



**Avaliação de bactérias como agentes de controle biológico de  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**LUCAS MELLO MORÁN**

**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**

Avaliação de bactérias como agentes de controle biológico de *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus*

LUCAS MELLO MORÁN

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

2024

**LUCAS MELLO MORÁN**

**Avaliação de bactérias como agentes de controle biológico de *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus***

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 Dra. Márcia  
Cristina Mendes

Coorientador: Dr. Fernando Berton  
Baldo

SÃO PAULO

2024

Eu **Lucas Mello Morán**, 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 11/06/24

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

---

Morán, Lucas Mello.

Avaliação de bactérias como agentes de controle biológico de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. / Lucas Mello Morán. - São Paulo, 2024.

91 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024D.LM01

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

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Sanidade, gestão ambiental e qualidade de alimentos, produtos e processos na produção agropecuária sustentável.

Orientador: Márcia Cristina Mendes

Coorientador: Fernando Berton Baldo

Versão do título para o inglês: Evaluation of Bacteria as Biological Control agents of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.

1. Carrapato-do-boi 2. *Serratia marcescens* 3. *Bacillus* sp. I. Morán, Lucas Mello II. Mendes, Márcia Cristina III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/01

---

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a toda  
minha família e amigos que me  
auxiliaram em toda a trajetória*

## Agradecimentos

Aos meus guias espirituais, que me protegeram e protegem todos os dias, me mostraram caminhos e auxiliaram nas resoluções de situações as quais me deparei.

À **Dra. Márcia Cristina Mendes**, minha orientadora, por se mostrar uma pessoa paciente, de um coração imenso e por depositar sua confiança no meu trabalho, agradeço a tudo que me foi ensinado por ela e a todo o apoio prestado em momentos difíceis na minha vida.

Ao **Dr. Fernando Berton Baldo**, meu coorientador, por me receber em seu laboratório para ensinar novas técnicas, por se tornar um amigo e por ser prestativo para me ensinar em momentos que me senti perdido diante ao meu trabalho.

À **Ms. Fernanda Calvo Duarte**, pesquisadora do Laboratório de Parasitologia Animal, por todas as ideias para melhorar este trabalho, por todas as conversas e incentivos a minha vida pessoal, por me auxiliar em diferentes situações, referentes a minha vida pessoal, como a minha vida acadêmica.

Ao **Dr. Ricardo Harakava**, por ceder o espaço da Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada, por me ensinar metodologias de identificação das bactérias utilizadas no estudo, por sua gentileza e prestatividade todas as vezes em que recorri a sua ajuda.

Aos meus amigos e amigas que realizam pós-graduação, do Laboratório de Parasitologia Animal, **Anderson dos Anjos Santana, Caroline Santos Gambini Coelho, Deborah Mirella de Melo Romano, Elianai Ribeiro de Souza, Isabella Barboza de Almeida, Karina Araújo dos Santos, Thais Araujo Moura**, por estarem presentes em diferentes momentos da minha vida, me auxiliarem na rotina do laboratório, agregarem com opiniões sobre o trabalho e me mostrarem que é possível encontrar uma família em seu trabalho.

Aos estagiários **Laís, Guilherme e André**, por auxiliarem nas rotinas de laboratórios e pelo companheirismo.

Às demais pessoas que passaram pelo Laboratório de Parasitologia Animal, **Rachel, Ana, Ana, Nathalia, Stephany**, seus esforços em aprender e auxiliar a pesquisa foram essenciais para o laboratório e ao trabalho de diversas pessoas, inclusive ao meu.

Aos meus amigos e amigas que realizam ou realizaram a pós-graduação de outros laboratórios do Instituto Biológico, **Giovanna Lopes Martinelli, Isabela Guarnieri Furiato Garofalo Leao, Luara Lucena Cassiano, Tamara Machado da Silva**, por serem prestativas (os) em relação as minhas dúvidas, me auxiliarem em algumas matérias do mestrado e pelos finais de expediente conversando e compartilhando momentos.

Aos meus pais, **Heitor Gonzalez Morán e Sueli Pereira de Mello Morán**, por acreditarem na minha capacidade de desenvolver um trabalho científico, por me apoiarem em momentos em que me senti desamparado, pelas conversas, risadas, viagens e por estarem presentes todos os dias da minha vida.

As minhas avós **Sara Morán Garcia** e **Alzira Nerger de Mello** por todo o apoio e carinho que recebi e recebo no meu dia a dia.

Aos meus tios e tias, **Victor, Miriam, Weber, Sandra, Flávio, Célia** e **Neuton**, por elevarem minha auto estima em respeito à minha capacidade intelectual.

Ao meu primo **Matheus Henrique Mello Martins**, meu irmão, que cresceu junto comigo e sempre acreditou no meu potencial e que sempre esteve presente em qualquer momento que precisei.

Aos meus primos **Vinicius Mello Mencaroni**, **Beatriz Mello Mencaroni**, **Felipe Morán de França** e **Yago Garcia Morán** por entenderem que esse período de distância será para um melhor desenvolvimento da minha carreira e por estarem presentes sempre que precisei.

À minha psicóloga **Dra. Beatriz Helena Monteiro**, por todas as sessões em que pensei em desistir de tudo conseguir fazer com que eu tivesse um período de reflexão e observação sobre o que eu realmente gostaria de realizar na minha vida.

Aos meus amigos **Raphael, Guilherme G., Gabriel, Rafael, Ian, Felipe D., Felipe G., Leonardo O., Joaquim, Caio, Felipe S., Kaique, Rogério, Gustavo, Iago, Ciro, Alexis, Luis, Henrique, Isaac, Guilherme L., Arthur, Vitor, Italo, Yan, Leonardo I., Vinicius**, pelas jogatinas, conversas, festas, churrascos e momentos de lazer diversos, que renovaram minhas energias me deixando apto a continuar meus estudos.

À minha namorada **Rafaela Batah Koester**, por ter chego de maneira mansa na minha vida, mostrado que a vida pode ser mais bela em casal, se tornado uma grande amiga e me ensinado a amar de modo diferente.

A toda equipe do Instituto Biológico, aos porteiros, faxineiros e demais colaboradores, por serem a base de toda a estrutura que é nossa pesquisa, por serem sempre simpáticos e dividirem boas conversas.

## Sumário

Resumo.....	10
Abstract .....	12
1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo Geral .....	17
2.2. Objetivos Especificos .....	17
3. Revisão de Literatura.....	18
3.1. Histórico da alimentação humana e a bovinocultura no Brasil.....	18
3.2. Origem, classificação carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888).....	19
3.2.1. Ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i> .....	20
3.2.2. Morfologia.....	20
3.2.3. Prejuízos ao bovino .....	21
3.2.3.1. Tristeza parasitária bovina.....	21
3.2.3.2. Babesiose bovina .....	22
3.2.3.3. Anaplasmosse bovina.....	23
3.3. Controle Químico do Carrapato <i>R. microplus</i> .....	23
3.3.1. Resistência do Carrapato <i>R. microplus</i> .....	24
3.3.2. Alternativa a resistência do Carrapato <i>R. microplus</i> .....	25
3.4. Controle biológico .....	26
3.4.1. Parasitoides no controle biológico.....	26
3.4.1.1. Parasitoides no controle biológico de carrapatos .....	27
3.4.1.2. Insetos predadores no controle biológico .....	28
3.4.1.3. Insetos predadores no controle biológico de carrapatos.....	30
3.4.1.4. Controle biológico com fungos entomopatogênicos.....	31
3.4.1.5. Controle biológico de carrapatos com fungos entomopatogênicos.....	32
3.4.1.6. Bactérias no controle biológico .....	33
3.4.1.7. Bactérias no controle biológico de carrapatos. ....	35
3.4.1.8. Bactérias no controle biológico do carrapato <i>R. microplus</i> . ....	36
4. Material e Métodos.....	37
4.1. Coleta dos carrapatos <i>R. microplus</i> .....	37
4.2. Larvas de carrapatos <i>R. microplus</i> .....	37
4.3. Bactérias .....	38
4.4. Local do experimento .....	38
4.5. Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas .....	38
4.6. Teste de imersão com larvas (TIL).....	40
4.7. Análise estatística .....	40
4.8. Quantificação de microrganismos .....	41
4.8.1. Semeadura de células viáveis.....	41

4.9.	Purificação e análise das soluções de bactérias .....	42
4.10.	Identificação de bactérias .....	42
4.10.1	Espectrometria de Massa (MALDI-TOF) .....	42
4.11.	PCR e Sequenciamento .....	43
4.11.1	Análise do sequenciamento .....	44
5.	Resultados.....	44
5.1.	Teste de imersão de fêmeas ingurgitadas .....	44
5.2.	Teste de imersão de larvas .....	51
5.3.	Avaliação da Concentração .....	52
5.4.	Purificação e identificação de bactérias por Espectrometria de Massa .....	52
5.5.	Sequenciamento .....	52
6.	Discussão.....	54
7.	Conclusões.....	57
8.	Referências .....	58

*“Todo processo tem um início e  
termina com uma revelação”*

*Shingo Annen (Shing02)*

## Resumo

MORÁN, LUCAS. **Avaliação de bactérias como agentes de controle biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2024. 85f. 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, 2024.

O Brasil é líder global na produção e exportação de carne bovina, bem como na produção de leite, representando uma indústria crucial para atender à demanda alimentar crescente. No entanto, um grande obstáculo para a eficiência da bovinocultura brasileira é a infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Este ectoparasita não apenas deprecia a qualidade do couro e reduz a produção de leite, mas também é vetor de doenças graves como a anaplasmose e babesiose, popularmente conhecidas como Tristeza Parasitária Bovina (TPB), gerando perdas estimadas em 3,2 bilhões de dólares anuais. Além disso, o uso excessivo e inadequado de agentes químicos para controlar essa praga tem levado à resistência aos produtos químicos. Nesse contexto, o controle biológico pode ser uma alternativa viável aos mecanismos de resistência adquiridos pelos carrapatos. Embora o controle biológico usando bactérias patogênicas tenha sido eficaz em outros contextos, há uma lacuna significativa na pesquisa sobre seu uso contra o *R. microplus*. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito de oito bactérias no carrapato *R. microplus*. Cinco bioensaios de imersão de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* foram realizadas em triplicatas e em dias diferentes (1º e 15º dia) a fim de avaliar sua eficácia após armazenamento em geladeira. Das oito bactérias, três delas (427b, 428d e 388b) resultantes em maiores valores de Eficácia de Produto e Inibição de Postura em relação as demais foram testadas também com larvas do carrapato. Em seguida foi realizada a identificação das 3 bactérias através de espectrofotometria de massa (MALDI-TOF) e Sequenciamento de Sanger. Os resultados obtidos através da identificação por MALDI-TOF e Sequenciamento apresentou as seguintes espécies para as bactérias testadas: 388b – *Bacillus* sp., 427b – *Bacillus* sp., 428d – *Serratia marcescens*. As três bactérias identificadas apresentaram taxa de Eficácia de Produto (EP) com os valores de 58,31%, 86,10% e 88,78% respectivamente no primeiro dia e para o décimo quinto dia 49,78%, 73,94% e 65,52% para as espécies, *Bacillus* sp. (388b), *Bacillus* sp. (427b), *Serratia marcescens* (428d). Os testes de imersão de larvas do carrapato *R. microplus* realizados com as três suspensões bacterianas não se mostrou eficaz. As informações obtidas neste estudo destacaram o potencial das bactérias

*Bacillus* spp. como protagonistas no controle biológico do carrapato dos bovinos, e recomendam a investigação dos metabólitos da bactéria *Serratia marcescens* devido à sua ação patogênica sobre o carrapato *R. microplus*

Palavras-chave: Carrapato-do-boi. *Serratia marcescens*. *Bacillus* sp.

## Abstract

MORÁN, LUCAS. **Evaluation of Bacteria as Biological Control Agents of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2024. 85f. 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, 2024.

Brazil is a global leader in the production and export of beef, as well as in milk production, representing a crucial industry to meet the growing food demand. However, a significant obstacle to the efficiency of Brazilian cattle farming is the infestation by the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. This ectoparasite not only depreciates the quality of leather and reduces milk production but also serves as a vector for serious diseases such as anaplasmosis and babesiosis, popularly known as Bovine Parasitic Sadness (BPS), generating estimated losses of 3.2 billion dollars annually. Moreover, the excessive and improper use of chemical agents to control this pest has led to chemical resistance. In this context, biological control may be a viable alternative to the resistance mechanisms acquired by ticks. Although biological control using pathogenic bacteria has been effective in other contexts, there is a significant gap in research on its use against *R. microplus*. This study aimed to verify the effect of eight bacteria on the *R. microplus* tick. Five bioassays of immersion of engorged female ticks were carried out in triplicate and on different days (1st and 15th day) to evaluate their efficacy after storage in a refrigerator. Out of the eight bacteria, three of them (427b, 428d, and 388b) resulting in higher Product Efficacy and Egg-Laying Inhibition values compared to the others that were also tested with tick larvae. Subsequently, the identification of the 3 bacteria was performed through mass spectrometry (MALDI-TOF) and Sanger Sequencing. The results obtained through identification by MALDI-TOF and Sequencing presented the following species for the tested bacteria: 388b – *Bacillus* sp., 427b – *Bacillus* sp., 428d – *Serratia marcescens*. The three identified bacteria showed a higher rate of Product Efficacy (PE) with values of 58.31%, 86.10%, and 88.78% respectively on the first day, and for the fifteenth day 49.78%, 73.94%, and 65.52% for the species, *Bacillus* sp. (388b), *Bacillus* sp. (427b), *Serratia marcescens* (428d), respectively. The immersion tests of *R. microplus* tick larvae conducted with the three bacterial suspensions did not prove to be effective. The information obtained in this study highlighted the potential of *Bacillus* spp. bacteria as key players in the biological control of cattle ticks and recommends investigating the metabolites of the *Serratia marcescens* due to

their pathogenic action on the *R. microplus* tick.

Keywords: Cattle tick. *Serratia marcescens*. *Bacillus* sp.

## 1. Introdução

O Brasil ocupa colocações importantes no ranking mundial de produção de bovinos e na pecuária de corte, sendo o detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo. Em 2020 o Brasil ocupou o segundo lugar no ranking de produção e o primeiro lugar exportação de carne bovina (CNA, 2021), enquanto na pecuária leiteira obteve a terceira colocação no ranking mundial de produção de leite (MAPA, 2023). A estimativa de crescimento populacional para 2050 é de 9,8 bilhões de pessoas e o Brasil deverá aumentar sua produção alimentar em 40% (MASSRUHÁ, 2020). Um dos problemas enfrentados na bovinocultura é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* conhecido como “carrapato-do-boi” é um ectoparasita de preferência parasitária dos bovinos, pertence ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae (NCBI- ID: 6941). Esse carrapato é considerado um grande problema na bovinocultura brasileira, seu ciclo de vida é monóxeno, ou seja, requer somente um único hospedeiro para completa-lo. As raças bovinas *Bos taurus* e *Bos indicus* são as mais afetadas por esse ectoparasita (VERÍSSIMO, *et al.*, 1997).

O ciclo de vida de *R. microplus* se divide em duas etapas, a fase parasitaria e a fase de vida livre (fase não parasitária). A fase não parasitária se introduz no momento em que a teleógina (ou fêmea ingurgitada), se desprende do animal e cai na pastagem para realizar a postura de seus ovos, após realizada a postura, os ovos eclodem em larvas, elas sobem até as pontas da folha do capim realizando um movimento chamado geotropismo negativo (GARCIA *et al.*, 2019; GALLARDO, MORALES, 1999), essas larvas que estão no capim sobem aos animais se ingurgitando e passando por ecdise, se tornando ninfas e se diferenciando sexualmente em adultos, as fêmeas e machos se reproduzem e as fêmeas passam a se ingurgitar, se tornando teleóginas, também denominadas fêmeas ingurgitadas. Cada teleógina pode realizar a postura de aproximadamente 3.000 ovos podendo reverter até 50% do seu peso corporal em massa de ovos. A espécie *R. microplus* possui indivíduos maduros menores comparados a outros carrapatos, com tamanho entre 2 e 3 mm em sua forma não alimentada, e alcançando 13 mm após se alimentarem. Possuem também um dimorfismo sexual e diferenças estruturais entre ninfas e adultos (FURLONG, 1993; GUIMARÃES *et al.*, 2001; WALL *et al.*, 2001).

A espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é geradora de prejuízos aos bovinos do Brasil, estimados em aproximadamente 3,2 bilhões de dólares de perdas anuais aos

pecuaristas (GRISI *et al.*, 2014). Altas infestações geram lesões na pele do animal, que podem abrir caminho para que bactérias oportunistas possam gerar infecções no hospedeiro e as miíases também passam a se apresentar nos bovinos que sofrem altos níveis de parasitismo (RECK *et al.*, 2014). As lesões causadas pelo carrapato levam a depreciação do couro e consequentemente diminuição de seu valor. Também, há a redução na produção de leite pois a perda de sangue do animal é recorrente, gerando impactos negativos na cadeia produtiva de bovinos do Brasil.

Além dos danos ao couro e ao leite do animal, os carrapatos da espécie *R. microplus* são transmissores da anaplasmose e babesiose, essas duas doenças causam a tristeza parasitária bovina (TPB). A babesiose é causada pelos protozoários *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, enquanto a anaplasmose é provocada pelo microorganismo *Anaplasma marginale* (ALMEIDA *et al.*, 2006; GUEDES JÚNIOR *et al.*, 2008).

A utilização de agentes químicos para o controle do carrapato é uma metodologia abrangente no Brasil, porém seu uso exagerado e errôneo acelera a geração de populações de carrapatos resistentes, pois o controle químico exerce uma seleção artificial de genes de resistência (ROUSH, 1993). Os produtos químicos mais utilizados estão classificados nas seguintes categorias: organofosforados, piretroides, formamidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis e benzoilfeniluréia (FUKUTO, 1990; ABBAS *et al.*, 2014; JONSSON *et al.*, 2018; NARAHASHI *et al.*, 1971; CULLY *et al.*, 1994; YATES *et al.*, 2003; CAMPBELL, 2012; WOLSTENHOME, 2012; FURLONG; MARTINS, 2000). As alternativas oferecidas comercialmente a resistência dos carrapatos foram as adoções de formulações combinadas dos produtos químicos citados acima, sendo a formulação “piretróide + organofosforado” a mais utilizada.

Há outras maneiras que podem ser utilizadas para controlar o carrapato-do-boi, como por exemplo o controle biológico, que é estudado a anos. O controle biológico é descrito por Heimpel e Mills (2017) como conexões ecológicas que fundamentam o controle e abrange interações indiretas entre as populações dos organismos-alvo, os seus agentes de controle, os seres humanos e seus recursos. Existem diversas abordagens de controle biológico, em sua maioria para insetos, utilizando parasitoides, insetos predadores, ácaros predadores, fungos entomopatogênicos, vírus e bactérias (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

A respeito das bactérias utilizadas no controle biológico, as mais utilizadas são as bactérias do gênero *Clostridium*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Xenorhabdus*, em nível de

espécie, as espécies *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* (Bt) (MONNERAT *et al.*, 2004). O emprego de bactérias como agentes de controle biológico de insetos vem sendo realizado a anos, existindo registros da bactéria *Bacillus thuringiensis* datados a 1915 quando Berliner realizou sua identificação, desde então a BT é estudada e aplicada como um controlador de insetos pragas. Além da BT, o gênero *Serratia* é patogênica para coleópteros (HURST *et al.*, 2018).

Ao tratar-se da utilização de bactérias para o controle biológico de carrapatos, os estudos são escassos, pois existe a hipótese de que a bactéria necessita ser ingerida para gerar patogenicidade ao carrapato alvo (OSTFELD *et al.* 2006). A literatura apresenta testes realizados com *Bacillus thuringiensis* em sua maioria para diversos carrapatos (JENKINS, 1964; ZHIOUA *et al.*, 1999; SAMISH; REHACEK, 1999; CASIQUE-ARROYO *et al.*, 2007). Referente a espécie *R. microplus*, estudos utilizando a bactéria *Cedecea lapagei*, *Serratia marcescens* e *Bacillus thuringiensis* constataram a capacidade de infecção e patogenicidade das bactérias, porém todos os estudos foram realizados *in vitro* constatando a teoria da necessidade da ingestão da bactéria para exercer influencias sobre o carrapato *R. microplus* (BRUM, 1988; FERNÁNDEZ-RUVALCABA *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2016). Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar e identificar cepas bacterianas patogênicas aos carrapatos da espécie *R. microplus*.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia de bactérias no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar *in vitro* a ação patogênica de oito bactérias sobre fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*.

Avaliar a eficácia das bactérias após o armazenamento em geladeira comum a 4°C no período de 15 dias.

Selecionar bactérias que demonstraram maior capacidade de infecção, virulência e letalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Realizar testes de imersão de larvas com as bactérias selecionadas a partir do teste de imersão de fêmeas ingurgitadas.

Realizar a purificação e identificação molecular dos isolados de bactérias que compuseram as suspensões com maior efetividade sobre *R. microplus* nos testes *in vitro*.

### **3. Revisão de Literatura**

#### **3.1. Histórico da alimentação humana e a bovinocultura no Brasil**

A segurança alimentar é o centro de desenvolvimento da sociedade e da humanidade, de tal modo, sendo um fator diferencial para o início das civilizações humanas. A busca por alimentos gerou o nomadismo e o estabelecimento de seres humanos em locais específicos por conta do cultivo e da criação de animais. Tal necessidade alimentar possibilitou a formação de cidades, territórios e o desenvolvimento de sociedades. Atualmente, sociedades se pautam na segurança alimentar, aliadas a outros eixos como a pesquisa e a tecnologia (CÂMARA e SILVA, 2022).

Com o crescimento populacional projetado para 9,8 bilhões de pessoas em 2050, o Brasil enfrentará o desafio de aumentar sua produção alimentar em 40% em relação ao atual (MASSRUHÁ, 2020). Esse aumento precisa considerar qualidade, sustentabilidade, sociedade e legislação (CÂMARA e SILVA, 2022). Produtos de origem animal são essenciais para a humanidade, e, para otimizar a produção, é fundamental equilibrar pilares como nutrição, genética, saúde, manejo e bem-estar, todos interligados e com implicações técnicas e econômicas (CÂMARA e SILVA, 2022).

A pecuária de corte é um setor vital para a economia brasileira, contribuindo com 8,5% do PIB nacional em 2019, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2020). O Brasil não só tem o maior rebanho comercial bovino do mundo, com cerca de 213,68 milhões de cabeças, como também é um líder global em exportações de carne bovina, enviando cerca de 2,49 milhões de toneladas equivalentes-carcaça ao exterior em 2019. Esses dados ressaltam o papel estratégico da bovinocultura de corte no agronegócio brasileiro.

Em relação a produção de vacas leiteiras, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite de acordo com o MAPA (2023), com uma produção anual superior a 34 bilhões de litros, presente em 98% dos municípios. Predominam pequenas e médias propriedades, empregando aproximadamente 4 milhões de pessoas. Em 2021, Minas Gerais foi o maior produtor, seguido por Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Santa Catarina (IBGE, 2021).

### 3.2. Origem, classificação carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888)

Um dos maiores problemas enfrentados na bovinocultura é o popularmente conhecido “carrapato-do-boi” da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Sobre os carrapatos, esses tendem a ser um problema em diferentes regiões do planeta, atualmente mais de 996 espécies já foram descritas, de acordo com o NCBI (Taxonomy-ID: 6935, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6935&lvl=3&in=f&keep=1&srchmode=1&unlock>), sendo divididas em três diferentes famílias, Nuttalliellidae com duas espécies, Argasidae com 15 gêneros, mais de 192 espécies, chamados comumente de carrapatos “moles”, Ixodidae com 787 espécies e 11 gêneros, chamados de carrapatos “duros” (GUGLIELMONE *et al.*, 2010; NAVA *et al.*, 2017).

No Brasil existem 73 espécies das famílias: Ixodidae compreendido em 47 espécies, dividido em cinco gêneros: *Amblyomma* (com maior abundância), *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor* e a família Argasidae, com 26 espécies, dividido por quatro gêneros: *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis* e *Ornithodoros*, sendo a última com maior número de espécies (KRAWCZAK *et al.*, 2015; LABRUNA *et al.*, 2016; LUZ *et al.*, 2016; WOLF *et al.*, 2016; MICHEL *et al.*, 2017; MUÑOZ-LEAL *et al.*, 2017), os carrapatos de maior importância para a comunidade científica no Brasil são do gênero *Amblyomma* e *Rhipicephalus*, por representarem risco à saúde pública e pelos impactos econômicos, respectivamente.

Atualmente a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), pertence ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae de acordo com o NCBI (NCBI-ID: 6941). Anteriormente, era denominado *Boophilus microplus*, porém Murrell; Barker (2003) através de análises filogenéticas determinaram que seu gênero deveria ser *Rhipicephalus*. O motivo pelo qual o gênero *Boophilus* se manteve como subgênero foi para facilitar a busca de publicações com o nome antigo.

O carrapato *R. microplus*, tem provável origem na Índia e na Ilha de Java, na Ásia. Expedições exploradoras do século XVI que transportavam animais, possibilitaram a disseminação dos carrapatos a outras regiões, sendo introduzido em regiões tropicais e subtropicais dos mundos. No Brasil, provavelmente expedições com animais domésticos parasitados propiciaram a dispersão destes parasitas (NUÑES *et al.*, 1982; GONZALES, 1995).

### **3.2.1. Ciclo de vida do carrapato *R. microplus***

Este ectoparasita possui o ciclo de vida monoxeno, ou seja, requer um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida e possui preferência parasitária aos bovinos (VERÍSSIMO *et al.*, 1997). No Brasil, esta espécie apresenta-se distribuída em todas as regiões, entretanto o clima influencia diretamente nas suas gerações, sendo na região Sul com três, Sudeste e Centro-Oeste com quatro a cinco gerações (CAMPOS PEREIRA *et al.*, 2008; CRUZ, 2017).

O ciclo de vida de *R. microplus* se divide em duas etapas, a fase parasitária e a fase de vida livre (fase não parasitária). A fase não parasitária se introduz no momento em que a teleógina (ou fêmea ingurgitada) se desprende do animal e cai na pastagem, esse desprendimento costuma ocorrer pelo início da manhã ou final da tarde, períodos que favorecem a fêmea ingurgitada. Após o desprendimento ela busca um ambiente propício, com baixa incidência solar e livre de predadores (GARCIA *et al.*, 2019; HITCHCOCK, 1955) para então entrar em período de pré-postura. Esse período dura de 3 a 5 dias para que ocorra a maturação dos ovários, produção e maturação dos ovos, que pode variar com o clima (LEGG, 1930). Após a pré-postura inicia-se a ovipostura e, após a postura dos ovos a fêmea morre.

Cada teleógina pode realizar a postura de aproximadamente 3.000 ovos, conseguindo reverter até 50% do seu peso corporal em massa de ovos. Em condições ideais as larvas eclodem dos ovos entre 10 a 15 dias. As larvas apresentam três pares de pernas, denominado hexápodas, no início com coloração da quitina quase translúcida que se modifica à medida que entra em contato com o oxigênio do ambiente e se torna avermelhada. O período de quiescência é breve e as larvas sobem às pontas da folha do capim em um movimento denominado geotropismo negativo (GARCIA *et al.*, 2019; GALLARDO, MORALES, 1999).

### **3.2.2. Morfologia**

Carrapatos são os maiores ácaros e com características únicas, como hipostômio denteado e órgão de Haller, e apresentam um idiossoma inteiriço e ovalado (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Os carrapatos da família Ixodidae possuem três estruturas visíveis no capítulo: a base do capítulo, hipostômio, queliceras e palpos, e a face dorsal do idiossoma possui um escudo, denominado escudo dorsal (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Os escudos dos Ixodidae têm diferentes ornamentações e o noto apresenta sulcos, especialmente nas fêmeas

quando não ingurgitadas. Os sulcos dorsais e ventrais são classificados conforme a terminologia de Rohr (1909), e os ocelos (olhos simples) estão situados na lateral do escudo (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

As placas espiraculares nos Ixodidae estão localizadas atrás da coxa IV, conectadas ao sistema respiratório traqueal do carrapato. A face ventral possui o orifício genital, genóporo e orifício anal. As pernas do carrapato variam conforme a fase de vida, com 3 pares de pernas em larvas e 4 pares em ninfas e adultos, possuindo também órgãos sensoriais conhecidos como órgão de Haller (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

A espécie *R. microplus* possui indivíduos maduros menores comparados a outras espécies, medindo entre 2 e 3 mm em sua forma não alimentada, e alcançando 13 mm após se alimentarem. Esta espécie apresenta um marcado dimorfismo sexual e diferenças estruturais entre ninfas e adultos (FURLONG, 1993; GUIMARÃES *et al.*, 2001; WALL *et al.*, 2001).

### **3.2.3. Prejuízos ao bovino**

Altas infestações da espécie de *R. microplus* acabam gerando lesões na pele do animal, deixando assim os ferimentos livres para que bactérias oportunistas possam causar mais infecções no bovino. Além das infestações provenientes do próprio ectoparasita, as miíases também passam a se apresentar nos bovinos que sofrem altos níveis de parasitismo (RECK *et al.*, 2014). A depreciação do couro por conta das lesões do carrapato causa a diminuição de seu valor como consequência e a redução de produção de leite recorrentes à perda de sangue por incumbência do método de parasitismo em função a sua picada é evidenciada da mesma maneira, sendo gerador de impactos na cadeia produtiva bovina do Brasil. Em 2020 o Brasil ocupou o segundo lugar no ranking de produção e o primeiro lugar exportação de carne bovina de acordo com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA, 2021).

O carrapato *R. microplus* causa aproximadamente 3,2 bilhões de dólares de perdas anuais aos pecuaristas (GRISI *et al.*, 2014), sendo a maior parte dos gastos diretos e indiretos nos bovinos, para evitar os carrapatos e patógenos transmitidos por esses, o *Anaplasma bovis* e a *Babesia bovis* (GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

#### **3.2.3.1. Tristeza parasitária bovina**

A babesiose e a anaplasnose bovina são doenças causadas por parasitas

sanguíneos que são transmitidas pelo carrapato *R. microplus* (DALGLIESH; STEWART, 1983; GUEDES JÚNIOR *et al.*, 2008). Além disso, a anaplasmose também pode ser transmitida mecanicamente por insetos hematófagos (GUGLIELMONE, 1995) e objetos contaminados (SOUZA *et al.*, 2000b).

A tristeza parasitária bovina engloba um conjunto de doenças amplamente reconhecidas. A babesiose é uma delas, sendo causada pelos protozoários *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, enquanto a anaplasmose é provocada pelo microorganismo *Anaplasma marginale* (ALMEIDA *et al.*, 2006; GUEDES JÚNIOR *et al.*, 2008). Essas enfermidades são responsáveis por causar significativos prejuízos econômicos, tais como mortalidade no rebanho, redução na produção de leite e diminuição do ganho de peso, além dos gastos associados ao controle e profilaxia (GONÇALVES, 2000; GRISI *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2005).

Nos bovinos, a apresentação clínica da tristeza parasitária, causada por *Babesia* spp. e *A. marginale*, depende de vários fatores, incluindo a presença do vetor, a estabilidade enzoótica ou instabilidade da região, o clima, o manejo dos animais, as condições fisiológicas do hospedeiro e a raça (SOUZA *et al.*, 2000).

### **3.2.3.2. Babesiose bovina**

A babesiose bovina, causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, é disseminada mundialmente por carrapatos, sendo particularmente comum em regiões tropicais e subtropicais e causando grandes perdas econômicas (CANTÚ- MARTÍNEZ *et al.*, 2008; BÖSE *et al.*, 1995).

No Brasil, país enzoótico, a babesiose é menos prevalente em regiões como o sertão e sul devido a condições ambientais desfavoráveis para o carrapato *R. microplus*, mas ainda assim causa prejuízos econômicos nestas áreas (GONZALES, 1995; LIMA *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2001; KESSLER *et al.*, 1983).

O causador da doença é o protozoário *Babesia*, especificamente as espécies *B. bovis* e *B. bigemina* no Brasil (ARAÚJO *et al.*, 1997; BOCK, 2004; MARTINS, 2002; RIEK, 1893). Seus efeitos nos bovinos incluem anemia, icterícia, e hemoglobinúria, com *B. bigemina* mais propensa a parasitar as hemácias e *B. bovis* predominantemente nos órgãos centrais (MASSARD e FREIRE, 1985). Os sintomas da infecção aguda variam desde febre, anorexia, ataxia, até problemas no sistema nervoso que podem ser fatais, enquanto sinais de infecções

subagudas são mais difíceis de identificar (BOCK *et al.* 2004; SANTOS *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2009).

### **3.2.3.3. Anaplasmose bovina**

A anaplasmose bovina, de importância econômica global, afeta a produção bovina em climas tropicais, subtropicais e temperados, com uma distribuição similar à das babesioses (SOUZA *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2003; FELSHEIM *et al.*, 2010; KOCAN *et al.*, 2010). A doença é causada pelas rickettsias *A. marginale* e *A. centrale*, pertencentes à família Anaplasmataceae (SOUZA *et al.*, 2001; VIDOTTO e MARANA, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2003; KOCAN *et al.*, 2010).

A transmissão pode ocorrer de forma mecânica ou biológica, sendo o carrapato *R. microplus* o principal vetor no Brasil, e é possível a transmissão transplacentária (ARAÚJO *et al.*, 1998; CARELLI *et al.*, 2007; KESSLER, 2001; BROWMAN, 2006; RIBEIRO *et al.*, 1995; MARTINS, 2002; KOCAN *et al.*, 2010). Nos carrapatos, a transmissão pode ser transestadial ou transovariana (MARTINS, 2002; BROWMAN, 2006; KESSLER, 2001).

Durante a alimentação do carrapato, o patógeno é injetado no sangue do animal, se reproduzindo por divisão binária após penetrar nas hemácias (KOCAN *et al.*, 2010). A infecção causa anemia e icterícia, com animais sobreviventes desenvolvendo infecções persistentes (KOCAN *et al.*, 2010), apresentando sintomas como anemia hemolítica, dispneia, taquicardia, febre, fadiga, entre outros (VIDOTTO e MARANA, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2003).

### **3.3. Controle Químico do Carrapato *R. microplus***

Uma das principais abordagens para controlar o carrapato *R. microplus*, é o emprego de produtos químicos. Ao longo dos anos, diversos compostos foram empregados como acaricidas. No entanto, devido a várias considerações, especialmente em relação à segurança dos animais e do meio ambiente, essencialmente, cada classe de acaricida tem um mecanismo de ação distinto, possibilitando que o controle seja conduzido de forma lógica e intencional.

Cada aplicação de acaricida impõe uma pressão de seleção artificial na população de carrapatos. Os químicos mais amplamente utilizados são classificados nas seguintes categorias: organofosforados (os OF agem inibindo a acetilcolinesterase, desencadeando uma

sequência de eventos que, em geral, são tóxicos para o carrapato), piretroides (atua sobre o canal de sódio que está relacionado à voltagem), formamidinas (ação mecânica vinculada aos receptores do neurotransmissor octopamina), lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis (ambos atuam tanto no canal de cloro mediado pelo Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico [GABA] quanto no mediado pelo glutamato) e benzoilfeniluréia (FUKUTO, 1990; ABBAS *et al.*, 2014; JONSSON *et al.*, 2018; NARAHASHI *et al.*, 1971; CULLY *et al.*, 1994; YATES *et al.*, 2003; CAMPBELL, 2012; WOLSTENHOLME, 2012; FURLONG; MARTINS, 2000).

### **3.3.1. Resistência do Carrapato *R. microplus***

Com cada aplicação de acaricida, uma pressão de seleção artificial é imposta sobre a população de carrapatos. Porém, nem todos os ectoparasitas serão sensíveis ao tratamento. Isso acontece porque algumas mutações aleatórias em certos indivíduos permitem sua sobrevivência ao tratamento. É estimado que, por exemplo, um em cada milhão de indivíduos pode apresentar naturalmente essa condição mutante (ROUSH, 1993).

Dentro deste cenário, após o controle químico ser iniciado, aqueles com tais mutações - que são naturalmente resistentes (menos sensíveis aos acaricidas) - podem sobreviver e reproduzir. Essa reprodução promove a perpetuação do gene de resistência na população, um fenômeno conhecido como estabelecimento do alelo resistente (FURLONG; MARTINS, 2000).

Diversos fatores podem acelerar o estabelecimento do "gene resistente" na população de carrapatos, o que pode diretamente afetar a efetividade do acaricida. De acordo com o manual da FAO (2004) e uma revisão feita por Abbas *et al.* (2014), esses fatores incluem: a porcentagem de indivíduos naturalmente resistentes na população; o tipo de alelo resistente (dominante, co-dominante ou recessivo); condições operacionais como frequência e método de aplicação do tratamento; a concentração do acaricida; e fatores biológicos como a proporção de carrapatos tratados versus não tratados e a diversidade de hospedeiros.

Como a maioria dos acaricidas são neurotóxicos, carrapatos podem desenvolver estratégias para sobreviver ao tratamento químico. Essas estratégias podem ser uma consequência da evolução e incluem: resistência metabólica/detoxificação celular, insensibilidade no local de ação, e redução da penetração cuticular da droga (HEMINGWAY *et al.*, 1998; OAKESHOTT *et al.*, 2003; FFRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004).

A resistência metabólica ocorre quando o carrapato resistente é capaz de eliminar

o acaricida através de processos enzimáticos celulares, também conhecidos como detoxificação celular, geralmente devido à presença de três famílias distintas de enzimas: citocromo P450 monooxigenase; esterases; e glutatona S-transferases (RANSON *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2007). Em insetos, essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de diversos substratos endógenos, como hormônios, e na oxidação de xenobióticos, como acaricidas (HODGSON; ROSE, 1991; HEMINGWAY *et al.*, 1998).

Um carrapato resistente pode apresentar os seguintes mecanismos para melhorar essa resistência metabólica: 1) aumento da expressão genética dessas enzimas e/ou 2) aumento da especificidade enzimática, ambos facilitando o processo de detoxificação celular (LI *et al.*, 2007). A maioria dos acaricidas possui um local específico de ação (por exemplo, uma subunidade específica da proteína do canal de sódio, no caso de piretroides). No mecanismo de insensibilidade no local de ação, mutações genéticas podem levar a alterações na sequência de nucleotídeos, que por sua vez pode alterar o(s) aminoácido(s) que compõem a proteína, causando uma alteração em sua estrutura terciária. Essas mudanças podem interferir na ligação das moléculas de acaricida a seus locais de ação, resultando em resistência (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1990; PEREIRA, 2008).

### **3.3.2. Alternativa a resistência do Carrapato *R. microplus***

Existem várias estratégias que podem ser empregadas para prolongar a eficácia dos acaricidas. Levando em consideração as diversas classes de acaricidas e o conhecimento adquirido até o momento, uma abordagem da indústria química para o surgimento da resistência foi a criação de produtos combinados, que possuem mais de um princípio ativo.

Uma das combinações mais comuns é a formulação "piretroide + organofosforado". Em uma pesquisa conduzida por Higa *et al.* (2016), foram avaliadas cepas originárias de diferentes estados brasileiros através de bioensaios. De acordo com os resultados apresentados, em 42 de 49 testes (85,7%) com piretroides, a eficácia não excedeu 90%. Entre 29 testes com amidinas, 20 (68,9%) também foram considerados ineficazes. Foram realizados testes com associações de compostos, nos quais a eficácia foi menor que 90% em apenas 32,9% dos casos, sendo 20,9% para a associação com organofosforados. Isso reforça a ideia de que a combinação de formulações aumenta a eficácia acaricida, inclusive para a classe química dos organofosforados mencionada, uma vez que eles também possuem formulação combinada (por exemplo, diclorvós + clorpirifós).

### **3.4. Controle biológico**

Heimpel e Mills (2017) descrevem o controle biológico como as conexões ecológicas que fundamentam esse controle, abrangendo interações tanto diretas quanto indiretas entre as populações dos organismos-alvo, os agentes responsáveis pelo controle biológico, os seres humanos e seus recursos.

O controle biológico é definido por conexões ecológicas que incluem a competição humana com pragas por recursos naturais (por exemplo, plantações e produção agrícola), contando com a presença do agente de controle biológico como parceiro do homem e adversário natural da praga. Neste cenário, os recursos naturais - seja vegetal ou animal, natural ou gerenciado - são externalidades que favorecem diretamente o conforto humano. O controle biológico acontece de forma natural em qualquer ecossistema sem necessidade de intervenção humana. Entretanto, o homem pode se envolver, manipular e facilitar a atividade do agente de controle biológico (FONTES *et al.*, 2020).

Na antiguidade, agricultores empregavam de maneira intuitiva determinados organismos para combater pragas. Smith e Kennedy (2009) referem-se a registros feitos no Egito há aproximadamente 4 mil anos, que mostram gatos sendo utilizados para guardar grãos estocados contra roedores. Ao preservar o fornecimento de alimentos dos humanos contra pragas, esses animais poderiam ser considerados entre os primeiros agentes de controle biológico empregados globalmente.

#### **3.4.1. Parasitoides no controle biológico**

Os parasitoides são insetos que vivem como parasitas durante a fase larval, enquanto os adultos são de vida livre. As larvas associam-se aos hospedeiros, consomem seus tecidos e nutrientes, e matam o hospedeiro ao completar seu ciclo de vida (EGGLETON; GASTON, 1990; GODFRAY, 1994). A palavra "parasitismo" é usada para descrever o ataque e a exploração do hospedeiro pelas larvas parasitoides (LAUMANN e SAMPAIO, 2020).

O modo de vida dos parasitoides difere dos predadores e parasitas comuns, e existem termos específicos, como "cleptoparasita" para organismos que exploram recursos de outros, "hiperparasitoide" para parasitoides que parasitam outros parasitoides, e categorias como

"parasitoides heterônomo" e "adelfoparasitoides ou hiperparasitoides heterônomo" para casos particulares de desenvolvimento e comportamento. Estes termos refletem a complexidade e diversidade da vida parasitoide, que inclui várias famílias de insetos, como Diptera, Hymenoptera e Coleoptera (LAUMANN e SAMPAIO, 2020).

O Brasil está expandindo em relação ao controle biológico aumentativo, com ênfase em um programa para controlar a broca-da-cana, *D. saccharalis*, em uma área de cerca de 3 milhões de hectares (VAN LENTEREN; BUENO, 2003; PARRA, 2014). O parasitoide asiático *C. flavipes* foi introduzido, mas seu crescimento populacional não foi suficientemente impactante, levando ao uso de criação comercial e liberação anual inundativa para combater a praga (GARCIA *et al.*, 2009). Além disso, parasitoides do gênero *Trichogramma* têm sido bem-sucedidos no controle de várias pragas em tomateiro, algodoeiro e milho (PARRA e ZUCCHI, 2004), com *Trichogramma galloi* sendo usado em 2010 em 500 mil hectares de cana-de-açúcar para combater a broca-da-cana (PARRA, 2014).

#### **3.4.1.1. Parasitoides no controle biológico de carrapatos**

Os parasitas pertencentes à ordem Hymenoptera desempenham um papel significativo no controle biológico de carrapatos. A investigação pioneira de L. O. Howard, no início do século XX, marcou um momento crucial na compreensão da interação entre vespas calcidóides e carrapatos. Howard identificou, nos anos de 1907 e 1908, duas espécies inovadoras de vespas calcidóides, originárias do estado do Texas, que parasitavam carrapatos. Estas espécies foram classificadas dentro do gênero *Ixodiphagus*, parte da família Encyrtidae. O termo "Ixodiphagus" é um neologismo do grego, combinando "ixod", referindo-se a carrapatos, com "phage", que significa 'que se alimenta de'. Essa denominação sublinha a relação alimentar específica desses parasitas com seus hospedeiros. Subsequentemente, uma diversidade de outras espécies dentro do mesmo gênero, partilhando hábitos alimentares similares, foram identificadas e descritas por pesquisadores em diversas regiões globais (RAMOS *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017; SORMUNEN *et al.*, 2019; TÓTH *et al.*, 2023).

O uso de vespas parasitoides em controle biológico ocorreu a aproximadamente um século atrás, neste período pouco sabia-se sobre a vespa do gênero *Ixodiphagus*, de tal maneira, foram realizados estudos fragmentados sobre a interação, ciclo de vida e impactos ecossistêmicos da espécie, em 1908 ninfas de carrapato contendo *I. hookeri* foram enviadas do Texas para África do Sul, Portugal e Itália (WOOD, 1911), mas não obtiveram sucesso no

controle de carrapatos. Tentativas posteriores nos EUA, incluindo a liberação de vespas em Massachusetts e em estados do oeste como Montana, Colorado, Idaho e Oregon, entre 1927 e 1932, para combater carrapatos *Dermacentor andersoni*, também falharam em estabelecer uma população de vespas ou reduzir significativamente as populações de carrapatos (COOLEY, 1927; LAROUSSE *et al.*, 1928; COOLEY e KOHLS, 1934), entre 1937 e 1939, aproximadamente 90.000 *I. hookeri* foram liberados em Massachusetts sem reduzir significativamente as populações de carrapatos (SMITH e COLE, 1943). Tentativas similares na Rússia falharam devido ao clima frio (COOLEY e KOHLS, 1934). O interesse por *Ixodiphagus* spp. reacendeu com um estudo no Quênia, onde a liberação de 150.000 *I. hookeri* diminuiu a infestação de *Amblyomma variegatum*, mas não afetou *Rhipicephalus appendiculatus*, sugerindo uma eficácia específica para certas espécies de carrapatos (STAFFORD III *et al.*, 1996).

O único estudo de campo bem-sucedido com *Ixodiphagus*, realizado no Quênia, indicou que a redução da população de carrapatos foi resultado da interação com vespas parasitoides, baseado em parâmetros detalhados como população de carrapatos, método de liberação e condições climáticas (STAFFORD III *et al.*, 1996). No entanto, o estudo foi de pequena escala e sem acompanhamento para avaliar a viabilidade e sustentabilidade a longo prazo. Além disso, a população de *R. appendiculatus* não foi afetada, sugerindo uma preferência do *Ixodiphagus* por certas espécies de carrapatos (STAFFORD III *et al.*, 1996).

No Brasil um estudo realizado em 2022 por Soares *et al* no município de Salto em São Paulo, não identificou a presença de *I. hookeri* em carrapatos da espécie *A. Sculptum* e *A. spp.* utilizando a amplificação do gene 16S para o COX 1 (gene do *I. hookeri*). A ausência desse parasita no estudo não anula a possibilidade da presença dessa vespa nos estados e municípios brasileiros, sendo necessárias novas avaliações de carrapatos em regiões diferentes do Brasil. Além do Brasil, a necessidade de estudar os mecanismos de ação do *I. hookeri* se expande para outros países, assim como o Manejo Integrado de Pragas, relacionando vespas com outros organismos capazes de diminuir a população de carrapatos.

#### **3.4.1.2. Insetos predadores no controle biológico**

Predadores são fundamentais para equilibrar agroecossistemas ao controlar artrópodes-praga. No entanto, práticas agrícolas têm fragmentado habitats e contribuído para a extinção de espécies, prejudicando a biodiversidade (CARDINALE *et al.*, 2012; FERREIRA *et*

*al.*, 2012). A diversificação de espécies em cultivos e a preservação de vegetação nativa são estratégias para amenizar esses efeitos e fortalecer a presença de predadores. Estes, por sua vez, podem adaptar-se à variabilidade alimentar, sobrevivendo mesmo quando suas presas preferenciais são escassas (SUJII *et al.*, 2020).

No controle biológico em agroecossistemas, a utilização de predadores segue estratégias como importação, inoculação e conservação. A eficiência depende da compreensão da relação predador-presa, sendo afetada por fatores como densidade e características das presas e predadores (HOLLING, 1961). Esta dinâmica é crucial para regular a densidade de presas (HASSEL, 1978). A aplicação de predadores é limitada pela falta de conhecimento sobre sua dinâmica nos agroecossistemas. A estratégia conservativa, focada em manter inimigos naturais, demanda entendimento profundo da ecologia destes predadores (JONSSON *et al.*, 2008). Landis *et al.* (2000) enfatizam a importância da seleção de plantas, comportamento dos predadores e aceitação dos produtores para essa estratégia. Evidências, inclusive no Brasil, mostram que essas abordagens conservativas aumentam a biodiversidade em agroecossistemas.

Excetuando o controle biológico conservativo, que visa manter inimigos naturais através da manipulação do ambiente, outras abordagens para usar predadores no controle de pragas necessitam da produção em massa desses predadores em condições artificiais. Para uso inoculativo ou inundativo, onde a liberação é semelhante à de inseticidas químicos, os predadores devem possuir: a) capacidade de serem facilmente criados em ambientes controlados com dietas alternativas; b) rápido desenvolvimento e ciclo de vida breve; c) adaptabilidade a variadas condições ambientais; e d) alta voracidade para controle eficaz da praga. Características como longevidade, capacidade de dormência e resistência a inseticidas também são valiosas comercialmente e para manejo integrado da praga (SUJII *et al.*, 2020).

No controle biológico clássico, predadores exóticos são introduzidos em áreas diferentes para combater pragas igualmente exóticas. Prefere-se predadores mais especializados no alvo, minimizando riscos de impactos negativos em artrópodes locais, seja por competição ou predação. É vital avaliar se o predador importado pode ser predado no novo ambiente. Além disso, para sua efetiva introdução, características como facilidade de criação e rápido desenvolvimento, já mencionadas anteriormente, são essenciais na escolha de tais predadores (SUJII *et al.*, 2020).

Predadores, geralmente generalistas, precisam de diversas presas para concluir seu ciclo de vida. Essa característica é benéfica, pois na falta da praga-alvo, eles podem se

alimentar de outras fontes, como presas alternativas ou alimento de origem vegetal (STILING e CORNELISSEN, 2005).

Estudos sobre interações predador-presa mostram que, mesmo generalistas, predadores podem regular significativamente populações de fitófagos (SYMONDSON *et al.*, 2002). Eles persistem em sistemas mesmo com declínio de pragas e se alimentam de recursos alternativos (EHLER, 1990). Contudo, a introdução de predadores generalistas exige avaliações de risco cuidadosas, pois podem deslocar espécies benéficas ou se tornarem pragas. Por exemplo, a joaninha *H. axyridis*, originária da Ásia e introduzida em várias regiões, tornou-se problemática. Na América do Sul, após ser introduzida na Argentina nos anos 1990, se espalhou, gerando impactos ainda não plenamente compreendidos.

A recente literatura destaca a relevância dos predadores no controle biológico, embora a teoria tradicional se baseie em modelos de interação específica, comum entre parasitóides (SYMONDSON *et al.*, 2002). Apesar disso, os predadores são valiosos no controle biológico, podendo atuar sozinhos ou em conjunto. Ampliar o entendimento sobre a bioecologia dos predadores potencializa sua aplicação eficaz.

### **3.4.1.3. Insetos predadores no controle biológico de carrapatos**

A respeito de insetos predadores de carrapatos, são notadamente reconhecidas as formigas como predadores naturais de carrapatos, sendo capazes de reduzir infestações. As formigas da espécie *Pheidole megacephala* são um exemplo de ocorrência na América do Sul (SAMISH e REHACEK, 1999; SAMISH *et al.*, 2004),

No entanto, empregá-los como agentes de controle biológico pode trazer consequências adversas, pois exige um significativo aumento na população de formigas, o que poderia provocar alterações em espécies não visadas afetando o ecossistema que recebe os insetos predadores (SYMONDSON *et al.*, 2002), ou transformar a formiga em uma praga (BARBOSA, 1998; FISHER *et al.*, 1999). Gleim *et al.* (2013) exploraram o uso potencial de *Solenopsis invicta* contra espécies de carrapatos: *Amblyomma americanum* e *Amblyomma maculatum* em habitats queimados. Diyes *et al.*, 2017 avaliaram o uso de 5 espécies diferentes de formigas pertencentes a quatro gêneros: *Monomorium* spp., *Pheidole* sp., *Tapinoma melanocephalum* e *Crematogaster* sp., como agentes de controle biológico do carrapato *Otobius megnini*, observando que formigas se alimentaram de ovos, larvas (tanto ingurgitadas quanto não ingurgitadas) e adultos (tanto machos quanto fêmeas), mas não de ninfas. Contudo,

são escassos os estudos que investigaram o efeito preciso das formigas na dinâmica populacional de carrapatos. Portanto, a relevância das formigas no controle biológico permanece sendo um tema de debate.

#### **3.4.1.4. Controle biológico com fungos entomopatogênicos**

Os fungos entomopatogênicos são espécies que podem causar doenças ou morte em insetos e outros artrópodes, como ácaros, carrapatos e aranhas, pertencentes à classe Arachnida. Existem também fungos que estabelecem relações neutras ou até mesmo benéficas com artrópodes, e juntamente com os entomopatogênicos, são classificados como fungos de invertebrados. (VALADARES-INGLIS *et al.*, 2020).

No filo Ascomycota, *Hirsutella* é o único gênero notável da família Ophiocordycipitaceae que alcançou reconhecimento mundial (VALADARES-INGLIS *et al.*, 2020). A família Cordycipitaceae, por sua vez, inclui diversos gêneros comercialmente importantes, como *Isaria*, *Lecanicillium* e *Beauveria*. Conforme apresentado por Rehner e Buckley em 2011, a espécie conhecida como *Beauveria bassiana* é na verdade um conjunto de espécies, incluindo *B. amorpha*, *B. bassiana sensu stricto*, *B. pseudobassiana* e *B. caledonica*, todas já encontradas no Brasil. Algumas delas são ativas em micoinseticidas usados em diversos países.

A família Clavicipitaceae também é notável por conter gêneros de relevância comercial, como *Aschersonia* e *Metarhizium*. Segundo Bischoff *et al.* (2009), o complexo de espécies *Metarhizium anisopliae* é composto por diversos agrupamentos e espécies individuais, algumas das quais foram descritas no Brasil. Micoinseticidas feitos com fungos desse gênero têm um papel proeminente.

No filo Entomophthoromycota, *Conidiobolus thromboides*, anteriormente chamado de *Entomophthora virulenta*, é o único membro com status comercial. Conforme relatado por Faria e Wraight (2007), esse patógeno foi utilizado no controle de algumas pragas como pulgões e cochonilhas, sendo aplicado em produtos na África do Sul, Colômbia e na América Central.

Há uma crescente quantidade de programas de controle de pragas utilizando micopesticidas ao redor do mundo, como indicado em revisões e livros recentemente publicados por Lacey *et al.* (2015) e Lacey (2017).

No Brasil, o registro de produtos biológicos por empresas teve um crescimento de 83% em menos de dez anos. O país abriga um dos maiores programas de controle de pragas de artrópodes com fungos. Anualmente, são tratados mais de 750 mil hectares de cana-de-açúcar e 250 mil hectares de pastagens com *M. anisopliae s.l.* para combater cercopídeos, principalmente cigarrinhas do gênero *Mahanarva*, conforme mencionado por Li *et al.* (2010).

#### **3.4.1.5. Controle biológico de carrapatos com fungos entomopatogênicos**

O controle biológico de carrapatos com fungos entomopatogênicos atualmente é amplamente estudado, sendo o *Metarhizium anisopliae* o fungo mais utilizado para o controle de carrapatos assim como para insetos e outros aracnídeos. A respeito de seus estudos, a eficácia do *M. anisopliae* no manejo de carrapatos em bovinos foi validada através de experimentos tanto em laboratório quanto em ambiente natural, destacando-se como uma opção viável para o mercado devido às suas propriedades benéficas (SAMISH E REHACEK, 1999; FRAZZON *et al.*, 2000; LEEMON *et al.*, 2008a; LEEMON *et al.*, 2008b; OJEDA-CHI *et al.*, 2010; SCHRANK e VAINSTEIN, 2010). Adicionalmente, os progressos nos estudos sobre a biologia molecular da interação entre *M. anisopliae* e carrapatos (SANTI *et al.*, 2009; SCHRANK e VAINSTEIN, 2010; BEYS DA SILVA *et al.*, 2010a, BEYS DA SILVA *et al.*, 2010b), assim como evidências que integram esses avanços a resultados práticos obtidos por meio de ensaios biológicos e aplicações a campo (BAHIENSE *et al.*, 2007, 2008; ALONSO-DÍAZ *et al.*, 2007; PERINOTTO *et al.*, 2012), reforçam o potencial desse fungo como uma ferramenta eficaz no combate ao carrapato *R. microplus*, aumentando sua relevância para estratégias de controle biológico, estudos destacam sua capacidade de gerar mortalidade de indivíduos, reduzir sua oviposição e eclosão de larvas (BITTENCOURT *et al.*, 1992; BITTENCOURT *et al.*, 1994a; BITTENCOURT *et al.*, 1994b; CASTRO *et al.*, 1997; MONTEIRO *et al.*, 1998; BITTENCOURT *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1999; FRAZZON *et al.*, 2000; SAMISH *et al.*, 2001; ONOFRE *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004; BASSO *et al.*, 2005; POLAR *et al.*, 2005a; POLAR *et al.*, 2005b; POLAR *et al.*, 2005c; MELO *et al.*, 2006; BAHIENSE *et al.*, 2006; BAHIENSE *et al.*, 2007; ALONSO-DÍAZ *et al.*, 2007; LEEMON e JONSSON, 2008; OJEDA-CHI *et al.*, 2010; ÁNGEL-SAHAGÚN *et al.*, 2010; ROMO-MARTÍNEZ *et al.*, 2013; FERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2017; GÁLVEZ *et al.*, 2017; THOMAS *et al.*, 2017; YODER *et al.*, 2019).

Além do fungo *M. anisopliae*, outras espécies de fungos são empregadas no

controle biológico de carrapatos, sendo exemplo notável a espécie *Beauveria bassiana*, também amplamente estudada no controle biológico de artrópodes. Os experimentos realizados com esse fungo no carrapato *R. microplus* apresentaram resultados promissores como agentes de controle (BITTENCOURT *et al.*, 1996; BITTENCOURT *et al.*, 1997a; BITTENCOURT *et al.*, 1997b; PAIÃO *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2006; POSADAS e LECUONA, 2007; GÁLVEZ *et al.*, 2017).

O uso de fungos em carrapatos é a prática de controle com maior número de publicações científicas, tendo a avaliação de suas aplicações em todos os estágios de carrapatos e sua maior eficácia em fêmeas ingurgitadas e larvas, o uso de fungos tende a ser um método promissor ao controle biológico de carrapatos.

#### **3.4.1.6. Bactérias no controle biológico**

Bactérias entomopatogênicas são classificadas como esporulantes e não esporulantes. As esporulantes são subdivididas em aeróbicas, como *Bacillus*, e anaeróbicas, como *Clostridium*. *Bacillus* e seus gêneros correlatos, com a *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* (Bt), são frequentemente empregados em controle biológico. Já as bactérias não esporulantes englobam gêneros como *Serratia*, *Pseudomonas* e *Xenorhabdus* (MONNERAT *et al.*, 2004).

Bactérias do gênero *Bacillus* e similares, encontradas globalmente em diversos substratos, são Gram-positivas e aeróbicas, com capacidade de crescimento facultativo em anaerobiose. *Paenibacillus popilliae* e *Paenibacillus lentimorbus* atuam em larvas de coleópteros, enquanto *Paenibacillus larvae* e *Paenibacillus alvei* afetam abelhas. *Bacillus laterosporus* tem impacto sobre insetos de ordens Diptera, Coleoptera e Lepidoptera (ORLOVA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2004). A espécie *Lysinibacillus sphaericus* é tóxico para Diptera, afetando transmissores de malária e filarioses (MONNERAT *et al.*, 2004a) e a bactéria mais empregada no controle biológico global é a espécie *B. thuringiensis*, que atua em diversas ordens de insetos e nematoides (BRAVO *et al.*, 2005). O gênero *Serratia* (Enterobacteriaceae) tem estirpes que são patogênicas para coleópteros e se tornam letais para os insetos quando colonizam sua hemocele após lesões ou estresse.

*Serratia entomophila* e *S. proteamaculans* causam a doença âmbar em larvas de *Costelytra zealandica* e *Pyronota* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae). Esta patologia faz com que, após a ingestão de *S. entomophila*, as larvas parem de se alimentar rapidamente e tenham seu

intestino médio dissolvido, resultando na coloração âmbar distintiva (HURST *et al.*, 2018).

O mecanismo molecular da patogenicidade de *S. entomophila* e *S. proteamaculans* ainda é incerto. Contudo, os determinantes patogênicos parecem ser codificados em um plasmídeo de 155 kb. Análises genéticas indicam que o componente que impede a alimentação está em um conjunto de genes de um prófago defeituoso com três regiões de DNA específicas. Genes nesse conjunto parecem contribuir para o efeito anti-alimentação (HURST *et al.*, 2003). Os genes *sep*, ligados à doença âmbar de *S. entomophila*, têm semelhanças com toxinas de entomopatógenos como *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* (HURST *et al.*, 2003).

Em 1901, Ishiwata, no Japão, isolou a bactéria *Bacillus thuringiensis* como causadora da morte de larvas de bicho-da-seda, *Bombyx mori*. Dez anos depois, Berliner, na Alemanha, identificou a mesma bactéria em larvas mortas da traça-da-farinha, *Anagasta kuehniella*, e a nomeou *B. thuringiensis*, em referência à região alemã de Turíngia. Em 1915, Berliner observou inclusões paraesporais nas células da bactéria.

A bactéria *B. thuringiensis* produz delta endotoxinas, proteínas cristalinas, durante sua esporulação. Estas são específicas para insetos-alvo, seguras para humanos, vertebrados e plantas, e biodegradáveis, sem prejudicar o ambiente (BRAVO *et al.*, 2005). Na década de 1960, a estirpe HD-1 da espécie *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* mostrou toxicidade significativamente mais alta que outras estirpes comerciais (DULMAGE, 1970). Isso incentivou a busca por novas toxinas, levando ao isolamento de uma estirpe eficaz contra dípteros em 1977 (GOLDBERG e MARGALIT, 1977) e outra contra coleópteros em 1983 (KRIEG *et al.*, 1983). Atualmente, existem cerca de 50 mil estirpes conhecidas de *B. thuringiensis*, com laboratórios globalmente buscando mais, e algumas são tóxicas até mesmo para nematoides e outros organismos.

A espécie *B. thuringiensis* foi encontrado em várias partes do mundo em substratos como solo, água e plantas (BRAVO *et al.*, 1998). Embora possa haver até  $10^4$  unidades por grama de solo e as subespécies *kurstaki* e *galleriae* sejam predominantes, não se observou relação entre o tipo de solo e atividade inseticida ou presença de subespécies (DAMGAARD *et al.*, 1994).

O avanço em bioinseticidas depende da identificação de estirpes mais potentes ou adaptadas a certos ambientes. Estirpes nativas das espécies *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* mostraram ser mais tóxicas que as normalmente utilizadas, com toxinas de genes ainda

desconhecidos (IBARRA *et al.*, 2003; MONNERAT *et al.*, 2004, 2005, 2007; MARTINS *et al.*, 2007).

Muitos genes responsáveis por delta-endotoxinas foram clonados e estudados, possibilitando análises mais detalhadas usando anticorpos monoclonais e sondas de DNA específicas. A técnica de PCR amplifica sequências de DNA bacteriano, auxiliando na comparação entre estirpes similares. Existem diversos oligonucleotídeos que podem ser usados em PCR para identificar genes específicos na espécie *B. thuringiensis* (MARTINS *et al.*, 2008; AGUIAR *et al.*, 2012).

A bactéria *B. thuringiensis* produz diversos fatores de virulência, incluindo  $\delta$ -endotoxinas,  $\alpha$ -exotoxinas e outras, com algumas estirpes gerando toxinas Vip (do inglês “vegetative insecticidal proteins”) durante seu crescimento vegetativo e proteínas inseticidas Sip (do inglês “secreted insecticidal proteins”) (ESTRUCH *et al.*, 1996; DONOVAN *et al.*, 2006). Esta bactéria também fabrica moléculas que funcionam como bioestimulantes e biofertilizantes, assim como proteínas parasporinas que têm atividade citotóxica contra células cancerígenas humanas (RADDADI *et al.*, 2007, 2008; OHBA *et al.*, 2009).

#### **3.4.1.7. Bactérias no controle biológico de carrapatos.**

O primeiro relato de bactérias como infectantes de carrapatos data de 1964, em um trabalho realizado por Jenkins em que são apresentadas 4 diferentes bactérias capazes de gerar patogenicidade, são essas *Bacillus cereus* com atividade sobre a espécie *Amblyomma americanum*, *Pasteurella turalensis* agindo em três espécies de carrapatos, sendo esses, *A. americanum*, *Dermacentor silvarum* e *Haemaphysalis concinna*, por fim, duas bactérias encontradas no carrapato da espécie *D. andersoni*, *Serratia marcescens* e *Salmonella enteritides*.

A ideia de usar bactérias como método de controle ganhou atenção em 1997, graças ao estudo de Hassanain *et al.* (1997). Onde foram realizados testes de eficácia de três subespécies de *B. thuringiensis* (*kurstaki*, *israeliensis* e *thuringiensis*), aplicando misturas de esporos e cristais nos carrapatos *Argas persicus* e *Hyalomma dromedarii*.

Zhioua *et al.* (1999) estudaram o efeito de uma cepa de BT var. *kurstaki* em carrapatos *Ixodes scapularis* e alcançaram 96% de mortalidade usando uma dose de  $10^8$  esporos/ml. A toxicidade também foi observada com  $10^6$  esporos/ml, enquanto a toxicidade

aguda (LC<sub>50</sub>) foi determinada como 10<sup>7</sup> esporos/ml.

Em 1999, Samish e Rehacek relataram uma mortalidade de 100% em *Ornithodoros erraticus* ao alimentar os carrapatos com uma mistura de esporos de *B. thuringiensis* e sangue, através de uma membrana artificial.

Em um trabalho de revisão de literatura Ostfeld *et al.* (2006) aborda o controle de carrapatos e zoonoses associadas em que, são descritos potenciais inimigos naturais dos carrapatos, incluindo aves, vespas, nematoides, a bactéria *B. thuringiensis* e fungos. A revisão destaca que, apesar de várias bactérias serem patogênicas aos carrapatos, seu potencial como biocontroladores é subestudado. Uma observação é que a bactéria *B. thuringiensis*, apesar de eficaz contra insetos, só é patogênico a carrapatos quando ingerido, o que parece inviável já que carrapatos ingerem majoritariamente sangue. Contudo, estudos recentes identificam uma diversidade de microrganismos em carrapatos, incluindo bactérias potencialmente úteis no biocontrole.

Casique-Arroyo *et al.* (2007) indicaram que cepas de *B. thuringiensis* apresentam atividades quitinolíticas, sendo potenciais para o controle de ácaros. Dunstand-Guzmán *et al.* (2015) destacaram a eficácia dos extratos proteicos de *B. thuringiensis* contra o ácaro *Psoroptes cuniculi*, atribuindo seu efeito acaricida a danos histológicos.

#### **3.4.1.8. Bactérias no controle biológico do carrapato *R. microplus*.**

Em 1988 Brum publica sua tese de doutorado, onde foram realizados testes de imersão em teleóginas da espécie *R. microplus* com a bactéria *Cedecea lapagei* e após a realização dos testes foi possível notar infecção genital ou morte dos carrapatos. Mais tarde, Brum *et al.* (1991) aplicaram Enterobacteriaceae no carrapato *R. microplus*, constatando que o microrganismo induziu infecção genital e morte em fêmeas ingurgitadas.

Fernández-Ruvalcaba *et al.* (2010) identificaram que certas cepas de *B. thuringiensis* têm efeito tóxico sobre o carrapato *R. microplus* usando ensaios de imersão. Essas cepas podem controlar variações resistentes de *R. microplus*, agindo possivelmente através dos espiráculos ou poro genital, e não pela ingestão. Esta rota de ação foi igualmente observada por Zhioua *et al.* (1999).

Martinez *et al.* (2013) exploraram estratégias de Manejo Integrado de Pragas para

carrapatos, focando na substituição gradual de produtos químicos convencionais por alternativas naturais. Eles apontaram o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, *B. thuringiensis* e extratos de plantas com propriedades biocidas como opções eficazes para controlar o carrapato *R. microplus*.

Singh *et al.* (2016), em um evento internacional, trazem a discussão sobre métodos biológicos para controlar carrapatos causadores da Tristeza Parasitária Bovina fronteira Texas-México, incluindo o uso de formigas, ácaros, galinhas, vespas parasitoides, *B. thuringiensis*, nematoides entomopatogênicos e pássaros *Buphagidae*.

As metodologias de controle biológico são vastas, sendo o uso de fungos a metodologia mais estudada, a escolha deste estudo de realizar a avaliação de bactérias como agentes de controle biológico de carrapatos da espécie *R. microplus* ocorreu pela vasta diversidade de microrganismos presentes no banco de bactérias da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas e pela escassez de trabalhos utilizando tais microrganismos como agentes de controle biológico de carrapatos.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Coleta dos carrapatos *R. microplus***

As fêmeas ingurgitadas de carrapato da espécie *R. microplus* foram coletadas diretamente dos bovinos leiteiros na Fazenda do Polo Regional da APTA de Pindamonhangaba (22°56'16.2"S 45°25'53.3"W).

### **4.2. Larvas de carrapatos *R. microplus***

As fêmeas coletadas para os bioensaios foram alocadas em uma estufa B.O.D, onde foram mantidas sob condições controladas de temperatura e uma umidade relativa (26±1°C e UR>80%), proporcionando condições ideais para o término de seu período de postura.

Os ovos resultantes foram cuidadosamente transferidos para tubos de vidro (tamanho 25x250mm e capacidade de 55 ml) tampados com algodão e umedecidos, garantindo uma atmosfera adequada para os ovos. Em seguida, os frascos foram colocados novamente na estufa, mantendo as mesmas condições de temperatura e umidade relativa mencionadas

anteriormente. Após 15 dias, as larvas haviam eclodido estando em condições propícias para serem utilizadas nos experimentos.

#### **4.3. Bactérias**

As bactérias utilizadas para os experimentos são oriundas da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico/IB de Campinas, oito isolados de bactérias (367b, 572b, 428d, 427b, 379b, 388b, 418a, 35c) foram multiplicadas em meio de cultura Nutrient Broth (NB) por 72h a 28°C, agitação constante (150 rpm) e posteriormente testados.

Para preservar a integridade e viabilidade destas suspensões, elas foram armazenadas em meio de cultura líquido (Nutrient Broth) sob refrigeração, mantendo uma temperatura constante de 4°C durante quinze dias.

Os isolados de bactérias utilizados para o presente estudo foram selecionados de acordo com resultados de um screening contendo 96 bactérias, previamente realizado.

#### **4.4. Local do experimento**

Os ensaios, que combinaram técnicas *in vitro* e moleculares, foram conduzidos no Instituto Biológico de São Paulo. Três laboratórios foram mobilizados para garantir a abrangência e especialização necessárias, sendo estes: Laboratório de Parasitologia Animal para a realização dos testes *in vitro*; Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada para a realização das identificações moleculares das bactérias; e a Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico de Campinas para a obtenção de aprendizados sobre microbiologia, fornecimento de insumos e suspensões bacterianas. A colaboração interdisciplinar entre estes laboratórios permitiu uma abordagem detalhada das análises.

#### **4.5. Teste de imersão com fêmeas ingurgitadas**

Foram realizados cinco bioensaios de imersão de fêmeas ingurgitadas, para cada bioensaio foram avaliados dois períodos de armazenamento das suspensões bacterianas em geladeira, no dia de seu recebimento e após quinze dias de armazenamento em geladeira, sendo assim, dois experimentos em datas diferentes para cada bioensaio, todos os experimentos

contidos nos bioensaios foram realizados em triplicatas para assegurar a confiabilidade dos dados coletados. Os diferentes bioensaios receberam a nomenclatura de “Ensaio X” onde x representa as suas diferentes realizações.

Um conjunto de 10 fêmeas ingurgitadas foi pesado e, em seguida, transferidas para copos plásticos com capacidade de 10 ml, os quais estavam previamente nomeados. De acordo com do grupo experimental:

- Grupo Tratado: As fêmeas foram imersas em 2 ml de suspensão bacteriana.
- Grupo Controle: Foram imersas em 2 ml do meio NB.

Esta imersão foi realizada com o período de 5 minutos e após sua conclusão as fêmeas de cada copo foram realocadas em placas de Petri que continham recortes de papel filtro, dispostos de forma a cobrir toda a sua base interna. As placas foram fechadas e mantidas em uma estufa B.O.D. configurada para  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e uma umidade relativa superior a 80%.

Para avaliar de forma mais precisa a ação das bactérias sob as fêmeas ingurgitadas, a metodologia de cálculo da reprodução estimada foi adotada, conforme delineada por Drummond *et al.*, (1973). Esta abordagem exige a computação de variáveis, que incluem Razão entre os Pesos (RP), Inibição de Postura (IP), Eficiência Reprodutiva (ER), Eficácia do Produto (EP).

As fórmulas específicas para calcular cada uma destas métricas são apresentadas a seguir:

$$RP = \frac{\text{Peso de Ovos}}{\text{Peso de Fêmeas}}$$

$$IP = 100 - \frac{RP \text{ tratado}}{RP \text{ controle}} \times 100$$

$$ER = \frac{\text{Peso de massa de ovos} \times \% \text{ de eclosão} \times 20000}{ER \text{ do grupo controle}}$$

20.000 ovos equivalem a quantidade presente a 1 grama.

$$EP = \frac{ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado} \times 100}{ER \text{ do grupo controle}}$$

Os parâmetros IP, ER e EP foram calculados com base nos dados coletados de cada controle. Especificamente, os valores finais para IP e EP foram determinados a partir da média dos resultados, originados das três repetições realizadas. As bactérias que apresentaram EP>50% no primeiro dia foram selecionadas para as próximas etapas deste estudo.

#### **4.6. Teste de imersão com larvas (TIL)**

Para o teste de imersão de larvas as suspensões bacterianas que se demonstraram patogênicas nos bioensaios de fêmeas ingurgitadas foram utilizadas, com a realização de seis repetições para cada teste realizado.

Tubos plásticos com volume de 1,5 ml foram preparados com 1 ml de suspensão bacteriana (destinados ao grupo tratado) ou com o meio NB (para o grupo controle). Utilizando um pincel, cerca de 100 larvas de *R. microplus* foram introduzidas em cada tubo, fechados e suavemente agitados, garantindo que as larvas permanecessem imersas na solução por um período de 10 minutos.

Concluída a imersão, o conteúdo de cada tubo foi vertido sobre um papel filtro. Em seguida, as larvas foram separadas do papel e transferidas para tubos de ensaio previamente identificados. Os tubos de ensaio foram selados com algodão umedecido e posicionados em uma estufa B.O.D com temperatura e umidade relativa já descritas.

A monitorização da mortalidade das larvas foi estabelecida em três momentos: nos dias 5, 10 e 15 após a execução dos testes, as larvas que exibissem movimentação foram categorizadas como vivas.

A taxa de mortalidade das larvas, provenientes das soluções bacterianas dos ensaios semanais, foram analisados, a fim de observar qualquer variação que possa indicar o período de viabilidade dessas soluções armazenadas a uma temperatura de 4°C.

#### **4.7. Análise estatística**

A interpretação estatística dos dados coletados foi conduzida através do software GraphPad Prism 9, utilizando o teste ANOVA. Estabeleceu-se um critério de significância com o valor de  $p < 0,05$  para diferenciar os resultados dos experimentos, de acordo com sua significância.

Foi analisado a massa das fêmeas após postura através da subtração do peso de fêmeas pelo peso dos ovos de todos os experimentos somados, incluindo o controle. Os resultados obtidos através do cálculo passaram por Análise de Variância (ANOVA) por Nested, utilizando a correção de Dunnett, com nível de confiança de  $p < 0,05$ . Médias de EP obtidas através do cálculo proposto por Drummond do primeiro e décimo quinto dia de experimento foram realizadas e analisadas por ANOVA de dois fatores em comparações múltiplas entre testes, a correção adotada para essa análise foi Tukey, com valor de significância de  $p < 0,05$ .

#### **4.8. Quantificação de microrganismos**

As bactérias que apresentaram maior taxa de controle do carrapato *R. microplus* foram quantificadas para a determinação da concentração utilizada neste estudo, sendo necessárias novas suspensões bacterianas, essas foram obtidas a partir do inóculo inicial mantido em armazenamento por criogenia, 20  $\mu\text{L}$  foram retirados do inóculo inicial e semeados em meio NB e levadas a temperatura e agitação constante já descritas.

##### **4.8.1. Semeadura de células viáveis**

Após a retirada das suspensões bacterianas da agitação constante, as bactérias foram semeadas através da técnica de estriamento por esgotamento em uma placa contendo o meio de cultura Nutrient Agar (NA), hermeticamente seladas e mantidas em estufa B.O.D a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  com umidade relativa acima de 80%. Após 24 horas, uma Unidade Formadora de Colônia foi transferida para o meio NB e levada novamente em agitação constante com os mesmos parâmetros já descritos e passadas 72 horas, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão foram semeados em um novo meio de cultura líquido, passando por agitação constante e retiradas para sua concentração.

Utilizando 8 tubos de ensaios autoclavados para cada suspensão, 9 ml de água destilada autoclavada foram transferidos para cada tubo e 1 ml de amostra bacteriana para o primeiro tubo, essa primeira solução foi transferida para a subsequente e a diluição subsequente para o próximo tubo contendo 9 ml de água destilada estéril, o processo se repetiu até o último tubo de ensaio, após finalizadas as diluições 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo foi semeado em meio NA e espalhadas em toda a placa com o auxílio de um espalhador de células em T estéril. Passadas 24 horas, cada UFC foi contada na diluição  $10^{-6}$  para as bactérias 428d e 427b, enquanto a bactéria 388b, recebeu a mesma análise, porém com um período de crescimento de 48 horas.

O cálculo utilizado para a determinação de colônias viáveis por ml contém a seguinte fórmula:

$$UFC = \frac{\text{Número de colônias} \times \text{diluição utilizada}}{\text{mL plaqueados}}$$

A partir desta metodologia foi possível estabelecer a concentração das 3 suspensões bacterianas que apresentaram maior eficiência no controle do carrapato *R. microplus*.

#### **4.9. Purificação e análise das suspensões de bactérias**

O processo de purificação bacteriana foi conduzido por meio da diluição seriada já descrita, as suspensões que passaram por purificação e análise foram as que demonstraram maior capacidade no controle do carrapato *R. microplus*. A diluição adotada nesse estudo foi a mesma do processo de quantificação de UFC ( $10^{-6}$ ). Este passo foi fundamental para avaliar a singularidade ou diversidade bacteriana presente na suspensão, que foi utilizada nos testes de imersão para fêmeas e larvas.

Após a semeadura, as placas foram devidamente seladas e encaminhadas para uma estufa B.O.D ajustada a uma temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e uma umidade relativa acima de 80%. Caso fossem identificadas colônias bacterianas distintas no meio, elas seriam isoladas e novamente semeadas em placas contendo NA. Estas novas placas, após serem semeadas, foram também hermeticamente seladas e armazenadas na estufa B.O.D, mantendo as condições de temperatura e umidade previamente especificadas.

#### **4.10. Identificação de bactérias**

##### **4.10.1 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)**

Foram realizadas duas identificações das três melhores suspensões bacterianas, utilizando as Colônias provenientes das purificações dos meios líquidos em duplicatas.

A identificação das bactérias foi realizada a partir de um espectrofotômetro de massa com nomenclatura de MALDI-TOF. O processo de espectrofotometria de massa consiste em avaliar o tempo de voo dos íons de uma molécula de um organismo, utilizando um detector

que avalia os diferentes momentos que tais íons o alcançam, tal detector registra o tempo de voo desses íons e compara com um banco de dados já existente para identificar o organismo com seus semelhantes.

Utilizando um palito de dente autoclavado, foi raspado uma porção da colônia bacteriana e transferida em poços específicos de uma placa metálica. Após a secagem da amostra foi aplicado um reagente matriz sobre a amostra que foi levada ao equipamento para leitura.

#### **4.11. PCR e Sequenciamento**

Três UFCs de cada bactéria foram transferidas para microtubos de 1,5 mL estéreis contendo 200 µL de água ultrapura. Essas amostras foram homogeneizadas em vórtex, incubadas a 94°C por 10 minutos e depois submetidas à amplificação de um fragmento de 1.500 pares de bases do gene 16S rRNA.

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL do reagente TaqDNA Polymerase 2x Master Mix RED™ (Ampliqon®, Odense, Dinamarca), 9,5µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e 1 µL de amostra, em um termociclador Axygen® MaxyGene II (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Os iniciadores utilizados foram: fD1 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3' e rP1 5' – ACGGTTACCTTGTTACGACTT – 3' (WEISBURG *et al.*, 1991) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 10 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 1.5 min e extensão final a 72°C por 4 min. Um controle negativo (sem DNA molde), um controle positivo (contendo DNA molde) e um controle branco (contendo água ultrapura) foram executados simultaneamente.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8% junto com o marcador molecular Mid Range DNA Ladder (Cellco Biotech, São Carlos, SP, Brasil). As bandas foram analisadas com o fotodocumentador Axygen® Gel Documentation System (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e os fragmentos com tamanho esperado foram purificados utilizando o kit Agarose Gel Extraction (Cellco Biotech, São Carlos, SP, Brasil).

Os amplicons foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia utilizando o reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems) na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS).

#### 4.11.1 Análise do sequenciamento

As sequências obtidas foram analisadas e tratadas utilizando o software Geneious Prime® (ver. 2024.0.4), sendo realizado o CONTIG para avaliação de qual sentido as sequências são encontradas. Os polimorfismos encontrados passaram por remoção utilizando a ferramenta DNA Protein Sequence Cleaner encontrada no website <http://www.cellbiol.com/> e após removidos os polimorfismos cada sequência foi analisada utilizando a ferramenta blastn, encontrada no website <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. As espécies encontradas foram salvas, a espécie que se destacou na análise das seis sequencias de cada UFC integrou a realização do alinhamento por MUSCLE através do software Geneious Prime.

## 5. Resultados

### 5.1. Teste de imersão de fêmeas ingurgitadas

Os bioensaios realizados com fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* evidenciaram a capacidade das bactérias de alterar o ciclo de vida desse parasita, dentre as 8 bactérias, 6 apresentaram capacidade de inibição de postura de ovos e, conseqüentemente, eficácia de produto.

Em ordem crescente, a bactéria 572b resultou em valores médios de IP: 3,95% e EP: 7,12% no primeiro dia de armazenamento de seu caldo bacteriano em geladeira e IP: 9,79% e EP: 13,95% no décimo quinto dia de armazenamento, a bactéria 35c culminou em valores médios de IP: 4,03% e EP: 16,07% no primeiro dia e IP: 2,16% e EP: 7,81% no décimo quinto dia de armazenamento, a bactéria 379b acarretou nos valores médios de IP: 10,85% e EP: 20,41% no primeiro dia e IP: 23,55% e EP: 29,01% no décimo quinto dia, a bactéria 388b produziu resultados de IP: 44,65% e EP: 58,31% no primeiro dia e IP: 36,38% e EP: 49,78% no décimo quinto dia, a bactéria 427b ocasionou valores de IP: 79,61% e EP: 86,10% no primeiro dia e IP: 58,73% e EP: 73,94% no décimo quinto dia, por fim, a bactéria 428d proporcionou resultados de IP: 68,75% e EP: 88,78% no primeiro dia IP: 69,73% e EP: 65,52% no décimo quinto dia, os resultados acima citados estão ilustrados em forma de tabela (Tabela 1) e gráficos (Figura 1 e 2).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos resultados obtidos nos cinco bioensaios de imersão de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* (1° e 15° Dia).

Bactéria	1° Dia		15° Dia	
	IP (%)	EP (%)	IP (%)	EP (%)
367b	0 ± 22,24	0,15 ± 24,93	0 ± 13,96	0,00 ± 16,77
572b	3,95 ± 13,42	7,12 ± 14,97	9,79 ± 12,58	13,95 ± 27,57
428d	68,75 ± 28,24	88,78 ± 26,82	69,73 ± 41,87	65,52 ± 41,31
427b	79,61 ± 27,45	86,10 ± 26,29	58,73 ± 43,95	73,94 ± 44,10
379b	10,85 ± 18,17	20,41 ± 30,24	23,55 ± 19,23	29,01 ± 19,25
388b	44,65 ± 34,96	58,31 ± 36,20	36,38 ± 36,96	49,78 ± 36,50
418a	0,00 ± 9,02	0,00 ± 13,67	2,77 ± 17,83	1,51 ± 21,90
35c	4,03 ± 23,69	16,07 ± 28,92	2,16 ± 22,01	7,81 ± 24,94

IP (%): Percentual médio de inibição de postura; EP (%): Percentual médio de eficácia de produto

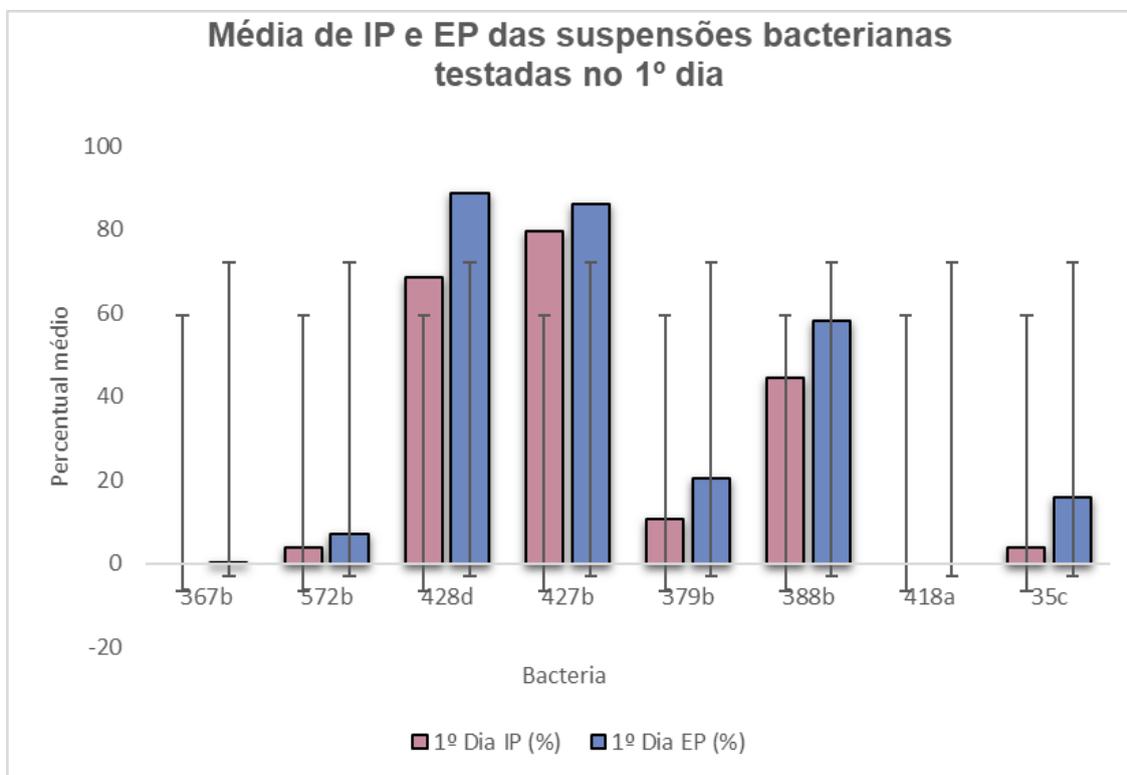


Figura 1 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos nos cinco bioensaios de imersão de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* (1° Dia).

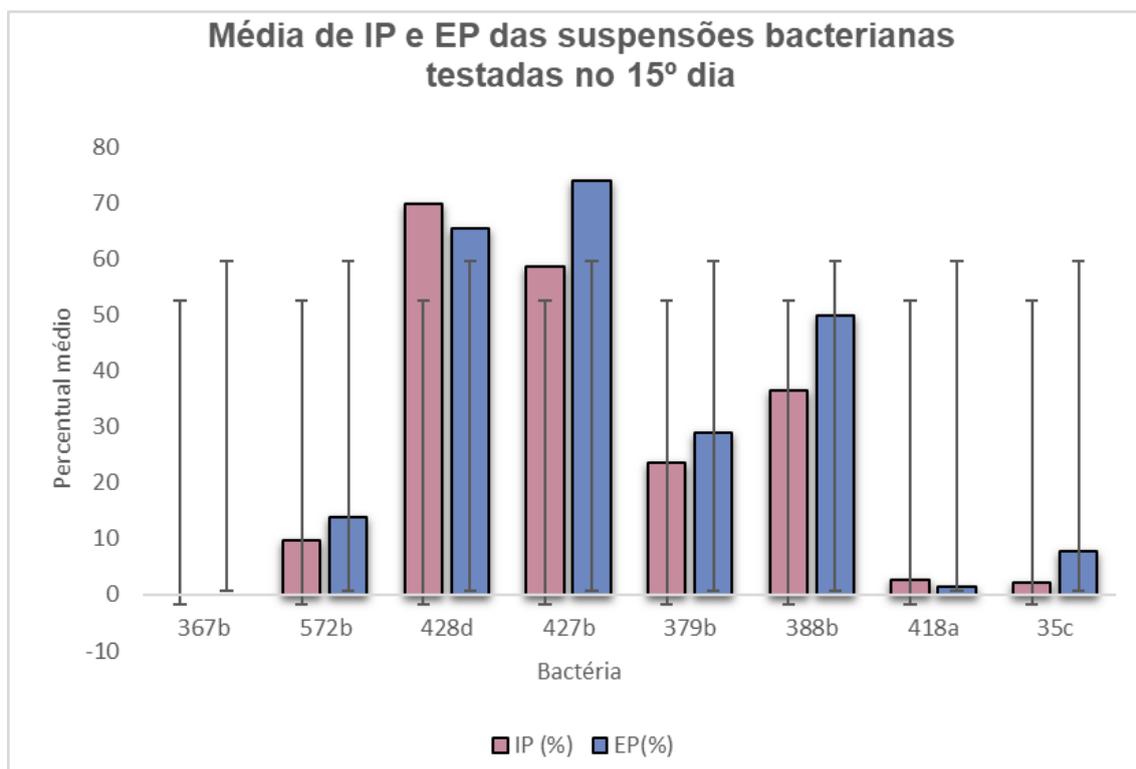


Figura 2 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos nos cinco bioensaios de imersão de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* (15º Dia).

A comparação dos resultados obtidos de EP no primeiro dia e no décimo quinto dia, utilizando ANOVA de dois fatores apresentaram o seguinte desfecho, a bactéria 367b apresentou diferença significativa quando comparadas as bactérias 428d, 427b ( $p < 0,001$ ) e 388b ( $p < 0,01$ ), a bactéria 572b trouxe diferença significativa quando equiparada as bactérias 428d, 427b ( $p < 0,01$ ) e 388b ( $p < 0,05$ ), a bactéria 428d exibiu diferença significativa quando contrapostas as bactérias 379b, 35c ( $p < 0,01$ ) e 418a ( $p < 0,001$ ), a bactéria 427b revelou diferença significativa assim que confrontada as bactérias 379b, 35c ( $p < 0,01$ ) e 418a ( $p < 0,001$ ) e pôr fim a bactéria 388b manifestou diferença significativa logo que comparadas as bactérias 418a ( $p < 0,01$ ) e 35c ( $p < 0,05$ ), como apresentado na Tabela 2.

A comparação entre dias de tratamento utilizando ANOVA de dois fatores retornou as seguintes observações, o primeiro dia de tratamento e armazenamento da bactéria 367b quando relacionada as demais bactérias no 15º dia de tratamento e armazenamento retornou diferenças significativas para as suspensões 428d, 427b e 388b, a bactéria 572b no seu primeiro dia de tratamento apresenta diferença significativa com as bactérias 428d e 427b no décimo quinto dia de tratamento, a bactéria 428d no seu primeiro dia de tratamento exibe diferenças estatisticamente significativas em relação as bactérias 367b, 572b, 379b, 418a, 35c testadas no 15º dia, as mesmas diferenças significativas constatadas para a bactéria 428d no

primeiro dia são observadas para a bactéria 427b no primeiro dia de tratamento e armazenamento, o tratamento com a bactéria 379b no primeiro dia exibe diferenças significativas com as bactérias 428d e 427b, a bactéria 388b apresenta diferença significativa no primeiro dia de tratamento quando comparada as bactérias 367b, 572b, 418a, 35c testadas no 15º dia, por fim, a bactéria 35c apresenta diferença significativa quando comparado o primeiro dia de imersão de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* com o 15º dia de imersão com as bactérias 428d e 427b (Tabela 3).

Esses resultados foram essenciais para delimitação de quais bactérias foram selecionadas para a realização dos demais experimentos, utilizando o critério de EP  $\geq 50\%$  as bactérias 388b, 427b e 428d passaram para as próximas etapas do presente estudo.

Tabela 2. Dados de análise de variância de dois fatores (ANOVA) das médias de EP do bioensaio e suas diferenças significativas.

Aplicação	
Comparações de aplicações	Significância (p)
367b x 428d	***
367b x 427b	***
367b x 388b	**
572b x 428d	**
572b x 427b	**
572b x 388b	*
428d x 379b	**
428d x 418a	***
428d x 35c	**
427b x 379b	**
427b x 418a	***
427b x 35c	**
388b x 418a	**
388b x 35c	*

As comparações entre cada par de grupos estão listadas na primeira coluna, seguidas pelos resultados estatísticos de EP obtido, para a significância: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Tabela 3 - Dados de análise de variância de dois fatores das médias de EP dos experimentos realizados no primeiro e no décimo quinto dia, comparando as aplicações em dias diferentes

		15° Dia de imersão (b)								
		Bactéria	367b	572b	428d	427b	379b	388b	418a	35c
1° Dia de imersão (a)	367b			ns	**	**	ns	*	ns	ns
	572b	ns			**	**	ns	ns	ns	ns
	428d	***	**			ns	**	ns	***	**
	427b	***	**	ns			**	ns	***	**
	379b	ns	ns	*	*			ns	ns	ns
	388b	**	*	ns	ns	ns			**	*
	418a	ns	ns	**	**	ns	*			ns
	35c	ns	ns	**	**	ns	ns	ns	ns	

As células com cores cinzas representam comparações da mesma bactéria, que não trouxeram resultado, para a significância: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Além dos resultados referentes a eficácia de produto e inibição de postura, foi possível observar mudanças em aspectos morfológicos das fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, sendo duas mudanças as mais notáveis. A primeira delas foi a mudança na coloração das fêmeas no segundo dia após a imersão, que passaram a perder suas listras amareladas resultando na cor preta (Figura 3 e 4) e a segunda mudança foi o extravasamento da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas que ficaram com a cor preta (Figura 5 e 6). Além do extravasamento da hemolinfa, fêmeas que passaram a apresentar esse aspecto de cor não conseguiram realizar sua postura com eficiência e seus ovos apresentaram aspecto seco sendo inviáveis para a maturação das larvas (Figura 7 e 8).

Em dois testes de imersão de fêmeas contendo três repetições, foi possível observar a mortalidade de 100% das fêmeas ingurgitadas que receberam as bactérias 427b, 428d e 388b no seu quinto dia, demonstrando a capacidade de inibir o ciclo de vida do carrapato *R. microplus* em testes *in vitro*.



Figura 3 - Fêmea ingurgitada do carrapato *R. microplus* com coloração preta após ação da bactéria 427b. (Fonte: Acervo pessoal)



Figura 4 - Fêmea ingurgitada do carrapato *R. microplus* com coloração preta após ação da bactéria 427b. (Fonte: Acervo pessoal)



Figura 5 - Extravasamento da hemolinfa de duas fêmeas ingurgitadas que passaram pela imersão com a bactéria 388b após 3 dias. (Fonte: Acervo pessoal)



Figura 6 - Extravasamento da hemolinfa de todas as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* que passaram pela imersão com a bactéria 428d após 3 dias. (Fonte: Acervo pessoal)



Figura 7 - Fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* que receberam a suspensão bacteriana 427b no quinto dia após a imersão. (Fonte: Acervo pessoal)

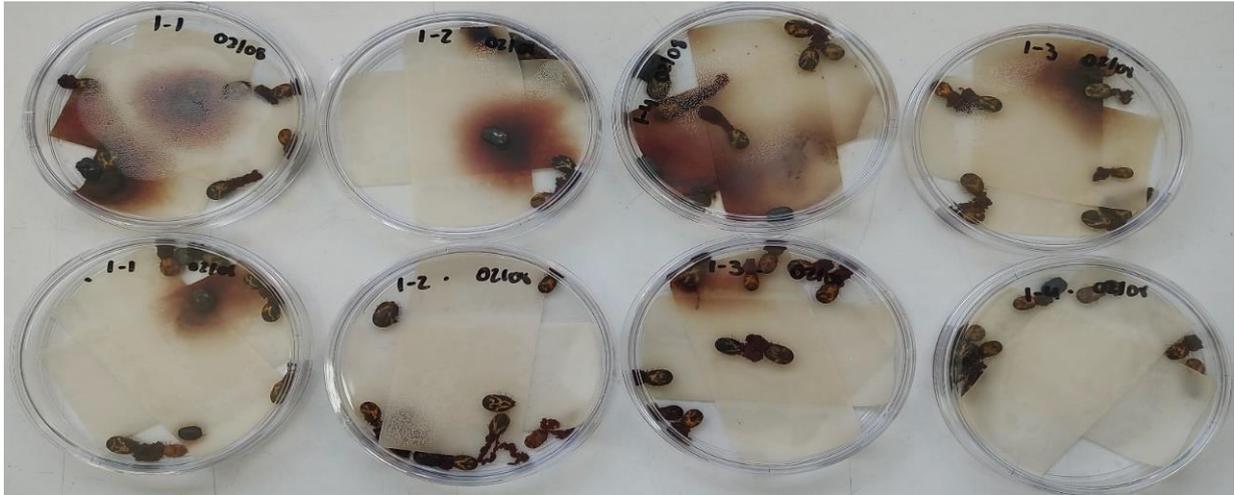


Figura 8 - Fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* apresentando duas colorações após realizado o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas com a bactéria 388b e o decaimento na sua oviposição. (Fonte: Acervo pessoal)

## 5.2. Teste de imersão de larvas

As três bactérias que apresentaram  $EP \geq 50\%$  foram designadas ao teste de imersão de larvas do carrapato *R. microplus*, os resultados obtidos através deste teste não demonstraram nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), tanto para os tratamentos comparados aos controles, quanto os tratamentos comparados entre si (Figura 7).

Os percentuais de mortalidade de larvas do *R. microplus* obtidos foram de 1,67%, 4,54%, 3,5%, 6,95% para o Controle, 388b, 428d, 427b respectivamente. Os resultados descritos estão representados no gráfico a seguir.

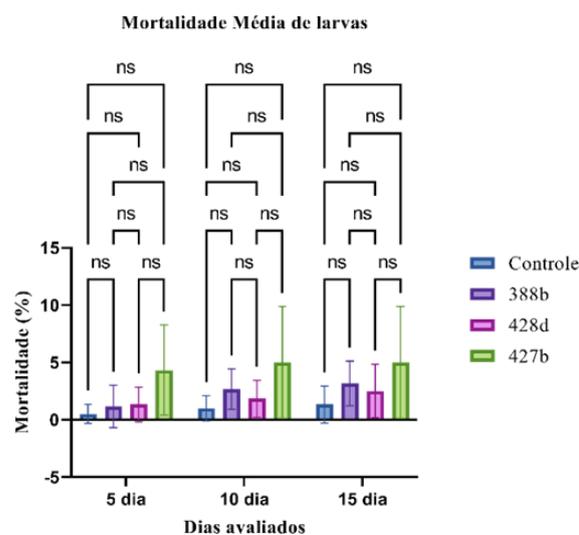


Figura 9. Média e desvio padrão da mortalidade de larvas ao longo dos 15 dias avaliados, com análise de variância adotada comparando controles e tratamentos de cada dia. Para a significância: ns: não significativo.

### 5.3. Avaliação da Concentração

As concentrações obtidas para as 3 suspensões bacterianas testadas em fêmeas ingurgitadas e larvas do carrapato *R. microplus* estão apresentadas a seguir na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração encontrada para as suspensões bacterianas com maior efetividade sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Suspensão Bacteriana	Concentração (UFC/mL)
388b	4,4x10 <sup>8</sup> UFC/mL
427b	4,3x10 <sup>8</sup> UFC/mL
428d	2,4x10 <sup>8</sup> UFC/mL

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/mililitro

### 5.4. Purificação e identificação de bactérias por Espectrometria de Massa

As três bactérias selecionadas passaram por diluições seriadas, atingindo a concentração 10<sup>-6</sup>. Nos meios de cultura em que foram semeadas as bactérias 427b e 388b observou-se apenas uma UFC (Unidade Formadora de Colônia), enquanto a bactéria 428d apresentou duas UFC morfologicamente distintas.

Os produtos resultantes dessas purificações foram levados ao Espectrômetro de Massa (MALDI-TOF) que não resultou em identificações de organismos para as bactérias 427b e 388b, pois sua pontuação estava abaixo do limiar esperado pelo software do MALDI-TOF, porém, a bactéria 428d foi identificada como *Serratia marcescens* e *Bacillus* sp. para cada colônia avaliada, dessa forma viu-se necessária a adoção do sequenciamento de Sanger.

### 5.5. Sequenciamento

As sequências resultaram em tamanhos de aproximadamente 536 à 786 pb (pares de bases) após os ajustes realizados no seu início e fim, a realização do blastn trouxe resultados esperados para a bactéria 388b, com a espécie *Bacillus safensis* encontrada para as 6 sequências referentes as 3 UFC analisadas, a bactéria 428d trouxe duas bactérias diferentes para seus sequenciamentos, para as 4 primeiras sequencias (referentes a duas UFC's) observou-se a bactéria *Serratia marcescens* e para as duas remanescentes a espécie *Bacillus thuringiensis* evidenciou-se, por fim, a bactéria 427b alinhou-se com o gene da espécie *Bacillus cereus*.

O alinhamento MUSCLE das sequências obtidas para a bactéria 388b com as oito expressões do gene 16S da espécie *Bacillus safensis* trouxeram o percentual de emparelhamento de identidade de 75,3% e os locais idênticos demonstraram percentual de 42,6% (Figura 6).

Nas sequencias obtidas para a bactéria 427b quando alinhadas com a expressão do gene 16S da espécie *Bacillus cereus* apresentaram o percentual de emparelhamento de identidade de 38,8% e seus locais idênticos com percentual de 4,3% (Figura 7). A bactéria 427b apresentou duas espécies diferentes quando realizado o blastn, dessa forma, as seis sequências referentes as três colônias semeadas foram emparelhadas com 8 expressões do gene 16S da bactéria *Serratia marcescens* obtendo 92,2% de emparelhamento de identidade e 68,5% locais idênticos (Figura 8), para gene 16S expressado pela bactéria *Bacillus thuringiensis* foi realizada a comparação das 2 sequencias referentes a terceira UFC, apresentando então 42,1% de emparelhamento de identidade e 34,2% de locais idênticos (Figura 9).

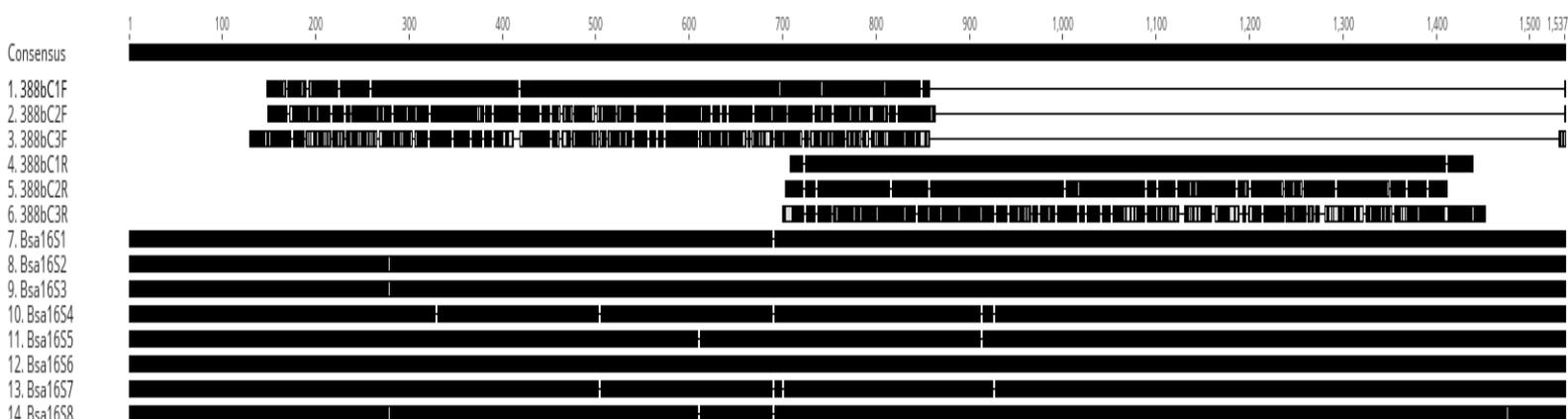


Figura 10 - Alinhamento MUSCLE das 6 sequencias obtidas de três UFC's diferentes provenientes da suspensão bacteriana 388b comparadas a 8 expressões do gene 16S da bactéria *Bacillus safensis* (Fonte: Acervo pessoal)



Figura 11 - Alinhamento MUSCLE das 6 sequencias obtidas de três UFC's diferentes provenientes da suspensão bacteriana 427b comparadas a uma expressão do gene 16S da bactéria *Bacillus cereus*. (Fonte: Acervo pessoal)

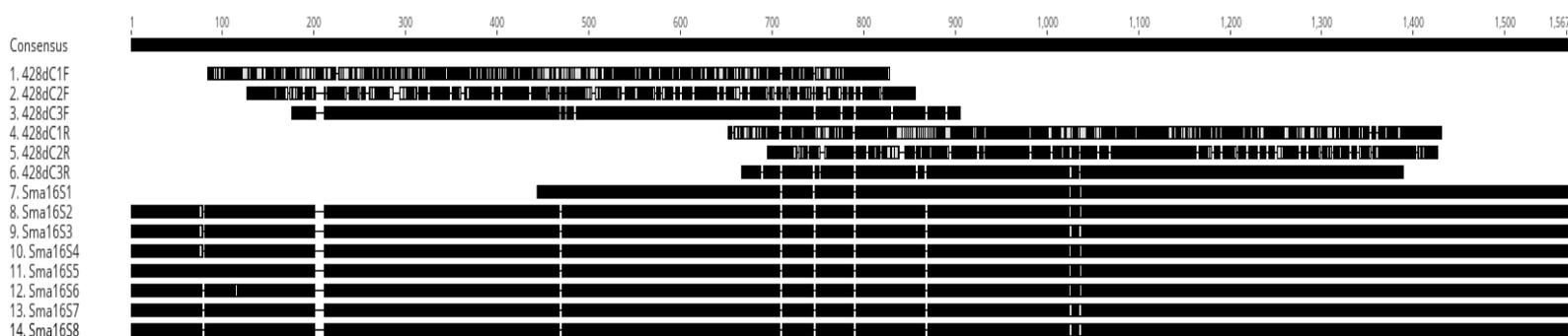


Figura 12 - Alinhamento MUSCLE das 6 sequências obtidas de três UFC's diferentes provenientes da suspensão bacteriana 428d comparadas a 8 expressões do gene 16S da bactéria *Serratia marcescens*. (Fonte: Acervo pessoal)

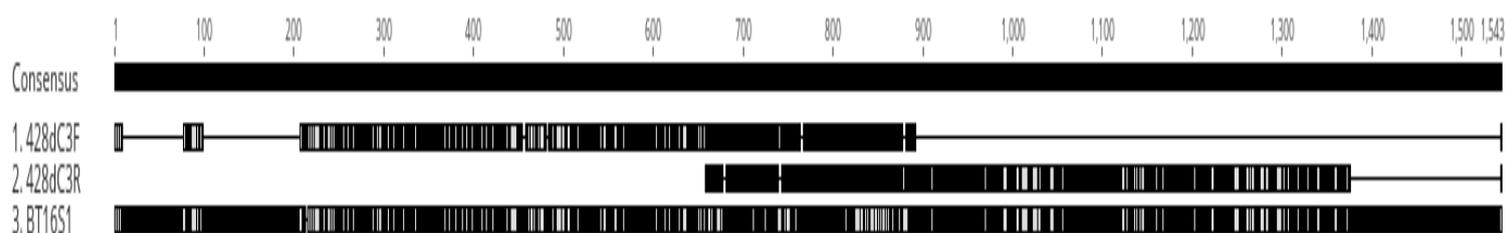


Figura 13 - Alinhamento MUSCLE das 2 sequências obtidas de duas UFC's diferentes provenientes da suspensão bacteriana 428d comparadas a uma expressão do gene 16S da bactéria *Bacillus thuringiensis*. (Fonte: Acervo pessoal)

## 6. Discussão

De um modo geral as bactérias utilizadas nesse estudo demonstraram capacidade de alterar o ciclo de vida do carrapato *R. microplus*. O seu armazenamento em geladeira não exerceu influência sobre o fator de virulência das suspensões bacterianas, o fato de estarem preservadas em geladeira fez com que o crescimento bacteriano alterasse, portanto, foi possível notar bactérias mais patogênicas e menos patogênicas no décimo quinto dia, de tal forma, sendo possível notar bactérias que estavam na fase de morte celular ou bactérias que estavam na fase lag (crescimento de bactérias).

Essa observação foi possível por conta de valores de eficácia de produto maiores ou menores no bioensaio realizado no décimo quinto dia de armazenamento. As análises de variância dos tratamentos realizados revelaram que as três bactérias selecionadas não possuíam diferença significativa quando comparadas entre si, porém diferenças significativas comparadas as demais bactérias, comprovando sua virulência.

As análises de espectrometria de massa não encontraram a espécie presente nas colônias das bactérias 427b e 388b, sendo então necessária realização do sequenciamento de Sanger das bactérias. O alinhamento MUSCLE do gene 16S das sequências obtidas com as bactérias encontradas no GenBank através do BLASTn resultou na espécie *Bacillus* sp. para as

bactérias 427b e 388b. A suspensão bacteriana 428d foi identificada através da espectrometria da massa como *Bacillus* sp. e *Serratia marcescens*, sendo semelhante nas suas identificações por espectrometria de massa e molecular, levantando a hipótese de haver duas bactérias em uma única suspensão bacteriana uma simbiose na atuação dessas bactérias, uma vez que estavam presentes na mesma suspensão bacteriana que gerou a maior eficácia de produto e maior inibição de postura de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*.

As bactérias 388b e 427b foram identificadas como *Bacillus* sp. através do sequenciamento e alinhamento do gene 16S, a amplificação do gene 16S serviu para identificar a nível de gênero as bactérias 427b e 388b, sendo necessário um novo sequenciamos para alcançar a espécie das bactérias fornecidas pela Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico/IB de Campinas.

Os resultados de imersão de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* divergiram dos resultados da imersão de larvas. As bactérias testadas geraram mortalidade de fêmeas ingurgitadas, porém as larvas que morreram não demonstraram um valor estatisticamente significativo. Desse modo, o período de imersão de larvas e fêmeas podem exercer influência na ingestão das bactérias e na adesão através dos seus espiráculos ou poros genitais como proposto nos trabalhos de Samish e Rehacek 1999; Zhidoua *et al.*, 1999; Fernández-Ruvacalba *et al.*, 2010. A coloração observada nas fêmeas ingurgitadas assemelha-se à publicação de Hendry e Rechav em 1981 onde há o relato da “blackening disease” causada por *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* sp. e *Proteus mirabilis* em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*. Essa mesma coloração preta foi observada por Brum (1988) quando realizou testes de imersão de fêmeas ingurgitadas da espécie *R. microplus* utilizando a bactéria *Cedecea lapagei*.

A respeito dos testes de imersão de fêmeas ingurgitadas utilizando bactérias do gênero *Bacillus*, os resultados relatados no presente estudo apresentam eficácia de produto variada em relação as duas suspensões bacterianas utilizadas (427b e 388b). Sobre a bactéria 427b foi observado EP de 86,10% no primeiro dia de armazenamento da suspensão bacteriana e EP de 65,52% no décimo quinto dia de armazenamento, essa eficácia de produto alta ocorreu pelo fato de uma alta inibição da postura de ovos pelas fêmeas ingurgitadas do *R. microplus*, enquanto a bactéria 388b apresentou resultados de EP: 58,31% no primeiro dia de armazenamento e EP: 49,78% no décimo quinto dia, tais valores discrepantes podem ter ocorrido pelo fato das bactérias se tratarem de espécies diferentes de *Bacillus* sp.

Quando aprofundadas as pesquisas a nível de espécie, a bactéria *B. thuringiensis*

é amplamente descrita como um agente no controle biológico de pragas (IBARRA *et al.*, 2003; MONNERAT *et al.*, 2005, 2007; MARTINS *et al.*, 2006, 2007), dentre essas pragas o carrapato se torna um alvo da interação dessa bactéria, como no trabalho desenvolvido por Zhioua *et al.* (1999) onde foi realizada a imersão de larvas ingurgitadas do carrapato *Ixodes scapularis* na bactéria *B. thuringiensis* por 30 segundos, obtendo 96% de mortalidade na terceira semana após realizado o teste, divergindo dos resultados dos testes de imersão de larvas do presente estudo, porém, se assemelhando ao teste de imersão de fêmeas ingurgitadas com a bactéria 427b, onde foi observado 100% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas 3 dias após realizada as imersões. Hassanain *et al.* (1997) realizaram testes com dois produtos comerciais, contendo duas variações da espécie de *B. thuringiensis*, sendo elas, *B. thuringiensis var. kurstaki* e *B. thuringiensis var. israelentis* em duas espécies de carrapatos (*Hyalomma dromedarii* e *Argas [persicargas] persicus*), as bactérias apresentaram mortalidade de fêmeas ingurgitadas, machos ingurgitados, machos não ingurgitados e fêmeas não ingurgitadas de *A. persicus* acima de 80%, o que difere do presente estudo na mortalidade de fêmeas ingurgitadas para a bactéria 388b, porém, novamente se assemelha a mortalidade observada na bactéria 427b. Para o carrapato *H. dromedarii* os testes apresentaram variações na mortalidade, sendo acima de 50%, assemelhando-se com os resultados apresentados neste trabalho, com a bactéria 388b.

Fernandéz-Ruvalcaba *et al.*, (2009) utilizaram três cepas diferentes de *B. thuringiensis* em carrapatos da espécie *R. microplus*, alcançando mortalidades variadas entre 95,8%, 85,41%, 79,15%, 91,60%, para cada cepa. A mortalidade obtida não gerou diferença significativa quando comparados entre si, porém, assim como neste estudo os percentuais de Eficácia do Produto apresentaram diferenças significativas nas suas comparações. Martinez *et al.* (2013) realizaram o estudo da utilização da bactéria *B. thuringiensis* como agente de controle biológico em fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* utilizando câmaras de infestações artificiais contendo bovinos. Seus resultados apresentaram um decaimento de fêmeas durante 7, 14 e 21 dias de coleta com valores médios de fêmeas ingurgitadas de 52,75 no sétimo dia, 1,25 no décimo quarto dia e 0,50 no vigésimo primeiro dia, representando de modo semelhante ao presente estudo a capacidade das bactérias 388b e 427b de diminuir a população de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*.

A bactéria 428d foi identificada como *Serratia marcescens* em simbiose com uma *Bacillus* sp. A bactéria *S. marcescens* se trata de um patógeno oportunista para pacientes hospitalares (YU, 1979; ACAR, 1986; HEJAZI e FALKINER, 1997; CRISTINA *et al.*, 2019), desse modo seu manuseio deve ser mais cauteloso quando se trata do controle biológico, o fato

de tal bactéria ser encontrada em leitos hospitalares não enfraquece seu efeito como agente de controle de pragas, pois existem trabalhos onde bactérias da espécie *S. marcescens* foram empregadas para a avaliação de sua eficácia (SOMEYA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013), o mesmo ocorre para carrapatos (CASTRO-SAINES *et al.*, 2021; CASTRO-SAINES *et al.*, 2022; MACHADO-FERREIRA *et al.*, 2015).

Pelo fato da bactéria *S. marcescens* apresentar-se promissora, o presente estudo traz à tona a possibilidade de sua utilização para o controle do carrapato, porém, ainda serão necessários estudos sobre sua expressão proteica, patogenicidade a humanos e mecanismos de ação sob o carrapato *R. microplus*.

Os tratamentos realizados com as bactérias da espécie *S. marcescens* no presente estudo demonstraram uma alta taxa de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de carrapato, porém letalidade baixa nas larvas. A alta mortalidade de fêmeas ingurgitadas assemelhou-se aos resultados exibidos por Castro-Saines *et al.* (2022), onde, através de testes utilizando inoculação com capilares nas fêmeas ingurgitadas, obtiveram resultados de mortalidade de 90%, além de uma inibição de postura de 94,18% e por inoculação da bactéria diretamente no celoma da fêmea, alcançaram também a mortalidade de 90%, porém uma inibição de postura maior com 99,84%. Em relação aos testes com larvas, esses foram utilizados para cortes histológicos não sendo discutido a mortalidade de larvas, porém a relação direta na capacidade de gerar mortalidade de fêmeas ingurgitadas e a diminuição na sua oviposição se destacam em ambos os trabalhos.

As bactérias utilizadas neste estudo demonstraram o potencial no controle das fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*, de tal modo, a análise genética para identificação das espécies torna-se inevitável, assim como a avaliação da patogenicidade da espécie *S. marcescens* para mamíferos.

## 7. Conclusões

- Dos oito isolados bacterianos testados, três apresentaram eficácia superior a 50% (388b, 427b e 428d);
- A preservação das bactérias em geladeira durante quinze dias não gerou influência sobre sua eficácia no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*;
- Os testes de imersão de larvas do carrapato *R. microplus* realizados com as três as suspensões bacterianas não trouxeram resultados significantes, sugerindo a hipótese da necessidade de sua

ingestão;

- O isolado bacteriano 388b resultou na bactéria *Bacillus* spp., que é amplamente utilizada no controle biológico de pragas, para fêmeas ingurgitadas de carrapato deste estudo apresentou 58,31%;
- O isolado bacteriano 428d foi identificado como *Serratia marcescens* com eficácia do produto de 88,78%;
- O isolado bacteriano 427b foi identificada como *Bacillus* spp., com potencial para controle do carrapato *R. microplus* em 86,10%.

## 8. Referências

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL D. C.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. **Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play.** Veterinary Parasitology, v. 203, n. 1-2, jun. 2014. 6-20 p.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil 2020.** Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>. Acesso em: 26 ago. 2023

ACAR, J. F. **Serratia marcescens Infections.** Infection Control, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 273- 280, maio 1986. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0195941700064201>.

AGUIAR, R. W. de S.; MARTINS, E. S.; RIBEIRO, B. M.; PONTES, R. G. M. S. de. **Cry10Aa protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an important insect pest in Brazilian cotton crop fields.** Bt Research, v. 3, n. 4, p. 20-28, jul. 2012. Disponível em: DOI: 10.5376/bt.2012.03.0004.

ALMEIDA M. B.; TORTELLI F. P.; RIET-CORREA B. R.; FERREIRA J. L. M.; SOARES M. P.; FARIAS N. A.; RIET-CORREA F. R.; SCHILD A. L. **Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005.** Pesquisa Veterinária Brasileira. 2006 26(4):236-242.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÓN, C. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.

**Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae) on naturally infested cattle in the mexican tropics.** Veterinary Parasitology, [S.L.], v. 147, n. 3-4, p. 336-340, jul. 2007. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.030>. Acesso em: 05 abr. 2024.

ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; SKODA, S. R.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; LORENZONI, A. G.; GALINDO-VELASCO, E.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.; FOSTER, J. E. **Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions.** Veterinary Parasitology, [S.L.], v. 170, n. 3-4, p. 278-286, jun. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.037>. Acesso em: 06 abr. 2024.

ARAÚJO, E. R.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; LEAL, C. R. B.; MIGUITA, M. **Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela Imunofluorescência Indireta e Teste de Conglutinação Rápida.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 6, n. 2, p. 111-115, 1997.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. **C. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 50, n. 3, p. 243-246, 1998.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. **Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 23, n. 4, p. 139-148, 2003.

BAHIENSE, T. C., FERNANDES, E. K. K., BITTENCOURT, V. R. E. P., 2006. **Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick.** Vet. Parasitol. 141, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.011>.

BACCHI, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. da C.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Performance of *Metarhizium anisopliae* and Its Combination with Deltamethrin against a Pyrethroid-Resistant Strain of *Boophilus microplus* in a Stall Test.** Annals Of The New York Academy Of Sciences, [S.L.], v. 1149, n. 1, p. 242-245, dez. 2008. Wiley. Disponível em: <https://doi.org/10.1196/annals.1428.031>. Acesso em: 05 abr. 2024.

BACCHI, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick.** Veterinary Parasitology, [S.L.], v. 141, n. 3-4, p. 319-324, nov. 2006. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.011>. Acesso em: 06 abr. 2024.

BACCHI, T. C.; FERNANDES, E. K.K.; ANGELO, I. da C.; PERINOTTO, W. M. de S.; BITTENCOURT, V. R. e. P. **Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 243-245, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612007000400012>. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612007000400012>. Acesso em: 05 abr. 2024.

BARBOSA, P. **Agroecosystems and conservation biological control.** Conservation Biological Control, [S.L.], p. 39-54, 1998. Elsevier. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012078147-8/50049-9>. Acesso em: 05 abr. 2024.

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.

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

p. 595-600, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000600010>. Acesso em: 06 abr. 2024.

BEYS DA SILVA, W. O., SANTI, L., CORRÊA, A. P. F., SILVA, L. A. D., BRESCIANI, F. R., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H., 2010a. **The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle.** Fungal Biol. 114, 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.007>.

BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. ***Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection.** 2010b. Fungal Biol. 114, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.08.003>.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. **A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage.** Mycologia, v. 101, p. 512-530, 2009. DOI: 10.3852/07-202.

BITTENCOURT V. R. E. P.; BAHIANSE T. C.; FERNANDES E. K. K. *et al.* **Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae).** 2003. Rev Bras Parasitol Vet 12:38–42

BITTENCOURT V. R. E. P.; MASCARENHAS A. G.; FACCINI J. L. H. *et al.* **Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais.** 1999a. Ciênc. Rural 29:351–354

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

BITTENCOURT V. R. E. P.; MASSARD C. L.; LIMA A. F. **Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*.** 1994b Rev Univ Rural Ser Cienc Vida 16:41–47

BITTENCOURT V. R. E. P.; MASSARD C. L.; LIMA A. F. **Dinâmica da infecção do carrapato *Boophilus microplus* pelo fungo *Metarhizium anisopliae***. 1995. Rev Univ Rural Ser Cienc Vida 17:83–88

BITTENCOURT V. R. E. P.; MASSARD C. L.; LIMA A. F. **Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. 1992. Arq Univ Fed Rur Rio J 15:197–202

BITTENCOURT V. R. E. P.; PERALVA S. L. F. S.; SOUZA E. J. **Ação de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre algumas características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em laboratório**. 1997a. Rev Univ Rural Ser Cienc Vida 19:65–71

Bittencourt V. R. E. P.; Peralva S. L. F. S.; Viegas E. C. *et al.* **Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus***. 1996. Rev Bras Parasitol Vet 5:81–84

BITTENCOURT V. R. E. P.; SOUZA E. J.; COSTA G. L. *et al.* **Evaluation of a formulation of *Beauveria bassiana* for control of *Anocentor nitens***. Abstracts of the IV international conference on ticks and tick-borne pathogens. 2002. Banff, Canada, p 88.

BITTENCOURT V. R. E. P.; SOUZA E. J.; PERALVA S. L. F. S. *et al.* **Avaliação da eficácia in vitro de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)**. 1997b. Rev Bras Parasitol Vet 6:49–52

BITTENCOURT V. R. E. P.; SOUZA E. J.; PERALVA S. L. F. S. *et al.* **Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)**. 1999b. Rev Bras Med Vet 21:78–82

BLOOMQUIST, J. R. **Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels**. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 106,

n. 2, 1993. 301-314 p.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. **Babesiosis of cattle**. *Parasitology*, v. 129, sup. 51, p. S247-S269, 2004.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; VOS, A. J. **Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis**. *Veterinary Parasitology*, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. ***Bacillus thuringiensis* mechanisms and use**. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. New York: Elsevier, 2005. v. 6, 175-206 p

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. **Characterization of cry genes in mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection**. *Applied Environmental Microbiology*, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BROWMAN, D. D. **Artrópodes**. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. Barueri, SP: Manole, 2006. cap. 1, p. 1-81.

BRUM, J. G. W. **INFECÇÃO EM TELEÓGINAS DE *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) POR *Cedecia lapagei* GRIMONT *et al.*, 1981: ETIOPATOGENIA E SAZONALIDADE**. 1988. 44 f. Tese (Doutorado) - Curso de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rj, 1988. Disponível em: <http://r1.ufrj.br/wp/ppgcv/wp-content/themes/PPGCV/pdf/R098.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2023.

CÂMARA, L. R. de A.; SILVA, M. M. C. da. **AGRONEGÓCIO: TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E SUSTENTABILIDADE NA GESTÃO PRODUTIVA E NUTRICIONAL DE BOVINOS DE CORTE**. *Gestão da Inovação Tecnológica e Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil Contemporâneo*, [S.L.],

v. 1, p. 74- 83, 2022. Regência e Arte Editora. <http://dx.doi.org/10.4322/978-65-86906-16-5>. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/978-65-86906-16-5>. Acesso em: 23 ago. 2023.

CÂMARA, L. R. DE A.; SILVA, M. M. C. DA. **AGRONEGÓCIO: TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E SUSTENTABILIDADE NA GESTÃO PRODUTIVA E NUTRICIONAL DE BOVINOS DE CORTE**. In: BUENO, Miriam Pinheiro (org.). **Gestão da inovação tecnológica e os objetivos de desenvolvimento sustentável no Brasil contemporâneo**. Uberlândia: Regência e Arte Editora, 2022. Cap. 5. p. 73-85. Disponível em: <https://doi.editoracubo.com.br/10.4322/978-65-86906-16-5.pdf>. Acesso em: 05/06/2024.

CAMPBELL, W. C. **History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents**. Current Pharmaceutical Biotechnology, v. 13, 2012. 853-865 p.

CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Chapter 3. In: CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. (Eds.). **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência**. Medicina Veterinária, São Paulo, 2008.169 p.

CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Chapter 3. In: CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; CARDINALE, B. J.; DUFFY, E.; GONZALES, A.; HOOPER, D. U.; PERRINGS, C.; VENAIL, C.; NARWANI, A.; MACE, G. M.; TILMAN, D.; WARDLE, D. A.; KINZIG, A. P.; DAILY, G. C.; LOREAU, M.; GRACE, J. B.; LARIGAUDERIE, A.; SRIVASTAVA, D.; NAEEM, S. **Biodiversity loss and its impacts on humanity**. Nature, v. 486, p. 59-67, Jun. 2012.

CANTÚ-MARTÍNEZ, M. A.; SALINAS-MELÉNDEZ, J. A.; ZARATE-RAMOS, J. J.; ÁVALOS-RAMÍREZ, R.; MARTÍNEZ-MUNOZ, A.; SEGURA-CORREA, J. C. **Prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* and *B. bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) in farms of northeastern Mexico**. Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 7, n. 2, p. 121-123, 2008.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.;

BUONAVOGLIA, C. **Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR.** Veterinary Microbiology, v. 124, n. 1-2, p. 107-114, 2007.

CARRILLO, D.; MORAES, G. J.; PEÑA, J. **Prospects for biological control of plant feeding mites and other harmful organisms.** New York: Springer, 2015. 328 p.

CASIQUE, A.; DENNIS, B.; Rube'n, S. H.; Jose, E. B. C. **Development of a recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74.** Antonie van Leeuwenhoek. 2007; 92:1-9.

CASTRO A. B. A.; BITTENCOURT V. R. E. P.; DAEMON E. **Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo.** 1997. Rev Univ Rural Ser Cienc Vida 19:73–82

CASTRO, M. E. B. de.; RIBEIRO, B. M.; CRAVEIRO, S. R.; INGLIS, P. W.; VALICENTE, F. H. **Controle de artrópodes-praga com vírus entomopatogênicos.** Controle Biológico de Pragas da Agricultura, Brasília, Df, v. 1, n. 1, p. 237-273, abr. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1121825/control-biologico-de-pragas-da-agricultura>. Acesso em: 26 ago. 2023.

CASTRO-SAINES, E.; HERNANDEZ-ORTIZ, R.; LAGUNES-QUINTANILLA, R.; PEÑA-CHORA, G. **Characterization of a strain of *Serratia* sp. with ixodicide activity against the cattle tick *Rhipicephalus microplus*.** Experimental And Applied Acarology, [S.L.], v. 85, n. 1, p. 101-111, set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-021-00640-4>.

CASTRO-SAINES, E.; PEÑA-CHORA, G.; HALLAL-CALLEROS, C.; LAGUNES-QUINTANILLA, R.; FLORES-PEREZ, I.; HERNANDEZ-ORTIZ, R. **Histometric and morphological damage caused by *Serratia marcescens* to the tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: ixodidae).** Archives Of Microbiology, [S.L.], v. 204, n. 11, artigo 677, 25 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-022-03275-0>.

CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Bovinocultura de corte – balanço 2021**. Disponível em: <https://balanco21perspectiva22.cnabrazil.org.br/>. Acesso em: 05/06/2024.

COOLEY, R. A. **A parasite of ticks**. Mont. State Bd. Ent. Bien. Rept. 1927, 6, 15–17.

COOLEY, R.A.; KOHLS, G.M. **A summary of tick parasites**. In Proceedings of the 5th Pacific Science Congress, Victoria, BC, Canada, 1–4 June 1934; Volume 5, pp. 3375–3381.

CRISTINA, M.; SARTINI, M.; SPAGNOLO, A. ***Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs)**. International Journal Of Environmental Research And Public Health, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 610, 20 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16040610>.

CRUZ, B. C. **Aspectos ecológicos, biológicos e de resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) na região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil**. (Tese doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2017. 146 p.

CULLY, D. F.; VASSILATIS, D. K.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; Van Der PLOEG, L. H.; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. **Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans***. Nature, v. 20, n. 371, 1994. p. 707-711.

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. **The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections**. Veterinary Parasitology, v. 13, n. 4, p. 317-323, 1983.

DAMGAARD, P. H.; SMITS, P. H.; HANSEN, B. M.; PEDERSEN, J. C.; EILENBERG, J. **Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass and cabbage foliage**. IOBC/WPRS Bulletin, v. 17, 1994, p. 262-266.

DIYES, G. C. P.; KARUNARATHNA, N. B.; SILVA, T. H. E. E.; KARUNARATNE, W. A. I. P.; RAJAKARUNA, R. S. **Ants as predators of the Spinose Ear Tick, *Otobius megnini***

(Dugès) in Sri Lanka. *Acarologia*, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 747-753, 6 jul. 2017. Les Amis d'Acarologia. Disponível em: <https://doi.org/10.24349/acarologia/20174200>. Acesso em: 05 abr. 2024.

DONOVAN, W. P.; ENGLEMAN, J.; DONOVAN, J.; BAUM, J.; BUNKERS, G.; CHI, D.; CLINTON, W.; ENGLISH, L.; HECK, G.; ILAGAN, O.; KRASOMI-OSTERFELD, C.; PITKIN, J.; ROBERTS, J.; WALTERS, M. **Discovery And Characterization of Sip1a: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran larvae.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, n. 4, Fev. 2006, p. 713-719. DOI: 10.1007/s00253-006-0332-7.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. ***Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides.** 13 *Journal Of Economic Entomology*, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 130-133, 1 fev. 1973. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jee/66.1.130>.

DULMAGE, H. T. **Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. alesti.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 15, n. 2, p. 232-239, Mar. 1970. DOI: 10.1016/0022-2011(70)90240-5.

DUNSTAND-GUZMÁN, E.; PEÑA-CHORA, G.; HALLAL-CALLEROS, C.; PÉREZ-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-VELAZQUEZ, V. M.; MORALES-MONTOR, J.; FLORES-PÉREZ, F. I. **Acaricidal effect and histological damage induced by *Bacillus thuringiensis* protein extracts on the mite *Psoroptes cuniculi*.** *Parasites & Vectors*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-9, 24 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0890-6>.

EGGLETON, P.; GASTON, K. J. **Parasitoid species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises.** *Oikos*, v. 59, n. 3, p. 417-421, 1990.

EHLER, L. E. **Introduction strategies in biological control of insects.** In: MACKAUER, M.; EHLER, L. E.; ROLAND, J. (Ed.). **Critical issues in biological control.** Andover: Intercept, 1990. p. 111-134.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; GRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. **Vip3a, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: (PNAS), v. 93, n. 11, p. 5389-5394, May 1996. DOI: 10.1073/pnas.93.11.5389.

FAN, Q-H; FLECHTMANN, C. H. W.; MORAES, G. J. **Annotated catalogue of Stigmaeidae (Acari: Prostigmata), with a pictorial key to genera.** Zootaxa, v. 4176, n. 1, p. 2016. DOI: 10.11646/zootaxa.4176.1.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION. **Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines.** Roma: Food and Agriculture Organisation, Animal Production and Health Division, Roma, Itália, 2004. 53 p.

FARIA, M. R.; WRIGHT, S. P. **Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types.** Biological Control, v. 43, n. 3, p. 237-256, Dec. 2007. DOI: 0.1016/j.biocontrol.2007.08.001.

FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L. da; MORAES, A. M. L. de; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae).** Journal Of Basic Microbiology, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 270-274, jul. 2004. Wiley. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.200410392>. Acesso em: 06 abr. 2024.

FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L. da; SOUZA, E. J. de; MORAES, A. M. L. de; BITTENCOURT, V. R. E. P. ***Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae).** Journal Of Basic Microbiology, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 393-398, set. 2003. Wiley. Disponível em: <http://doi.org/10.1002/jobm.200310263>. Acesso em: 06 abr. 2024.

FERNANDES, E. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria***

***bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick.** Parasitology Research, [S.L.], v. 98, n. 4, p. 324-332, 22 dez. 2005. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00436-005-0058-y>. Acesso em: 06 abr. 2024.

FERNÁNDEZ-RUVACALBA, M.; PEÑA-CHORA, G.; ROMO-MARTÍNEZ, A.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V.; de LA PARRA, A. B.; de LA ROSA, D. P. **Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides.** Journal of Insect Science. 2010; 10:1-6.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; ALONSO-DÍAZ, M. A. **First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics.** 2012. Vet. Parasitol. 183, 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.028>.

FERREIRA, J.; PARDINI, R.; METZGER, J. P.; FONSECA, C. R.; POMPEU, P. S.; SPAROVEK, G., LOUZADA, J. **Towards environmentally sustainable agriculture in Brazil: challenges and opportunities for applied ecological research.** Journal of Applied Ecology, v. 49, p. 535-541, Apr. 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2012.02145.x.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; LE GOFF, G. **The genetics and genomics of insecticide resistance.** Trends in Genetics, v. 20, 2004. 163-170 p.

FISHER, T. W.; BELLOWS, Thomas S.; CALTAGIRONE, L. E.; DAHLSTEN, D. L.; HUFFAKER, Carl B.; GORDH, G. (ed.). **Handbook of Biological Control: principles and applications of biological control.** [S. I.]: Elsevier, 1999. 1046 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-257305-7.X5046-2>. Acesso em: 05 abr. 2024.

FLECHTMANN, C. H. W.; MCMURTRY, J. A. **Studies on how phytoseiid mites feed on spider mites and pollen.** International Journal of Acarology, v. 18, p. 157-162, 1992. DOI: 10.1080/01647959208683946.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF. Embrapa, 2020. ISBN 978-65-86056-01-3

FONTES, E.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R. **Estratégias de uso e histórico**. Controle Biológico de Pragas da Agricultura, Brasília, Df, v. 1, n. 1, p. 21-43, abr. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1121825/control-biologico-de-pragas-da-agricultura>. Acesso em: 25 ago. 2023.

FRAZZON, A. P. G.; JUNIOR, I. S. V.; MASUDA, A. **In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus***. 2000. Vet Parasitol 94:117–125. doi:10.1016/S0304-4017(00)00368-X

FRAZZON, A. P. G.; VAZ JUNIOR, I. da S.; MASUDA, Aoi; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus***. Veterinary Parasitology, [S.L.], v. 94, n. 1-2, p. 117-125, dez. 2000. Elsevier BV. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00368-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00368-x). Acesso em: 05 abr. 2024.

FUKUTO, T. R. **Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides**. Environmental Health Perspectives, v. 87, 1990. p. 245-254

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil**. Caderno Técnico da Escola Veterinária UFMG, v. 8, p. 49-61, 1993.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite. 2000. 25 p.

GALLARDO, J.; J. MORALES. **Incidencia de *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense* y dinámica poblacional de *B. microplus* (Acari: Ixodidae) en el Municipio Morán, estado Lara**. Bioagro, 1999. 11(2): 51-60.

GÁLVEZ, A. B.; SEGURA, R. P.; GÓMEZ-VÁZQUEZ, A. **Control biológico de *Rhicephalus (Boophilus) microplus* con hongos entomopatógenos / Biological Control of**

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with Entomopathogenic Fungi. Ciba Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 33-62, 13 out. 2017. Centro de Estudios e Investigaciones para el Desarrollo Docente - CENID. Disponível em: <http://doi.org/10.23913/ciba.v6i12.68>. Acesso em: 06 abr. 2024.

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S.; MACEDO, L. P. M. **Criação do parasitóide *Cotesia flavipes* em laboratório**. In: BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: Ed. da Ufla, 2009. p. 117-168.

GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. da S.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. **Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p. il. color. p. 20-24.

GLEIM, E. R.; CONNER, L. Mike; YABSLEY, M. J. **The Effects of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: formicidae) and burned habitat on the survival of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae)**. Journal Of Medical Entomology, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 270-276, 1 mar. 2013. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://doi.org/10.1603/ME12168>. Acesso em: 05 abr. 2024.

GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University, 1994. 484 p.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. **A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens***. Mosquito News, v. 37, p. 355-358, Set. 1977.

GONÇALVES, P.M. **Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil**. Ciência Rural. Santa Maria, v 10, n°1, 2000.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 235 p.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. **Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil**. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 23, n. 2, 2014. 150-156 p.

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.

GUEDES JUNIOR, 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 Northeastern region of the State of Pará, Brazil**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

GUGLIELMONE, A. A. **Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America**. Veterinary Parasitology, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, A. J.; ROBBINS, R. G. **Las garrapatas (Acari. Ixodida) de la región zoogeográfica neotropical**. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, 2004. 142 p.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, G. R.; APANASKEVICH, A. D.; PETNEY, N. T.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, G. I.; SHAO, R.; BARKER, C. S. **The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names**. Zootaxa, n. 2528, 2010. 1-28 p.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001. 217 p.

HASSANAIN, M. A.; EL GARHY, F. M.; ABDEL-GHAFFAR, A. F.; EL-SHARABY, A.; ABDEL MEGEED, N. K. **Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. I. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties on soft and hard ticks (Ixodidae)**. Parasitology

Research. 1997; 83:209-213.

HASSELL, M. P. **The dynamics of arthropod predator prey-Systems**. Princeton: Princeton University Press, 1978. 237 p.

HEIMPEL, G. E.; MILLS, N. J. **Biological Control: ecology and applications**. Cambridge: Cambridge University Press. 2017. 297 p. DOI: 10.1017/9781139029117.

HEJAZI, A.; FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. Journal Of Medical Microbiology, [S.L.], v. 46, n. 11, p. 903-912, 1 nov. 1997. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-46-11-903>.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.; PRAPANTHADARA, L.; JAYAWARDENAL, K. G. I.; RANSON, H. **The role of gene slicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 353, 1998. 1695-1699 p.

HENDRY, D. A.; REHAV, Y. **Acaricidal bacteria infecting laboratory colonies of the tick *Boophilus decoloratus* (Acarina: Ixodidae)**. Journal Of Invertebrate Pathology, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 149-151, jul. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90044-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(81)90044-6).

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, C. J.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. **Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties**. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, v. 25, n. 2, 2016. 163-171 p.

HITCHCOCK, L. F. **Studies on the parasitic stages of the cattle fever tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae)**. Australian Journal of Zoologia, v. 3, 1955. 145-155.

HODGSON, E.; ROSE R. **Insect Cytochrome, p450**. In: Arinç E., Schenkman J.B., Hodgson E. (eds). **Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds**. NATO ASI Series Advanced Science Institutes Series (Series A: Life Sciences),

v. 202. Springer, Boston, MA. 1991.

HOLLING, C. S. **Principles of insect predation**. Annual Review of Entomology, v. 6, p. 163-182, 1961.

HOY, M. A. **Agricultural acarology: introduction to integrated mite management**. Boca Raton: CRC Press, 2011. 430 p.

HURST, M. R.; BEATTIE, A.; JONES, S. A.; LAUGRAUD, A.; KOTEN, C.; HARPER, L. ***Serratia proteamaculans* strain AGR96X encoding an anti-feeding prophage (tailocin) with activity against grass grub (*Costelytra giveni*) and Manuka Beetle (*Pyronota* spp.) larvae**. Applied and Environmental Microbiology, v. 84, n. 10, pii: e02739-17, May 2018. DOI: 10.1128/AEM.02739-17.

HURST, M. R.; O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R. **Peripheral sequences of the *Serratia entomophila* pADAP virulence-associated region**. Plasmid, v. 50, n. p. 213- 229, Nov. 2003. DOI: 10.1016/S0147-619X(03)00062-3.

IBARRA, J. E.; DEL RINCON, M. C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; DE OLIVEIRA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, J.; PENA, G.; BRAVO, A. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquitoes species**. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.9.5269-5274.2003.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal referente ao ano de 2020**. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-dapecuaria-municipal.html?edicao=31709&t=destaques>. Acesso em: 23 ago. 2023.

JENKINS, D. W. **Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods**. Annotated list and bibliography. Bull. WHO, 30 (Supp.), 1964. p. 150

JONSSON, M.; WRATTEN, S. D.; LANDIS, D. A.; GURR, G. M. **Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods**. *Biological Control*, v. 45, n. 2, p. 172-175, Mai. 2008. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.01.006.

JONSSON, N. N.; KLAFKE, G.; CORLEY, S. W.; TIDWELL, J.; BERRY, C. M.; KOH-TAN, H. H. C. **Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus***. *Frontiers in Bioscience*, v. 23, n. 2, 2018. p. 796-810.

KESSLER, R. H. **Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale***. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; RIBEIRO, O. C. **Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babés 1888 Starcovici 1893) em bezerros no Estado de Mato Grosso do Sul**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 18, n. 8, p. 931-935, 1983.

KLAFKE, G. M. (Eds.). ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência***. *Medicina Veterinária, São Paulo*, 2008. 169 p.

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. **The natural history of *Anaplasma marginale***. *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

KRANTZ, G. W.; WALTER, D. E. **A manual of acarology**. Lubbock: Texas Tech University Press, 2009. 807 p.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. ***Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in Southern Brazil**. *Journal of Medical Entomology*, v. 52, n. 1, 2015. 28-37 p.

KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. ***Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von *Coleopteren* wirksamer pathotyp**. *Journal of Applied Entomology*, v. 96, p. 500-508, 1983. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1983.tb03704.x.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. **A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil.** Parasites & Vectors, v. 9, n. 1, 2016. 1-15 p.

LACEY, L. **Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice.** San Diego: Academic Press, 2017. 461 p.

LACEY, L.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; GOETTEL, M. S.; BROWNBIDGE, M. **Insect pathogens as biological control agents: back to the future.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 132, p. 1-41, Nov. 2015. DOI: 10.1016/j.jip.2015.07.009

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. **Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture.** Annual Review of Entomology, v. 45, p. 175–201, Jan. 2000. DOI: 10.1146/annurev.ento.45.1.175.

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. **Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture.** Annual Review of Entomology, v. 45, p. 175–201, Jan. 2000. DOI: 10.1146/annurev.ento.45.1.175.

LAROUSSE, F.; KING, A.G.; WOLBACH, S.B. **The overwintering in Massachusetts of *Ixodiphagus caucurtei*.** Science 1928, 67, 351–353.

LAUMANN, R. A.; SAMPAIO, M. V. **Controle de artrópodes-praga com parasitoides.** Controle Biológico de Pragas da Agricultura, Brasília, Df, v. 1, n. 1, p. 65- 112, a b r . 2020. Disponível em : <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1121825/control-biologico-de-pragas-da-agricultura>. Acesso em: 25 ago. 2023.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. **Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*.** Journal Of Invertebrate Pathology, [S.L.], v. 97, n. 1, p. 40-49, jan. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.006>. Acesso em: 05 abr. 2024.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. **Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*.** Journal Of Invertebrate Pathology, [S.L.], v. 97, n. 1, p. 40-49, jan. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.006>. Acesso em: 06 abr. 2024.

LEEMON, D. M.; TURNER, L. B.; JONSSON, N. N. **Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin).** Veterinary Parasitology, [S.L.], v. 156, n. 3-4, p. 248-260, out. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.007>. Acesso em: 05 abr. 2024.

LEGG, J. **Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*).** Proceedings of the Royal Society of Queensland, v. 41, 1930. p. 121-132

LI, X.; SCHULER, M. A.; BEREBAUM, M. R. **Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics.** Annual Review of Entomology, v. 52, 2007. 231-253 p.

LI, Z.; ALVES, S. B.; ROBERTS, D.; FAN, M.; DELALIBERA, I.; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, DEN. **Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi.** Biocontrol Science & Technology, v. 20, n. 2, p. 117-136, 2010. DOI: 10.1080/09583150903431665.

LIMA, F. V. A.; MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; SILVA, C. M. S. **Exames soroepidemiológicos da babesiose bovina (*Babesia bovis*) através de um teste ELISA indireto no Estado do Pará.** Revista de Ciências Agrárias (Belém), n. 32, p. 55-64, 1999.

LUZ, H. R.; MUÑOZ-LEAL, S.; ALMEIDA, J. C.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. **Carrapatos parasitando morcegos (Mammalia: Chiroptera) na Caatinga, Brasil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 25, n. 4, set/dez 2016. 484-491 p.

MACHADO-FERREIRA, E.; VIZZONI, V. F.; PIESMAN, J.; GAZETA, G. S.;

SOARES, C. A. G. **Bacteria associated with *Amblyomma cajennense* tick eggs.** Genetics And Molecular Biology, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 477-483, 3 nov. 2015. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-475738420150040>.

MAPA, **Ministério da Agricultura e Pecuária. Mapa do leite.** 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 23 ago. 2023.

MARTINEZ, R.; FERNADEZ-RUVALCABA, M.; HERNANDEZ-VELAZQUEZ, V. M.; PENA-CHORA, G.; LINA-GARCIA, P.; OSORIO-MIRANDA, J. **Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested.** Basic Research Journal of Agricultural Science and Review. 2013; 2(3):64-79.

MARTINS, E. S.; AGUIAR, R. W. D. S.; MARTINS, N. F.; MELATTI, V. M.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. **Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*).** Journal of Applied Microbiology, v. 104, p. 1363-1371, Jan. 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03665.x.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; SILVA-WERNECK, J. O. S.; SONE, E. H.; WAGA, I. C.; COLIN, B.; MONNERAT, R. G. **Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*).** Biological Control, v. 40, n. 1, p. 65-68, 2007. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2006.09.009.

MARTINS, J. R. **Carrapato bovino.** 2002. Disponível em: <<http://www.carrapatobovino.com/babesioseeanaplasmose.htm>>.

MASSARD, C. L.; FREIRE, R. B. **Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil.** A Hora Veterinária, v. 4, n. 23, p. 53-56, 1985.

MASSRUHÁ, S. Agricultura 4.0. **Fazendas Conectadas.** Revista Pesquisa Fapesp. São Paulo, ano 21, n. 287, p. 20, jan. 2020. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/wp->

MELO D. R.; REIS R. C. S.; BITTENCOURT V. R. E. P. **Patogenicidade in vitro do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. 2006. Rev Bras Parasitol 15:157–162

MICHEL, T.; SOUZA, U.; DALL'AGNOL, B.; WEBSTER, A.; PETERS, F.; CHRISTOFF, A.; LUZA, A. L.; KASPER, N.; BECKER, M.; FIORENTIN, G.; KLAFKE, G.; VENZAL, J.; MARTINS, J. R.; JARDIM, M. M. M.; OTT, R.; RECK, J. ***Ixodes* spp. (Acari: Ixodidae) ticks in Rio Grande do Sul state, Brazil**. Systematic and Applied Acarology, v.22, 2017. 2057-2063 p.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R.; BERRY, C. **Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis***. Biological Control, v. 41, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R.; DIAS, D. S.; SILVA, S. F. da; MARTINS, E. S.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S. **Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, p. 103-1006, Feb. 2005. DOI: 10.1590/S0100-204X2005000200001.

MONNERAT, R.; SILVA, S.; DIAS, D.; MARTINS, É.; PRAÇA, L.; JONES, G.; SOARES, C; DIAS, J.; BERRY, C. **Screening of Brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti***. Journal of Applied Entomology, v. 128, p. 469-473, July 2004. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2004.00874.x.

MONNERAT, R.; SILVA, S.; DIAS, D.; MARTINS, É.; PRAÇA, L.; JONES, G.; SOARES, C; DIAS, J.; BERRY, C. **Screening of Brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti***. Journal of Applied Entomology, v. 128, p. 469-473, Jul. 2004. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2004.00874.x.

MONTEIRO S. G.; BITTENCOURT V. R. E. P.; DAEMON E *et al.* **Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).** 1998. Rev Bras Parasitol Vet 7:113–116

MORAES, G. V. J.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil.** Ribeirão Preto: Holos, 2008. 288 p.

MUÑOZ-LEAL, S.; TOLEDO, L. F.; VENZAL, J. M.; MARCILI, A.; MARTINS, T. F.; ACOSTA, I. C. L.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. **Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: Ornithodoros) associated with stream breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: Cycloramphus) in Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 8, 2017. 682-692 p.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. **Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae).** Systematic Parasitology, v. 56, n. 1, 2003. 169-172 p.

NARAHASHI, T. **Mode of action of pyrethroids.** Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, v. 44, 1971. p. 337-345.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; GONZALEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. **Ticks of the Southern Cone of América: Diagnosis, Distribution, and Hosts With Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance.** Academic Press, 2017. 339 p.

NOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M. de; AZEVEDO, J. L. **Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*.** American Journal Of Veterinary Research, [S.L.], v. 62, n. 9, p. 1478-1480, 1 set. 2001. American Veterinary Medical Association (AVMA). Disponível em: <http://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1478>. Acesso em: 06 abr. 2024.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*, la**

**garrapata comun del ganado vacuno.** Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19 p.

OAKESHOTT, J. G.; HOME, I.; SUTHERLAND, T. D.; RUSSELL, R. J. **The genomics of insecticide resistance.** *Genome Biology*, v.4, Issue1. Article 202. Jan. 2003. 1-4 p.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. **Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*.** *Anticancer Research*, v. 29, p. 427-433, 2009.

OJEDA-CHI, M. M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. **Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics.** *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 170, n. 3-4, p. 348-354, jun. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.022>. Acesso em: 05 abr. 2024.

OJEDA-CHI, M. M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. **Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics.** *Veterinary Parasitology*, [S.L.], v. 170, n. 3-4, p. 348-354, jun. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.022>. Acesso em: 06 abr. 2024.

OLIVEIRA, E. J.; RABINOVITCH, L.; MONNERAT, R. G.; PASSOS, L. K.; ZAHNER, V. **Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 6657-6664, 2004. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6657-6664.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; DE BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. 2001. **Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*.** *Am. J. Vet. Res.* 62, 1478–1480. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1478>.

ORLOVA, M. V.; SMIRNOVA, T. A.; GANUSHKINA, L. A.; YACUBOVICH, V. Y.; AZIZBEKYAN, R. R. **Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*.** *Applied and*

Environmental Microbiology, v. 64, p. 2723-2725, 1998.

OSTFELD, R. S.; PRICE, A.; HORNBOSTEL, L. V.; BENJAMIN, A. M.; KEESING, F. **Controlling ticks and tick-borne zoonosis with biological and chemical agents.** Bio Science. 2006; 56(5):383-394.

PAIÃO, J. de C. V.; MONTEIRO, A. C.; KRONKA, S. do N. **Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*.** World Journal Of Microbiology And Biotechnology, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 245-251, 2001. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1023/A:1016653700599>. Acesso em: 06 abr. 2024.

PARRA, J. R. P. **Biological Control in Brazil.** Scientia Agricola, v. 71, n. 5, p. 420-429, Sept./Oct. 2014. DOI: 10.1590/0103-9016-2014-0167.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. **Trichogramma in Brazil: feasibility of use after twenty years of research.** Neotropical Entomology, v. 33, n. 3, p. 271-281, Mai. /Jun. 2004. DOI: 10.1590/S1519-566X2004000300001.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (biologia, controle e resistência).** São Paulo: MedVet, 2008. 169 p.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M. G.; SÁ, F. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi.** Experimental Parasitology, [S.L.], v. 130, n. 3, p. 257-260, mar. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.003>. Acesso em: 05 abr. 2024.

POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A. **Comparison of Water, Oils and Emulsifiable Adjuvant Oils as Formulating Agents for *Metarhizium Anisopliae* for Use in Control of *Boophilus Microplus*.** Mycopathologia, [S.L.], v. 160, n. 2, p. 151-157, set. 2005. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s11046-005-0120-4>. Acesso em: 06 abr. 2024.

POLAR, P.; KAIRO, M. T. K.; PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A. **Assessment of Fungal Isolates for Development of a Myco-Acaricide for Cattle Tick Control. Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 276-284, set. 2005. Mary Ann Liebert Inc. Disponível em: <http://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.276>. Acesso em: 06 abr. 2024.

POLAR, P.; MURO, M. A. de; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A.; ROACH-BENN, C. **Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 134, n. 1-2, p. 159-167, nov. 2005. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.010>. Acesso em: 06 abr. 2024.

POSADAS J. B.; LECUONA R. E. **Efectividad de cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, para el control microbiano de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Rurrel and Barrer) (Acari: Ixodidae)**. 2007. Anais do X Simpósio de Controle Biológico, Brasília, Brasil

RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. **Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis***. Annals of Microbiology, v. 58, n. 1, p. 47-52, 2008.

RADDADI, N.; CHERIF, A.; OUZARI, H.; MARZORATI, M.; BRUSETTI, L.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. ***Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains**. Annals of Microbiology, v. 57, p. 481-494, Dec. 2007.

RAMOS, R. A.; CAMPBELL, B. E.; WHITTLE, A.; Lia, R. P.; MONTARSI, F.; PARISI, A.; DANTAS-TORRES, F.; WALL, R.; OTRANTO, D. **Occurrence of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Italy**. Ticks Tick Borne Dis. 2015, 6, 234–236.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.;

SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R. **Evolution of supergene families associated with insecticide resistance.** Science 298: 2002. 179-181 p.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R. **Evolution of supergene families associated with insecticide resistance.** Science 298: 2002. 179-181 p.

RECK, J.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, R. O.; SOUZA, U. A.; WEBSTER, A.; LEITE, R. C.; GONZALES, J. C.; FLAFKE, G. M.; MARTINS, J. R. **Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle?** Preventive Veterinary Medicine, v. 1, 2014. 59-62 p.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A. ***Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs.** Mycologia, v. 97, p. 84-98, Jun. 2011. DOI: 10.1080/15572536.2006.11832842.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; SOUZA, E. J.; BITTENCOURT, V. R. E. P. **Ação in vitro dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: ixodidae).** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 544-547, out. 2001. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000500005>. Acesso em: 06 abr. 2024.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M.; SCATAMBURLO, M. A.; MARTINS, N. E. **Transmissão congênita da anaplasmosse bovina.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 47, n. 3, p. 297-304, 1995.

ROHR, C. J.; **Estudos sobre Ixódidas do Brasil.** Gómes Irmao, Rio de Janeiro, 1909, 220 p.

ROMO-MARTÍNEZ, A.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M.; PEÑA-CHORA, G.; LINA-GARCÍA, L. P.; OSORIO-MIRANDA, J. **Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:**

**Ixodidae) on cattle artificially infested.** 2013. Basic. Res. J. Agric. Sci. Rev. 2, 64–79. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/280309624\\_Evaluation\\_of\\_natural\\_origin\\_products\\_for\\_the\\_control\\_of\\_Rhipicephalus\\_Boophilus\\_microplus\\_Acari\\_Ixodidae\\_on\\_cattle\\_artificially\\_Infested](https://www.researchgate.net/publication/280309624_Evaluation_of_natural_origin_products_for_the_control_of_Rhipicephalus_Boophilus_microplus_Acari_Ixodidae_on_cattle_artificially_Infested). Acesso em: 06 abr. 2024

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

SALAS, A. F.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; ALONSO-MORALES, R. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. C.; CERVANTES-CHÁVEZ, J. A. **Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*.** Medical And Veterinary Entomology, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 36-43, 19 out. 2016. Wiley. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12203>. Acesso em: 06 abr. 2024.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. **PATHOGENICITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI TO DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES OF *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (ACARI: IXODIDAE).** Journal Of Parasitology, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 1355-1359, dez. 2001. American Society of Parasitologists. Disponível em: [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1355:poeftd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1355:poeftd]2.0.co;2). Acesso em: 06 abr. 2024.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. **Biological control of ticks.** Parasitology, [S.L.], v. 129, n. 1, p. 389-403, out. 2004. Cambridge University Press (CUP). Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0031182004005219>. Acesso em: 05 abr. 2024.

SAMISH, M.; REHACEK, J. **Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control.** Annual Review of Entomology. 1999; 44:159-182.

SAMISH, M.; REHACEK, J. **PATHOGENS AND PREDATORS OF TICKS AND THEIR POTENTIAL IN BIOLOGICAL CONTROL.** Annual Review Of Entomology, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 159-182, jan. 1999. Annual Reviews. Disponível em: <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.159>. Acesso em: 05 abr. 2024.

SANTI, L.; SILVA, W. O. B. DA.; PINTO, A. F. M.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection.** 2009. Res. Microbiol. 160, 824–828. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.09.012>.

SANTOS, H. Q.; LINHARES, G. F. C.; MADRUGA, C. R. **Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e elisa.** Ciência Animal Brasileira, v. 2, n. 2, p. 133-137, 2001.

SANTOS, M. A. B.; MACEDO, L. O.; SOUZA, I. B.; RAMOS, C. A. N.; ALVES, L. C.; RAMOS, R. A. N.; CARVALHO, G. A. **Larvae of *Ixodiphagus* wasps (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil.** Ticks Tick Borne Dis. 2017, 8, 564–566.

SANTOS, T. R. B.; GONZALES, J. C.; CHIES, J. M.; FARIAS, N. A. R. **Transmissão transovariana de *Babesia bigemina*, (SMITH & KILBORNE, 1893) por partenóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 7, n. 1, p. 7-10, 1998.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. ***Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins.** Toxicon, [S.L.], v. 56, n. 7, p. 1267-1274, dez. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>. Acesso em: 05 abr. 2024.

SILVA, W. O. B. da; SANTI, L.; CORRÊA, A. P. F.; SILVA, L. A. D.; BRESCIANI, F. R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle.** Fungal Biology, [S.L.], v. 114, n. 11-12, p. 911-916, nov. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.007>. Acesso em: 05 abr. 2024.

SIMMONDS, P.; ADAMS, M. J.; BENKO, M.; BREITBART, M.; BRISTER, J. R. **Consensus statement: virus taxonomy in the age of metagenomics.** Nature Reviews

Microbiology, v. 15, p. 161-168, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.177.

SINGH D.; MATHEW I. L. **The Effect of *Bacillus thuringiensis* and Bt Transgenics on Parasitoids during Biological Control Centre for Environmental and Applied Entomology.** International. Journal. Pure Applied. Bioscience. 2015; 3(4):123-13.

SINGH, H.; MISHRA, A. K.; RAO, J. R. **Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines.** Tropical Animal Health and Production, v. 41, n. 2, p. 153-159, 2009.

SINGH, N. K.; JOHN, A. G.; PEREZ DE LEON, A. A. **Medical Parasitology and Zoology United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, USA** Bacteriol Parasitol 2016; 7:5.

SMITH, C.N.; COLE, M.M. **Studies of parasites of the American dog tick.** J. Econ. Entomol. 1943, 36, 569–572.

SMITH, E. H.; KENNEDY, G. G. **History of entomology.** In: **RESH, V. H.; CARDÂE, R. T. Encyclopedia of insects.** 2. ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009. p. 449-585.

SOARES, C. O.; SOUZA, J. C. P.; MADRUGA, C. R.; MADUREIRA, R. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. **Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOARES, L. A.; FIORINI, L. C.; DUARTE, F. C.; ALMEIDA, I. B. de; SAMPAIO, P. H. S.; ROMANO, D. M. de M.; MENDES, M. C. **Investigation of the parasitoid *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) ticks in the municipality of Salto, São Paulo, Brazil.** Arquivos do Instituto Biológico, [S.L.], v. 89, n. 1, p. 1-5, abr. 2022. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000112022>. Acesso em: 05 abr. 2024.

SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. **Characterization of cry genes in mexican *Bacillus***

*thuringiensis* strain collection. Applied Environmental Microbiology, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. **Molecular mechanisms of insecticide resistance.** In: TABASHNIK, B. E.; ROUSH, B. E. **Pesticide Resistance in Arthropods.** New York: Chapman & Hall, Inc., 1990. 58-96 p.

SOMEYA, N.; KATAOKA, N.; KOMAGATA, T.; HIRAYAE, K.; HIBI, T.; AKUTSU, K. **Biological Control of Cyclamen Soilborne Diseases by *Serratia marcescens* Strain B2.** Plant Disease, [S.L.], v. 84, n. 3, p. 334-340, mar. 2000. Scientific Societies. [8](#).

SOMEYA, N.; NAKAJIMA, M.; WATANABE, K.; HIBI, T.; AKUTSU, K. **Potential of *Serratia marcescens* strain B2 for biological control of rice sheath blight.** Biocontrol Science And Technology, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 105-109, fev. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150400016092>.

SORMUNEN, J. J.; SIPPOLA, E.; KAUNISTO, K. M.; VESTERINEN, E. J.; SÄÄKSJÄRVI, I. E. **First evidence of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitization in Finnish castor bean ticks (*Ixodes ricinus*).** Exp. Appl. Acarol. 2019, 79, 395–404.

SOUZA E. J.; REIS R. C. S.; BITTENCOURT V. R. E. P. **Evaluation of *in vitro* effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*.** 1999. Rev Bras Parasitol Vet 8:127–131

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; MASSARD, C. L. **Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio Paraíba.** Ciência Rural, v. 31, n. 2, p. 309-314, 2001.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A. H. **Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000a.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R.; CUNHA, N. C.;

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. **Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000b.

STAFFORD III, K. C.; DENICOLA, A. J.; MAGNARELLI, L. A. **Presence of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in two Connecticut populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae)**. J. Med. Entomol. 1996, 33, 183–188.

STILING, P.; CORNELISSEN, T. **What makes a successful biocontrol agent? A meta-analysis of biological control agent performance**. Biological Control, v. 34, n. 3, p. 236-246, Sept. 2005. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2005.02.017.

SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; VENZON, M.; FERNANDES, O. A. **Controle de artrópodes-praga com insetos predadores**. Controle Biológico de Pragas da Agricultura, Brasília, Df, v. 1, n. 1, p. 113-140, abr. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1121825/control-biologico-de-pragas-da-agricultura>. Acesso em: 25 ago. 2023.

SYMONDSON, W. O. C.; SUNDERLAND, K. D.; GREENSTONE, M. H. **Can generalist predators be effective biocontrol agents?** Annual Review of Entomology, v. 47, n. 1, p. 561-594, Jan. 2002. DOI:10.1146/annurev.ento.47.091201.145240.

SYMONDSON, W. O. C.; SUNDERLAND, K. D.; GREENSTONE, M. H.. **Can Generalist Predators be Effective Biocontrol Agents?** Annual Review Of Entomology, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 561-594, jan. 2002. Annual Reviews. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240>. Acesso em: 05 abr. 2024.

THOMAS, D. B.; TIDWELL, J. P.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. **In vitro efficacy testing of a commercial formulation of the acaropathogenic fungus *Metarhizium brunneum* Petch (Hypocreales: Clavicipitaceae) strain F52 against the southern cattle fever tick *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae)**. Subtrop. Agric. Environ. 2017, 68, 1–6.

TÓTH, A. G.; FARKAS, R.; GYURKOVSKY, M.; KRIKÓ, E.; SOLYMOSI, N. **First detection of *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Ixodes ricinus* ticks**

(Acari: Ixodidae) from multiple locations of Hungary. Sci. Rep. 2023, 13, 1624.

VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. Ro. de. **Controle de artrópodes-praga com fungos entomopatogênicos**. Controle Biológico de Pragas da Agricultura, Brasília, Df, v. 1, n. 1, p. 201-236, abr. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1121825/control-biologico-de-pragas-da-agricultura>. Acesso em: 26 ago. 2023.

VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P. **Augmentative biological control of arthropods in Latin America**. BioControl, v. 48, n. 2, p. 123-139, 2003.

VERÍSSIMO, C. J.; SILVA, R. G.; OLIVEIRA, A. A. D.; RIBEIRO, W. R.; ROCHA, U. F. **Contagens de instares do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos mestiços**. Boletim de Indústria Animal, v. 54, n.2, 1997. 21-26 p.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. **Diagnóstico em anaplasmose bovina**. Ciência Rural, v. 31, n. 2, p. 361-368, 2001.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Ectoparasites: Pathology, Biology and Control**. Second Edi. United Kingdom: Blackwell Science; 2001. p. 181-185.

WALTER, D. E.; PROCTOR, H. C. **Mites: ecology, evolution & behaviour**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. 486 p.

WANG, K.; YAN, P.; CAO, L.; DING, Q.; SHAO, C.; ZHAO, T. **Potential of Chitinolytic *Serratia marcescens* Strain JPP1 for Biological Control of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin**. Biomed Research International, [S.L.], v. 2013, p. 1-7, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/397142>.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. **Novel Babesia and Hepatozoon agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick**

***Ornithodoros guaporensis* in Brazil.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 7, n. 3, 2016. 449-456 p.

WOLSTENHOLME, A. J. **Glutamate-gated chloride channels.** The journal of Biological Chemistry, v 287, n. 48, 2012. 40232-40238 p.

WOOD, H. P. **Notes on the life history of the tick parasite *Hunterellus hookeri*.** Howard. J. Econ. Entomol. 1911, 4, 425–431.

YATES, D. M.; PORTILLO, V.; WOLSTENHOLME, A. J. **The avermectin receptors of *Haemonchus cotortus* and *Caenorhabditis elegans*.** International Journal for Parasitology, v. 30, n. 33, 2003. 1183-1193 p.

YODER, J.A.; KRIEGER, M.; OAKLEY, M.; TROTTER, J.; SCHMELZER, P.; NIKSIC, A.; RODELL, B.M.; KLEVER, L.A. **Growth characteristics and pathogenic consequences of predominant entomopathogenic Yukon soil fungi *Mortierella alpina* and *Penicillium expansum*, and effectiveness of Met52®, against larvae of the winter tick, *Dermacentor albipictus*.** Stud. Fungi 2019, 4, 94–103.

YU, V. L. ***Serratia marcescens*.** New England Journal Of Medicine, [S.L.], v. 300, n. 16, p. 887-893, 19 abr. 1979. Massachusetts Medical Society.  
<http://dx.doi.org/10.1056/nejm197904193001604>.

ZHIOUA, E.; HEYER, K.; BROWNING, M. **Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae).** Journal of Medical Entomology. 1999; 36(6):900-2.