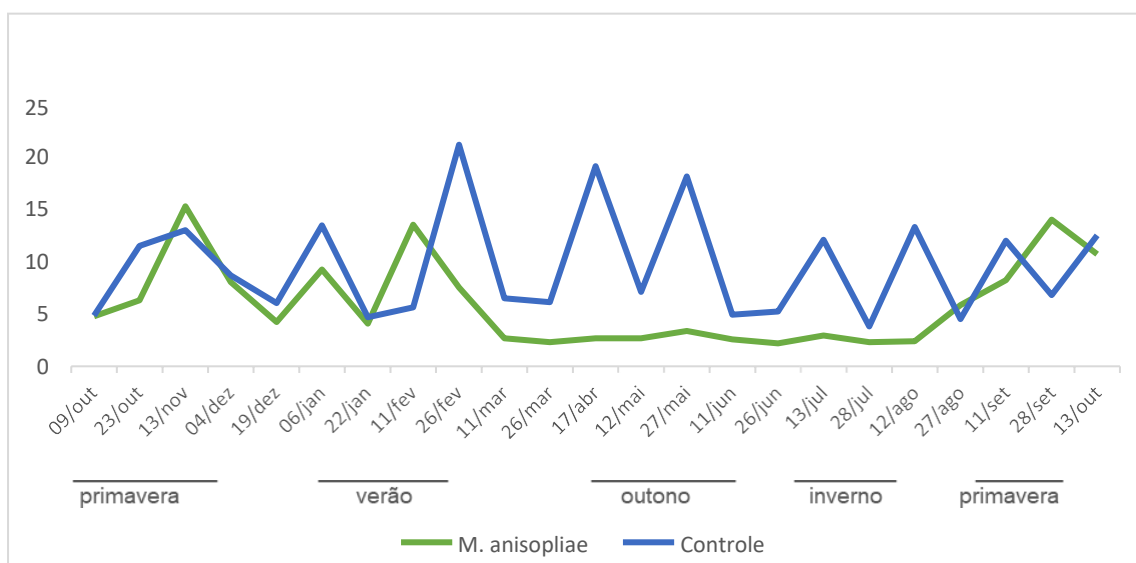
**Tabela 10.** Eficácia do tratamento com fungo *M anisopliae* no pasto para o controle do *R microplus* de acordo com a sazonalidade e dados de temperatura e umidade do IZ

		Primavera	Verão	Outono	Inverno	Média anual
Média teleógena	Controle	4,73	5,3	7,54	4,4	5,45
	tratado	4,40	4,8	1,69	1,6	2,83
	Eficácia	<b>6,92</b>	<b>9,43</b>	<b>77,65</b>	<b>63,78</b>	<b>48,07</b>
	P<0,01	NS	NS	0,01	0,01	0,01
Temperatura	Mínima	18,8	18,8	12,1	12,3	-
	Máxima	32,3	31,1	28,3	29,8	-
Umidade	Mínima	41,8	51,8	41,9	34,9	-
	Máxima	93,7	98,5	99,5	96,6	-

Dados de temperatura e umidade obtidos pelo Portal Agrometeorológico e Hidrológico do Estado de São Paulo (<http://www.ciiagro.org.br/>)



**Figura 12.** Contagem de teleóginas do *R. microplus* nos bovinos em pasto tratado com fungo *M. anisopliae* e no bovinos no pasto controle no PRP



**Figura 13.** Contagem de teleóginas do *R. microplus* nos bovinos em pasto tratado com fungo *M. anisopliae* e nos bovinos em pasto controle no IZ

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 RESISTÊNCIA

O uso de produtos químicos contra *R. microplus* por décadas tem sido considerado a forma mais eficaz e econômica do seu controle, todavia o uso contínuo e descontrolado dos carrapaticidas evoluiu para o surgimento de cepas resistentes a boa parte dos compostos disponíveis no mercado de acordo com Higa, *et al.* (2016).

De um modo geral, o desenvolvimento da resistência das pragas aos inseticidas depende da quantidade e da frequência da sua aplicação de acordo com Bloomquist (2009). Neste estudo os relatos por parte dos proprietários em relação aos produtos comerciais usados revelaram que a maioria dos produtores usava carrapaticidas compostos pela associação de organofosforados e piretróides. Destas propriedades, 89% apresentaram resistência ao diazinon e 11% à cipermetrina. A baixa frequência da resistência à cipermetrina provavelmente esteja relacionada ao fato da sua apresentação conjunta com organofosforados em um mesmo produto, sugerindo a maior efetividade do organofosforado comparado ao piretroide quando utilizados em associação.

Conforme evidenciado nos resultados deste trabalho a resistência do *R. microplus* à cipermetrina foi encontrada em 45% (18) das 40 propriedades analisadas e demonstraram ainda baixos valores resistência. A hipótese da alta resistência ao piretroide neste trabalho foi descartada pelos resultados inesperados de alta susceptibilidade das amostras analisadas.

A resistência aos carrapaticidas observada neste estudo contradiz dados relatados por Albuquerque, *et al.* (2010) e Higa, *et al.* (2016) que encontraram cepas de *R. microplus* no Estado de São Paulo resistentes aos produtos compostas apenas por piretroides mostrando baixa eficácia do piretroide em populações de campo. Lovis, *et al.* (2012) demonstraram níveis altos de resistência à cipermetrina no Estado São Paulo com fator de resistência variando de 8,0 a 309,3, valores que discordam dos nossos resultados. Klafke, *et al.* (2016) avaliaram amostras de *R. microplus* do Rio Grande do Sul através da dose diagnóstica e verificaram que a resistência à cipermetrina foi detectada em 98,08% das 104 amostras analisadas.

Os resultados sugerem que há uma razoável eficácia dos piretróides em cepas de *R. microplus* no Estado de São Paulo. Uma hipótese a ser considerada é a falha do controle de

qualidade dos produtos comerciais testados, somada ao armazenamento inadequado dos produtos nas propriedades rurais, pois o teste com a cipermetrina técnica neste trabalho causou alta mortalidade nas larvas.

O local de ação dos piretroides é o canal de sódio dos artrópodes, e cinco mutações associadas à resistência foram descritas em detalhes por Kumar e colaboradores (2020). Outras cinco mutações não sinônimas já foram encontradas, porém, sem uma correlação segura em relação ao fenótipo resistente a piretroides. Dessas mutações, a única relatada até o momento no Brasil foi a C190A (Domínio II S4-5), notificado por Andreotti *et al.* (2011), Domingues *et al.* (2012) e Lovis *et al.* (2012). Neste trabalho foram encontradas sete amostras de *R. microplus* (FR de 3,39 a 28,2) com a mutação T2134A no Domínio III S6 (F1550I – substituição de uma fenilalanina por uma isoleucina). É o primeiro relato dessa mutação no Brasil, tendo sido citadas em cepas altamente resistente aos piretróides de carrapatos do México e Estados Unidos (Chen, *et al.*, 2009; Miller, *et al.*, 2013, Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2014; Stone, *et al.*, 2014 e Kumar *et al.*, 2020). A ausência de uma correlação direta entre os fenótipos resistentes e os genótipos encontrados pode ser explicada pela presença de outras mutações para as quais não foram realizados ensaios de detecção. Os resultados deste trabalho abrem duas possibilidades: a implementação de novos ensaios e o questionamento sobre a influência de outros fatores.

Os fenótipos encontrados nos resultados do teste de pacote de larvas podem não apenas ser explicados pela mutação T2134A, mas podem ser consequências de outras 4 mutações já descritas como associadas à resistência a piretroides relatadas por Kumar *et al.* (2020). Deve-se levar em consideração também a capacidade metabólica do *R. microplus* relacionada às variações de fenótipos. Relatos demonstrando a ocorrência de genótipos do tipo sensível com fenótipos resistentes, sugerindo capacidades aprimoradas de desintoxicação metabólica por sítios catalíticos de certas enzimas, podem ser observados nos trabalhos de Baffi, *et al.* (2008); Cossio-Bayugar *et al.* (2009) e Miranda, *et al.* (2009).

Nas atividades de esterases em larvas vivas e mortas fica evidente que a amostra P19, justamente a que apresentou o maior FR (28.2) para cipermetrina, coincidiu com a maior atividade de esterases obtida, confirmando o relato de Lovis *et al.* (2012), na qual esta atividade em carrapatos muitas vezes está relacionado com o desenvolvimento de resistência a piretróides.

O teste do Pacote de Larvas (TPL) para a investigação da resistência em amostras de campo do *R. microplus*, especialmente para carrapaticidas organofosforados (usa-se o

princípio ativo diazinon), foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pela FAO (2004), com o intuito de facilitar o monitoramento global da resistência.

Vários trabalhos relatam a resistência aos organofosforados em espécies de *R. microplus* no Brasil, como descritos por Gomes *et al.* (2011); Mendes *et al.* (2011); Domingues *et al.* (2012); Raynal *et al.* (2013) e Reck *et al.* (2014). Os resultados obtidos para diazinon encontrados nos testes fenotípicos corroboram com os acima citados, pode-se assim afirmar que a situação da resistência ao organofosforado oscila entre as propriedades rurais em decorrência do histórico de uso dos acaricidas. Falhas de tratamento dos animais também contribuem para esta situação (Martins *et al.*, 2008; Lovis *et al.* 2012).

Nos perfis enzimáticos detectados para amostras de larvas testadas neste estudo com o diazinon que revelaram elevação nos níveis de  $\alpha$  -  $\beta$ -esterase nas larvas vivas apresentaram correlação positiva com fatores de resistência. Da mesma forma, a relação metabólica da enzima no processo de resistência foi demonstrada de acordo com Miller *et al.* (2008) e Chigure *et al.* (2018), que verificaram a correlação positiva entre as maiores atividades enzimáticas de esterases e a resistência ao diazinon em amostras de *R. microplus* do México.

Apresenta-se com este trabalho o relato da primeira mutação T2134A (F1550I) em populações de *R. microplus* no Brasil. Os dados de resistência à cipermetrina e ao diazinon são informações úteis para futuras tomadas de decisões, tendo em conta o uso frequente de produtos carrapaticidas à base de compostos organofosforados e das suas associações em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

## 6.2 FUNGOS

Para o melhor aproveitamento dos bioinsumos é preciso certificar-se de que a sua aplicação esteja sendo feita nas melhores condições possíveis tendo em vista a sazonalidade, a biologia do carrapato e qual fase do seu ciclo de vida é mais susceptível.

Os fatores abióticos, tais como temperatura e umidade, influenciam na biologia do *R. microplus* e conseqüentemente na sua dinâmica populacional, o que permite o desenvolvimento e a sobrevivência do carrapato durante o ano todo, em níveis mais que suficientes para causar perdas significativas à produtividade.

É consenso científico que na Região Sudeste ocorre quatro gerações anuais de carrapatos, sendo que a maior infestação se dá entre os meses entre setembro e março. Entretanto, o trabalho realizado por Cruz *et al.* (2020) nos anos de 2015 a 2017 relatam

cinco gerações ao longo do ano para a Região Sudeste, com picos de infestação que se concentraram na primavera, verão e outono. Os resultados obtidos nas contagens das teleóginas do grupo controle tanto em PRP quanto no IZ não estão em conformidade aos dados de Cruz *et al.* (2020).

No trabalho realizado por Garcia *et al.* (2011) em teste de campo os autores usaram a cepa (E9) de *M anisopliae* na concentração de 1,37 a 2,2 x10<sup>7</sup> conídeos os por m<sup>2</sup> em água com aplicações em intervalos de 21 dias. Segundo esses autores o fungo *M. anisopliae* não apresentou efeito patogênico sobre *R. microplus* de acordo com o teste de Tukey. Resultado diferente foi obtido neste estudo, em que a média de eficácia anual variou de 35 a 48%. Estas variações possivelmente podem ter sido influenciadas pelos diferentes métodos usados na aplicação dos fungos no pasto e pela dinâmica populacional do *R microplus* de cada local do experimento. Outro fator que justifica essa divergência seria pela maior concentração de fungo utilizada somada a adição de óleo mineral (5%) à calda.

Os conídeos formulados com óleo propiciaram a eficácia dos tratamentos neste trabalho, pois o óleo protege os conídios da radiação UV, além de aumentar a fixação destes à cutícula do artrópode, conferindo estabilidade para sua utilização a campo (KAAYA, *et al.*, 2012; VERÍSSIMO, *et al.*, 2015 e LOBO, *et al.*, 2016).

A pastagem baixa é outro fator importante que justifica a divergência entre porcentagem de eficácia no Pólo Regional de Pindamonhangaba (PRP) e Instituto de Zootecnia (IZ) em determinados meses do ano, justamente por favorecer incidência de radiação UV no campo onde foi aplicado o fungo.

Considerando a média anual de 36% a 48% de eficácia obtidas neste estudo pode-se observar que houve efeito na ação do fungo e que novas pesquisas poderão aprimorar o tratamento.

## 7. CONCLUSÃO

- Análises fenotípicas das quarentas propriedades analisadas, dezoito delas apresentam fatores de resistência a cipermetrina.
- Este é o primeiro registro da mutação do domínio III T2134A de *R. microplus* no Brasil.
- Análises fenotípicas com o princípio ativo diazinon mostraram que noventa por

cento das propriedades exibiram resistência.

- O isolado do *M. anisopliae* (IBCB 425) na concentração  $5 \times 10^{13}$  apresenta potencial eficácia para controle de carrapatos *R. microplus* a campo



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol.; 18: 265-267, 1925.

ALBUQUERQUE, G.R.; SPAGNOL, F.H.; PARANHOS, E.B. Avaliação *in vitro* da ação de acaricidas sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (ACARI: IXODIDAE) DE BOVINOS LEITEIROS NO MUNICÍPIO DE ITAMARAJU, BAHIA, BRASIL. Ciência Animal Brasileira, [s.l.], v. 11, n. 3, p.01-14, 2 out. Universidade Federal de Goiás. 2010. <http://dx.doi.org/10.5216/cab.v11i3.8149>.

ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J. L. M., SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 26, n. 4, p. 237-242, 2006.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.), Controle microbiano de insetos. FEALQ: Piracicaba. P.289–382. 1998

ANDREOTTI, R. Caracterização de inibidores de serinoproteases (BmTIS) presentes em larvas de carrapatos *Boophilus microplus* e o seu efeito no controle da infestação parasitária em bovinos. Tese de doutorado em Ciências. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2002.

ANDREOTTI, R.; GUERREIRO, F D.; SOARES, M A.; BARROS, J C.; MILLER, R J.; LEÓN, A P. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Ver bras parasitol vet.20 (2): 127-133. 2011. [Http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612011000200007](http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612011000200007). Pmid:21722487.

ARAÚJO, A.W.M.V. MECANISMOS DE INTERAÇÃO DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* COM O FUNGO ACAROPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*. 2017. Tese de doutorado em Ciências- Centro de biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO.

ABCBio. Mercado Brasileiro de Biodefensivos- Relatório Anual 2018. Disponível:

[file:///C:/Users/LPA4/Downloads/agroanalysis\\_abcbio%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/LPA4/Downloads/agroanalysis_abcbio%20(1).pdf)

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE.

ABIEC. Perfil da Pecuária no Brasil Relatório Anual 2016. Disponível em

<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>.

BAFFI, M. A.; SOUZA, G. R. L. de; SOUSA, C. S. de; CERON, C. R.; BONETTI, A. M. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Molecular And Biochemical Parasitology*, [S.L.], v. 160, n. 1, p. 70-73, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.03.009>.

BANDARA, K.M.U.J.; KARUNARATNE, S.H.P. Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Sri Lanka. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, [s.l.], v. 139, p.1-13, jun. Elsevier BV. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.002>.

BARBOZA, H. T. G.; NASCIMENTO, X. P. R.; FREITAS-SILVA, O.; SOARES, A. G.; DA COSTA, J. B. N. Compostos Organofosforados e seu Papel na Agricultura Rev. Virtual Quim.10 (1), 172-193. 2018

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P. S.; KESSLER, R. H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 613-617, 2005.

BASTOS, L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. *Cad. Saúde Coletiva*. Rio de Janeiro, v. 19, p. 51-60, 2011.

BEDI, J. S.; GILL, J. P. S.; AULAKH, R. S.; KAUR, P. Pesticide Residues in Bovine Milk in Punjab, India: Spatial Variation and Risk Assessment to Human Health. *Arch Environ Contam Toxicol.* v 69, p. 230–240, 2015.

BERNARDO, C. C., BARRETO, L. P., E SILVA, C. DE S. R., LUZ, C., ARRUDA, W., & FERNANDES, É. K. K. Conidia and blastospores of *Metarhizium spp.* and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 9(5), p. 1334–1342, 2018.

BERTI-FILHO, E.; MACEDO, L. P. M. Fundamentos de Controle Biológico de Insetos-Praga. Natal, RN: IFRN Editora, 2011.

BIDOCHKA, M.J.; SMALL, C.L.; SPIRONELLO, M. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environmental Microbiology*, v.7, p.1361-1368, 2005.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, v.101, p.512-530, 2009.

BLOOMQUIST, J.R. Insecticides: Chemistries and Characteristics. Em “University of Minnesota's electronic textbook of Integrated Pest Management”. 2009. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>

BRITO L.G; BARBIERI, F.S; FUNES-HUACCA, M.E; NÉRY, L.O; SILVA, R.R; SANTOS, A.P. L; GONÇALVES, A.E; RABELO, M.D; OLIVEIRA, M.C.S.

Identificação de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*74. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Rondônia Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF 2015.

BRITO L.G; BARBIERI, F.S; ROCHA, R.B; OLIVEIRA, M.C; RIBEIRO, E.S. Avaliação da eficácia dos acaricidas utilizados no controle do carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*, em rebanhos leiteiros criados no sudoeste da Amazônia brasileira. *Vet Med Int* 2011: 806093. 2011.

BURNS, C. J.; MCINTOSH, L. J.; MINK, P. J.; JUREK, A. M.; LI, A. A. Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B*, [S.L.], v. 16, n. 3-4, p. 127-283, abr. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2013.783383>.

CAMARGO, M. G.; NOGUEIRA, M. R.S.; MARCIANO, A. F.; PERINOTTO, W. M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J.B.; SCOTT, F. B.; ANGELO, I. C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V. R.E.P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 223, p. 38-42, jun. Elsevier BV. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.014>.

CAMPOS JUNIOR, D.A; OLIVEIRA, P.R. Avaliação in vitro da carga de acaricida mas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Cien Rural* 35: 1386-92. 2005.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. CEPEA - ESALQ/USP. BOLETIM DO LEITE. PIRACICABA-SP. Ano 26 nº 306 | DEZEMBRO – 2020. Disponível em: <https://cepea.esalq.usp.br/upload/revista/pdf/0163608001608229202.pdf>

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

CHEN, A.C.; HAIQI, H.E.H.; TEMEYER, K.B.; JONES, S.; GRENN, P.; BARKER, S.C. A survey of *Rhipicephalus microplus* populations for mutations associated with pyrethroid resistance. *J econ entomol*. 102:373–380. 2009.

CHEN, W.; LIU, Y.; JIÃO, B. Dissipation behavior of five organophosphorus pesticides in kumquat sample during honeyed kumquat candied fruit processing. *Food Control*.66, 87. 2016.

CHIGURE, G.M.; SHARM, A.K.; KUMAR, S.; FULAR, A.; SAGAR, S.V.; NAGAR, G.; UPADHAYA, D.; SARAVANA, B.C.; KUMAR, R.; GHOSH, S. Role of metabolic enzymes in conferring resistance to synthetic pyrethroids, organophosphates, and phenylpyrazole compounds in *Rhipicephalus microplus*. Int. J. Acarol. 44, 28-34. 2018.

COELHO, W.A. C; PEREIRA, J.S; FONSECA, Z.A.A. S; ANDRÉ, W.P. P; BESSA, E.M, *et al.* Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente à cipermetrina e amitraz em bovinos leiteiros no nordeste do Brasil. Act Vet Bras 7: 229-232. 2013.

COSSÍO-BAYUGAR, R.; MARTÍNEZ-IBAÑEZ, F.; AGUILAR-DÍAZ, H.; MIRANDA-MIRANDA, E. Pyrethroid Acaricide Resistance Is Proportional to P-450 Cytochrome Oxidase Expression in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. Biomed Research International, [S.L.], v. 2018, p. 1-6, 4 jul. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8292465>.

COSSÍO-BAYUGAR, R.; MIRANDA, M.E.; PORTILLA- ORTILLA, S. D.; OSIO-MIRANDA, J. Quantitative pcr detection of cholinesterase and carboxylesterase expression levels in acaricide resistant *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. J. entomol. 6:117–123.2009.

CRUZ, B. C; DE LIMA MENDES, A. F; MACIEL, W. G, DOS SANTOS; I. B, GOMES, L. V. C; FELIPPELLI, G; TEIXEIRA, W. F. P; FERREIRA, L. L; SOARES, V. E; LOPES, W. D. Z, DA COSTA, A. J; DE OLIVEIRA, G. P. Biological parameters for *Rhipicephalus microplus* in the field and laboratory and estimation of its annual number of generations in a tropical region. Parasitol Res. Aug;119(8):2421-2430.2020 doi: 10.1007/s00436-020-06758-5.

DOMINGUES, L. N.; BRASIL, B. S. A. F.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHO, A. P.; BARROS, A. T. M.; LEITE, R. C.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L M. F. Survey of pyrethroid and organophosphate resistance in Brazilian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: detection of c190a mutation in domain ii of the paratype sodium channel gene. Veterinary parasitology. v.189, n.2-4, p.327-332.2012.

DRUMMOND, R.O.; CRUST, S.E.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAN, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus decoloratus* laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. v.66, p.130–133, 1973.

DU, Y. *et al.* Molecular mechanism of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Acta Horticulturae, [s.l.], n. 1169, p.25-32, Jul. International Society for Horticultural Science (ISHS). 2017. <http://dx.doi.org/10.17660/actahortic.2017.1169.5>.

DU, Y.; NOMURA, Y.; SATAR, G.; HU, Z.; NAUEN, R.; HE, S. Y.; ZHOROV, B. S.; DONG, K. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, [S.L.], v. 110, n. 29, p. 11785-11790, 2 jul. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305118110>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA Uso de Agrotóxicos. BARRIGOSI, J.A.F. 2018. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>. Acesso em: 10. 02. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA. ANUÁRIO LEITE 2020. SÃO PAULO: editorial da Texto Comunicação Corporativa elaborado por concessão da Embrapa Gado de Leite. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215763/1/AnuarioLEITE2020.pdf>. Acesso em: 16 mars. 2020

FERNANDES, E.K.K.; ARRUDA, W, LUZ, C.S.R.; SILVA, C.; BARRETO, L.P.; BERNADO, C.C. Conidia and blastospores of *Metarhizium spp.* and *Beauveria bassiana spp* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás. 2018.

FERNANDES, É.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. Experimental and Applied Acarology, v.46, p.71–93, 2008.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus*. Journal of Basic Microbiology, v.44, p.270-274, 2004.

FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. Journal of Applied Microbiology, v.108, p.115–128, 2010.

FEYEREISEN, R; DERMAUW, W; VAN LEEUWEN, T. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. Pesticide Biochemistry and Physiology, [s.l.], v. 121, p.01-13, jun. Elsevier BV.2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.004>.

FLAUSINO, J.R.N; GOMES, C.C.G; GRISI, L. Avaliação da resistência do carrapato *Boophilus microplus* ao amitraz e a piretróides, no município de Seropédica, Rio de Janeiro. Rev Bras Parasitol Vet 4 Suppl: 45. 1995

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Guideline's resistance management and integrated parasite control in ruminants: module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. Rome: FAO, P.25–77.2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (FAO). Guidelines on Prevention and Management of Pesticide Resistance. September E-ISBN 978-92-5-107348-3.2012. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-bt561e.pdf>

FRANCISCHETTI, I. M., VALENZUELA, J. G., PHAM, V. M., GARFIELD, M. K., RIBEIRO, J. M. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. J. Exp. Biol. Aug; 205 (Pt 16): 2429-51.2002.

FREIRE, J.J. Arseno e cloro-resistência e emprego do Tiofosfato de Dietilparanitrofenila (parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888). Bol. Dir. Prod. Anim., Porto Alegre v. 9, n. 1, p.3-31, 1953.

FREIRE, J.J. Carrapato resistente as balneações carrapaticidas no Rio Grande do Sul. Bol.Prod. Anim., Porto Alegre 13 (25):62-80, 1956.

FRUMKIN, H; HESS, J; LUBER, G; MALILAY, J & MCGEEHIN, M. Climate change: the public health response. *American Journal of Public Health*, 98(3), 435-445.2008

FURLONG, J. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* to acaricides in Minas Gerais state, Brazil. In: IV SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, Puerto Vallarta, Jalisco, México, p. 41-46, 1999.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos que comemorar? *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, ano 27, n. 159, p.1-7,2007.

GALLO, D. *et al.* Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, v. 10, 920 p.2002.

GARCIA, F. M. Zoologia Agrícola: manejo ecológico de pragas / Flavio Roberto Mello Garcia. 2ed. Pag 27. Ampl. Porto Alegre: Ríagel. 2002.

GARCIA, M. V.; HIGA, L. O. S.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, A. Protocolos sobre bioensaios para diagnóstico da resistência de *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo. Brasília, DF: Embrapa, p. 179-194. 2016.

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. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 181, n. 2-4, p. 267-273, set. Elsevier BV.2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.031>.



GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABO, M.P.J.; PRETTE, N.; BECHARA G.H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. Braz J Microbiol, V. 36, p.368-372, 2005.

GODARA, R.; KATOCH, R.; RAFIQI, Shafiya I.; YADAV, A.; NAZIM, Kaifa; SHARMA, Rohini; SINGH, N. K.; KATOCH, M. Synthetic pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from north-western Himalayas, India. Tropical Animal Health And Production, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 1203-1208, 15 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-019-01810-8>.

GOMES, A.; KOLLER, W.W.; BARROS, A.T.M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Cienc. 41(8): 1447-1452.2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011005000105>.

GOMES, R.C, FEIJÓ, G.L. D, CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad>

GONÇALVES, L. FATOS HISTÓRICOS DO CONTROLE BIOLÓGICO. Floresta e Ambiente, Seropédica, RJ, ano 3, p. 96-101, 1996.

GONZALES, J.C.; SILVA, N.R. Fósforo- resistência do *B. microplus* no Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congresso Estadual da Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul,2, Porto Alegre, 1972. Anais...Porto Alegre,1972.

GONZALES, J.C.; MORAN, C.; SILVA, N.R. Ação de misturas de carrapaticidas sobre carrapatos resistentes. Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 1(1):11-7, 1973.

GONZÁLEZ-RODRIGUES, F.; LIÉBANAS, A. J. F.; FRENCH, G. A.; LÓPEZ, S. J. F. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solidphase 60 microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical Bioanalytical Chemistry. v. 382, p. 164-172, 2005.

GREGOR A, KOSTRZEWSKA E, GODOROWSKA W Determination of serum proteins in the presence of dextran by means of the biuret reaction. *Infusionsther Klin Ernahr.* 4(1):48-50. 1977. doi: 10.1159/000219790.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 23, p. 150-156, 2014.

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

GUARAGNA, G. P; CARVALHO, J. B. P; FIGUEIREDO, A. L; GAMBINI, L. B; BARBOSA, M. I. A. Efeito dos fatores genéticos e ambientes na nfestação natural de carrapatos (*B. microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. *Boletim de Indústria Animal*, São Paulo, v.45, n.1, p.19-32.1988.

GUEDES JÚNIOR, D. S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J. M.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the North e astern region of the State of Pará, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

GUERRERO, F. D., DAVEY, R. B., & MILLER, R. J. 2001. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 38 (1): 44–50. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.1.44>

GUERRERO, F.; PÉREZ DE LEÓN A. A.; RODRIGUEZ- VIVAS, R.; JONSSON, N.; MOLLER, R.; ANDREOTTI, R. Acaricide research and development, resistance and

resistance monitoring. In D.E. Sonenhine and R.M. Roe (eds.), *Biology of Ticks* 2nd Edition, Vol 2. Oxford University Press, New York. 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Names for Ixodidae (acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nominadúbia, nominanuda, lapsus, incorrect and suppressed names-with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa*, 3767, 1-256.2014.

GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.A.; PETNEY, T.N, ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G.; SHAO, R.; BARKER, S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528: 1–28. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina. 2010.

GÜNGÖRDÜ, A.; SIRECI, N.; KÜÇÜKBAY, H.; BIRHANLI, A.; OZMEN, M. Evaluation of in vitro and in vivo toxic effects of newly synthesized benzimidazole-based organophosphorus compounds. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [S.L.], v. 87, p. 23-32, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.007>.

HAJEK AE, ST. LEGER RJ. Interactions between fungal pathogens and insects' host. *Annu Rev Entomol*, v. 39, p. 293-322, 1994.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N. J.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 34, n. 7, p. 653-665, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>.

HIGA, L. de O. S.; PIÑA, F. T. B.; RODRIGUES, V. da S.; GARCIA, M. V.; SALAS, D. R.; MILLER, R. J.; LEON, A. P. de; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Evidence of acaricide resistance in different life stages of *Amblyomma mixtum* and *Rhipicephalus microplus* (Acari: ixodidae) collected from the same farm in the state of veracruz, mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, [S.L.], v. 174, p. 104837, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104837>.

HIGA, L.O. S. *et al.* Controle do carrapato-do-boi por meio de acaricidas. In: ANDREOTTI, Renato. Carrapatos na Cadeia Produtiva de Bovinos. Campo Grande, Ms:

Embrapa Gado de Corte, p. 136-145.2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1107103/controle-do-carrapato-do-boi-por-meio-de-acaricidas>>. Acesso em: 19 jan. 2020.

HIGA, L.O. S.; ANDREOTTI, R.; GARCIA M.V.; BARROS, J.C.; KOLLER, W.W. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. *Braz. J. Vet. Parasitol*, Jaboticabal, v.25, n. 2, p. 163-171, abr.-jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612016026>.

HUANG, B.F.; FENG, M.G. Comparative tolerances of various isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. *Mycopathologia*, v.168, p.145–152, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- AGÊNCIA IBGE- Pesquisa da Pecuária Municipal. Editoria: Estatísticas Econômicas. 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29163-ppm-2019-apos-dois-anos-de-queda-rebanho-bovino-cresce-0-4>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária. 2018. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp\\_2018\\_2tri.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_2tri.pdf). Acesso em: 16 mar. 2020.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. Banco de dados. São Paulo. Estimativa da Produção Animal no Estado de São Paulo para 2019 v. 14, n. 8, 2019. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/AIA/AIA-62-2019.pdf>. Acesso em: março de 2020.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A *Micro-Biuret method for estimating proteins*. *Anal. Biochem*, n. 9, p. 401-410, 1964. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90200-3).

JONES, G. A. Seleção de isolados de *Metarhizium spp.* para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese. 2017. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária,

Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

JYOTI, S.; Nirbhay K.; SINGH, H.; SINGH, N. K.; RATH, S. S. Multiple mutations in the acetylcholinesterase 3 genes associated with organophosphate resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Punjab, India. *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 216, p. 108-117, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.004>.

KAAYA, G.P.; HEDIMBI, M. O uso de fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, como biopesticidas para controle de carrapatos. *Int. J. Agric. Sci*; 2: 244–250.2012.

KEMP, D.H.; MCKENNA, R.V.; THULLNER, R.; WILLADSEN, P. Strategies for tick control in a world of acaricide resistance. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL; CONTROL DE LA RESISTENCIA EN GARRAPATAS Y MOSCAS DE LA IMPORTANCIA VETERINARIA Y ENFERMEDADES QUE TRANSMITEN, 4. 1999. Jalisco, México. Proceedings... Jalisco, México: IICA. p. 1–10.1999.

KIRKLAND, B, H.; WESTWOOD, G.S.; KEYHANI, N.O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *J Med Entomol*, V41, p. 705-711, 2004.

KLAFKE, G.M.; CASTRO-JANER, E.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A.; SCHUMAKER, T.T.S. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 184, n. 2-4, p. 212-220, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.018>.

KLAFKE, G.M; SABATINI, G.A; DE ALBUQUERQUE, T.A; MARTINS, J.R; KEMP, D.H, *et al.* Ensaios de imersão em Larval com ivermectina em populações de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Vet Parasitol* 142: 386-390. 2006.

KLAFKE, G.M; WEBSTER, A.; DALL AGNO, B.; PRADEI, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L.H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M.F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V. B.; SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil, Ticks and Tick-borne Diseases, v. 8, p.73-80. 2017

KOH-TAN, H. H. C.; STRACHAN, E.; COOPER, K.; BELL-SAKYI, L.; JONSSON, N. N. Identification of a novel  $\beta$ -adrenergic octopamine receptor-like gene ( $\beta$ AOR-like) and increased ATP-binding cassette B10 (ABCB10) expression in a *Rhipicephalus microplus* cell line derived from acaricide-resistant ticks. Parasites & Vectors, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 10-20, 2 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1708-x>.

KUMAR, R; SHARMA, A. K; GHOSH, S. Menace of acaricide resistance in cattle tick, *Rhipicephalus microplus* in India: status and possible mitigation strategies. Veterinary Parasitology, [S.L.], v. 278, p. 01-23, fev. Elsevier BV. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108993>.

LARANJA, R.J.; MARTINS, J.R.; CERESÉR, V.H. Identificação de uma estirpe de *Boophilus microplus* resistente a carrapaticidas piretróides no Estado do Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 6. 1989. Bagé. Anais... Bagé: CBPV, p. 83.1989.

LEAL, B.; THOMAS, D.; DEARTH, R. Population Dynamics of Off-Host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) larvae in response to habitat and seasonality in south texas. Veterinary Sciences, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 33, 23 mar. MDPI AG.2018. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci5020033>.

LEITE, R.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. 1988. 151f. Tese

(Doutorado em Parasitologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

LEITE, R.C. *et al.* *in vitro* susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to commercial acaricides. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.4, p.283-294, 1995.

LEORA SOFTWARE, A user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkely, CA, 1987.

LOBO, L.S.; RODRIGUES J.; LUZ, C. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulações contra vetores da dengue em condições de laboratório e de campo. *Biocontrol Sci. Technol.* 26: 386–401. 2016. doi: 10.1080 / 09583157.2015.1123220.

LOMER, C.J.; BATEMAN, R.P.; JOHNSON, D.L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, v.46, p.667–702, 2001.

LOPES, W.D; CRUZ, B.C; TEIXEIRA, W.F; FELIPPELLI, G; MARCIEL, W.G, et al. Eficácia do fipronil (1,0 mg / kg) contra cepas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes à ivermectina (0,63 mg / kg). *Prev Vet Med* 115: 88-93. 2014.

LOVIS, L.; GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; BODINE, D. M.; BETSCHART, B.; SAGER, H. Distribution patterns of three sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from North and South America, South Africa and Australia. *International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, [S.L.], v. 2, p. 216-224, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.08.001>.

LOVIS, L.; MENDES, M.C.; PERRET, J.L.; MARTINS, J.R.; BOUVIER, J.; BETSCHART, B.; SAGER, H. Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 191, n. 3-4, p. 323-331, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.011>.

LOVIS, L.; REGGI, J.; BERGGOETZ, M.; BETSCHART, B.; SAGER, H. Determination of Acaricide Resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) field populations of argentina, south africa, and australia with the larval tarsal test. *Journal Of Medical Entomology*, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 326-335, 1 mar. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1603/me12127>.

MACHADO, F.A; PIVOTO, F.L; FERREIRA, M.S; GREGORIO, F.V; VOGEL, F.S, et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na região centro-oeste do Rio Grande do Sul: carrapato multirresistente. *Rev Bras Parasitol Vet* 23: 337-342. 2014.

MANS, B.J; KLERK, D; PIENAAR, R; LATIF, A.A; OLIVEIRA, P.L. Nuttalliella namaqua: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks». *PLoS ONE*. 6 (8): e23675. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0023675.

MARTINS, J.R.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. & DOYLE, R.L. Acaricide resistance in Brazil and the use of mixtures as chemical alternative for tick control. VI Seminario Internacional de Parasitología Animal, Boca del Río Veracruz, Mexico, 4p.2008. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=596823&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22MARTINS,%20J.%20R.%22&qFacets=autoria:%22MARTINS,%20J.%20R.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>

MEDEIROS, M. A. O Controle Biológico de insetos-praga e sua Aplicação em Cultivo de Hortaliças. Circular Técnica da Embrapa Hortaliças, v. 8, p. 1–15, 1997.

MELLO, I. N. K., SILVEIRA, W. F. Resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal. *Acta Veterinaria Brasilica*. v.6, n.2, p. 94-104, 2012.

MENDES, E.C; MENDES, M.C; SATO, M.E. Diagnóstico da resistência ao amitraz em populações brasileiras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) com teste de imersão larval. *Exp Appl Acarol* 61: 357-369, 2013.

MENDES, M.C.; LIMA, C.K.P.; NOGUEIRA, A.H.C.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D.P.; GABRIEL, F.H.L.; UENO, T.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 São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 178, n. 3-4, p. 383-388, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.006>.

MENDES, M.C.; SILVA, M.X.; BRACCO J.E. Teste bioquímico para determinar a força de duas cepas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Rev Bras Parasitol Vet* 10(2): 61-65. 2001.

MENDES, M.C; PEREIRA, J.R; PRADO, A.P. Sensitivity of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) to pyrethroids and organophosphate in farms in the Vale do Paraíba Region, São Paulo, Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.2, p.81-85, 2007.

MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biol*, v.114, p.49-56, 2010.

MILLER, R. J.; ALMAZÁN, C.; ORTÍZ-ERTÍZ, M.; DAVEY, R B.; GEORGE, J E.; LEÓN, A P. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (boophilus) microplus* of Mexico. *Veterinary parasitology*. [s.l.], v. 191, n. 1-2, p. 97-101, Jan. Elsevier bv.2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.011>.

MILLER, R.J.; LI, A.Y.; TIJERINA, M.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected in Mexico. *J. Med. Entomol.* 45, 905-911.2008.

MIRANDA, E. M.; BAYUGAR, R. C; DELGADO, M. D. R. Q.; VALENCIA, F. O. S. N.; ORANTES, S. N. age-induced carboxylesterase expression in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. *J parasitol.* 4:70–78.2009.

MORAES, C.K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, v.46, n.3, p.205-210, 2003.

MRDAKOVIĆ, M.; ILIJIN, L.; VLAHOVIĆ, M.; MATIĆ, D.; GAVRILOVIĆ, A.; MRKONJA, A.; PERIĆ-MATARUGA, V. Acetylcholinesterase (AChE) and heat shock proteins (Hsp70) of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae in response to long-term fluoranthene exposure. *Chemosphere*, [S.L.], v. 159, p. 565-569, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.059>.

NAGAR, G.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; SARAVANAN, B. C.; KUMAR, R.; GUPTA, S.; KUMAR, S.; GHOSH, S. Molecular mechanism of synthetic pyrethroid and organophosphate resistance in field isolates of *Rhipicephalus microplus* tick collected from a northern state of India. *Experimental And Applied Acarology*, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 319-331, 30 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-018-0265-8>.

NUNES, B. C.; LEITE, A. E. L. M.; PEREIRA, M. C.; FRANQUE, M. P. Análise Histórica da Pesquisa de antiparasitários do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite, Brasil. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*. v. 7, n. 1, p. 130 – 134, 2017.

OLIVEIRA F.P.; SPADA J.C.P.; SILVA T.S.D.; FERREIRA L.C.; LUQUETTI B.C.; SOUTELLO, R.V.G. VII SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS DA UNESP. RESISTÊNCIA DO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* A DIFERENTES CARRAPATICIDAS UTILIZADOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. VII SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS DA UNESP – DRACENA, 2011 Dracena: Unesp, 04 f.2011.

OLIVEIRA, T.C.G.; PATARROYO, J.H.; MASSARD, C.L. Susceptibilidade de amostras de *Boophilus microplus* (Canestrini,1887), do Rio de Janeiro, Brasil à carrapaticidas Organofosforados. *Arq. Med. Vet. Zoot.* 38(2):205-14,1986.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO- FAO. Manejo da resistência e controle parasitário integrado em ruminantes: diretrizes. Módulo 1. Carraças: resistência acaricida: diagnóstico, manejo e prevenção [online]. p. 25-77. Disponível em:<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>. 2004.

PAL, S, ST LEGER RJ, WU LP. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 8969-8977, 2007.

PARIZI, L. F.; POHL, P. C.; MASUDA, A.; V. JUNIOR, I. da S. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, [S.L.], v. 18, n. 01, p. 1-7, 2009. (SciELO). <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01801001>.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. 2002. Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. Editora Manole, São Paulo, 609p.2002.

PATARROYO, J.H.; COSTA, J.O. Susceptibility of Brazilian samples of *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. *Trop. Anim. Helth. Prod. Edinburg* 12:6-10, 1980.

PEREIRA, JOSÉ ROBERTO EFICÁCIA IN VITRO DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE CARRAPATICIDAS EM TELEÓGINAS DE *Boophilus microplus* COLETADAS DE BOVINOS LEITEIROS DO VALE DO PARAÍBA, ESTADO DE SÃO PAULO *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 15, núm. 2, abril-junho, pp. 45-48 Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária Jaboticabal, Brasil.2006.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; SÁ, F.A.; MONTEIRO, C.M.O.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; QUINELATO, S.; MARCIANO, A.F.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Eficiência da formulação comercial de *Beauveria bassiana* Controle de carrapatos nas pastagens, no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.34, p.95-101, 2012.

POHL, P. C.; KLAFKE, G. M.; CARVALHO, D. D.; MARTINS, J. R.; DAFFRE, S.; VAZ, I. da S.; MASUDA, A. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *rhipicephalus (boophilus) microplus*. *International Journal For Parasitology*,

[S.L.], v. 41, n. 13-14, p. 1323-1333, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.08.004>.

QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A., CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; MORAES, A.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Virulence potencial of *Metarhizium anisopliae* isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Veterinary Parasitology*, v.194, p.556-565, 2012.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.87, p.77–83, 2004.

RAYNAL, J.T.; SILVA, A.A.B.; SOUSA, T.J.; BAHIENSE, T.C.; MEYER, R.; PORTELA, R.W. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia State North-Central region. *Rev Bras Parasitol Vet.* 22(1): 71-77. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013005000006>. PMID:23538503.

RECK J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNO, R.; SOUZA, U. A; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R.S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, [s.l.], v. 201, n. 1-2, p. 128-136. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>.

ROBBERTSE, L.; BARON, S.; MERWE, N. A. V D.; MADDER, M.; STOLTSZ, W. H.; MARITZ-OLIVIER, C. Genetic diversity, acaricide resistance status and evolutionary potential of a *Rhipicephalus microplus* population from a disease-controlled cattle farming area in South Africa. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 595-603, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.018>.

ROCHA, C.M.B.M. O carrapato dos bovinos. Lavras: UFLA, 1997. 27p. Boletim Técnico: Série Extensão da Universidade Federal De Lavras, ano VI, n.06, 1997.

RODRÍGUEZ-HIDALGO, R. *et al.* The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. Plos One, [s.l.], v. 12, n. 4, p.1-17, 7 abr. Public Library of Science (PLoS). 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0174652>.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; PÉREZ-COGOLLO, L. C.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; OJEDA-CHI, M. M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; MILLER, R. J.; LI, A. Y.; LEÓN, A. P. de; GUERRERO, F.; KLAFKE, G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 113-122, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612014044>.

ROSARIO-CRUZ, R. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. Frontiers in Bioscience, [s.l.], v., n. 14, p.01-13. Frontiers in Bioscience. 2009. <http://dx.doi.org/10.2741/3403>.

SANTANA, B.B; RAMOS, R.A; SANTANA, M. A; ALVES, L.C; DE CARVALHO, G.A. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) para piretróides e suas associações em Pernambuco, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet 22: 276-280. 2013.

SCHLEIER, J. J.; PETERSON, R. K. D. Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. Green Chemistry Series, [s.l.], p.01-20. Royal Society of Chemistry.2011. <http://dx.doi.org/10.1039/9781849732901-00094>.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Programa de Inovação e Transferência de Tecnologia em Controle Biológico. 2017. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/noticia/secretaria-de-agricultura-desenvolve-programa-de-inovacao-e-transferencia-de-tecnologia-em-controle-biologico>

SHAW, R.D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.). Bull. Entom. Res., v.56, p.389–405, 1966.

SILVA, L. C. C. DA; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NETTO, D. P. Milk contamination by organophosphorus and carbamate residues present in water and animal feedstuff. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, v. 35, n. 5, p. 2485-2494, set./out. 2014.

SILVA, T. P. P.; MOREIRA, J. C.; PERES, F. Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira. *Ciência & Saúde Coletiva*. v. 17(2), p. 311-325, 2012.

SILVA, W.W, ATHAYDE, A.C. R, ARAUJO, G.M. B, SANTOS, V.D DOS, SILVA NETO, A.B. Resistência de admissão de plantas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas não semi-aridoparaibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. *Agropec. Cien no Semi-árido* 1: 59-62. 2005.

SOUZA, A.P; SARTOR, A.M, BELLATO, V, RERUSSOLO, S. Eficácia de carrapaticidas em rebanhos de bovinos leiteiros de região da região centro sul do Paraná. *Rev de CienAgrovet* 2: 131-135. 2003.

STAFFORD, K. C.; WILLIAMS, S. C.; MOLAEI, G. Integrated Pest Management in Controlling Ticks and Tick-Associated Diseases. *Journal of Integrated Pest Management*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.01-07, 1 Jan. Oxford University Press (OUP). 2017. <http://dx.doi.org/10.1093/jipm/pmx018>.

STONE, B. F. and HAYDOCK, K. P., A Method for Measuring the Acaricide Susceptibility of the Cattle Tick *Boophilus microplus*, *Veterinary Parasitology*, vol. 71, , p. 77-97, 1962.

STONE, N. E.; OLAFSON, P.U.; DAVEY, R. B.; BUCKMEIER, G.; BODINE, D.; SIDAK-LOFTIS, L C.; GILES, J R.; DUHAIME, R.; MILLER, R J.; MOSQUEDA, J. Multiple mutations in the para-sodium channel gene are associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* from the United States and Mexico. *Parasites & vectors*. 2014 [s.l.], v. 7, n. 1, p. 01-15, 1 out. Springer science and business media llc. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0456-z>.

SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LI, Y.; HAN, X.; MA, C.; YIN, H.; LUO, J. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology International*, v.62, p.412–415, 2013.

TADDEI, R. (2016). Os desastres em uma perspectiva antropológica. *ComCiência*, 176, 1.

TEMEYER, K. B.; DAVEY, R. B.; CHEN, A. C. Identification of a Third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively Encoding an Acetylcholinesterase. *Journal of Medical Entomology*, [s.l.], v. 41, n. 3, p.01-15, 1 maio. Oxford University Press (OUP).2004. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.259>.

TEMEYER, K. B.; OLAFSON, P. U.; PRUETT, J. H. Sequence Polymorphism in Acetylcholinesterase Transcripts and Genotyping Survey of BmAChE1 in Laboratory and Mexican Strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Medical Entomology*, [s.l.], v. 49, n. 3, p.555-562, 1 maio. Oxford University Press (OUP).2012. <http://dx.doi.org/10.1603/me11215>.

VEGA F.E.; KAAYA H.F. Insect pathology. Academic Press, Cambridge. 2012.

VEIGA, L.P; SOUZA, A.P; BELLATO, V; SARTOR, A.A; NUNES, A, et al. Resistência à cipermetrina e ao amitraz em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Planalto Santa Catarina. *Rev Bras Parasitol Vet* 21: 133-136. 2012.

VERISSIMO, C.J. Resistencia e controle do carrapato do boi. Instituto de Zootecnia (IZ/APTA/SAA). 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Andreia\\_Buzatti/publication/319056573](https://www.researchgate.net/profile/Andreia_Buzatti/publication/319056573)

VILLAR, D.; KLAFKE, G. M.; RODRÍGUEZ-DURÁN, A.; BOSSIO, F.; MILLER, R.; LEÓN, A. A. Pérez de; CORTÉS-VECINO, J. A.; CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J. Resistance profile and molecular characterization of pyrethroid resistance in a *Rhipicephalus microplus* strain from Colombia. *Medical And Veterinary Entomology*, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 105-115, 19 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12418>.

VUDRIKO, P.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; OKWEE-ACAI, J.; TAYEBWA, D.S.; BYARUHANGA, J.; BBIRA, J.S.; FUJISAKI, K.; XUAN, X.; SUZUKI, H. C190A knockdown mutation in sodium channel domain II of pyrethroid-resistant *Rhipicephalus appendiculatus*. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1590-1593, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.007>.

WANG, C.; ST LEGER R.J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell* 6:808–816. 2007. <https://doi.org/10.1128/EC.00409-06>

WARE, G.W & WHITACRE, D.M. An introduction to insecticides [online]; Minnesota.2004. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>

WHARTON, R.H. & ROULSTON, W.J. Acaricide resistance in *Boophilus microplus* in Australia. In: HEMOPARASITE WORKSHOP, Cali, 1975. Proceeding... Cali, Colombia, Centro Internancional de Agricultura Tropical, 1975.

WHARTON, R.H.; ROULSTON, W.J.; UTECH, K.B.W.; KERR, J.D. Assessment of the efficiency of acaricides and their mode of application against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Austr. J. Agricultural Res.*, v.21, p.985-1006, 1970.