

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGO NO CONTROLE  
BIOLÓGICO *in vitro* DE CARRAPATOS DE ANIMAIS  
DOMÉSTICOS

THAIS PREMOLI AZEVEDO

VILA VELHA-ES  
NOVEMBRO / 2015

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGO NO CONTROLE  
BIOLÓGICO *in vitro* DE CARRAPATOS DE ANIMAIS  
DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada a  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ciência Animal, para a  
obtenção do grau de Mestre em Ciência  
Animal

**THAIS PREMOLI AZEVEDO**

VILA VELHA - ES  
NOVEMBRO / 2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

A994a Azevedo, Thais Premoli.  
Ação de fungos nematófago no controle biológico *in vitro* de carrapatos de animais domésticos / Thais Premoli Azevedo. – 2015.  
37 f. : il.  
Orientadora: Flaviana Lima Guião Leite.  
Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2015.  
Inclui bibliografias.  
1. Bovino. 2. Carrapato. 3. Controle biológico. 4. Fungos. I. Leite, Flaviana Lima Guião. II. Universidade Vila Velha. III. Título.  
CDD: 636.2

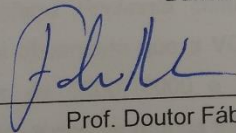
THAIS PREMOLI AZEVEDO

AÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NO CONTROLE  
BIOLÓGICO *in vitro* DE CARRAPATOS DE ANIMAIS  
DOMÉSTICOS

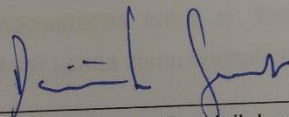
Dissertação apresentada a  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ciência Animal, para a  
obtenção do grau de Mestre em Ciência  
Animal

Aprovada em 27 de novembro de 2015,

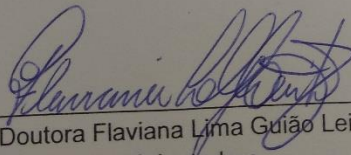
Banca examinadora:



Prof. Doutor Fábio Ribeiro Braga (UWV)



Prof. Doutor Dominik Lenz (UWV)



Prof. Doutora Flaviana Lima Guião Leite (UWV)  
Orientadora

## RESUMO

Azevedo, Thais Premoli; Msc; Universidade Vila Velha – ES; novembro 2015; Ação de fungos nematófago no controle biológico *in vitro* de carrapatos de animais domésticos; Orientadora: Flaviana Lima Guião Leite.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um carrapato que parasita principalmente bovinos, servindo de vetor para doenças como a babesiose e a anaplasmose que são transmitidas através da hematofagia, levando a perdas econômicas tanto pelo adoecimento dos animais quanto pela diminuição da produção. O aumento da resistência de carrapatos ao controle químico, juntamente com o risco de contaminação ambiental e alimentar, tem aumentado o interesse do uso de controle biológico para esses parasitos. Teleóginas de *R. microplus* foram coletadas de animais naturalmente infectados e divididas três grupos tratamento, sendo banhadas em cada grupo com 5000, 10000 e 15000 clamidósporos, e um grupo controle. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação *in vitro* do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (VC4) em teleóginas de *R. microplus*. Foi observado que a VC4 é capaz de infectar o *R. microplus* nas concentrações de 5000, 10000 e 15000 clamidósporos, havendo diferença estatística entre todos os grupos tratados quando comparados com o controle, mas não quando comparados entre si. Esses resultados demonstram a possibilidade da VC4 ser usada como controle biológico desses carrapatos.

**Palavras-chave:** bovinos, carrapato, controle biológico, fungos

## ABSTRACT

Azevedo, Thais Premoli; Msc; Universidade Vila Velha – ES; novembro 2015; Ação de fungos nematófago no controle biológico *in vitro* de carrapatos de animais domésticos; Orientadora: Flaviana Lima Guião Leite.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a tick that parasites mainly cattle and serve as vector to many diseases including babesiosis and anaplasmosis that are transmitted during hematophagous feeding, bringing economic losses due to animal sickness and decrease in production. The arising of resistance to substances used for chemical control, along with the risk of environmental and food contamination by these chemicals, has raised interest in biological control for ticks. Engorged females of *R. microplus* were collected from naturally infested animals and divided into three treatment groups, which were bathed in solutions containing 5000, 10000 and 15000 chlamydozoospores, and one treatment group. The present study aimed to evaluate the *in vitro* effect of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydozoosporia* on *R. microplus* engorged females. It was observed that *P. chlamydozoosporia* (VC4) was able to infect *R. microplus* ticks at concentrations of 5000, 10000 and 15000 chlamydozoospores, having statistical difference ( $p < 0.05$ ) between all treatment groups when compared to the control group but not when compared among themselves. These results suggest the possibility of VC4 to be used as a biological control for *R. microplus* ticks.

**Key words:** biological control, cattle, fungus, ticks

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                        | 5  |
| 1.1. <i>RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS</i> ..... | 5  |
| 1.2. CONTROLE QUÍMICO DE CARRAPATOS .....             | 8  |
| 1.3. CONTROLE BIOLÓGICO DE CARRAPATOS .....           | 9  |
| 1.4. FUNGOS NEMATÓFAGOS .....                         | 10 |
| <br>  |    |
| 2. ARTIGO CIENTÍFICO .....                            | 14 |
| ABSTRACT .....  | 14 |
| INTRODUCTION .....                                    | 15 |
| MATERIAL AND METHOD .....                             | 18 |
| RESULTS AND DISCUSSION .....                          | 19 |
| REFERENCES .....                                      | 23 |
| TABLES AND FIGURES .....                              | 28 |
| <br>  |    |
| 3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....                     | 32 |

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os carrapatos pertencem a classe Arachnida, subclasse Acari, Ordem Parasitiformes, Subordem Ixodida (Metastigmata) e dividido em duas famílias, a Ixodidae e Argasidae. Os carrapatos da família Ixodidae são denominados duros pois apresentam escudo quitinoso. Nesta família os carrapatos podem ter um, dois ou três hospedeiros (TAYLOR et al., 2010) e são vetores de vários microrganismos causadores de doenças de ampla extensão global, e por isso, de grande importância econômica (BITTENCOURT, 2000; TAYLOR et al., 2010).

Dentro da família Ixodidae, o *Boophilus microplus*, atualmente *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (TAYLOR et al., 2010), parasita principalmente bovídeos, podendo eventualmente parasitar outros animais como o cavalo, diversos animais de produção, e animais selvagens como o veado e o antílope (HOOGSTRAAL, 1956). Este carrapato pode ser encontrado por toda América do Sul até o sul dos Estados Unidos, Austrália, Ásia, Índias Ocidentais (TAYLOR et al., 2010) e no continente Africano (HOOGSTRAAL, 1956). O *R. microplus* possui ciclo de vida monóxeno (TAYLOR et al., 2010; MONTEIRO, 2011) dividido em fase parasitária e fase de vida livre (SANTOS & VOGEL, 2012). A fase parasitária tem duração de 21 a 22 dias (TAYLOR et al., 2010; MONTEIRO, 2011), iniciando no momento que a larva se fixa no hospedeiro (MORANDO & GELINSKI, 2010) e finalizando no momento em que a teleógina (fêmea ingurgitada) deixa o hospedeiro para fazer a oviposição no ambiente. Já a fase de vida livre ocorre no ambiente, e inclui desde a oviposição até a fixação da larva no hospedeiro (TAYLOR et al., 2010).

O ciclo de vida se inicia com a eclosão do ovo no ambiente, que ocorre de 14 a 146 dias, variando de acordo com temperatura e umidade (MONTEIRO, 2011). Após a eclosão, as larvas são exápodes (TAYLOR et al., 2010) e pequenas, tendo 0,6mm de comprimento e 0,42mm de largura



(COOLEY, 1946). A fase larval dura do 4<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de infestação se tornando em seguida metalarvas, fase que dura do 5<sup>o</sup> ao 13<sup>o</sup> dia (GONZALES et al., 1974).

As ninfas são maiores, tendo de 2,4 a 2,7mm de comprimento e 1,6 a 1,8mm de largura (COOLEY, 1946), são octópodes e tem o corpo oval com coloração que varia de castanha a azul-acinzentada e escudo laranja-acastanhado (TAYLOR et al., 2010). O estágio de ninfa pode durar do 9<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> de infestação se tornando em seguida metaninfas que se diferenciam em machos e fêmeas quando adultas (GONZALES et al., 1974).

Gonzales et al. (1974) descrevem que as metaninfas se diferenciam em machos, chamados de neandros que estão presentes entre 12<sup>o</sup> e o 15<sup>o</sup> dia de infestação, se tornando posteriormente gonandros, que permanecem no hospedeiro até o 38<sup>o</sup> dia. Já para se tornarem fêmeas, os mesmos descrevem que ocorre a muda para neóginas que são observadas do 14<sup>o</sup> a 23<sup>o</sup>, para partenóginas, observadas do 16<sup>o</sup> ao 34<sup>o</sup> dia, e para teleóginas que se desprendem do hospedeiro entre o 18<sup>o</sup> ao 35<sup>o</sup> dia. Uma vez no ambiente, as teleóginas iniciam a fase de pré-postura que dura até 3 dias, seguida da fase de postura que pode variar de 5 a 10 dias (THOMPSON, 1976), quando fazem a postura de 3000 a 4000 ovos. Ao fim da oviposição as fêmeas morrem se tornando quenóginas (MONTEIRO, 2011).

Os adultos possuem escudo quitinoso não ornamentado, corpo variando de oval a retangular, com pernas de cor creme (TAYLOR et al., 2010). A base do gnatossoma (ou capítulo) é curta, com formato hexagonal, os olhos estão presentes, os festões ausentes (MONTEIRO, 2011) e os espiráculos tem formato circular ou oval (TAYLOR et al., 2010). Os machos são diferenciados das fêmeas pois possuem suas placas adanais desenvolvidas e prolongamento caudal (MONTEIRO, 2011). Outra diferença é seu escudo, que se estende por toda cobertura dorsal, enquanto nas fêmeas está localizado apenas atrás do gnatossoma (TAYLOR et al., 2010).

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* está associado a perdas econômicas na pecuária bovina por ser um parasita hematófago vetor de várias doenças. Primeiramente, a picada do carrapato causa irritação local,

com regiões hiperêmicas e produção de exsudato (GONZALES et al., 1974), servindo como porta de entrada para infecções secundárias, formação de miíases, e causando lesões que diminuem a qualidade e valor do couro (MONTEIRO, 2011). Além disso, ao se alimentar, cada fêmea pode chegar a sugar 1,5 ml de sangue, podendo desenvolver um quadro de anemia no bovino, diminuindo a produção de carne e leite (MONTEIRO, 2011). Ao se alimentar, o *R. microplus* também pode servir de vetor e transmitir os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a reckettsia *Anaplasma marginale* (TAYLOR et al., 2010; MONTEIRO, 2011). Esses hemoparasitas se multiplicam nas glândulas salivares dos carrapatos, sendo transmitidos durante a hematofagia (KOCAN, 1995). A transmissão pode ocorrer em todos os estágios da vida do carrapato, pois esses microrganismos tem a capacidade de atravessar a barreira transovariana, infectando as gerações seguintes (TAYLOR et al., 2010). Uma vez infectados, os hemoparasitas podem permanecer no carrapato por longos períodos de tempo pois se tornam dormentes enquanto seu hospedeiro, o carrapato, está inativo. Sendo assim, os carrapatos portadores desses microrganismos se tornam reservatórios dessas doenças no ambiente (KOCAN, 1995).

A babesiose bovina pode ser causada tanto pela *Babesia bovis* quanto pela *Babesia bigemina*, sendo uma doença endêmica no Brasil (FERNANDES et al., 2011). A *B. bovis* é a mais patogênica e virulenta das babesias, tendo como sinais clínicos febre, anemia, depressão, hemoglobinúria e deposição de hemácias nos pequenos capilares, que, quando no cérebro, resulta em anóxia e lesão tecidual, causando incoordenação, agressão e convulsão, sendo, nestes casos, fatal. A *B. bigemina*, por sua vez, é menos virulenta e bovinos geralmente são resistentes e não apresentam a doença clínica, sendo esta mais comum em animais mais velhos. (TAYLOR et al., 2010). Rios-Tobón et al. (2014) descrevem a presença de infecção de *Babesia sp.* em 89% dos carrapatos analisados provenientes de fazendas na Colômbia, sendo 79% infectados somente com *B. bigemina* e 10% com infecção mista de *B. bigemina* e *B. bovis*. A *Anaplasma marginale*, por sua vez, causa anemia aguda seguida de anemia hemolítica. Os bezerros com menos de um ano normalmente apresentam sinais clínicos moderados, aumentando a sua

patogenia e virulência de acordo com que o animal envelhece. Os sinais clínicos incluem depressão, fraqueza, dispnéia, desidratação, ruminação reduzida, icterícia, redução na produção do leite, aborto e morte (TAYLOR et al., 2010).

A diminuição da produção (resultante da perda de peso, retardo no crescimento e redução da produção de leite) ocasionadas pelo parasitismo de carrapatos, tem gerado perda econômica perceptível aos produtores pecuários, levando-os a implementar medidas de combate ao carrapato com intuito de diminuir a carga parasitária nos animais, aumentando assim sua produção (Da ROCHA et al., 2011).

## **1.2. Controle químico de carrapatos**

Para o controle do *R. microplus*, os acaricidas químicos tem sido o principal método de escolha (OJEDA-CHI et al., 2010), porém, como o tratamento é, por muitas vezes, realizado pelos próprios produtores, sem haver orientação médica-veterinária (CAMILLO et al., 2009), o manejo inadequado se torna um importante fator no desenvolvimento de resistência parasitária (SANTOS & VOGEL, 2012). Sendo assim, a grande importância econômica do *B. microplus* (BORGES et al., 2007), juntamente com a superpopulação de carrapatos (SANTOS & VOGEL, 2012) e a pressão de seleção (BORGES et al., 2007; SANTOS & VOGEL, 2012) por uso indiscriminado de produtos químicos, tem levado ao desenvolvimento de carrapatos resistentes a essas drogas (OJEDA-CHI et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

A resistência de carrapatos a carrapaticidas tem sido demonstrada através de vários estudos. Castro-Janer et al. (2010) evidenciaram a resistência do *B. microplus* ao fipronil em fazendas no Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e São Paulo que utilizavam esse princípio ativo para o controle de ectoparasitas. Por sua vez, Castro-Janer et al. (2011) constataram a presença larvas de *B. microplus* resistentes a ivermectina e ao fipronil oriundos de fazendas do Uruguai. A resistência do *B. microplus* a piretróides

(deltametrina e cipermetrina) foi comprovada por Fernandes (2011) em fazendas no estado de Goiás em estudo com larvas desta espécie. Por fim, Borges et al. (2007) também observaram resistência de carrapatos no estado de Goiás a deltametrina e a cipermetrina, mas dessa vez em larvas de *Rhipicephalus sanguineus*, assim como larvas resistentes ao coumafós (organofosforado).

Além do aparecimento de carrapatos resistentes, o uso de controle químico também tem como desvantagem o risco para a saúde de humanos e animais assim como a contaminação do meio ambiente. O uso de acaricidas leva ao acúmulo de resíduos tóxicos no leite e na carne bovina, levando a contaminação do alimento e risco a saúde pública (CASTRO-JANER et al., 2010; OJEDA-CHI et al. 2010; CAMARGO et al., 2012), além de risco de contaminação ambiental (CAMARGO et al., 2012). Além dos problemas já citados, a intoxicação animal (CASTRO-JANER et al., 2010) e o elevado custo do controle químico (MONTEIRO, 2011) tem levado ao aumento de interesse e estudos sobre o controle biológico como alternativa para o controle de carrapatos (HAJEK & St. LEGER, 1994; GRONVOLD et al., 1996; MONTEIRO, 2011; CAMARGO et al., 2012).

### **1.3. Controle biológico de carrapatos**

O controle biológico constitui na utilização de predadores naturais que atacam os diferentes estágios de vida do organismo alvo para o controle populacional de plantas e animais (GRONVOLD et al., 1996; PARRA et al., 2002; MONTEIRO, 2011). Na atividade pecuária o controle biológico é utilizado para manter endo e ectoparasitas em densidade aceitáveis, não causando danos clínicos aos animais nem perdas econômicas (GRONVOLD et al., 1996).

Os fungos entomopatogênicos têm sido utilizados para o controle biológico de carrapatos (ANGELO et al., 2010; FERNANDES et al., 2012) pois são capazes de penetrar a cutícula de insetos (HAJEK & St. LEGER, 1994, MONTEIRO, 2011). A secreção de enzimas como a protease e a quitinase

permite que o fungo transpasse a cutícula do carrapato e atinja seus órgãos internos, levando-o a morte (MONTEIRO, 2011, FERNANDES et al., 2012). Esta característica os faz levar vantagem sob outros organismos antagonistas que requerem a ingestão do patógeno, já que a infecção por via oral em artrópodes hematófagos é rara (HAJEK & St. LEGER, 1994, MONTEIRO, 2011)

As diferenças no ciclo de vida, hospedeiros e comportamento entre espécies de carrapatos faz com que exista também variação na sua interação com diversas espécies de fungos, e conseqüentemente, na eficácia destes em seu controle biológico (FERNANDES et al., 2012), existindo a necessidade de descobrir e desenvolver novos fungos para o controle biológico desses parasitas (ANGELO et al., 2010; FERNANDES et al., 2012).

#### **1.4 Fungos nematófagos**

Os fungos são organismos que podem crescer como célula única ou multicelular que, assim como as plantas, possuem parede celular mas não são capazes de fazer fotossíntese, sendo assim, existem como agente saprófita ou parasita obrigatoriamente (CARTER, 1988). No ambiente esses fungos atuam na reciclagem de carbono e nitrogênio do solo provenientes da biomassa de nematóides. A habilidade desses fungos de capturar e destruir nematóides tem chamado a atenção para a seu potencial no controle biológico, sendo que Zopf, em 1888, foi o primeiro a observar o hábito predatório desses fungos (GRAY, 1987).

Os fungos nematófagos englobam mais de 150 espécies sendo dividido em três grupos: predadores de nematóides, endoparasitos e oportunistas (parasitos de ovos) (GRAY, 1987; NORDBRING-HERTZ et al., 2006; MONTEIRO, 2011). Os fungos nematófagos predadores constituem o maior grupo e são capazes de formar armadilhas ao longo de suas hifas para capturar os nematoides mecanicamente ou por adesão (GRAY, 1987). Essas estruturas podem ser em forma de anéis, botões, hifas ou redes tridimensionais adesivas, e uma vez aprisionado, o nematoide tem sua

cutícula penetrada por hifas e seu conteúdo interno digerido (NORDBRING-HERTZ et al., 2006; MONTEIRO, 2011). Os mecanismos que permitem esses fungos invadir e digerir o hospedeiro incluem enzimas capazes de interferir na integridade estrutural do hospedeiro, e toxinas que interferem em seu sistema regulatório e inibem certos processos fisiológicos e enzimas (HAJEK & St. LEGER, 1994).

Enquanto os predadores, em sua maioria, conseguem viver de forma saprófita, os fungos endoparasitos são, predominantemente, parasitos obrigatórios, dependendo dos nematoides como substrato para sua alimentação (GRAY, 1987; NORDBRING-HERTZ et al., 2006;). Esses microrganismos não produzem hifas fora do corpo do hospedeiro, mas existem como conídios que, ao serem ingeridos, desenvolvem hifas que se alimentam do conteúdo interno do seu hospedeiro. Por fim, as hifas rompem o corpo do organismo parasitado e terminam seu ciclo reprodutivo formando conídios (GRAY, 1987; MONTEIRO, 2011).

Os fungos nematófagos oportunistas tem ação ovicida e é o grupo mais promissor para a utilização como controle biológico, pois, quando comparado com os fungos predadores e endoparasitos, é mais eficiente no controle da população de nematoides (MONTEIRO, 2011). Lysek and Krajc (1987) descrevem o parasitismo do ovo como iniciando com a fase de contato, onde provavelmente há ação de enzimas, já que não foi observado órgão de penetração nesse estágio. Seguindo para o estágio de adesão, quando o fungo forma o órgão de penetração (apressório) na superfície do ovo, capaz de atravessar sua camada quitinosa. Os autores acreditam que enzimas também estejam presentes nesta fase. Os autores seguem relatando que após a penetração ocorre então a formação de hifas no interior do ovo, e se inicia a fase de consumo. MONTEIRO (2011, p.288) descreve a classificação dos fungos nematófagos de acordo com sua atividade ovicida em três tipos: (1) efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo; (2) efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo; e (3) efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca e colonização interna do ovo.

O fungo *Pochonia chlamydosporia* (antigamente *Verticillium chlamydosporium*) (NORDBRING-HERTZ et al., 2006; MONTEIRO, 2011;),

está se destacando entre os fungos ovicida por seu potencial para utilização no controle biológico de nematoides. O fungo *P. Chlamydosporia* atua penetrando nos ovos através do apressório e digerindo o conteúdo do ovo (NORDBRING-HERTZ et al., 2006). Estudos recentes têm demonstrado a capacidade ovicida deste fungo, como por exemplo, por Silva et al. (2010a), que demonstram sua eficácia na destruição in vitro de ovos de *Trichuris vulpis*. Braga et al. (2010) por sua vez, demonstram a atividade ovicida tipo 3 do *P. Chlamydosporia* quando parasitando ovos de *Toxocara (Neoascaris) vitulorum*, o que também foi observado por Silva et al. (2010b) em ovos de *Anoplocephala perfoliata*, e por Braga et al. (2008) em ovos de *Eurytrema coelomaticum*. Já Araújo et al. (2009) observaram além da atividade ovicida tipo 3, também os tipos 1 e 2 quando interagindo com ovos de *Dipylidium caninum*.

Recentemente os fungos nematófagos têm sido considerados também como controle biológico de artrópodes. Braga et al. (2013) demonstraram interação entre o fungo nematófago *D. flagrans* e o carrapato *Amblyomma cajenense*. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* em telógenas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## 2. Artigo científico

Este artigo científico foi elaborado seguindo as normas da revista International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.

### Original Research Article

*In vitro* activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*  
on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks

**Thais Premoli Azevedo<sup>1</sup>, Emy Hiura<sup>1</sup>, Aline Del Carmen Lopes<sup>1</sup>, Manuela Colares<sup>1</sup>, Dominik Lenz<sup>1</sup>, Flaviana Lima Guião Leite<sup>1</sup>, Fabio Ribeiro Braga<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Vila Velha, Vila Velha ES, Brazil

\*Corresponding author email id: [thaispremoli@hotmail.com](mailto:thaispremoli@hotmail.com)

#### **Abstract**

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a tick that parasites mainly cattle and serve as vector to many diseases including babesiosis and anaplasmosis that are transmitted during hematophagous feeding, bringing economic losses due to animal sickness and decrease in production. The arising of resistance to substances used for chemical control, along with the risk of environmental and food contamination by these chemicals, has raised interest in biological control for ticks. Engorged females of *R. microplus* were collected from naturally infested animals and divided into three treatment groups, which were bathed in solutions containing 5000, 10000 and 15000 chlamydospores, and one treatment group. The present study aimed to evaluate the *in vitro* effect of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *R. microplus* engorged females. It was observed that *P. chlamydosporia* (VC4) was able to infect *R. microplus* ticks at concentrations of 5000, 10000 and 15000 chlamydospores, having



statistical difference ( $p < 0.05$ ) between all treatment groups when compared to the control group but not when compared among themselves. These results suggest the possibility of VC4 to be used as a biological control for *R. microplus* ticks.

**Key words:** biological control, cattle, fungus, ticks

## **Introduction**

The *Boophilus microplus*, currently *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, is a hard tick that parasites mainly cattle (Taylor et al., 2010), but that can eventually be found parasitizing other domestic and wild animals (Hoogstraal, 1956). Its one-host life cycle can be divided into two phases, a parasitic and a free-living phase (Santos & Vogel, 2012). The parasitic phase begins at the moment the larvae fixates itself on the host and ends once the engorged female leaves the host to lay eggs on the environment. In its turn, the free-living phase occurs on the environment and it includes from oviposition to the moment the larvae settles on the host (Taylor et al., 2010).

The identification of the *R. microplus* ticks can be accomplished through its anatomic characteristics. The adults have a round to rectangular body, cream coloured legs and non-ornamented chitinous dorsal plate, or scutum. In females the dorsal plate is placed only in a small portion of the scutum while in males it covers all dorsal surface of the plate (Taylor et al., 2010). Other differences between males and females are the caudal developed adanal shields and caudal process present only in males. In these ticks the eyes are present, the festoons absent, the capitulum is short with a hexagonal base (Monteiro, 2011) and the spiracular plate is round or oval shaped (Taylor et al., 2010).

The *R. microplus* tick is a vector to many diseases, such as *Babesia bovis* and *bigemina* and *Anaplasma marginale* that are transmitted through its hematophagous feeding (Gonzales et al., 1974; Taylor et al., 2010). These diseases can cause symptoms ranging from anemia, dehydration and weight loss to convulsion and death, causing economic losses due to abortions and reduction in milk production and weight gain (Taylor et al., 2010).

To control *R. microplus* populations, the use of chemical acaricides has been the main method of choice (Ojeda-Chi et al., 2010). However, cattle farmers tend to use these chemicals without a veterinarian's orientation (Camillo et al., 2009), resulting in, many times, wrong management of pest control, which causes the ticks to develop resistance to these acaricides (Ojeda-Chi et al., 2010; Camargo et al., 2012). Another downside of chemical acaricides use besides causing resistance problems is its effect on human health and the environment. The use of these substances leads to the accumulation of toxic residues in the meat and milk of cattle causing the contamination of food and the environment becoming a health hazard (Castro-Janer et al., 2010; Ojeda-Chi et al. 2010; Camargo et al., 2012). In association with the problems already mentioned, the high cost of chemical control along with the risk of animal intoxication, has led to an increase in interest in using biological control as an alternative to tick control (Hajek & St. Leger, 1994; Gronvold et al. 1996; Monteiro, 2011; Camargo et al., 2012).

At livestock farms, biological control is used to keep endo and ectoparasites at sub-clinical densities, so it will not cause damage to the animals' health or economic loss to the producers (Gronvold et al. 1996). For the biological control of ticks, entomopathogenic fungi have been the preferential choice (Angelo et al., 2010;

Fernandes et al., 2012). These fungi are able to secrete enzymes that allows them to pass through the tick's cuticle and reach its internal organs, causing its death (Monteiro, 2011; Fernandes et al., 2012). New research has shown that the nematophagous fungi are also effective when used as biological control for ticks (Braga et al., 2013).

The nematophagous fungi feed on both eggs and worms and can be divided in three groups: (1) trapping or predatory, that created traps with their hyphae to trap and kill the nematode; (2) endoparasites, that attack the nematodes with their spores, that can either be ingested or adhered to the surface of nematodes; and (3) egg-parasitic, that use an structure called apressoria to break through the eggs' shell to feed on its interior content (Nordbring-Hertz et al., 2006).

Among the nematophagous fungi, the specie *Pochonia chlamydosporia* has attracted attention to its potential to be used as biological control of nematodes due to its capacity to prey on eggs (Araújo et al. 2009; Braga et al. 2010; Silva et al. 2010a,b). But Braga et al (2013) has recently opened a new door for biological control of ticks when he used a nematophagous fungus, *Duddingtonia flagrans*, to infect and kill engorged females of the tick *Amblyomma cajenense*. Therefore, the aim of the present paper was to analyse the efficiency of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* for the biological control of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## Material e Methods

### Fungi

The nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (VC4) used was isolated and kept at a B.O.D. incubator at  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  and  $80 \pm 10\%$  relative humidity. The number of chlamydospores in three aliquots of  $10\mu\text{l}$  of the fungi solution was counted and the average was calculate to discover the amount of chlamydospores/ml.

### Experimental Assay

Engorged females of *R. microplus* were collected from naturally infested animals and divided into three treatment and one control group, having eight ticks in each group. The ticks were first washed in distilled water and after in a 70% alcohol solution. They were then dried in paper towels and lastly fixated to Petri dishes.

The ticks from treatment group 1, 2 and 3 were bathed in a fungi solution containing 5,000 (VC4-A), 10,000 (VC4-B) and 15,000 (VC4-C) chlamydospores, respectively, for about 10 seconds before being fixated to a Petri dish. The control group, on the other hand, was bathed in distilled water for 10 seconds before being fixated. A wet cotton ball with distilled was placed in each Petri dish which were then wrapped in Pvc paper and incubated at  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  and  $80 \pm 10\% \text{RH}$ .

The confirmation of the presence of *P. chlamydosporia* on the *R. microplus* was accomplished two ways. First, the hyphae present in the tick's cuticle was scraped off and inoculated into two Petri dishes, one containing agar-agar at 2% (WA2%) and one

containing potato dextrose, and incubated at  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  and  $80 \pm 10\% \text{ RH}$ . The fungi colony was then placed into a test tube containing distilled water, the solution was stirred and aliquots of  $10\mu$  each were observed under a microscope to find chlamydo spores. The same process was repeated but this time a tick with visible hyphae was placed in the test tube with distilled water to search for chlamydo spores.

### Statistical analysis

The average and standard deviation of each treatment group was calculated for each day and total number of infected ticks. The data was interpreted statistically by analysis of variance at significance levels of 1 and 5% probability followed by the Tukey test (Ayres et al., 2003), using the program BioEstat 5.0.

## Results and Discussion

During this experiment, it was observed that the first sign of the infection of the *P. chlamydo sporia* fungus on *R. microplus* ticks is the manifestation of small white dots all over the ticks' scutum, at this time no visible hyphae is present. As *P. chlamydo sporia* continues to spread through the host, the presence of white, cotton like hyphae starts to be noticed, as well as a change in colour of the tick's body to a dark brown (Figure 1). It was also observed that after the tick changes colour and the hyphae becomes visible, it dies and its insides are digested, becoming a dark red/brown liquid.

On the treatment groups, only one tick in the VC4-B group showed visible hyphae without first having the presence of white dots in its scutum, this same tick was the only one that did not lay any eggs, showing a higher predisposition to the fungal infection than the other ticks, which was also described by Perinotto et al (2012) . In their study, the authors observed statistical difference ( $p>0.05$  and  $p>0.01$ ) for the biological parameters evaluated between two different *R. microplus* populations with the same fungi concentration of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, coming to the conclusion that the ticks' predisposition to fungal infection was the probable reason for the results. None of the ticks in the control group presented white dots or visible hyphae in their bodies.

Table 1 shows the average number of *R. microplus* ticks that were infected by *P. chlamydosporia* on the treatment and control groups considering all observation days. All treatment groups showed statistical difference ( $p<0.05$ ) when compared to the control group, but did not show statistical difference when compared to one another.

Table 2, on the other hand, shows the average number of *R. microplus* ticks that were infected by *P. chlamydosporia* on the treatment and control groups for each observation day. On the first observation day that was no statistical difference ( $p<0.05$ ) between the treatment and control groups, and among the control groups. However, from the second observation date to the sixth it was observed statistical difference when comparing the treatment groups to the control group, but not when comparing the treatment groups among themselves.

The results from Table 1 and 2 demonstrates that even though *P. chlamydosporia* is a nematophagous fungus it is capable of infecting *R. microplus*. This ability may be due to the secretion chitinases and proteases (Esteves et al., 2009), which helps this fungus penetrate the scutum of the ticks and reach its internal organs. It also indicates that a solution with 5000 chlamydospore concentration is sufficient to successfully infect *R. microplus*. Braga et al. (2013) also suggested that the nematophagous fungus *D. flagrans* was able to infect *A. cajennense* ticks with the help of chitinases.

In Figure 2 the percentage of ticks with visible hyphae for each treatment group on different observation days is shown. Throughout the experiment, the ticks in the control group did not have any visible hyphae in their bodies, differently from the treatment groups, where all concentrations of VC4 showed ticks with visible hyphae. On the first observation day no ticks presented visible hyphae, while on the second day it was noticed in only one tick in the VC4-B group. From the third day forward, all treatment groups had ticks presenting hyphae. As time progressed it was perceived that the higher the concentration of chlamydospores in the treatment group, the higher the percentage of the ticks in that group with visible hyphae in their scutum.

Since the visible hyphae also indicated mortality, at the sixth observation day a 37.5, 62.5 and 75 percentage of mortality could be observed for the VC4-A, VC4-B and VC4-C concentrations respectively. Studies with biological control of *R. microplus* using entomopathogenic fungi showed a higher control percentage when compared to the present one using a higher solution concentration. Athayde et al. (2001) observed a control percentage of female adults of *R. microplus* of 91% when using *M. flavoviride*, 86% when using *M. anisopliae*, and 89% when using *B. bassiana* at  $10^8$

conidia/ml concentration. In their turn, Frazzon et al. (2000) described a control percentage of 10-29% for *M. flavoviride* and 38-49% for *B. bassiana* for engorged females at  $10^7$  and  $10^8$  conidia/ml concentration. Furthermore, Ojeda-Chi et al. (2010) detected an efficiency of 65-100% for 2 strains of *M. anisopliae* at concentrations of  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  conidia/ml. Angelo et al. (2010) was the only one to obtain a lower control percentage of 3-41% for different concentrations of *L. lecanii* ranging from  $10^5$  to  $10^8$  conidia/ml for engorged females.

After isolating the fungi from infested tick on a Petri dish containing WA2%, it was observed that the colony that grew on the agar had similar cotton-like appearance from the fungi that developed on the ticks. From the fungi colony and distilled water solution seen under a microscope (Figure 3), it was also observed a chlamyospore measuring 30  $\mu\text{m}$  (Braga, 2008) with similar characteristics to those found in the solution of isolated VC4, and that it was intact and viable, indicating that *P. chlamydosporia* was responsible for the infection of the tested *R. microplus*. On the other hand, no chlamyospores were observed under the microscope for the tick and distilled water solution. The difficulty to find chlamyospore for both solution can be explained by the short time elapsed between the appearance of visible hyphae and inoculation of the fungi in the WA2%, and the day the test was performed, which was only 6 days. Therefore, it may not have been enough time to produce a high number of chlamyospores, making it difficult to be observed under the microscope.

In conclusion, the present study demonstrated that *Pochonia chlamydosporia* is able to infect and kill *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks, and therefore, has promising potential to be used as a biological control for these parasites.



## References

Alonzo-Diaz, M.A., Garcia, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutierrez, R., Angel-Sahagun, C.A., Rodriguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sanchez, H., 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 147: 336-340.

Angelo, I.C., Fernandes, E.K.K., Bahienses, T.C., Perinotto, W.M.S., Moraes, A.P.R., Terra, A.L.M., Bittencourt, V.R.E.P., 2010. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 172: 317-322.

Araujo, J.M., De Araujo, J.V., Braga, F.R., Carvalho, R.O., Ferreira, S.R., 2009. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. *Veterinary parasitology*. 166: 86-89.

Athayde, A.C.R., Ferreira, U.L., Lima, E.A.L.A., 2001. Fungos entomopatogênicos: uma alternativa para o controle do carrapato bovino – *Boophilus microplus*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 21: 12-15.

Ayres, M., Ayres J.R.M., Ayres, D.L., Santos A.S., 2003. Aplicações Estatísticas Nas Áreas De Ciências Biológicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá: Brasília Cnpq. 290.

Braga, F. R., 2008. Ação In Vitro do fungo da espécie *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* sobre os ovos de Fasciola hepática e *Schistosoma mansoni*. Dissertação (Magister Scientiae). Universidade Federal de Viçosa, pós-graduação em Medicina Veterinária. Viçosa, Minas Gerais.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Araujo, J.M., Tavela, A.O., Carvalho, L.M., Mello, I.N.K., Paula, A.T., Lelis, R., Queiroz, J.H., 2013. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterization of its chitinase, Biocontrol Science and Technology.

Braga, F.R., Ferreira, S.R., Araújo, J.V., Araujo, J.M., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Campos, A.K., Freitas, L.G., 2010. Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (syn. *Neoascaris*) *vitulorum* eggs. Tropical Animal Health and Production. 42: 314.

Camargo, M.G., Golo, P.S., Angelo, I.C., Perinotto, W.M.S., Sá, F.A., Quinelato, S., Bittencourt, V.R.E.P., 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. Veterinary Parasitology. 188: 140-147.

Camillo, G., Vogel, F.F., Sangioni, L.A., Cadore, G.C., Ferrari, R., 2009. Eficiência *in vitro* de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural. 39 (2): 490-495.

Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T.S., 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. *Veterinary Parasitology*. 173: 300-306.

Esteves, I., Peeteira, B., Atkins S.D., Magan, N., Kerry, B., 2009. Production of extracelular enzymes by diferente isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*. 113: 867-876.

Fernandes, E.K.K., Bittencourt, V.R.E.P., Robets, D.W., 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*. 130: 300-305.

Frazzon, A.P.G., Junior, I.S.V., Massuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 94: 117-125.

Gonzales, J.C., Da Silva, N.R., Wagner, E.M., 1974. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (CAN. 1887) em bovinos estabulados. *Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS. Porto Alegre*. 2 (1): 25-34.

Gronvold, J., Henriksen, S.A., Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., 1996. Biological control: Aspects of biological control- with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated livestock. *Veterinary Parasitology*. 64: 47-64.

Hajek, A.E., St. Leger, R.J., 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.

Hoogstraal, H., 1956. African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan (with Special Reference to Equatoria Province and with Preliminary Reviews of the Genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*. Dept. of the Navy, Bureau of Medicine and Surgery, Washington,DC.

Monteiro, S.G., 2011. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 1ª Ed. São Paulo: Roca. P. 356.

Nordbring-Hertz, B., Tunlid, A., Jansson, H.B., 2006. Nematophagous fungi. **Encyclopedia of Life Sciences**. Em: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0004293>. Acesso em: 18 de novembro de 2015.

Ojeda-Chi, M.M., Rodriguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary parasitology*. 170 (3-4): 348-354.

Perinotto, W.M.S., Angelo, I.C., Golo, P.S., Quinelato, S., Camargo, M.G., Sá, F.A., Bittencourt, V.R.E.P., 2012. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology*. 130: 257-260.

Santos, F.C.C., Vogel, F.S.F., 2012. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente ao amitraz e cipermetrina em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul de 2005 a 2011. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 107: 121-124.

Silva, A.R., Araujo, J.V., Braga, F. R., Alves, C.D.F., Frassy, L.N., 2010a. In vitro ovicida activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia clamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Veterinary Parasitology*. 172:76-79.

Silva, A.R., Araújo, J.V., Braga, F.R., Alves, C.D.F., Filho, J.D.R., 2010b. Destruction of *Anoplocephala perfoliata* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Journal of Equine Veterinary Science**. 30(12).

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2010. *Parasitologia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 198.

## Tables and Figures

Table 1: Average and standard deviation of *Pochonia chlamydosporia* infecting *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks for treatment and control groups.

|                 | Treatment              | Control            |
|-----------------|------------------------|--------------------|
| <b>VC4-A*</b>   | 4.3 ± 2.2 <sup>A</sup> | 0 ± 0 <sup>B</sup> |
| <b>VC4-B**</b>  | 5.3 ± 2.2 <sup>A</sup> | 0 ± 0 <sup>B</sup> |
| <b>VC4-C***</b> | 6.7 ± 3.3 <sup>A</sup> | 0 ± 0 <sup>B</sup> |

Values followed by the same letter in the same row and column do not show statistical difference ( $p < 0.05$ ). \*concentration of 5,000 chlamydo-spores; \*\*concentration of 10,000 chlamydo-spores; \*\*\*concentration of 15,000 chlamydo-spores.

Table 2: Average and standard deviation of *Pochonia chlamydosporia* infecting *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks for treatment and control groups on different observation days.

| Days     | VC4-A*                 | VC4-B**                | VC4-C***           | Control            |
|----------|------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>1</b> | 0 ± 0 <sup>A</sup>     | 0,1 ± 0,3 <sup>A</sup> | 0 ± 0 <sup>A</sup> | 0 ± 0 <sup>A</sup> |
| <b>2</b> | 0,6 ± 0,5 <sup>B</sup> | 0,8 ± 0,4 <sup>B</sup> | 1 ± 0 <sup>B</sup> | 0 ± 0 <sup>A</sup> |
| <b>3</b> | 0,6 ± 0,5 <sup>B</sup> | 0,8 ± 0,4 <sup>B</sup> | 1 ± 0 <sup>B</sup> | 0 ± 0 <sup>A</sup> |
| <b>4</b> | 0,6 ± 0,5 <sup>B</sup> | 0,8 ± 0,4 <sup>B</sup> | 1 ± 0 <sup>B</sup> | 0 ± 0 <sup>A</sup> |
| <b>5</b> | 0,6 ± 0,5 <sup>B</sup> | 0,8 ± 0,4 <sup>B</sup> | 1 ± 0 <sup>B</sup> | 0 ± 0 <sup>A</sup> |
| <b>6</b> | 0,8 ± 0,4 <sup>B</sup> | 0,9 ± 0,3 <sup>B</sup> | 1 ± 0 <sup>B</sup> | 0 ± 0 <sup>A</sup> |

Values followed by the same letter in the same row and column do not show statistical difference ( $p < 0.05$ ). \*concentration of 5,000 chlamydo-spores; \*\*concentration of 10,000 chlamydo-spores; \*\*\*concentration of 15,000 chlamydo-spores.

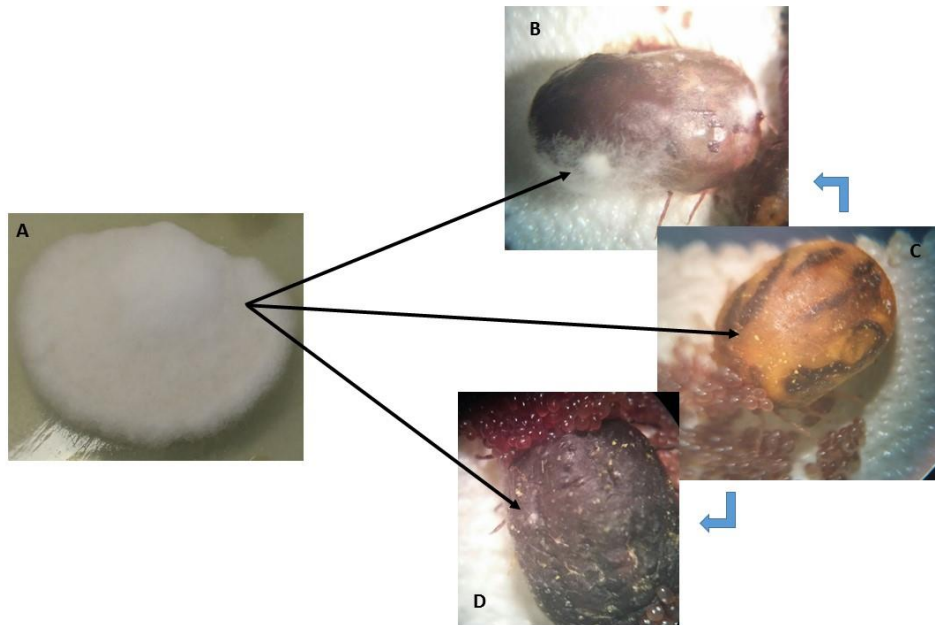


Figure 1: *P. chlamydosporia* parasitizing *R. microplus* ticks

(A) *P. chlamydosporia* isolated from infected tick; (B and D) *R. microplus* with visible hyphae; (C) *R. microplus* without visible hyphae; Black arrows indicates ticks parasitized with *P. chlamydosporia*; Blue arrows indicates evolution from non-visible hyphae to visible hyphae.

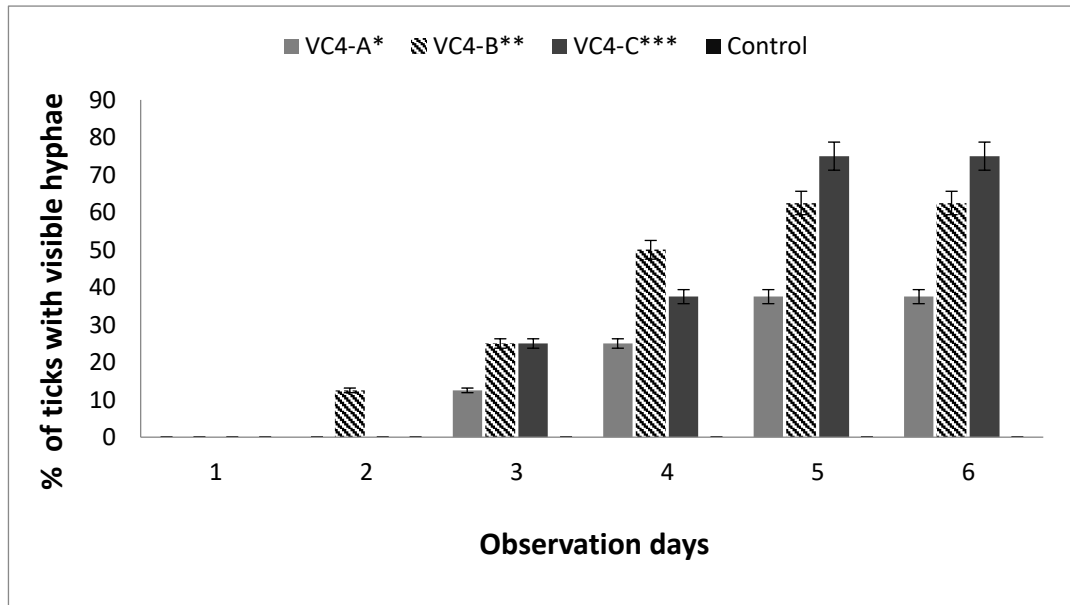


Figure 2: Percentage of ticks with visible hyphae for each treatment group on different observation days.

\*concentration of 5,000 chlamydo spores; \*\*concentration of 10,000 chlamydo spores; \*\*\*concentration of 15,000 chlamydo spores.



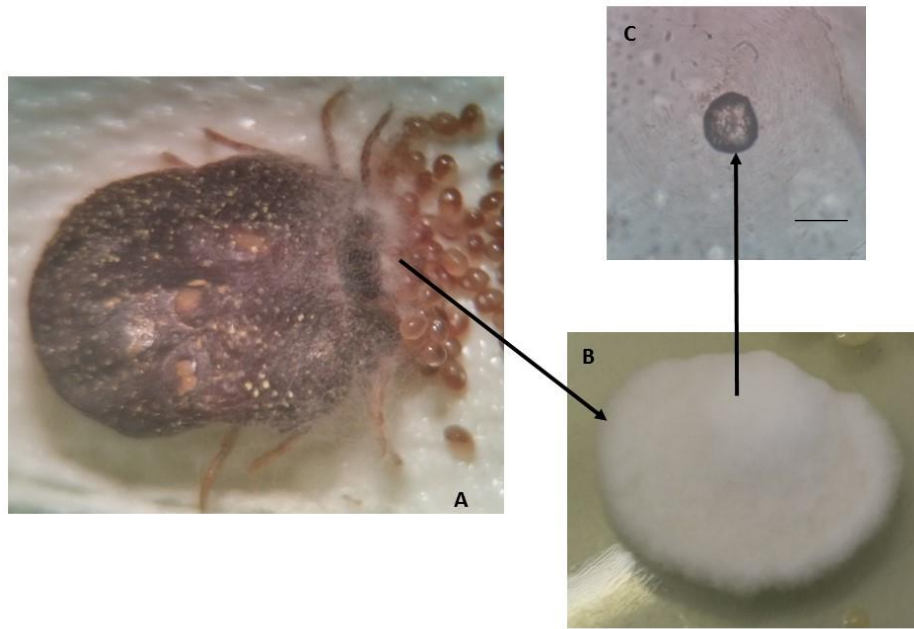


Figure 3: *R. microplus* infected with *P. chlamydosporia*.

(A) *R. microplus* infected with *P. chlamydosporia*; (B) *P. chlamydosporia* isolated from infected tick;

(C) Chlamydospore of *P. chlamydosporia* colony observed under a microscope. Bar = 30  $\mu\text{m}$

### 3. Referência Bibliográfica

ALONZO-DIAZ, M. A.; GARCIA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGUN, C. A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 336-340, 2007.

ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIENSES, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; MORAES, A. P. R.; TERRA, A. L. M., BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.

ARAUJO, J. M.; De ARAUJO, J. V.; BRAGA, F. R.; CARVALHO, R. O.; FERREIRA, S. R. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. **Veterinary parasitology**, 166, p. 86-89, 2009.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LIMA, E. A. L. A. Fungos entomopatogênicos: uma alternativa para o controle do carrapato bovino – *Boophilus microplus*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 21, p. 12-15, 2001

AYRES M., AYRES J. R. M.; AYRES, D. L.; SANTOS A. S. Aplicações Estatísticas nas áreas de ciências Biológicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá: Brasília Cnpq. p. 290, 2003.

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

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O. Observação in vitro da ação dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **Parasitologia latinoamericana**, v. 63, p.40-45, 2008.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O.; CARVALHO, L. M.; MELLO, I. N. K.; PAULA, A. T.; LELIS, R. & QUEIROZ, J. H. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterization of its chitinase, **Biocontrol Science and Technology**, 2013.

BRAGA, F. R.; FERREIRA, S. R.; ARAÚJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; CAMPOS, A. K.; FREITAS, L. G. Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (syn. *Neoascaris*) *vitulorum* eggs.

**Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p.309-314, 2010.

BORGES, L. M. F.; SOARES, S. F.; FONSECA, I. N.; CHAVES, V. V.; LOULY, C. C. B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v. 36, 87-95, 2007.

CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**. v. 188, p. 140-147, 2012.

CAMILLO, G.; VOGEL, F. F.; SANGIONI, L. A.; CADORE, G. C.; FERRARI, R. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 39, n. 2, p. 490-495, 2009.

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, p. 225-229, 1988.

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

CASTRO-JANER, E.; RIFRAN, L.; GONZALES, P.; NIELL, C.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; SCHUMAKER, T. T. S. Determination of the susceptibility of (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) (Acari: Ixodidae) to ivermectina and fipronil by Larval Imersion Test (LIT) in Uruguay. **Veterinary Parasitology**. v. 178, p. 148-155, 2011.

COOLEY, R. A. The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus*, and *Haemaphysalis* (Ixodoidea) of the New World. **National Institute of Health Bulletin**, Washington DC, v. 187, p. 1-54, 1946.

Da ROCHA, C. M. B. M.; LEITE, R. C.; BRUHN, A. M. G.; FURLONG, J. Perceptions of milk producers from Divinópolis, Minas Gerais, regarding *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, n. 4, p. 295-302, out-dez 2011.

ESTEVEZ, I.; PEETEIRA, B.; ATKINS S. D.; MAGAN, N.; KERRY, B., Production of extracelular enzymes by diferente isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**. v.113, p. 867-876, 2009.

FERNANDES, F.F.; Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 538 – 543, 2001.

FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIENSE, T. C.,; MORAES, A. M. L.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT V. R. E. P. An intensive

search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, E. K. K; BITTENCOURT V. R. E. P.; ROBETS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**. v. 130, p. 300-305, 2012.

FRAZZON, A. P. G.; JUNIOR, I. S. V.; MASSUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 94, p. 117-125, 2000.

GONZALES, J. C.; Da SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (CAN. 1887) em bovinos estabulados. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS**. Porto Alegre, v. 2, n. 1, p. 25-34, 1974.

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with special reference to their ecology. **Biology Revision**, v. 62, p.245-307, 1987.

GRONVOLD, J., HENRIKSEN, S.A., LARSEN, M., NANSEN, P. & WOLSTRUP, J. Biological control: Aspects of biological control- with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated livestock. **Veterinary Parasitology**. v. 64, p. 47-64, 1996.

HAJEK, A. E.; St. LEGER, R. J. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**. v. 39, p. 293-322, 1994.

HOOGSTRAAL, H., African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan (with Special Reference to Equatoria Province and with Preliminary Reviews of the Genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*. Dept. of the Navy, **Bureau of Medicine and Surgery**, Washington,DC, 1956.

KOCAN, K. M. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic disease of cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 57, p. 121-151, 1995.

LYSEK, H.; KRAJCI, D. Penetration of ovicida fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. **Folia Parasitologica**. v. 34, p. 57-60, 1987.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 1ª Ed. São Paulo: Roca, 2011. 356 p.

MORANDO, A.; GELISNKI, J. M. L. N. Estudo preliminar do desenvolvimento embrionário *in vitro* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Unoesc & Ciência**. v. 1, p. 23-28, 2010.

MORANDO, A.; GELINSKI, J. M. L. N. Estudo preliminar do desenvolvimento embrionário *in vitro* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Unoesc & Ciência - ACBS**, v. 1, n. 1, p. 23-28, jul. 2010. ISSN 2178-3411. Disponível em: <http://editora.unoesc.edu.br/index.php/acbs/article/view/35>. Acesso em: 18 de novembro de 2015.

NORDBRING-HERTZ, B.; TUNLID, A; JANSSON, H. B. Nematophagous fungi. **Encyclopedia of Life Sciences**. Em: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0004293>. Acesso em: 18 de novembro de 2015.

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**. v. 170, n. 3-4, p. 348-354, 2010

PARRA, José Roberto Postali. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 609 p.

RIOS-TOBON, S.; GUTIERREZ-BUILES, L. A.; RIOS-OSORIO, L. A. Assessing bovine babesiosis in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks and 3 to 9-month-old cattle in the middle Magdalena region, Colombia. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**. v. 34, n. 4, p. 313-319, 2014.

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**. v. 130, p. 257-260, 2012.

SANTOS, F. C. C; VOGEL, F. S. F. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente ao amitraz e cipermetrina em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul de 2005 a 2011. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 107, p. 121-124, 2012.

SILVA, A. R.; ARAUJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ALVES, C. D. F.; FRASSY, L. N. In vitro ovicida activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia clamydosporea* on *Trichuris vulpis* eggs. **Veterinary Parasitology**. v. 172, p. 76-79, 2010a.

SILVA, A. R.; Araújo, J. V.; Braga, F. R.; Alves, C. D. F.; Filho, J. D. R. Destruction of *Anoplocephala perfoliata* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporea*. **Journal of Equine Veterinary Science**. V. 30, n. 12, 2010b.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 198 p.

THOMPSON, K. C. A technique to establish a laboratory colony of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**. v. 2, n. 2, p. 223-229, 1976.